

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANII*
IZOLATLARINDA DİRENÇ GENLERİNİN PCR İLE
ARAŞTIRILMASI VE PFGE YÖNTEMİYLE GENOTİP
TAYİNİ**

SİBEL GÖRDEBİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF . DR . Fatih KÖKSAL**

ADANA 2011

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANII*
İZOLATLARINDA DİRENÇ GENLERİNİN PCR İLE
ARAŞTIRILMASI VE PFGE YÖNTEMİYLE GENOTİP
TAYİNİ**

SİBEL GÖRDEBİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF . DR . Fatih KÖKSAL**

**Bu çalışmada TF2010 YL4 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2011

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimine danıştığım, her türlü yardımı benden esirgemeyen, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Fatih Köksal` a ve bölümümüzün tüm öğretim üyelerine,

Çalışmalarımda bana yardımcı olmaktan hiçbir zaman kaçınmayan, başta Dr. Beril Akçimen, Ar.Gör.Tülin Güven, Suna Gökmen, Yük.lis.Mümtaz Güran, Yük.Lis.Onur Uçar, Yük.Lis.Ayşe Karacalı ve Yük.Lis.Sitti Çalık olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma ve bölümümüz personellerine,

Tüm hayatım boyunca desteklerini gördüğüm kardeşlerim; Kübra Gördebil ve Esra Gördebil`e, annem; Sevgi Gördebil`e ve babam; İsmail Gördebil`e

Teşekkürlerimi arz ederim.

Sibel Gördebil

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Hastane Enfeksiyonu	3
2.2. Taksonomi ve Tarihçe	5
2.3. Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler	6
2.4.Patogenez ve Virülans	9
2.5.Epidemiyoloji	9
2.6.Acinetobacter Enfeksiyonlarının Tedavisi	11
2.7. <i>Acinetobacter baumannii</i> enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan Antibiyotikler	12
2.7.1- Anti-psödomonal aktivite ile geniş spektrum gösteren penisilinler	12
2.7.2- Penisilinlerle beta laktamaz inhibitörleri kombinasyonu	12
2.7.3- Sefalosporinler	12
2.7.4- Karbapenemler	13
2.7.5-Aminoglikozidler	13
2.7.6-Tetrasiklinler	14
2.7.7-Sülfonamidler	15
2.8.Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları	15
2.8.1. İlacın hedef bölgesindeki değişiklikler	15
2.8.2. Dış membran geçirgenliğinin bozulması	15
2.8.3 Beta Laktamazlar	16

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
3.1.Tür tayini ve Karbapenem direncinin belirlenmesi	22
3.2.Klonal ilişki tespiti	23
3.2.1. PFGE	24
3.2.1.1.Örneklerin hazırlanması	24
3.2.1.2.Örneklerin agaroz gömülmesi	24
3.2.1.3. Örneklerin agaroz içinde parçalanması	25
3.2.1.4. Lisis işlemlerinden sonra kalıpların yıkanması	25
3.2.1.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi	26
3.2.1.6 - Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi	26
3.2.1.7. Elektroforez	26
3.2.1.8. Sonucun gözlenmesi	27
3.2.1.9. PFGE yönteminde kullanılan solüsyonlar	27
3.2.1.9.1- TE buffer	27
3.2.1.9.2. Hücre Süspansiyon Tamponu(HST)	27
3.2.1.9.3. Lisis-1	28
3.2.1.9.4. Lisis-2	28
3.2.1.9.5. 0,5x TBE	28
3.2.1.9.6. 20mg/ml proteinase K solüsyonu	28
3.2.1.9.7. % 10 sodium dodecyl sulfate solüsyonu	28
3.2.2. PCR	28
3.2.2.1. Oxa genlerinin multipleks PCR ile belirlenmesi	28
3.2.2.1.1- Kültür plaklarından DNA ekstraksiyonu	29
3.2.2.1.2. OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 primerleri ile multiplex PCR amplifikasyonu	30
3.2.2.1.3. Fragmentlerin agaroz gel elektroforezi ile belirlenmesi	30
3.2.2.1.4. Görüntüleme ve Bant Profillerinin Analizi	31
3.2.2.2. ISAbal insersiyon sekansının PCR ile belirlenmesi	31
3.2.2.2.1. ISAbal sekansının amplifikasyonu	31
3.2.2.2.2. Fragmentlerin agaroz gel elektroforezi ile belirlenmesi	32
3.2.2.2.3. Görüntüleme ve bant profillerinin analizi	33

4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
7.KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: OXA 51 ve 58 genlerinin PCR jel görüntüsü	37
Şekil 2: OXA51 ve 24 genlerinin PCR jel görüntüsü	37
Şekil 3: ISAbal1 geni PCR görüntüsü	38
Şekil 4: PFGE jel görüntüsü	38
Şekil 5: PFGE ile elde edilen dendrogram görüntüsü	39

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Acinetobacter cinsinin taksonomisi	5
Tablo 2: Acinetobacter türlerinin üreme özellikleri	8
Tablo 3: Betalaktamazların sınıflandırılması	21
Tablo 4: Örneklerin izole edildiği servisler	23
Tablo 5: Multipleks PCR primerleri	30
Tblo 6: Örneklerin izole edildiği servisler	35
Tablo 7: Örneklerin izole edildiği klinik meteryal	36

KISALTMALAR

BOS:	Beyin omurilik sıvısı
ÇİD:	Çoklu ilaç direnci
HE:	Hastane enfeksiyonu
HST:	Hücre süspansiyon Tamponu
GN:	Gram negatif
MRSA:	Metisilin resistan Stafilococcus aureus
MLEE:	Multilocus enzyme electrophoresis
MLST:	Multilocus sequence typing
MDR:	Multi drug resistan
OMP:	Outer mebrane protein
PBP:	Penisilin Bağlayan Protein
PCR:	Polimeraz polymerase chain reaction
PFGE:	Pulsed field gel electrophoresis
RFLP:	Restriksiyon fragment Length Polimorfizm
SDS-PAGE:	Sodium Dodesil Sülfat poli akrilamid jel elektroforezi
TBE:	Tris- Borik asit EDTA
UPGMA:	Unweighted pair group mathematical averaging
VRE:	Vankomisin resistan Enterecoc

ÖZET

KARBAPENEM DİRENÇLİ ACİNETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA DİRENÇ GENLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI VE PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESİS YÖNTEMİYLE GENOTİP TAYİNİ

Acinetobacter baumannii özellikle yoğun bakım ünitelerinde nozokomiyal enfeksiyonlara ve salgınlara yol açan önemli bir patojendir. Karbapenem grubu antibiyotikler de dahil, çoklu ilaç direnci göstermesi bu patojenle olan enfeksiyonların tedavisinde ciddi problemlere sebep olmaktadır. Karbapenem direnci sıklıkla OXA tipi karbapenemazlar ile oluşmaktadır. OXA tipi enzimler 4 subgrupta (OXA-51, OXA-58, OXA-23, OXA-24) toplanır. *Acinetobacter* izolatlarında OXA-51 sub grubundaki enzimler intrinsik olarak bulunurken, mobil elementler ile horizontal olarak kazanılan genlerle kodlanan OXA-58, OXA-23 ve OXA-24 sub grup enzimlerde beraberinde bulunabilmektedir. Ayrıca *blaOXA-51* geninin upstream bölgesinde yerleşen *ISAbA 1* segmenti de transkripsiyonel bir promotor olarak β -laktamaz gen ekspresyonunu indüklemektedir.

Bu çalışmada hastanemizde hastane enfeksiyonlarından izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında karbapenemaz enzimini kodlayan *blaOXA* genlerinin subgruplarının Multipleks PCR, *ISAbA1* segmentinin tek tüp PCR yöntemi ile araştırılması ve klonal ilişkilerinin PFGE yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

İncelenen 55 izolatın tamamında(%100) OXA 51 ve *ISAbA1* geni tespit edilmiştir. İzolatların 4(%7.27)ünde OXA 58, OXA 51 ve *ISAbA1*, 3(%5.45)ünde OXA24, OXA51 ve *ISAbA1* geni belirlenmişken OXA 23 geni hiç bir izolatta bulunamamıştır. PFGE ile klonal ilişkilerinin incelenmesi sonucu, 55 izolatın 29(%52.72)'unun yakın ilişkili olduğu ve aynı klondan köken aldığı görülmüştür.

Anahtar sözcük: *Acinetobacter baumannii*, *blaOXA21*, *blaOXA23*, *blaOXA51*, *blaOXA58*, PFGE

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF RESISTANCE GENES OF CARBAPENEM RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII ISOLATES WITH POLIMERASE CHAIN REACTION AND GENOTYPING WITH PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS

Acinetobacter is a pathogen which can cause serious nosocomial outbreaks especially in intensive care units. Carbapenemases of OXA are the mostly cause of carbapenem resistance. OXA type enzymes divide into 4 subgroups. (OXA51, OXA24, OXA58, OXA23) OXA 51 subgroup of genes are intrinsic in Acinetobacter strains. Genes gained horizontally with mobile elements which codes the subgroup enzymes like OXA 58, 23 and 24 can be together with OXA 51 gene.

As being a transcriptional promotor ISAbal; which localized at the upstream location of blaOXA 51 gene can induce beta-lactamase gene expression.

In this work we aimed to investigate the subgroups of blaOXA genes with multiplex PCR, ISAbal segment with in-house PCR and clonal relations of isolates with PFGE between carbapenem resistant A.baumannii strains isolated from nosocomial infections in our hospital. OXA-51 and ISAbal genes identified from whole (%100) of the 55 isolates. We identified OXA 58, OXA 51 and ISAbal genes in 4 of the isolates, OXA 24, 51 and ISAbal genes in 3 of isolates but OXA 23 gene had been identified in none of the isolates. As a result of PFGE, 29 of 55 isolates found to be closely related and also thought to be in the same clone.

Key Words: Acinetobacter baumannii, blaOXA21, blaOXA23, blaOXA51, blaOXA58, PFGE

1.GİRİŞ

Doğada saprofit olarak yaşayan *Acinetobacter* cinsi bakteriler, 1970'lerden itibaren hastane kökenli enfeksiyonlardan sorumlu olarak izole edilmelerine rağmen, düşük prevalansları sebebi ile klinik önemleri anlaşılamamış ve uzun yıllar ihmal edilmişlerdir. Ancak son yıllarda hastane enfeksiyonlarında geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın olarak kullanılmasına bağlı olarak, MRSA,VRE ve pseudomonaslar gibi hastane kökenli bakteriler arasında türlerinin yanı sıra, *A.baumannii* suşlarının da, çoklu ilaç direnci gelişmesine yol açmıştır¹. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören ve immun sistemi baskılanmış hastalarda yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara sebep olan ÇİD A.baumani suşlarının PCR, PCR-RFLP, PFGE ve tam genom dizi analiz yöntemleri kullanılarak yapılan klonal düzeydeki tiplendirilmeleri, özellikle de karbepenem dirençli bazı suşların, bütün dünyada hastanelere hakim olmaya başladıklarını göstermiştir. Tedavi başarısızlıkları sebebi ile yüksek oranda hasta kayıplarının yaşandığı karbepenem dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında yeni antibiyotiklerin yaratılması ve suşların hastane içi, hastaneler arası, bölgesel, ülke bazlı ve uluslar arası hareketlerinin takibi büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda daha önce kullanımı sınırlı olan kolistin gibi daha toksik antibiyotikler yüksek oranda direnç gelişimi ile sonlanmıştır. Muhtemelen yeni yaratılacak antibiyotikler de yoğun antibiyotik baskısı sebebi ile *A.baumannii* suşlarında kısa sürede direnç gelişimini provoke edecektir. Özellikle dirençli suşların moleküler epidemiyolojik metodlarla klonal düzeyde sürveyansı ise, yeni ve daha etkinli kontrol tedbirlerinin geliştirilmesine ışık tutacak, mevcut kontrol tedbirlerinin de gözden geçirilerek revize edilmesine sebep olacaktır. Sonuç olarak antibiyotik baskısının yanı sıra *A.baumannii* suşlarının epidemiyolojik özelliklerinin tespiti ve takibine dayalı etkin kontrol politikaları geliştirilecektir. Yapılacak sürveyans çalışmalarında fenotipe dayalı yöntemler yerine klonal düzeyde tanımlama yapabilecek moleküler yöntemlerin kullanılması sonuçların güvenilirliği yönünden son derece önemli olacaktır. Bu amaçla bakterinin housekeepin genlerinin analiz edildiği, MLEE veya MLST gibi yöntemler tam genom dizi analizi, PFGE ve direnç genlerinin tanımlanması

gibi yöntemlerden bir veya bir kaçının kombine olarak kullanılmasının yararlı olacağı gösterilmiştir.

Biz bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinde hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olan karbapenem dirençli *A.baumani* suşlarının epidemiyolojik özelliklerini tespit amacı ile Ocak -Kasım 2009 tarihleri arasında kalan 11 aylık süre içerisinde hastanenin farklı klinik ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen klinik materyallerden izole edilen karbapenem dirençli *A.baumannii* suşlarının klonal ilişkileri ile direnç genleri dağılımını pulsed-field gel elektroforezi ve *bla_{OXA}* gen polimorfizmi yöntemlerini kullanarak tespit etmeyi amaçladık. Bu çalışmadan elde edilecek veriler, önümüzdeki dönemde devam ettirilecek çalışmalarla, gerek Ç.Ü Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi, gerekse bölge hastanelerinden izole edilecek *A.baumannii* suşları ile ilgili elde edilecek verilerle kıyaslanarak, progressiv epidemiyolojik çalışmalara ve kontrol politikalarının geliştirilmesine ışık tutacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

Acinetobakter türleri hastane infeksiyonlarının % 3-20'sinden sorumludur. Hastane enfeksiyonları ile ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalar *A.baumannii-calcoaceticus* kompleksi türlerin tüm klinik *Acinetobacter* izolatlarının % 80'ini oluşturduğunu göstermiştir. *A.baumannii* dışı türler daha çok gıdalardan izole edilirken, aminopenisilinler, üreidopenisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefamisinler, aminoglikozidler, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi hastanelerde yoğun olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğuna karşı direnç gösteren ve yeni antibiyotiklere karşı da hızla direnç geliştirebilme potansiyeline sahip olan *A.baumannii* suşları, özellikle yoğun bakım ünitelerinde, pnömoni, ventilatörle ilişkili pnömoni, üriner infeksiyon, kateter infeksiyonları, kan dolaşım yolu infeksiyonları ve menenjitlerde yol açtıkları tedavi başarısızlıkları ile yüksek mortalitenin sebebidir^{2,3,4,5}.

2.1 Hastane Enfeksiyonu

Semmelweis 1847'de puerperal sepsisten bir etkenin sorumlu olabileceği ve el yıkama ile sepsisin azaldığını belirlemesi ve daha sonra Pasteur'un 1862'de bunu destekleyen teoriler ortaya atması ile mikrobiyal ajanların hastanelerde, hastalar arasında, kros kontaminasyonla yüksek morbidite hızına sahip enfeksiyonlar oluşturduğu fikri benimsenmiştir. Daha sonra Lister'in (1867) cerrah ellerinin ve tıbbi enstrümanların fenolik sprey kullanarak dezenfeksiyonunun, cerrahi operasyonlarda mikroorganizmaların bulaş riskini düşürüleceğini göstermesi tarihte hastane enfeksiyonlarının kontrolüne yönelik atılan ilk adımları oluşturmuştur. Ancak Florence Nightingale'in hastane hijyeni kavramını bir hastane politikası olarak yerleştirmesi, enfeksiyon kontrol çalışmaları için yeni bir dönemin başlangıcı olarak kabul edilmiştir⁶. Enfeksiyon hastalıklarının kontrolüne yönelik en önemli kilometre taşı antibiyotiklerin keşfidir. A. Fleming'in 1928'de Penisilin'in keşfi ile başlayan antibiyotik çağı, G. Domagk'ın (1932) sülfonamid grubundan prontosilini, S.A.Waksman'ın 1943'de streptomisini bulması ve Tetrasiklin ve Kloromfenikol'ün 1940'lı yıllarda kullanıma girmesi ile çok kısa sürede bir çok antibiyotiğin modern tıbbın kullanımına girmesi

sürmüştür^{7,8}. Ancak ilk kullanıma girdikleri yıllarda bile bu antibiyotiklerden çoğuna karşı bazı bakteriler arasında direncin görülmesi antibiyotiklerden uzun süreli faydalanmanın mümkün olamayacağına işaret olarak kabul edilmiştir. Mesela bazı stafilokok türleri arasında 1942 yılında penisilin 1961 yılında metisilin direncinin % 1 olduğu kaydedilmiştir. Bu ilk dirençli sporadik bakteriler yoğun antibiyotik baskısı ile yaygın ve çoklu ilaç dirençli hale gelmiş, özellikle modern cerrahi girişimlerin uygulandığı, immunsistemi baskılanmış hasta kabul eden büyük hastanelerde yüksek mortalite ile seyreden hastane enfeksiyonlarının görülmesine yol açmıştır.

Hastane enfeksiyonu veya nozokomiyal enfeksiyonlar hastaneye yatıştan 72 saat sonra ve taburcu olduktan sonraki bir aylık dönemde ortaya çıkan enfeksiyonlardır⁹. Tıp alanındaki teknolojik gelişimlere bağlı olarak tanı ve tedavi amaçlı invaziv işlemlerdeki artış, kateter ve sonda uygulamaları, uygunsuz antibiyotik kullanımı, bağışıklık sisteminin zayıfladığı durumlar HE riskini arttırmaktadırlar^{10,11}. Hastane enfeksiyonları mortalite ve morbidite oranlarını, hastanede kalış süresini ve tedavi maliyetini önemli oranda arttırdığı için, önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir^{12,13}.

HE oranları günümüzde verilen hizmet kalitesinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir¹⁴. Hastane enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar antibiyotik ve tıbbi uygulamalardaki değişikliklere bağlı olarak zaman içinde farklılıklar göstermektedir. Günümüzde uygunsuz ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ile invazif girişimlerin artması sonucu, *P. aeruginosa*, metisiline dirençli *S. aureus*, koagulaz negatif stafilokoklar, Enterobakter türleri, *E. coli*, *K. pneumoniae*, Proteus türleri, enterokoklar, kandida ve Asinetobakter türlerinde anlamlı artış görülmektedir¹⁵.

Asinetobakter türleri, deri ve mukoza kolonizasyonları sonrasında yüksek morbidite ve mortaliteye neden olarak HE içinde ayrı bir önem kazanmaktadır. Bu bakterilerin hastane ortamında kullanılan ekipmanlarda uzun süre canlılığını koruması *A. baumannii* ile gelişen enfeksiyonlarda artışa neden olmaktadır. *A.baumannii* hastanede salgınlara neden olan, kan dolaşımı ve solunum sistemi enfeksiyonlarına yol açan önemli bir patojendir¹⁶.

2.2. Taksonomi ve Tarihçe

Günümüzde Asinetobakter cinsinin üyeleri olarak tanımlanan bakteriler birçok taksonomik değişikliğe uğramıştır. İlk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından topraktan izole edilen ve *M. calcoaceticus* olarak isimlendirilen bu bakteri günümüze kadar en az 15 farklı isimle anılmıştır. Bunlardan en iyi bilinenleri *B. anitratum*, *Herellea Vaginicola/Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, *B5W*, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii*'dir. Taksonomik çalışmalar sonucu *Acinetobacter* cinsi günümüzde *Moraxellacea* ailesi içinde yer almaktadır^{17,18}(Tablo1).

Tablo 1: Acinetobacter cinsinin taksonomisi

Alem:	Bacteria
Şube:	Proteobacteria
Sınıf:	Gamma Proteobacteria
Takım:	Pseudomonadales
Familya:	Moraxellaceae
Cins:	<i>Acinetobacter</i>

DNA benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda, en son 32 genomik tür tanımlanmıştır. Yedi genomik türe özel isimler verilirken diğer genomik türler isimlendirilmemiştir. İsimlendirilen türler; *A.baumannii*, *A.calcoaceticus*, *A.haemolyticus*, *A. Junii*, *A. johnsoni*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*.

Grup 1, 2, 3 ve 13TU olağan dışı bir benzerlik göstermekte ve genellikle *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi adı altında incelenmektedir. Son yayınlanan kitaplarda ise sakkarolitik ve asakkarolitik olarak iki farklı grupta yer alan asinetobakter türlerinden söz edilmektedir^{19,20}.

I-Sakkarolitik Asinetobakter Türleri:

A. Hemolitik:

1. *A. alcaligenes*

2. *A. anitratus*
3. *A. Haemolyticus*

B. Non-hemolitik:

1. *A. baumannii*
2. *A. calcoaceticus*
3. *A. anitratus*
4. *A. calcoaceticus subsp. Anitratus*

II-Asakkarolitik Asinetobakter Türleri:

Non-hemolitik:

1. *A. calcoaceticus subsp. lwoffii*
2. *A. johnsonii*
3. *A. junii*
4. *A. lwoffii*

2.3. Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler

Asinetobakter cinsi bakteriler; 35-37°C'de üreyebilen, nonfermentatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, indol negatif, hareketsiz, nitratları redükte etmeyen, aerop üreyen gram negatif mikroorganizmalardır²¹. Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar^{22,23,24,25}. Gram negatif kokobasil, diplokok şeklinde görülebilirler. Üremenin logaritmik fazında 1-1,5 x 1,5-1,5 µm boyutlarında basil, üreme dışında ise kok şeklinde, daha çok kokobasil, ikişerli, küme halinde veya kısa basil olarak görüldüğünden Gram boyalı preparatların incelenmesinde *Haemophilus* ve *Neisseria* türleri ile karıştırılabilir^{26,27}.

MacConkey agar besiyerinde enterobakterilerden daha küçük, opak, pigmentsiz, S tipi koloniler oluştururlar. Klinik örneklerden üretilebilmeleri için seçici-ayırıcı besiyerleri geliştirilmiş olup bu amaçla en sık Herellea agar (Difco) ve Leeds Acinetobacter Medium kullanılmaktadır. Kontamine örneklerden (dışkı, toprak) izole etmek amaçlı içinde asetat ve amonyum tuzu bulunan sıvı mineral besiyeri kullanılabilir^{27,28}.

Rutin laboratuvar koşullarında biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre Asinetobakter tür ayrımı yapılmaktadır. Glukozu oksitleyen ve

hemoliz yapmayan izolatlar genellikle *A.baumannii*'dir. *A. baumannii* 44°C'de üreyebilme yeteneğiyle de diğerlerinden kolayca ayırt edilebilir. Glukozu oksitleyemeyen, hemoliz yapmayan *A. lwoffii*, hemoliz yapan *A.haemolyticus* olarak adlandırılır. *A. johnsonii* diğer türlerden 37°C'de üreyememesi nedeni ile ayırt edilebilir²⁹.

Geleneksel biyokimyasal metotlar türler arasında ayırım yapmak için yeterli olmamaktadır. Bu amaçla birçok karbon kaynağının asimilasyonu temeline dayanan hazır ticari kitler kullanılmaktadır. Ticari sistemlerden; API 20 NE (bioMerieux, Fransa) 5, Biolog GN2 Microplate (Biolog, Hayward ABD) 15 tür identifiye edebilmektedir. Bu kitlerin en büyük dezavantajı bazı türlerin tablolarda yer almaması nedeniyle tüm türleri tanımlayamamasıdır²¹.

Salgını tanımlamak ve kaynağı ortaya çıkarmak için çok çeşitli tiplene yöntemleri kullanılmıştır. Serolojik reaksiyonlar, bakteriyofaj, bakteriyosin, protein profiller, antibiyotik duyarlılık paternleri, "multilocus" enzim elektroforez, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), "pulsed-field gel" elektroforez (PFGE) ve ribotiplendirme bu amaçla kullanılabilse de en uygun ve ideal metot bilinmemektedir.

Tablo 2: Acinetobacter türlerinin üreme özellikleri

TEST	1- <i>A. calcoaceticus</i>	2- <i>A. baumannii</i>	3- <i>A. haemolyticus</i>	4- <i>A. junii</i>	5- <i>A. johnsonii</i>	6- <i>A. lwoffii</i>	7- <i>A. radioresistens</i>
Üreyebildiği ısı							
44 °C'de	-	+	-	-	-	-	-
41 °C'de	-	+	-	+	-	-	-
37 °C'de	+	+	+	+	-	+	+
Glukozdan asit	+	+	D	-	-	D	D
Jelatin hidrolizi	-	-	+	-	-	-	-
Karbonhidrat kullanımı							
dl-Laktat	+	+	-	+	+	+	+
dl-4-aminobutirat	+	+	+	D	D	D	+
Trans-akonitat	+	+	D	-	-	-	-
Sitrat	+	+	+	D	+	-	-
Glutarat	+	+	-	-	-	-	+
Aspartat	+	+	D	D	D	-	-
Azelat	+	+	-	-	-	+	+
B-Alanin	+	+	-	-	-	-	-
I-Histidin	+	+	+	+	-	-	-
d-malat	-	+	+	+	D	D	-
Malonat	+	+	-	-	D	-	+
Histidin	-	-	-	-	-	-	-
I-Fenilalanin	+	D	-	-	-	-	+
Fenilasetat	+	D	-	-	-	+	+

2.4.Patogenez ve Virülans

Asinetobakter cinsi bakterilerin virülans potansiyelleri düşük olduğundan konak savunma mekanizması normal olanlarda enfeksiyon oluşturma riski düşüktür ve genellikle fırsatçı hastane enfeksiyonlarına neden olurlar³¹. Hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritin insan için endotoksijenik potansiyeli tam bilinmemektedir. Kapsül içermesi, bakteriosin üretimi, kuru ortamda uzun süre yaşaması gibi özellikler Asinetobakterlerin yaşam süresini artıran önemli faktörlerdir^{21,31}. Potansiyel virülansın sorumlu olan faktörler şunlardır:

i) Polisakkarit kapsül: L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşur. Bakteri yüzeyinin hidrofilik özelliğini sağlar ve fagositozdan korur ve selektif kompleman eksikliği olan bireylerde enfeksiyona yatkınlık yaratabilir. Damar içi kateter, trakeal kanül gibi yüzeylere tutunmayı kolaylaştırır

ii) Fimbria ve/veya kapsüler polisakkarit: İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar.

iii) Lipopolisakkarit ve Lipid A: Dokulardaki lipidleri yıkan enzimler üretirler, hücre duvarında bulunan lipid A potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırır.

iv) Aerobaktin gibi siderofor ve demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda antibiyotik direnci sağlayan PER-1 geninin virülansı arttırdığı ve klinik olarak mortalitesi daha yüksek enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir^{21,23,33,34}.

2.5.Epidemiyoloji

Asinetobakter dünya çapında salgınlara neden olmaktadır fırsatçı patojendir özellikle solunum yolu ve yaralarda kolonize olmaktadır. *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kapı kolu, klavye, hasta çarşafı, ventilatör aleti gibi ekipmanlar salgının yayılmasına sebep olurlar³⁵. Asinetobakter cinsi bakteriler, yaşamlarını sürdürebilmek için gereksinimlerinin az olması ve çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilme avantajı nedeniyle doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler.

Asinetobakterler diğer mikroorganizmalara kıyasla, kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH ortamlarında canlı kalabilmeleri nedeniyle, cansız yüzeylerde günlerce canlı kalabilmektedirler³⁶. Pastörize sütlerden, donmuş yiyeceklerden, dökümhane ve

hastane havasından, camdan, musluklardan, peritoneal diyaliz maddelerinden, anjiyografi kateterinden, ventilatörlerden, laringoskoplardan, kontamine eldivenlerden, pamuktan, formikadan, kullanılmış enjektörlerden, hasta yastıklarından, kuru filtrelerden izole edilmiş ve buralarda günlerce canlı kalabildiği gösterilmiştir^{38,23,31}.

Özellikle koltuk altı, kasık gibi nemli bölgeler başta olmak üzere derinin normal florasında yer alabilmekte ve sağlıklı bireylerin yaklaşık % 25'inin derilerinde *Asinetobakter* türlerini taşıdığı düşünülmektedir³⁹. Faringeal kolonizasyon %7 oranında görülmektedir. Deri dışında ağız boşluğu ve solunum yollarında taşıyıcılık söz konusu olmaktadır. Hastaneye yatmayan bireylerde ise bu durum son derece nadir görülmektedir. Hastanede yatan hastalarda ise özellikle salgın dönemlerinde taşıyıcılık hızı yüksek olup %7-18 boğaz taşıyıcılığı görülmektedir⁴⁰. Yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hasta dışkılarında çoklu ilaca dirençli *Asinetobakter* türleri izole edilmiş ve trakeostomili hastaların % 45'inde kolonizasyon belirtilmiştir^{22,26}. Bir çalışmada en sık kolonizasyon bölgesi eller (%26), kasık bölgesi (%25), ayak parmak arası (%24), alın (%23) ve dış kulak yolu (%21) olarak tespit edilmiştir⁴¹.

Çevresel ortamlar dikkate alındığında, *Asinetobakter* türleri hastane havası, buhar makinesi, musluk, periton diyalizat banyoları, yataklar, tansiyon aletleri, anjiyografi kateteri ve ekipmanı, solunum tedavisi solüsyonları ve mekanik ventilasyon cihazından izole edilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde özellikle ventilasyon uygulanan hastalarda, solunum sisteminde taşıyıcılığın yüksek oranda arttığı ve salgınlara yol açtığı gösterilmiştir. Ülkemizde yoğun bakım ünitelerinde yapılan çok merkezli bir çalışmada *Asinetobakter* cinsi bakteriler gram negatif bakteriler arasında üçüncü sırada (%18.2) olduğu belirlenmiş ve antibiyotik direncinin arttığı belirtilmiştir⁴². *Asinetobakter* türleri kuru ortamlarda 21-30 gün canlılığını korumaktadır. Özellikle mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda salgınlar gözlenmesi, solunum yollarında yüksek taşıyıcılığa sebep olmaktadır.

Deri taşıyıcılığı oranlarının yüksek olması hasta bakımı sırasında sağlık personelinin kontamine olmasına ve etkenin sürekli yayılmasına neden olmaktadır⁴³. Son yirmi yılda *Asinetobakter* enfeksiyonları ılıman iklimlerde giderek yaygınlaşan ortak bir nozokomiyal sorun haline gelmiştir⁴⁴.

2.6.Acinetobacter Enfeksiyonlarının Tedavisi

Antibiyotiğe duyarlı Asinetobakter türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar, genelde geniş spektrumlu sefalosporinler, beta-laktam-beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları ile aminoglikozitle kombinasyon halinde kullanılan karbapenemlerle tedavi edilmektedir⁴⁴. Tedavi süresi, çoğunlukla enfeksiyon bölgesine bağlıdır⁴⁴.

Çoklu ilaca dirençli izolatların neden olduğu enfeksiyonlar için antibiyotik seçenekleri oldukça sınırlı olabilmekle birlikte, karbapenemler, sulbaktam ve kolistin en etkili antibiyotikler olarak görülmektedir^{45,46,47}. Sefoperazon sulbaktam, sulbaktam bunlara alternatif olarak kullanılmaktadır^{48,49}. En etkin in vitro ajan polimiksinler; polimiksin B ve polimiksin E dir^{50,51}. Polimiksinlerin nefrotoksisite ve nörotoksisiteye sebep olduğu bilindiğinden 1960 ve 1970 yıllarda kullanımı bırakılmıştır. Son yıllarda çoklu ilaca dirençli gram negatif basillerin artması sonucu polimiksin kullanımına tekrar başlanılmıştır⁵².

A.baumannii son yıllarda hastane enfeksiyonlarında ve özellikle ventilatör ilişkili pnömonide sık karşılaşılan etkenlerden biri olan *A.baumannii* pnömonilerinde mortalite oldukça yüksektir^{54,45}. Çoğul ilaca dirençli *A.baumannii*'nin neden olduğu ventilatör ilişkili pnömonide ampisilin-sulbaktam ile aminoglikozid kombinasyonu veya tek başına kolitsin tedavisi in vitro duyarlılık sonuçlarına göre önerilen tedavi seçeneklerindedir^{55,45}.

İn vitro çalışmalar, çoklu ilaca dirençli Asinetobakter'e karşı polimiksinlerin imipenem, rifampin veya azitromisin ile birlikte kullanılması sırasında sinerjik etkiler oluştuğunu ortaya koymuştur. Motaouakkil ve arkadaşları, kolitsin ve rifampin kombinasyonu ile birlikte, ventilatörle ilişkili 16 pnömoniyi veya kan dolaşımı enfeksiyonlarını başarılı şekilde tedavi ettiklerini yayınlamışlardır⁵⁶.

Asinetobakter enfeksiyonlarında En sık kullanılan kombinasyon, düşük direnç oranları ve in vitro sinerji göstermesinden dolayı imipenem ile amikasindir. Karbapenemlere orta düzeyde direnci olan *A.baumannii*'ye karşı in vitro çalışmalarda rifampisin ile kolistin kombinasyonu sinerjik bulunmuştur^{57,58,59}. Karbapeneme dirençli Asinetobakter enfeksiyonları için imipenem ile rifampinin klinik kullanımı başarılı bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda yeni kullanıma giren tigesiklinin geniş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan gram negatif bakterilere ve çoklu ilaca dirençli Asinetobakter cinsi

bakterilere in vitro etkinliğinin oldukça iyi olduğu gösterilmiřtir⁶⁰. Bununla birlikte yakın zamanda tigesikline karşı direnç geliştiği bildirilmiřtir⁶¹.

2.7. *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler

Beta laktam antibiyotikler: Bu grup antibiyotikler ortak beta laktam halkası ile antibakteriyel etkilerini gösterirler. Başlıca beta laktam antibiyotikler: Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlardır. Bakteri huce duvarının sentezini bozarak bakterisidal bir etki oluştururlar. En önemli etkileri bakteri duvarında peptidoglikan komponentlerin birleşmesini sağlayan transpeptidasyon olayının aktivatör enzimi transpeptidazın aktivitesini bloke etmesidir⁶².

2.7.1- Anti-psodomonal aktivite ile geniş spektrum gösteren penisilinler

Karboksi ve ureidopenisilin yapısındaki bu antibiyotiklerin gram negatif basiller üzerine etkinliği aminopenisilinlerden daha fazladır. Tikarsilin ile karbenisilinin etkisi benzerdir, fakat tikarsilinin etkin dozu daha duşuktur. Piperasilin ve azlosilin psodomonaslar ile gram negatif anaeroblara karşı yüksek aktivite gosterirler⁶².

2.7.2- Penisilinlerle beta laktamaz inhibitörleri kombinasyonu

Beta laktamazlara duyarlı beta laktamların hidrolizini engellemek için oneriilmektedir. Klavulanik asit ile amoksisilin ve tikarsilin kombinasyonları ile ampisilin/sulbaktam kombinasyonu bulunmaktadır. Sulbaktam yarı sentetik beta laktamaz inhibitorüdür⁶².

2.7.3- Sefalosporinler

Cephalosporium turu mantarlardan elde edilen üç aktif fermentasyon urunun biri olan sefalosporin-C türevi ilaçlardır. Birinci kuşak sefalosporinler gram pozitif koklara çok etkilidirler. İkinci kuşak sefalosporinler gram negatif bakterilere, özellikle proteus ve enterobakter üzerine biraz daha fazla etkilidirler. nc kuşak sefalosporinler enterobakterilere ikinci kuşaktan daha fazla etkilidirler. Organizmaya dağılımları birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlerden iyidir⁶².

2.7.4- Karbapenemler

İmipenem ve meropenem günümüzde kullanımda olan iki karbapenem derivativesidir. Karbapenemler kimyasal olarak sentetik ya da yarı sentetik beta laktam türevi antibiyotiklerdir. Penisilinlerden farklı olarak, C1 atomuna bir kükürt atomu buna da bir tiazolidin halkası bağlanmıştır. C2 ve C3 atomlarında doymamış bağlar vardır. 6-Transhidroksimetil grubunun varlığı birçok beta laktamaz türüne karşı molekülün direncini sağlar. Karbapenemler, başta PBP2 olmak üzere PBP1A, PBP1B, PBP3, PBP4 ve PBP5'e bağlanarak hücre duvar sentezini engellerler⁶³. İmipenem, bir beta laktam halkası içerir, penisilin ve sefalosporinlerden farklı olarak α -halkasındaki sülfür atomunda metilen vardır. Bu yapı bakteri hücreesindeki hedef proteinlere bağlanmasını artırır. Bunun sonucunda etki spektrumu genişler ve antibakteriyel gücü artar. Molekül ağırlığı düşüktür, bakteri hücre membranından girişi kolay olur. Beta laktam halkasında bulunan hidroksimetil yan zinciri beta laktamazlara dayanıklılığı sağlar. Penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise molekülün *P. aeruginosa*'ya etkinliğini sağlamaktadır. Meropenem, gram negatif mikroorganizmalara karşı imipenemden daha etkilidir⁶³. Karbapenemler tüm antibiyotikler içerisinde en geniş spektrumlu gruptur. Gram negatif çomaklar ve koklar, gram pozitif koklar ve anaeroplara üzerine etkilidirler. Diğer beta laktam antibiyotiklerde post-antibiyotik etki sadece gram pozitif bakterilerde görülürken, imipenemin hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler için post-antibiyotik etkisi tespit edilmiştir. Bu farkın nedeni, imipenemin PBP2'ye de bağlanarak bakterilerde sferoblast formasyonu oluşturmasıdır⁶³.

2.7.5-Aminoglikozidler

Aminoglikozidler, *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi mantarlardan elde edilen doğal ya da yarı sentetik bakterisidal etkili antibiyotiklerdir. Etkilerini, RNA'daki kodonların okunmasını azaltarak ve tRNA antikodonlarındaki bilginin ribozomlarda yanlış okunması ile proteinlerin yanlış kodlanmasına yol açarak gösterirler. Bunun sonucunda bakteri protein sentezi sonlanır. Bu etkinin gerçekleşebilmesi için streptomisin ribozomal 30 S alt birimine bağlanırken diğer aminoglikozidler 30 S ribozom üzerinde birçok bölgeye ve aynı zamanda ribozomun 50S alt ünitesine de bağlanırlar. Aminoglikozidler, bakterilerin dış membranlarındaki porin kanallarından periplazmik aralığa difüzyonla girer, ancak bakteri sitoplazmik membranını

geçebilmeleri enerji ve oksijene bağımlı aktif transport mekanizması ile olmaktadır. Bu işlem Energy-Dependent Phase 1 (EDP 1) ve Energy-Dependent Phase 2 (EDP 2) olmak üzere iki fazda gerçekleşir. Diğer protein sentezini inhibe eden antibiyotikler bakteriyostatik etki gösterir gösterirken, aminoglikozidlerin bakterisidal etki göstermesinin transport esnasında hücre membranında delikler oluşmasına ve sonuçta hücre duvar geçirgenliğinin bozulmasına bağlı olduğu düşünülmektedir⁶⁴.

2.7.5-Kinolonlar: Kinolonlar, konsantrasyona bağımlı bakterisidal etkiye sahip antibiyotiklerdir. Bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan iki topoizomeraz (DNA giraz ve topoizomeraz IV) ile etkileşime girerek DNA sentezini durdurmaktadırlar.

DNA giraz, iki GyrA ve iki GyrB alt birimlerinden oluşan tetramerik bir enzim olup *gyrA* ve *gyrB* genlerinden kodlanır. Topoizomeraz IV de, ParC ve ParE alt birimlerinden oluşmaktadır. Florokinolonların gram pozitif ve gram negatif bakterilerdeki enzim hedefleri farklıdır.

Gram negatif bakterilerde birincil hedef DNA giraz, gram pozitif bakterilerde ise topoizomeraz IV'tür⁶⁵.

2.7.6-Tetrasiklinler

Tetrasiklinler naftasenkarboksamid türevi bileşiklerdir. Yapılarında dört halka içerdiklerinden tetrasiklin adını almışlardır. Hepsinde karboksamid ortak yapısı vardır. R, R₁, R₂ ve R₃ pozisyonuna farklı kökenlerin gelmesiyle birbirlerinden ayrılırlar. Bakteriyostatik etkili maddelerdir. Bakteriyostatik etkisi bakteri hücresinde ribozomların 30 S alt ünitelerine reverzibl bir şekilde bağlanarak, protein sentezi inhibisyonuyla meydana gelmektedir. Bu bağlanma sonucu, tRNA-aminoasit kompleksinin ribozom-mRna kompleksiyle birleşmesi engellenir. Böylece protein sentezinde peptid zincirine yeni aminoasitlerin eklenmesi önlenmektedir. Minosiklin vestibüler sistemi bozarak sarhoşluk benzeri bir duygu oluşturabilmektedir. Gebe kadınlarda karaciğer üzerine olumsuz etkisi daha fazla olduğundan kontrendikedir. Doksisisiklin nefrotoksisitesinin düşük olması ve dokulara kolay dağılması nedeniyle böbrek yetmezliği olanlarda ve prostatitte kullanılmaktadır. Minosiklin ve doksisisiklin yağda çözünür bileşikler olduğundan kan beyin engelini kolayca geçebilirler, fakat yan etkileri nedeniyle menenjit tedavisinde ilk tercih ilaç olarak kullanılamamaktadırlar⁶².

2.7.7-Sülfonamidler

Sülfonamidler dihidropteroat enzimini inhibe ederek folik asit, dolayısıyla folinik asit sentez reaksiyonunu inhibe ederler. Sülfonamidlerin yapısı para aminobenzoik asit (PABA) yapısına benzediğinden, bakterilerin büyümesinde gerekli olan ve dışarıdan sağlanan bu madde ile sülfonamidler yalancı substrat gibi etkileşerek yarışmaya girmektedir. Bakterilerden farklı olarak insan hücrelerinde, besinlerle alınan folik asit hücre içine geçebildiğinden sülfonamidler etkili olamamaktadır⁶².

2.8. Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları

β -laktam antibiyotiklere karşı başlıca 3 yolla direnç gelişir: Bakteri hücre duvarındaki temel peptidoglikan yapı, kovalent bağlarla bağlı, bakteriyi ağ şeklinde kavrayan, sağlam, bakterinin yapısını ve bütünlüğünü sağlayan büyük bir heteropolimerdir. β -laktam antibiyotikler ise transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe edip, bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki ederler. Hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelmektedir^{66,67}. β -laktam antibiyotiklerin etki gösterebilmeleri için penisilin bağlayan proteinlere (PBP) etkin konsantrasyonda bağlanması gereklidir. Bakteriler, bu basamakların her birinde bir engel oluşturarak direnç geliştirebilirler. Bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç 3 yolla gelişebilmektedir:

2.8.1. İlacın hedef bölgesindeki değişiklikler:

β -laktam antibiyotiklerin hedef bölgesi olan PBP'lerdeki değişiklikler; kromozomal mutasyonlar sonucu PBP'nin beta-laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması, PBP sayısında azalma olması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir^{68,69}. Gram pozitif bakterilerde daha fazla görülmektedir.

2.8.2. Dış membran geçirgenliğinin bozulması

Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotikler, dış membrandaki 'outer mebrane protein'(OMP) adı verilen porlar yolu ile hücre içine girmektedir. β -laktam antibiyotikler dış membrandan porin F ve porin C adı verilen başlıca 2 kanal aracılığı ile geçerler. İmipenem dış membrandan ayrıca D2 proteini adı verilen özel bir porini

kullanarak da geçer. Dolayısıyla bir GN bakteri porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak tüm beta-laktamlara direnç geliştirebilirken, imipeneme duyarlı kalır. Öte yandan, özellikle *P.aeruginosa* ve *Enterobacter* suşlarında dış membrandan D2 proteinin kaybolması bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir^{70,71}.

2.8.3 Beta Laktamazlar

İnsanlarla mikroorganizmalar arasındaki savaşta bakterilerin silahlarından biri geliştirdikleri direnç mekanizmalarıdır. β -laktamazlar (BL), β -laktam antibiyotiklerin β -laktam halkasındaki amid bağlarını parçalayarak antibakteriyel etkisini ortadan kaldıran enzimlerdir⁷². Bugüne kadar en az 350 ye yakın β -laktamaz enzimi tanımlanmıştır. β -laktamazlar biyokimyasal özellikleri substrat profilleri moleküler yapılarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır.

Bunlar arasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırılmaları kullanılmaktadır. 1980'de Ambler β -laktamazlar moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmıştır:

Sınıf A, Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlardır.

Sınıf B, Aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallobeta-laktamazlardır.

Sınıf C, Kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan öncelikle sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir.

Sınıf D, Oksasilini hidroliz eden serin β -laktamazlardan oluşur.

Bugün için en geçerli kabul edilen beta laktamaz sınıflandırması 1995 yılında Bush, Jacoby ve Mederios tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre b-laktamazları 4 gruba ayırmışlardır⁷³.

Grup 1: Bunların birçoğu kromozomal enzimlerdir ve indüklenebilme özelliğine sahiptirler. Moleküler sınıflamada sınıf C'de yer alırlar. Kromozomal AmpC enzimleri, ayrıca plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 β -laktamazları da bu grupta yer almaktadır. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz ederler. Klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler, buna karşın aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Karbapeneme karşı da duyarlıdırlar. Grup 1 enzimlerini

kodlayan genler plazmidlerde de görülebilmekte ve Enterobacteriaceae arasında transmisyon yoluyla aktarılabilmektedir.

Salmonella dışında hemen tüm GN bakterilerde kromozomal grup 1 β -laktamazlar bulunur. Ancak sentez miktarı açısından farklılıklar göstererek yüksek veya düşük düzeyde üretilebilir. *E.coli*, *P.mirabilis* ve *Shigella spp.*'de ampisilin ve dar spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç oluşturmayacak kadar düşük düzeyde sentezlenen yapısal enzimler vardır. Buna karşın *E.coli* izolatlarının %2'sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir. *Enterobacter spp.*, *P.aeruginosa*, *C.freundii*, *Serratia spp.*, *Morgenella morganii*, *Providencia stuartii* ve *Providencia rettgeri*'deki sentezlenen kromozomal beta-laktamazlar indüklenebilen türdendir^{74,75}. Normalde bakteri tarafından bu enzimler bir baskılayıcı mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir penisilin ya da sefalosporin eklendiğinde enzim sentezinde birkaç yüz kat artış olabilmektedir⁷⁴. Farklı β -laktam antibiyotikler değişik oranlarda olmak üzere Grup 1 beta-laktamazları indükleyebilirler. Ancak, indükleyici β -laktamın ortadan kalkmasıyla bakteri tekrar eski bazal beta-laktamaz sentezine geri döner. Bu yüzden bu mekanizma ile klinikte kalıcı bir direnç söz konusu olmaz. Esas sorun bu enzimleri doğal olarak fazla miktarda sentezleyen mutant suşlar nedeniyle oluşur. İndüklenebilir kromozomal β -laktamaz taşıyan bu GN bakterilerde normalde 10^{-5} - 10^{-7} arasında bir sıklıkla baskılanmış mutantlar bulunur. Bu baskılanmış mutantlarda beta-laktamaz enzimlerinin sentezi devamlı ve yüksek düzeyde olmaktadır. Böyle bakterilerle oluşan infeksiyonların bir indükleyici antibiyotik ile tedavisi sırasında duyarlı bakterilerin ortadan kalkması, antibiyotik etkisine dirençli doğal mutantların

ortam da çoğalması ile tedavi başarısızlıkları olabilmektedir. Bunun yanı sıra dirençli bakterilerin hastane mikroflorasına yerleşmesine bağlı olarak da hastane infeksiyonu epidemileri ortaya çıkabilmektedir^{74,75}.

Grup 2: En geniş kategoriye oluşturan bu grup substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Tümü moleküller sınıfı olarak A ve D'de yer almaktadır. Bu β -laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar⁷⁶. 2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık tanımlanmış edilen

türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar^{77,74,75}.

2a: Bu alt grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır.

S. aureus'un enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *B.cereus*'un kromozomal beta-laktamazları, *citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler de bu gruptadır⁷³.

2b: Hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β -laktamaz inhibitörlerine duyarlı β -laktamazları içerirler⁷⁴.

Plazmid kontrolündeki "geniş spektrumlu" TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. Bu enzimlere ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi β -laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu denilmiştir. TEM-1, TEM- 2 ve SHV-1 β -laktamazları Enterobacteriaceae ailesinde yaygın olarak bulunur. Ayrıca OHİO-1 ve *H.influenzae*'da saptanan ROB-1 enzimini de içermektedir. TEM-1 betalaktamazı özellikle *E.coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenidir. Ayrıca TEM-1 enzimi, diğer Enterobacteriaceae üyelerinde olduğu gibi *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunur. SHV-1 özellikle *K.pneumoniae* suşlarında bulunur^{77,78}.

2be: Oksiimino β -laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM- ve SHV- enzimleri gelişmiştir⁷⁷.

Bunlar grup 2be'de yer almakta ve genişlemiş-spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) olarak adlandırılmaktadır. Sefoksitin, sefotetan ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. Özellikle *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Türkiye'den izole edilen bakteriyel suşlarda saptanmıştır^{79,80}.

2br: Klavulanik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu β -laktamazlar bu gruba alınmıştır. TEM-30 dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi bu gruptadır.

2c: Bu grup içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, *Aeromonas hydrophilia*'nın ER-1enzimi, *M.catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *V.cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır.

2d: Bu grup Carbapenem Hydrolysing Class D β - Lactamase(CHDLs) olarak isimlendirilirler. Bu enzimler genellikle oksasilini hidrolize ederler. Oxacilinazlar amoxicilin, methicilin, cephalaridine, cephalotini de hidrolize ederler. İntrinsik olarak karbapenemaz aktivitesi gösterebilirler. OXA enzimleri bu gruptadır, OXA enzimleri temel olarak 4 ana gruba ayrılır bunlar: OXA23, OXA24, OXA58, OXA51. *A.baumannii*'de OXA tip enzimlerin karbapenem hidroliz aktivitesi ilk olarak İskoçyanın başkenti olan Edinburgh'da identifiye edildi. İskoçya'da bu enzim *A.baumannii*'de plazmidten identifiye edilmiş ve ARI-1 olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu enzim OXA 23 olarak isimlendirilmiştir. OXA 23 enzimi *A.baumannii*'de dünya çapında karbapenem direnci sağlamaktadır. OXA 51 geni *A.baumannii*'de kromozomda lokalize olan beta laktamazdır, çok düşük seviyede oksasilinaz üretmektedir⁸¹. OXA 23'ün OXA 27 ve OXA 49 olarak subgrupları bulunmaktadır. Çin'de *A.baumannii*'de OXA 49 identifiye edilmiştir. OXA24; OXA25, OXA 26, OXA 40 subgruplarını içermektedir. İspanyada karbapenem dirençli *A.baumannii*'de OXA24 ve OXA25 varyantları bildirilmiştir.OXA58 ilk olarak Fransa'da salgın sırasında identifiye edildiği bildirilmiştir. OXA58 Türkiye, İspanya, Romanya, Kuveyt, İtalya, Arjantin, Avusturya, İngiltere gibi çeşitli coğrafik bölgelerde yayılım göstermektedir. *A.junii*'de bulunan OXA58 ve IMP-4 beta laktamazları birlikte karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. OXA23 ve OXA58 genleri genellikle plazmidten izole edilmektedir, OXA24 ise kromozomda lokalize olmaktadır. *P.aeruginosa*'da OXA 40 geni çoğunlukla integronla taşınmaktadır⁸¹.

2e: Bu grupta yer alan β -laktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadırlar. *B.fragilis*'in CepA enzimi, *B.uniformis* ve *B.vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA, *E.coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S.maltophilia*'nın L2 ve *Y.enterocolitica*'dan izole edilen Blal enzimleri bu grupta yer almaktadır⁷³.

2f: Bu grupta, *E.cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E.cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *S.marcescens*'in Sme-1 enzimi yer almaktadır. Karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır⁷³.

Grup 3c: Bu grubun özelliği diğer beta laktam antibiyotiklere göre karbapenemler üzerine zayıf etki göstermeleridir. Güçlü sefalosporinaz aktiviteye sahiptir. Bu enzim geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler de dahil sefalosporinleri çok yüksek oranda hidroliz etmesiyle diğer alt gruplardan ayrılmaktadır. *Legionella gormanni* metallo-beta-laktamaz enzimi bu gruptadır^{82,83}.

Grup 4: Molekül sınıfı henüz belirlenmemiş, yapıları belirlenmemiş kavulanik asitle inhibe olmayan penisilinazlar bu grubu oluşturur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. *A.faecalis*, *B.fragilis*, *C.jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E.coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazı ve *Pseudomonas cepacia*'daki β -laktamazlar da bu gruba dahildir. Bir bakteride birden çok beta-laktamaz tipi aynı anda görülebilir ve bu çok sık olan bir durumdur. Böylece kromozomal ve plazmid kökenli beta-laktamazlar bazen iç içe geçerler. Grup 1'deki kromozomal β -laktamazlar, Grup 2'deki ESBLenzimler ve Grup 3'deki β -laktamazlar hastane infeksiyonlarında sorun olarak en sık karşımıza çıkan enzimlerdir.

Tablo 3: β -laktamazların sınıflandırılması

BETA LAKTAMAZ GRUBU	ALT GRUP	MOLEKÜLER SINIF (AMBLER)	SUBSTRAT	ÖZELLİKLER
1		C	Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler. Klavulanik asitle inhibe olmaz
2		A,D		Birçoğu klavulanik asitle inhibe olur
	2a	A	Penisilinler	Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar
	2b	A	Penisilinler Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu betalaktamazlar
	2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu Sefalosporinler	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar
	2br	A	Penisilinler	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar
	2c	A	Penisilinler	Karbenisilini hidroliz eden enzimler
	2d	D	Penisilin, oksasilin	Oksasilini hidroliz eden Klavulanik asit ile az inhibe olurlar.
	2e	A	Sefalosporinler	Klavulanik asit ile inhibe olan Sefalosporinazlar.
	2f	A	Penisilin, Sefalosporin, karbapenemler	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler
3	3a,3b,3c	B	Karbapenemler dahil bir çok beta-laktam	Metallo-beta-laktamazlar.
4		?	Penisilinler	Diğer gruplara girmeyen enzimler

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez laboratuvarından 12.01.2009 ile 09.11.2009 tarihleri arasından farklı kliniklerden gönderilen 55 *Acinetobacter baumannii* suşu, hastane enfeksiyonları epidemiyolojisine ışık tutmak amacı ile değerlendirilmiştir. Fenotipik yöntemlerle tanımlanan suşlar arasındaki muhtemel klonal ilişki, direnç genlerindeki ve PFGE kalıplarındaki polimorfizm dikkate alınarak tanımlanmaya çalışılmıştır. *A.baumannii* türü identifikasyonu için Vitek-2 otomatize sistemi kullanılmış ve antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesinde PCR yöntemi ile dirençten sorumlu bilinen gen bölgelerini hedef alan primerler kullanılmıştır.

3.1.Tür tayini ve Karbapenem direncinin belirlenmesi

Hasta örneklerinden kanlı besi yerine ekimler yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış, üreme sonunda non-hemolitik, oksidaz negatif, katalaz pozitif kolonilerden yayma preparat yapılmış, Gram negatif kokobasil şeklinde görünmüş olan kolonilerden saf kültür elde edilmiştir. Elde edilen saf kültürler Vitek-2 otomatize sistemi(BioMerieux, Durham, NorthCarolina, USA) ile tür düzeyinde antibiyotik direnci tespit edilmiştir. Vitek-2 otomatize sistemi için özel olarak kullanılan deney tüpüne (12x75 mm) 3ml steril tamponlanmış tuzlu su (%0.45-0.50 NaCl, ph 4.5-7.0) konulmuş, saf koloniler öze ile alınmış tüpe aktarılmış ve McFarland 0,5 bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonları ayarlanmıştır. İncelenen her örnek için 2 tane tüp kullanılmıştır. Birinci tüpe saf bakteri kolonilerinden hazırlanan süspansiyon eklenir, ikinci tüp ise boş yerleştirilmiştir. Kasetin içerisinde bulunan birinci tüpün arka kısmına Gram negatif identifikasyon kartı (Vitek-2 GN, BioMerieux SA-France) ve boş tüpün arka kısmına Gram negatif antibiyotik duyarlılık kartı(Vitek-2-AST-P534 BioMerieux-SA-France) yerleştirilmiş kullanım talimatına uygun yerleştirilmiştir. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası suşların cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır, izolatlar antibiyotik duyarlılık yönünden de değerlendirilmiştir.

Saf kültür şeklinde üretilmiş *A.baumannii* suşları PFGE ve PCR çalışmalarında kullanılmak üzere %10 gliserol, %10 kan içeren Beyin kalp infüzyon agar (BHIB) besiyerinde -20°C’de saklanmıştır.

Hastane enfeksiyonu ile ilişkili 12.01.2009-09.11.2009 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden 55*A.baumannii* izole edilmiştir. Bu örneklerin farklı kliniklerde yatan hastalara ait olduğu bilinmektedir.

Tablo 4: Örneklerin izole edildiği servisler

Klinik	Suş sayısı	Suş%
Reanimasyon	11	%20
Dahiliye yoğun bakım	9	%16,3
Yanık	8	%14,5
Çocuk yoğun bakım	7	%12,7
Beyin cerrahi yoğun bakım	9	%16,3
Çocuk yeni doğan	2	%3,6
Cerrahi yoğun bakım	2	%3,6
Beyin cerrahi klinik	1	%1,8
Genel çocuk klinik	2	%3,6
Göğüs hastalıkları klinik	2	%3,6
Dermatoloji klinik	1	%1,8
Nöroloji yoğun bakım	1	%1,8
Toplam	55	

3.2.Klonal ilişki tespiti

Klinik meteryalden izole edilen *A.baumannii* suşları hastane kökenli salgın olup olmadığını belirlemek amacıyla yüksek ayırım gücüne sahip genotipik bir yöntem olan PFGE yöntemi ile tiplendirilmiştir ve direnç genlerini belirlemek amacıyla PCR metodu uygulanmıştır. Yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve stabilitesini belirlemek için iki kere tekrarlanmıştır.

3.2.1. PFGE

PFGE yöntemi, Rıza Durmaz ve arkadaşlarının (2009) yöntemine uygun şekilde yapıldı ve elektroforez için CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) cihazı kullanıldı.

3.2.1.1. Örneklerin hazırlanması

- 1- Tür düzeyinde tanımlanan bakterilerden kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı.
- 2- Bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve kültürün saflığı kontrol edildi.
- 3- Besiyerindeki tek koloniden tekrar kanlı agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- 4- Saf kültür olarak üreyen kolonilerden 1ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içerisinde süspanse edildi.
- 5- Bakteri yoğunluğu yaklaşık 5 McFarland olacak şekilde ayarlandı.
- 6- Bu bakteri solüsyonundan 1ml ependorfa aktarıldı.
- 7- 12000g de 4°C'de 3 dakika santrifüj edildi.
- 8- Ependorf içerisindeki süpernatant kısım atılır ve pellet üzerine 1ml HST eklenir.

3.2.1.2. Örneklerin agarza gömülmesi

1- 25ml lik balon içerisine 9ml HST(100Mm Tris-HCL, 100Mm EDTA, Ph8.0) konuldu ve içerisine %2 ik (0,2g) düşük erime ısılı agaroz (BIO-RAD Low melting agar 161-3113EDU) eklendi. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz çözüldükten sonra balon 45-50°C'lik su banyosuna konuldu daha sonra içerisine %1 sodyum dodesil sülfat eklendi ve stok solüsyondan 1,5ml lik ependorflara 200µl dağıtıldı kuru ısı bloğunda 45-50°C'de kullanıma hazır bekletildi.

2- Her suş için bir agaroz kalıbı belirlenir buz kalıbı üzerinde bekletildi.

3- Bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50°C'de içerisinde 200 µl düşük erime ısılı agaroz bulunan tüpe eklendi. Agarın homojen yayılması için birkaç defa pipetaj yapıldı.

4- Karışım bekletilmeden agaroz kalıbına (10mm x 5mm x 1,5mm, Bio Rad Laboratories) konuldu.

5- Kalıplar +4 °C'de 20 dakika bekletildi. Bu kalıpların +4 °C'de bekletilmesi daha kaliteli DNA hazırlamak için önemlidir.

3.2.1.3. Örneklerin agaroz içinde parçalanması

Hazırlanan lisis- 1(50 mMTris-HCL) solüsyonu 1-5ml lik steril kapaklı tüplere 500 µl dağıtıldı.

1. +4°C'deki kalıplar lisis- solüsyonu içerisine yerleştirildi.
2. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.
3. 1 saatin sonunda su banyosunda çıkarılan tüplerin içindeki lisis-1 solüsyonu dökülür.
4. Lisis-2(0.5M EDTA , %1 sarkozil,400µg/ml proteinaz K) solüsyonu hazırlandı 500 µl tüplere dağıtıldı.
5. 55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

3.2.1.4. Lisis işlemlerinden sonra kalıpların yıkanması

1. Lisis aşamalarında sonra kalıpların zarar görmemesi ve katılaşması için 15 dakika +4°C'de bekletildi.

2. Daha kalıplar önce yaklaşık 6ml 3defa ultrapür su ile ve 6ml TE tamponu ile 3 defa 15'er dakika yıkandı.

Yıkama işlemleri ile saflaşmış olan DNA kalıpları restriksiyon enzimi(RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

3.2.1.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

1- DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Restriksiyon enzimi olarak Apa1 kullanıldı. Parçalardan biri 100 µl B buffer solüsyonu içerisine konularak oda sıcaklığında bekletildi.

2- Daha sonra her kalıp için aşağıdaki karışım hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 30 ünite Apa1 enzimi konuldu (Fermentase,lot:00053654).

10 µl Apa1 buffer(10x)(Fermentase)

3 µl Apa1 enzim(10 ünite/ul)(Fermentase)

87ul steril distile su (Reagent Grade Type 1)

3- Agaroz kalıbının içerisinde bulunduğu buffer solüsyonu aspire edildi. Üzerine yukarıda hazırladığımız gibi enzim solüsyonu eklendi ve 37°C’de çalkalamalı su banyosunda 2 saat bekletildi.

4- Tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi ve kalıplar yüklemeye hazır hale geldi.

3.2.1.6 - Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

1- 100 ml 0.5x TBE içinde % 1.1’lik agaroz (Pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.

1.1,1g “pulsed-field certified agarose” balona konuldu.

2-100ml 0,5x TBE tamponu balaona konuldu ve karıştırıldı.

3- Balonun ağzı aliminyum folyo ile kapatılarak 60 saniye mikrodalga fırında tutuldu, karıştırılıp tekrar 15 saniye tutuldu iyice homojenize olması sağlandı.

4- Agarozun döküleceği aparat hazırlandı düz zemine yerleştirildi.

5- RE ile kesilmiş olan agaroz kalıpları 15 dişli tarağın uç kısmına paralel olarak yerleştirildi.

6- Kurutma kağıdı veya kağıt havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı.

7- 45-50°C ye kadar soğuyan agar kasetin üzerine döküldü.

8- Oda sıcaklığında 20 dakika katılaşması için bekletilir, katılaştıktan sonra tarak çekildi.

9- Daha sonra agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılır içinde 1900mililire 0,5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

3.2.1.7. Elektroforez

CHEFF-DR II cihazında (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) elektroforez yapıldı. Aşağıdaki elektroforez şartlarına göre yapıldı.

	BLOK
Başlangıç vuruş süresi	5sn
Bitiş vuruş süresi	30sn
Akım	6V

Sıcaklık	14°C
Süre	20 saat

3.2.1.8. Sonucun gözlenmesi

1- Elektroforezden sonra jel 5 µg/ml ethidium bromür içeren 400ml ultra pure saf su içinde 20 dakika boyandı.

2- Sonra UV ışık altında görüntülendi.

3- Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.

4- GelCompar II yazılım sistemi (version 5.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart görüntü yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. UPGMA kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturuldu, kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1,5 olarak alındı. Bant profilleri %80 benzerlik gösteren izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve büyük harfle isimlendirildi. Aynı küme içerisindeki subtipler ise rakamlar ile gösterildi.

3.2.1.9. PFGE yönteminde kullanılan solüsyonlar

3.2.1.9.1- TE buffer

TrisHCL	1,576gr
EDTA	0,0372gr

Ultra pure su ile 1 litreye tamamlandı. Karışım homojenize edildi NaOH ile pH 7.6'ya ayımlandı.

3.2.1.9.2. Hücre Süspansiyon Tamponu(HST)

Tris HCL(SIGMA T-3253)	15,76gr
EDTA (AMRESCO 0105-50)	37,22gr

Ultra pure su ile 1 lt. ye tamamlandı. Karışım homojenize edildi NaOH ile pH sı 8.9'a ayarlandı.

3.2.1.9.3. Lisis-1

Tris HCL (SIGMA T-3253) 7,88 gr

EDTA (AMRESCO 0105-50) 18,61gr

Ultra pure su ile 1lt ye tamamlanır. Karışım homojenize edilir NaOH ile pH 8,26'ya ayarlanır.

3.2.1.9.4. Lisis-2

EDTA (AMRESCO 0105-50) 186,1 gr

N-lauryl Sarcosine(AMRESCO 0719-500) 10 gr

EDTA Ultra pure su ile 1lt ye tamamlanır çözüldükten sonra üzerine sarkosine eklenir. NaOH ile pH 8,22'ye ayarlanır.

3.2.1.9.5. 0,5x TBE

Tris base (SIGMA T-1503) 5.3845 gr

Borik asit (MERCK 1.00165.0500) 2.75 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500) 0.3722 gr

Ultra pure su ile 1lt ye tamamlanır. Karışım homojenize edilir.

3.2.1.9.6. 20mg/ml proteinase K solüsyonu

Proteinaz K (Roche, Lot 11207200) 100 mg

Distile su 5 ml

3.2.1.9.7. %10 sodium dodecyl sulfate solüsyonu

Sodium dodecyl sulfate (SIGMA L-5750) 10gr

Ultra pure saf su 100ml

3.2.2. PCR

3.2.2.1. Oxa genlerinin multipleks PCR ile belirlenmesi

Jane F. Turton ve arkadaşlarının çalışmasından optimize edilen Multiplex PCR yöntemi ile aşağıdaki tablo.5'de belirtilen primerler kullanıldı elektroforez işlemi uygulandı.

Tablo 5: Multipleks PCR primerleri

OXA23like-F	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3'
OXA23like-R	5'-ATTTCTGACCGCATTTCCAT-3'
OXA24like-F	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA-3'
OXA24like-R	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'
OXA51like-F	5'TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'
OXA51like-R	5'TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'
OXA58like-F	5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3'
OXA58like-R	5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'

3.2.2.1.1- Kültür plaklarından DNA ekstraksiyonu

1. Saf olarak elde edilen *A.baumannii* örnekleri distile su ile Mc Farland 5 bulanıklığında süspanse edildi.

2. Hazırlanan bakteri süspanسیونundan 500µl ependorf tüpe alınarak, 8000 xg de 3 dakika oda ısısında santrifüj (HERAEUS Biofuge Primo R) edildi.

3. Üst sıvı atılıp ve pelletin üzerine 500 µl TE buffer (10mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH7.5) eklendi.

4. Daha sonra 100°C'de, 10 dakika kuru ısı bloğunda (BİOSAN Termoblock TDB-120) tutuldu.

5. 500 µl bakteri süspanسیونuna 150 µl boncuk(SIGMA) konuldu ve Mickle cihazında (Mickle Tissue Disintegrator, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) maksimum hızda (10), 7 dakika mekanik lizise uğratıldı.

6. 12.000 xg de 10 dakika santrifüj edildi.

7. 200 µl süpernatant alınıp ve yeni bir ependorfa aktarıldı. Spektrofotometrede (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) DNA kantitasyonu yapılan örnekler PCR ile amplifikasyon işleminde kalıp olarak kullanılıncaya kadar 20°C de saklandı.

20°C'de saklanan örnelelere OXA genlerinin belirlenmesi için Multipleks PCR yöntemi uygulandı ve ISaba1 insersiyon sekansını belirlemek üzere PCR yöntemi uygulandı.

3.2.2.1.2. OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 primerleri ile multiplex PCR amplifikasyonu

Ekstraksiyon işlemi yapılan *A.baumannii* örneklerinde elde edilen DNA örneklerine OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 primerleri kullanılarak Multiplex PCR işlemi uygulandı. Amplifikasyon 5µl PCR buffer, 2,5 µl MgCl₂, dNTP 1 µl, her bir primerden 0,2 µl, Tag 0,3 µl ,4 µl DNA ve karışım distile su ile 50 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı:

94°C'de 5 dak. ilk denatürasyon	} 35 siklus
94°C'de 40 sn. denatürasyon	
47°C'de 60 sn. bağlanma(annealing)	
72°C'de 60 sn. uzama (ekstensiyon)	
72°C'de 10 dak. son uzama	

3.2.2.1.3. Fragmentlerin agaroz gel elektroforezi ile belirlenmesi

Amplifikasyon sonrasında fragmentlerin varlığını gösterebilmek amacı ile ampliconlar elektrikli ortamda agaroz jel içerisine yüklendi ve elektroforez işlemine tabi tutuldu. İşleme aşağıdaki gibi devam edildi :

1. Elektroforez matrisi olarak kullanılmak üzere % 2'lik agaroz jel 1xTBE solüsyonu ile hazırlandı.
2. Balon içerisine 2gr agaroz tartıldı ve üzerinde 100ml 1x TBE eklendi.
 - a. Balonun ağzı alimintum folyo ile kapatıldı, homojenize olana kadar mikrodalga fırında homojenize olana kadar ısıtıldı.
 - b. Agaroz sıcaklığı 60°C'nin altına düşmeyecek kadar oda sıcaklığında bekletildi.
 - c. Agaroz içerisine 10mg/ml lik ethidium bromid stok solüsyonundan 5 µl. eklendi, son konsantrasyon olarak %0,5mg/ml elde edildi.
 - d. %2'lik agaroz jel önceden hazırlanmış jel kalıbına dikkatlice döküldü.
 - e. Oda sıcaklığında 20 dakika jelin katılaşması için bekletildi.
 - f. Jel katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çekildi, elektroforez tankına (OWL Separation System Model Mini GEL Elektrophoresis System) yerleştirildi.

3. Parafilm üzerine %20 sükröz, %0,25 brom fenol mavisi ile hazırlanan 6x yoğunluğundaki yükleme tamponundan 3 µl konuldu, 15 µl örnek ile karıştırıldı. 18 µl yoğunluğundaki farklı örneklerden olan karışım ayrı kuyucuklara yüklendi. Kuyulardan bir tanesine marker (Fermentas O'Range Ruler, 100bp Ladder, Lot: 0302) yüklendi.
4. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak 120 V akım verildi. Brom fenol mavisinin jeldeki migrasyonu takip edilerek, boya jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

3.2.2.1.4. Görüntüleme ve Bant Profillerinin Analizi

1. Elektroforezden sonra jel UV ışığa altında görüntüledi. Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.
2. Aranılan büyüklükteki bantlar belirlendi.

3.2.2.2. ISaba1 insersiyon sekansının PCR ile belirlenmesi

Turton JF (2006) ve arkadaşlarının çalışmasına uygun olarak optimize edilerek çalışılmıştır. Oxa direnç genlerinin genellikle upstream bölgesine yerleşen 548bp lik sekans PCR ile belirlendi. ISaba1-F(CACGAATGCAGAAGTTG), ISaba1-R(CGACGAATACTATGACAC) primerleri kullanılarak insersiyon sekansı elektroforezi yapıldı. ISaba1 sekansını belirlemek için, OXA genlerinin PCR'ı için yapılan ekstraktlar kullanıldı.

3.2.2.2.1. ISaba1 sekansının amplifikasyonu

Ekstraksiyon işlemi yapılan A.baumannii örneklerinde elde edilen DNA örneklerine ISaba1 primeri kullanılarak PCR işlemi uygulandı.

Amplifikasyon 5µl PCR buffer, 2 µl MgCl₂, dNTP 1 µl, her bir primer 0,4 µl, Tag 0,5 µl, 4 µl DNA ve karışım distile su ile 50 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı:

95°C'de 5 dak. ilk denatürasyon	}	36 siklus
94°C'de 60 sn. denatürasyon		
50°C'de 60 sn. bağlanma(annealing)		

72°C'de 90 sn. uzama (ekstensiyon)

72 °C'de 6 dak. son uzama

3.2.2.2.2. Fragmentlerin agaroz gel elektroforezi ile belirlenmesi

Amplifikasyon sonrasında fragmentlerin varlığını gösterebilmek amacı ile ampliconlar elektrikli ortamda agaroz jel içerisine yüklendi ve elektroforez işlemine tabi tutuldu. İşleme aşağıdaki gibi devam edildi:

- 1- Elektroforez matrisi olarak kullanılmak üzere % 2'lik agaroz jel 1xTBE solüsyonu ile hazırlandı.
- 2- Balon içerisine 2gr agaroz tartıldı ve üzerinde 100ml 1x TBE eklendi.
 - a. Balonun ağzı alimintum folyo ile kapatıldı, homojenize olana kadar mikrodalga fırında homojenize olana kadar ısıtıldı.
 - b. Agaroz sıcaklığı 60°C'nin altına düşmeyecek kadar oda sıcaklığında bekletildi.
 - c. Agaroz içerisine 10mg/ml lik ethidium bromid stok solüsyonundan 5 µl eklendi, son konsantrasyon olarak %0,5mg/ml elde edildi.
 - d. %2'lik agaroz jel önceden hazırlanmış jel kalıbına dikkatlice döküldü.
 - e. Oda sıcaklığında 20 dakika jelin katılaşması için bekletildi.
 - f. Jel katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çekildi, elektroforez tankına (OWL Separation System Model Mini GEL Elektrophoresis System) yerleştirildi.
- 3- Parafilm üzerine %20 sükröz, %0,25 brom fenol mavisini ile hazırlanan 6x yoğunluğundaki yükleme tamponundan 3 µl konuldu, 15 µl örnek ile karıştırıldı. 18 µl yoğunluğundaki farklı örneklerden olan karışım ayrı kuyucuklara yüklendi. Kuyulardan bir tanesine marker (Fermentas O'Range Ruler, 100bp Ladder, Lot: 0302) yüklendi.
- 4- Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak 120 V akım verildi. Brom fenol mavisinin jeldeki migrasyonu takip edilerek, boya jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

3.2.2.2.3. Görüntüleme ve Bant Profillerinin Analizi

1. Elektroforezden sonra jel UV ışığa altında görüntüledi. Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez laboratuvarında Ocak-2009 ve Kasım-2010 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden izole edilen *A.baumannii* izolatının blaOXA direnç genlerini ve epidemiyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla, PFGE ve PCR yöntemleri kullanıldığı bu çalışmada, suşların tür ve karbapenemaz sentezleme durumu bakımından identifikasyonu Ç.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Laboratuvarında otomatize VITEK-2 cihazıyla yapıldı. Bir yıllık dönemde toplanan, 55 karbapenem dirençli *A.baumannii* suşu çalışmaya dahil edildi. Bu suşların çoğunluğu Reanimasyon kliniğinde tedavi gören hastalardan alınan klinik örneklerden ve bu klinik örneklerin çoğunluğu ise reanimasyon servisinde ve en fazla yara meteryalinden izole edildi .

Tablo 6: Örneklerin izole edildiği servisler

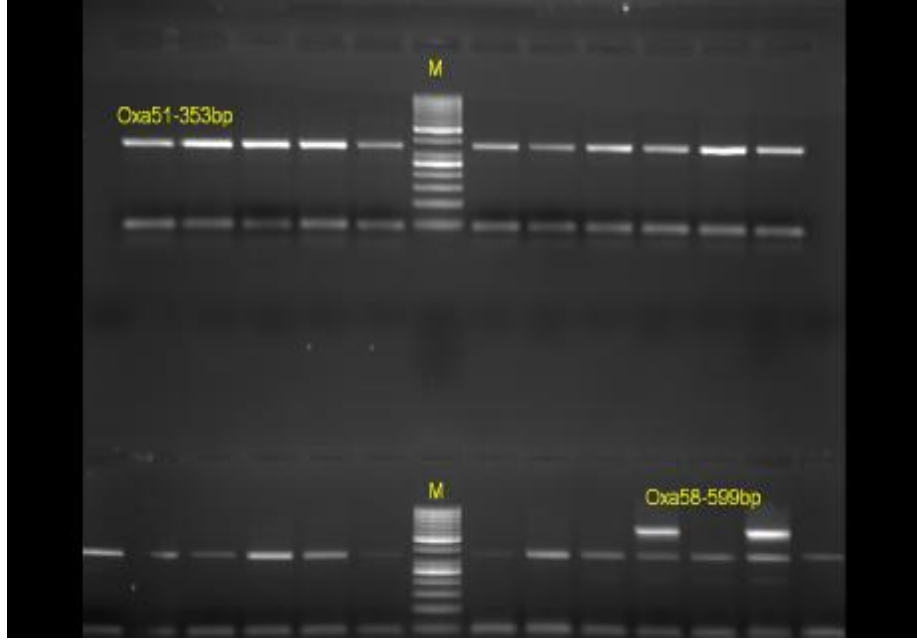
Klinik	Suş sayısı	Suş%
Reanimasyon	11	% 20
Dahiliye yoğun bakım	9	% 16,3
Yanık	8	% 14,5
Çocuk yoğun bakım	7	% 12,7
Beyin cerrahi yoğun bakım	9	% 16,3
Çocuk yeni doğan	2	% 3,6
Cerrahi yoğun bakım	2	% 3,6
Beyin cerrahi klinik	1	% 1,8
Genel çocuk klinik	2	% 3,6
Göğüs hastalıkları klinik	2	% 3,6
Dermatoloji klinik	1	% 1,8
Nöroloji yoğun bakım	1	% 1,8
Toplam	55	

Tablo.7 Örneklerin izole edildiği klinik meteryal

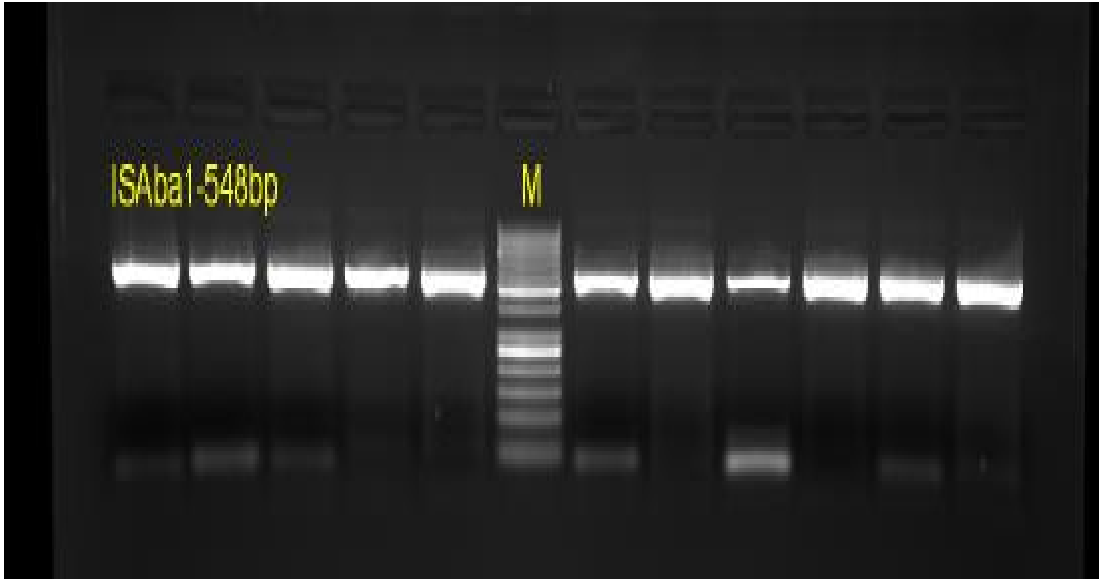
İzole edilen klinik meteryal	Suş sayısı	Suş%
Yara	13	%23,63
Bronko alveoler lavaj	9	%16,36
Kan	12	%21,81
Tak	4	%7,27
Trakeal aspirasyon	6	%10,9
BOS	5	%9,09
Pü	1	%1,81
İdrar	2	%3,63
Dren	1	%1,81
Katater kanı	2	%3,63
Toplam	55	

Ç.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Labaratuvarından alınan örnekler bölümümüz labaratuvarında pasajlanarak tek koloni elde edilmiş ve stok besiyerine alınarak kullanılabilecek kadar -20°C de saklanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 55 test izolatının DNA'ları Mickle-glassmilk yöntemi ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlar DNA kalıbı olarak kullanılarak önce blaOXA genlerinin varlığını tespit amacı ile spesifik primerlerin kullanıldığı tek tüp multipleks-PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Elde edilen hedef oxa fragmentleri % 0.5 ethidiumbromide içeren % 1.8'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Hedef oxa fragmenti tespit edilen örnekler için DNA ekstraktları ISAbal dizisini tespit amacı ile spesifik primerler kullanılarak tek tüp PCR yöntemi ile amplifiye edildi. Diğer taraftan test suşları hem hastane enfeksiyonu yönünden değerlendirilmek hem de oxa tiplerinin yayılımını gösterebilmek amacı ile ApaI enziminin kullanıldığı PFGE yöntemi ile değerlendirildi.

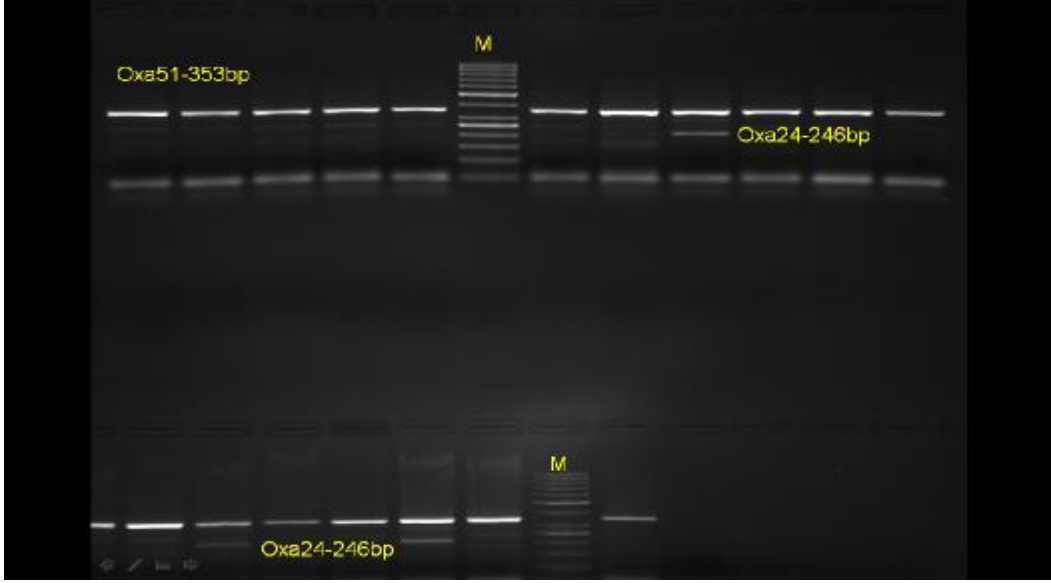
PCR sonuçlarına göre izolatların tamamında bla_{OXA51} (%100) ve ISAbal (%100) geni tespit edildi (Şekil 1 ve Şekil 2). Ayrıca bla_{OXA51} ve ISAbal segmentine ilave olarak izolatların 4(%7.27)'ünde bla_{OXA-58} ve 3(%5.45)'ünde bla_{OXA-24} geni belirlendi (Şekil 1 ve Şekil 3). bla_{OXA-23} kodlayan gen hiçbir izolatta görülmedi.



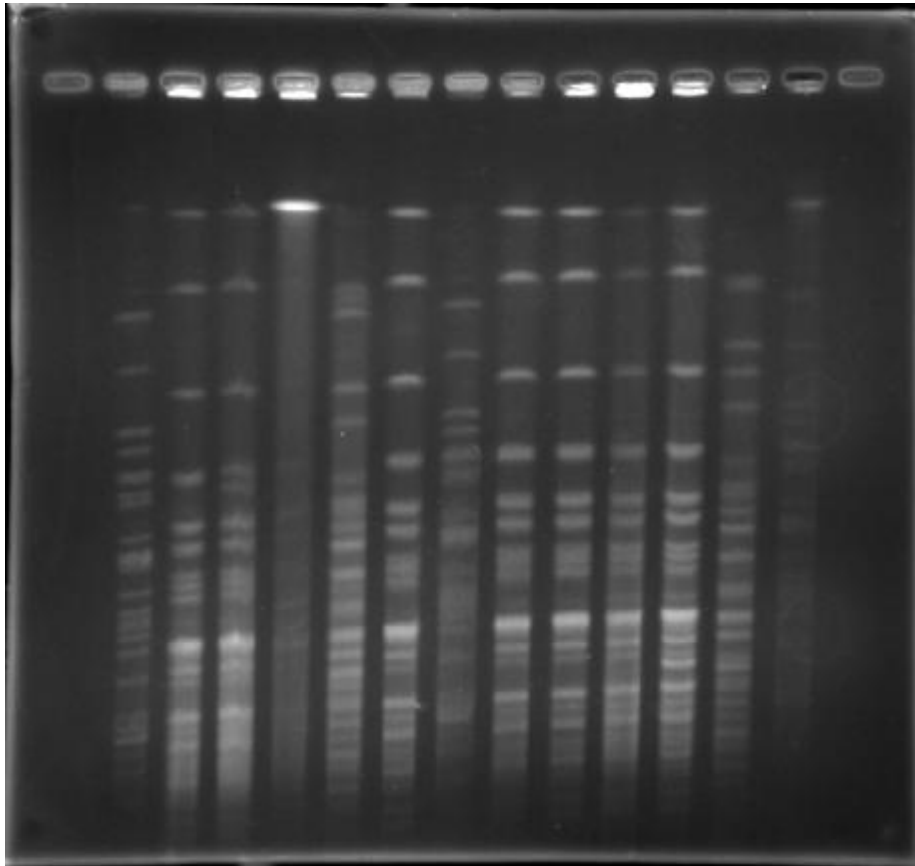
Şekil 1: OXA 51 ve 58 genlerinin PCR jel görüntüsü



Şekil 2: ISAbal1 geni PCR jel görüntüsü



Şekil 3: OXA51 ve 24 genlerinin PCR jel görüntüsü

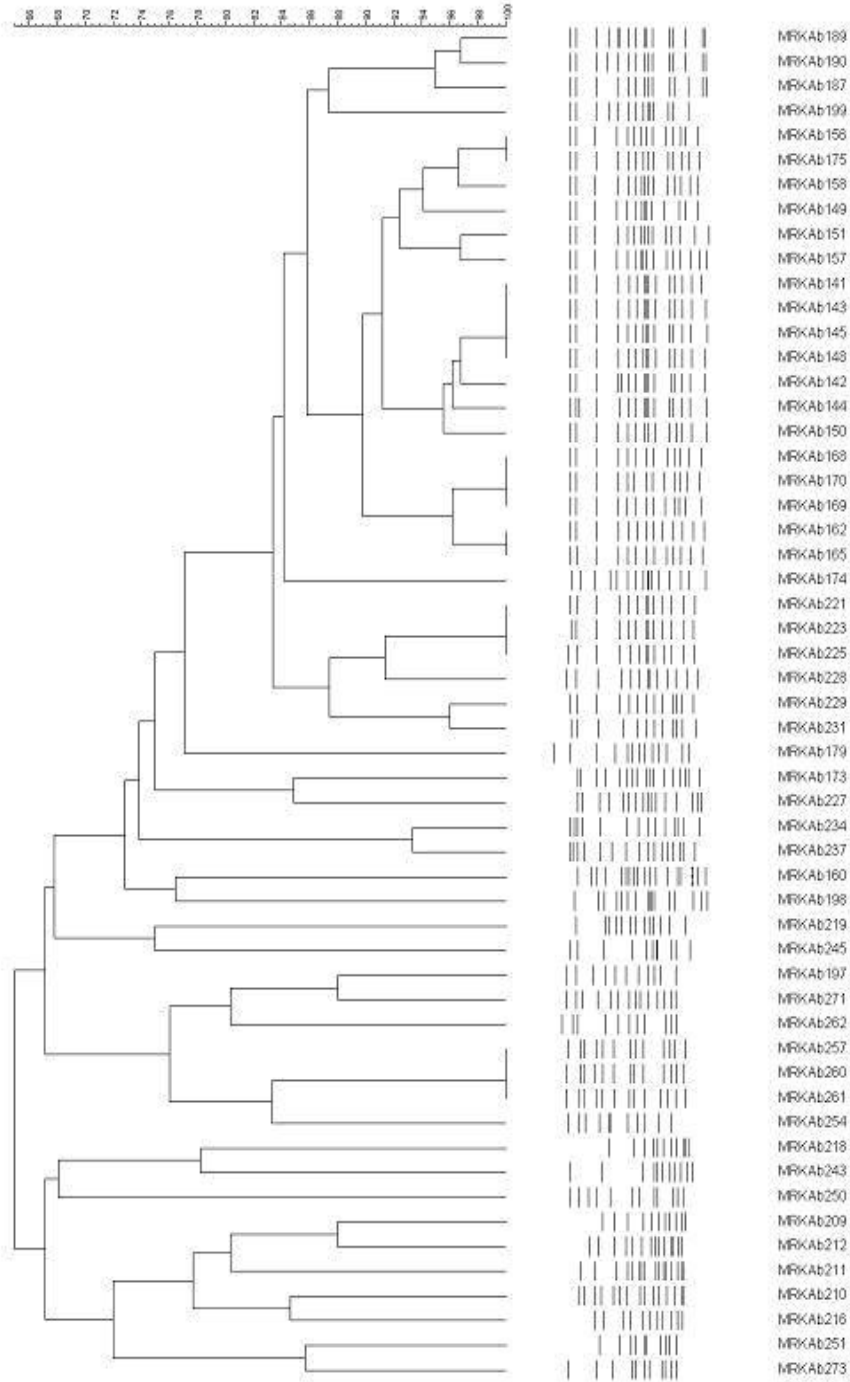


Şekil 4: PFGE jel görüntüsü

Doc:001 (0%) C01 (5%-1.5%) P4 (0% S=00%) [0.0%-100.0%]
A.baumannii

A.baumannii

PFGE TİPİ



Şekil 5: PFGE ile elde edilen dendrogram görüntüsü

Toplam 55 *A.baumannii* izolatının PFGE ile incelenmesi sonucu 16 farklı PFGE kümesi belirlendi. Bunlar arasında en büyük kümeyi 29 üyeli “A” kümesi oluşturdu. Bu küme içerisinde 20 subtip (A1-A20) tespit edildi. Beyin Cerrahi Yoğun bakım ve Dahiliye Yoğun bakım kliniklerinde yatan hastalara ait klinik örneklerden izole edilen (MRKAb 156 ve 175, PFGE tip A5) 2 suş %100 bant profil benzerliği gösterdi. Yine Yanık, Çocuk yoğun bakım ve Beyin cerrahi yoğun bakımda izole edilen 4 suş (MRKAb 141,143,145 ve 148, PFGE tip A10); Yanık , Beyin cerrahi ve reanimasyon kliniklerinden izole edilen 3 suş(MRKAb 168,169 ve 170, PFGE tip A14), Yanık ve Çocuk yoğun bakımdan izole edilen 2 suş (MRKAb162ve 165, PFGE tipA15) ve yanık, reanimasyon ve dahiliye yoğun bakım kliniğinden izole edilen 3 suş (MRKAb221, 223 ve 225, PFGE tipA17)da %100 benzerlik gösterdi.

“A” kümesini takiben 4 üyeli “J” kümesi, 3 üyeli “I” ve “N” kümesi, 2 üyeli “C”, “D”, “O” ve “P” kümeleri tespit edildi. Bunlardan “J” kümesi içerisinde değerlendirilen 4 suşun üçü (MRKAb 257, 260, 261, PFGE tip J1) %100 bant profil benzerliği gösterdi. Ayrıca tek üyeli 8 tip belirlendi.

PFGE tip B1(MRKAb 179), C1(MRKAb 173), E1(MRKAb 160) suşlarında bla_{OXA24} direnç geni belirlendi. PFGE tip O2(MRKAb 216), J2(MRKAb 254), G1(MRKAb 219), A17(MRKAb 221) suşlarında bla_{OXA58} direnç geni tespit edildi.Bu belirlenen direnç genlerinin PFGE paternleri farklı bulundu.

5. TARTIŞMA

Acinetobacter baumannii özellikle yoğun bakım ünitelerinde nozokomiyal enfeksiyonlara ve salgınlara yol açan önemli bir patojendir. Son yıllarda hastane enfeksiyonlarında geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın olarak kullanılmasına bağlı olarak, bu antibiyotiklere karşı kısa sürede direnç gelişmiştir. *Acinetobacter* cinsi bakteriler hastane florasına yerleşerek uzun süre yaşamını sürdürmekte ve hastanede yatan ve özellikle immünsistemi baskılanmış hastalarda sistemik enfeksiyonlara yol açmaktadır.

Karbapenem grubu antibiyotikler de dahil, çoklu ilaç direnci göstermesi bu patojenle olan enfeksiyonların tedavisinde ciddi problemlere sebep olmakta ve morbidite ve mortalitede önemli oranda artışlara yol açmaktadır. Karbapenem dirençli suşların klonal yayılımla bütün dünyada hastanelere hakim olmaya başladıkları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. *Acinetobacter* suşlarının hastane içi, hastaneler arası, bölgesel, ulusal ve uluslar arası hareketlerinin takibi büyük önem taşımaktadır. Özellikle dirençli suşlarla yapılan sürveyans çalışmaları mevcut kontrol önlemlerinin değerlendirilmesine, yeni ve daha etkin kontrol sistemlerinin geliştirilmesine olanak verecektir. Bu suşların belirlenmesinde, suşlar arası ilişkilerin tespit edilmesinde PFGE altın standart yöntemdir.

Biz bu çalışmada, Ç.Ü. Balcalı Hastanesinde hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olan karbapenem dirençli *A.baumannii* suşlarının epidemiyolojik özelliklerini tespit amacı ile, Ocak 2009- Kasım 2009 tarihleri arasında kalan 11 aylık periyod içerisinde hastanenin farklı klinik ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen klinik materyallerden izole edilen karbapenem dirençli *A.baumannii* suşlarının karbapenem direncine yol açan OXA gen analizini yapmayı ve klonal ilişkilerini pulsed-field jel elektroforez yöntemi kullanarak tespitini amaçladık.

Bizim çalışmamızda Karbapenem dirençli 55 *A.baumannii* izolatının tamamında OXA-51 ve ISAbal1 genlerini tespit ettik. Sadece 4 izolatta OXA-58 ve 3 izolatta OXA-24 kodlayan gen belirledik.

Turton ve arkadaşlarının (2006) İngiltere’de yaptıkları çalışmada, Multipleks PCR yöntemi ile *A.baumannii* izolatlarında OXA-51, OXA-23 ve Class 1-integraz kodlayan genler araştırılmış ve izolatların tamamında OXA-51 kodlayan gen belirlemişlerdir. Bu bizim çalışmamızla uyumludur⁸⁴.

Ayrıca Pournaras ve arkadaşlarının Yunanistan’da (2005) yaptıkları bir çalışmada, Karbapenem dirençli 17 *A.baumannii* izolatının 15’inde OXA-51 ve 14’ünde ise OXA-58 kodlayan gen tespit etmişlerdir⁸⁵.

Kore’de, Yang ve arkadaşlarının çalışmasında (2006) ise 49 *A.baumannii* izolatının tamamının OXA-51 ve OXA-23 tipi karbapenemaz taşıdığı gösterilmiştir⁸⁶.

Ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda, Deniz Gür ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları Ankara ve İstanbul’ da izole edilen 321 *A.baumannii* izolatı ile yaptıkları çalışmada, 2006 yılında izole edilen 75 suşun 44 (%58.6) ünde karbapenem direnci tespit ettikleri, bu suşların 26 (%59.1)sının OXA-23, 18(%40.9)’inin OXA-58 kodlayan gen taşıdıkları gösterilmiştir. Ankara’da izole edilen 18 suşun biri (OXA-23) hariç hepsinin OXA58-like tipi, İstanbul’da izole edilen 26 suşun 25’inin OXA-23 ve birisinin OXA58-like tipi gen taşıdıkları belirlenmiştir. Buna göre OXA tipi karbapenemazların dağılımında bölgesel farklılıkların olabileceği görülmektedir⁸⁷.

OXA-51 kodlayan gen *A.baumannii* izolatlarında intrinsik olarak bulunmaktadır ve bu genin upstream bölgesine yerleşmiş ISAbal’in promoter olarak karbapenem direnci ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da karbapenem dirençli izolatlarımızın tamamında ISAbal segmenti bulduk. Farklı çalışmalarda ISAbal’in OXA-51 dışındaki genlerin de upstreamine yerleşip karbapenemaz üretimini indüklediği gösterilmiştir. ABD’de Higgins ve arkadaşlarının yaptıkları (2009), beş kıtadan izole edilen 492 karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatının karbapenemaz genleri ve moleküler epidemiyolojisinin araştırıldığı bir çalışmada, bütün izolatların OXA-51 kodlayan gen taşıdığı, 304 izolatın ayrıca OXA-23, OXA-58 ve OXA-40 genlerinden birini taşıdığı; ISAbal’in 193 izolatta OXA-51 geninin upstreaminde yer aldığı ancak 5 izolatta OXA-40, 3’ünde OXA-23, 2’sinde OXA-58 kodlayan gen içeren izolatlarda ve direnç geni gösterilemeyen 183 izolat ve karbapenem duyarlı 7 izolatta da bulunduğu tespit edilmiştir⁸⁸.

Biz bu çalışmada karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarının klonal ilişkisini PFGE yöntemi ile inceledik. İncelenen 55 suşun 16 farklı klonda toplandığını ve

suşların 29'unun "A" klonunda yer aldığını tespit ettik. Tüm dünyada karbapenem dirençli *A.baumannii* suşları arasındaki klonal ilişkiyi tespit etmek için PFGE ile yapılan moleküler çalışmalarda bölgesel ve ulusal farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Yang ve arkadaşlarının Kore'de Karbapenem dirençli 49 izolat ile yaptıkları çalışmada, PFGE yöntemi ile suşların tamamının klonal ilişkili olduğu belirlenmiştir⁸⁶.

Buna karşın, Pournaras ve arkadaşlarının Yunanistan'da yaptıkları çalışmada 17 Karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatının PFGE ile incelenmesi sonucu 6 farklı klon tespit etmişlerdir⁸⁵.

Ülkemizde ise Gür ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Ankara'da izole edilen ve OXA-58 tipi karbapenemaz üreten suşların tamamı PFGE yöntemi ile eş veya benzer bant paterni vermiştir. İstanbul'da izole edilen ve OXA-58 kodlayan gen içeren suş ise Ankara'daki suşlardan farklı bant profili göstermiştir. OXA-23 tip karbapenemaz üreten İstanbul (25) ve Ankara (1)'da izole edilen suşlar ise PFGE ile klonal ilişkili olarak bulunmuş ve bu klonun iki farklı şehirde dağıldığı düşünülmüştür⁸⁷.

Karbapenem dirençli *A.baumannii* suşları arasındaki klonal ilişkiyi tespit etmek için PFGE yöntemini kullandığımız bu çalışmada hastanemizde yerleşik bir klon olduğunu ve bu klonun hastanemizin farklı kliniklerinde yerleştiğini ve çeşitli hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olduğunu tespit ettik.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hastane enfeksiyonlarından izole edilen Karbapenem dirençli 55 *A.baumannii* izolatının karbapenemaz enzimini kodlayan *bla*_{OXA} genlerinin subgruplarının multipleks PCR, *ISAbal1* segmentinin ise tek tüp PCR yöntemi ile araştırıldığı ve elde edilen direnç kalıpları ile bu suşlara ait PFGE polimorfizminin muhtemel bir klonal yayılıma ışık tutabilmek amacı ile karşılaştırıldığı bu çalışmada,

1- Hastanemizdeki Karbapenem dirençli 55 *A.baumannii* izolatının tamamının *bla*_{OXA-51} tipi karbapenemaz kodlayan gen taşıdığı,

2- Ayrıca bu suşların hepsinin karbapenemaz kodlayan genlerin promoteri olan *ISAbal1* segmentini de bulundurduğu,

3- Ülkemizde özellikle Ankara'da yaygın bulunan *bla*_{OXA-58} tipi genlerin bölgemizde daha az sıklıkta (%7.27) görüldüğü, *bla*_{OXA-24} geninin ise %5.45 sıklıkta görüldüğü tespit edilmiştir

4- Marmara bölgesi ile İstanbul'da daha çok görüldüğü bildirilen *bla*_{OXA-23} genlerinin bölgemiz izolatlarında görülmediği

5- *bla*_{OXA-51} tipi karbapenemaz kodlayan gen taşıyan Karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarının 16 PFGE kümesi içerisinde toplandıkları ve en büyük kümeyi izolatların %52.72'sini içeren A kümesinin oluşturduğu

6- Bu küme içerisinde ve diğer küçük kümelerde hastanemizin farklı kliniklerinden izole edilen suşların yer almasının hastanemizde yerleşik bir klon olduğu ve bu klondaki izolatların hastane ortamında yayılarak hastane enfeksiyonlarına yol açtığı, ayrıca özellikle A kümesi içerisindeki subtip sayısının fazla olmasından dolayı bu klonun uzun süredir hastanemizde bulunduğu sonucuna varılmış olup, sonuç olarak; mevcut epidemiyolojik veriler esas alınarak hastanede yerleşik olduğu görülen *A.baumannii* suşunun çevresel örneklerden yapılacak izlem çalışması ile kaynak tespitinin yapılması ve önleyici tedbirlerin alınmasının ve benzer çalışmalarla hastaneye yeni giren klonlarında izlenerek, hastane florasında kalıcı yerleşime fırsat verilmeden kaynaktan yok edilmesinin gerektiği kanıtlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J:** Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, **1997** and **1998**, *Clin Infect Dis* **2000**;30(3):454-60.
2. **Bergogne-Berezin E, Towner KJ:** Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features, *Clin Microbiol Rev* **1996**;9(2):148-65.
3. **Başustaoğlu A, Özyurt M:** Nozokomiyal patojen olarak Acinetobacter'lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri, *Hastane Enfeksiyon Derg* **1998**;2(2):288-93.
4. **Ferrara AM:** Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia, *Int J Antimicrob Agents* **2006**;27(3):183-95.
5. **Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM:** CDC definitions for nosocomial infections, *Am J Infect Control* **1988**;16(3):128-40.
6. **Koneman EW, Allen SD, Janda WM.** Color Atlas and Of Diagnostic Microbiology Sixth Edition , Lippincott, Philadelphia **2006** S.305-323
7. **Lawrence C. Book review:** Medicine and victory:British military medicine in the second World War. *Medical History*. **2005 July** 1;49(3): 372-373
8. **Goozner M.** From The 800 Million Pill –Me Too! *MedGenMed*. **2004**; 6(2):57
9. **Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM.** CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* **1988**;16:28-140.
10. **Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH.** Nazokomiyal Acinetobacter enfeksiyonları. *Flora* **1999**;4:170-6.
11. **Weinstein RA:** Nosocomial infection update. *Emerg Infect Dis* **1998**;4:416-20.
12. **Yalçın AN.** İnfeksiyon kontrolünde maliyet analizi. **Doğanay M, Ünal S** (Editörler). *Hastane enfeksiyonları'nda 1. baskı*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; **2003**.s.125–34.
13. **Peşken Y.** Hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. **Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H** (Editörler). *Sterilizasyon, dezenfeksiyon ve hastane enfeksiyonları'nda*. Samsun: Deomed Medikal Yayıncılık; **2002**. s.203–13.
14. **Özer B.** Trakya Üniversitesi Hastanesi Merkez Yoğun Bakım Ünitesi Hastane İnfeksiyon Sürveyansı ve İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinin Antimikrobiyal Duyarlılıkları ve Serotiplendirmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; **2005**.
15. **Biçmen C, Şenol G, Eriş FN, Florat N.** Bir göğüs hastalıkları eğitim hastanesinde yatan hastaların çeşitli örneklerinden soyutlanan gram negatif çomakların antibiyotiklere duyarlılıkları ve karbapeneme direnç özellikleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2004**;34:37–45.
16. **Alp E, Esel D, Yıldız O, Voss A, Melchers W, Doğanay M.** Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream isolates in a Turkish University Hospital. *Scand J Infec Dis* **2006**;38:335–40.

17. **Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Taley JT, Williams St.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th (International) Ed. Baltimore: *Williams and Wilkins* **1994**;129.
18. **Bergogne-Berezin E. and Towner K.J.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*. **1996**; 148-165.
19. **Bartual S.G., Seifert H., Hippler C., Luzon M.A.D., Wisplinghoff H., Rodriguez-Valera F.** Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* **2005**; 43:7382-4390.
20. **Forbes B.A., Sahn D.F., Weissfeld A.S.** *Acinetobacter, Chryseomonas, Flaviomonas* and *Stenotrophomonas*. *Diagnostic Microbiology-Bailey and Scott's. 11th* **2002**; 378-383.
21. **Bahar İH, Esen N.** *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. İçinde: **Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M** (Editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi **2008**; 2195-2201.
22. **Schreckenberge PC, Von Graevenitz A.** *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella,* and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: **Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, eds.** *Manuel of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM pres **2003**;749-779.
23. **Bergogone-Berezin E, Towner KJ.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogenes: microbiological and epidemiological features. *Clin Microbiol Rew* **1996**;(2):48-165.
24. **Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F.** Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **2005**; 43 (9):4382-4390.
25. **Towner KJ.** *Acinetobacter*. In: **Collier L, Balows A, Susman M, eds.** *Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9 th ed. London:**1998**;1229-1239.
26. **Berezin BE, Towner KJ.** *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* **1996**;9:148-65.
27. **Towner KJ.** *Acinetobacter*. In: **Collier L, Balows A, Susman M (Eds.)**. *Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9 th ed. London: Arnold; **1998**; 1229-39.
28. **Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM.** Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp. and comparison with Herrellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol* **1994**;13:2353-8.
29. **Schreckenberger PC, Graevenitz A.** *Acinetobacter, Achromobacter, Alcaligenes, Moraxella, Methylobacterium,* and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: **Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (Eds.)**. *Manuel of Clinical Microbiology*. 7 th ed. Washington DC: ASM pres; **1999**; 539-60.
30. **Hanlon GW.** The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. *Lett Appl Microbiol*. **2005**;41(5):375-378.
31. **Allen DM, Hartman BJ.** *Acinetobacter* species. In: **Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds.** *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6 th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2005**;2:2632-2636.
32. **Weaver R, Actis LA.** Identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* **1994**;32 (7): 1833-1838.
33. **Goel VK, Kapil A.** Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane Proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiol* **2001**;1:16-23.

34. **Vahapoglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksal I.** Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol* **2001**;50:642-645.
35. **Lisa L. Maragakis^{1,2} and Trish M. Perl^{1,2}.** *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Clinical Infectious Diseases* **2008**; 46:1254–63.
36. **Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B.** Bacteriological, clinical, and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* **2003**;54:39–45.
37. **Karshgil T, Balci İ.** Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarında antibiotik direnci. *İnfeksiyon Dergisi* **2000**;14:511-4.
38. **Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B.** Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* **2003**;54(1):39–45.
39. **Bergogne-Berezin E. and Towner K.J.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*. **1996**; 148-165.
40. **Mulin B., Talon D., Viel J.F., Vincent C., Leprat R., Thouverez M., Michel- Briand Y.** Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1995**; 14: 569-57.
41. **Seifert H., Dijkshoorn L., Gerner-Smidt P., Pelzer N., Tjernberg I., Vanechoutte M.** Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology* **1997**; 35: 2819-2825.
42. **Yücesoy M, Yuluğ N, Kocagöz S, Ünal S, Çetin S, Çalungu S and Study Group.** Antimicrobial resistance of gram-negative isolates from intensive care units in Turkey. Comparison to previous three years. *J Chemotherapy* **2000**;12:294-8.
43. **Kaul R., Burt J., Cork L., Dedier H., Garcia M., Kennedy C., Brunton J., Krajden M., Conly J.** Investigation of a multiyear multiple critical care unit outbreak due to relatively drug-sensitive *Acinetobacter baumannii*: risk factors and attributable mortality. *J Infect Dis* **1996**; 174: 1279-1287.
44. **Munoz-Price LS, Weinstein RA.** *Acinetobacter* Infection. *N Engl J Med* **2008**;358 (12):1271-1281.
45. **Akalın H.** Nozokomiyal Pnömoni-II: Tedavisi ve Önleme. *Hastane İnfeksi Derg* **2004**;8:215-224.
46. **Towner KJ.** Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* **1997**;46:721-726.
47. **Levin AS, Barone AA, Penco J, et al.** Intravenous colistin therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* **1999**;28:1008-1011.
48. **Aksaray S., Dokuzoguz B., Güvener E. Et al.** Surveillance study of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2000**; 45: 695-699.
49. **Günseren F., Mamikoglu L., Öztürk S. et al.** Surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1999**; 43: 373-378.

50. **Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J.** Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* **2000**;31:101-106.
51. **Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ.** Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* **2003**;36:1268-1274.
52. **Falagas ME, Kasiakou SK.** Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care* **2006**;10 (1):27.
53. **Akalm H.** Nosokomiyal Pnömoni-II: Tedavisi ve Önleme. *Hastane İnfeksi Derg* **2004**;8:215-224.
54. **Villers D, Espaze E, Coste-burel M, et al.** Nosocomial *Acinetobacter baumannii* Infections: Microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med* **1998**;129:182-189.
55. **Levin AS, Levy CE, Manrique AEI, Medeiros EAS, Costa SF.** Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents* **2003**; 21:58-62.
56. **Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, et al.** Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect* **2006**;53:274-278.
57. **Akalm H.** Çoğul Dirençli Gram Negatif Bakteriler. İn. **Doğanay M, Ünal S.** *Hastane İnfeksiyonları*. Ankara: Bilim TıpYayınevi **2003**:269-289.
58. **Levin AS.** Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin Microbiol Infect* **2002**;8:144-153.
59. **Hogg GM, Barr JG, Webb CH.** In-vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **1998**;41:494-495.
60. Tygacil Product Insert. Philadelphia (PA): *Wyeth Pharmaceuticals Inc* **2005**.
61. **Peleg AY, Potoski BA, Rea R, et al.** *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother* **2007**;59:128-131.
62. **Dökmeci İ.** *Kemoterapötik ilaçlar.* **Dökmeci İ** (Editör). Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar'ında. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri; **1992**.s.705-86.
63. **Chambers HF. Other beta-lactam antibiotics.** İn: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.).** *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; **2000**; 264-72.
64. **Gilbert DN.** Aminoglycosides. İn: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.).** *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; **2000**; 279-306.
65. **Hooper GC.** Quinolones. İn: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.).** *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; **2000**; 404-19.
66. **Speller DCE, Humphreys H.** Hospital-acquired infection. İn: **Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.).** *Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections.* 9th ed. London: Arnold; **1998**; 187-229.
67. **Bonomo R.A, Szabo D.** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **2006**; 43:49-56.

68. **Schreckenberger PC, Von Graevenitz A.** *Acinetobacter, Achromobacter, Alcaligenes*. In: Baron EJ, Pfaller MA; Tenover FC, Tenover RH (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press; **2000**; 749–60.
69. **Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM.** Description of Leeds Acinetobacter Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important Acinetobacter spp. and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol.* **1994**;32(10):2353–8.
70. **Livermore DM.** Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis* **1991**; 78:7–16.
71. **Bradford PA.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **2001**; 14:933–51.
72. **Özgür GÜLER, Osman AKTAŞ, Hakan USLU.** Klinik örneklerden izole edilen bakterilerden beta-laktamaz varlığının ve çeşitli antibiyotik gruplarına karşı duyarlılıkların araştırılması *ANKEM Derg* **2008**; 22(2):72-80.
73. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39: 1211-33.
74. **Livermore DM.** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **1995**; 8: 557-84.
75. **Gür D.** Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfek Derg* **1997**;1: 38-45.
76. **Medeiros AA.** Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* **1997**; 24: 19-45.
77. **Yuluğ N.** Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. *ANKEM Derg* **1997**; 11: 205-7
78. **Livermore DM.** Beta-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *JAntimicrob Chemother* **1998**; 41: 24-41.
79. **Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalm HE, Livermore DM.** Transferable production of PER-1 beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa. *J Antimicrob Chemother* **1995**; 35: 281-94. 39.
80. **Vahapoğlu H, Hall LM, Mülazımoğlu L, et al.** Resistance to extended spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase in Salmonella typhimurium from Istanbul, Turkey. *J Med Microbiol* **1995**; 43: 294-299.
81. **L. Poirel and P. Nordmann.** Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology **2006**.10.1111/j.1469-0691.01456.
82. **Bimbaum J, Kahan F M, Kroop H.** Carapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. *Am J Med*, **1985**; 78(6): 3–21.
83. **Harold C, Neu M D.** Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am J Med*, **1985**; (2A): 2–13.
84. **Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL.** Identification of Acinetobacter baumannii by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of clinical microbiology*.**2006**; 2974-2976.

85. **Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonmidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis N, Legakis NJ, Tsakris A.** Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2006**; 57:557-561 .
86. **Yang HY, Lee HJ, Suh JT, Lee KM.** Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 B-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J*. **2009**; 50(6):764-770.
87. **Gür D, Korten V, Ünal S, Deshpande LM, Castanheira M.** Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY program sites. *Journal of Medical Microbiology*. **2008**; 57:1529-1532.
88. **Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H.** Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J.Antimicrob. Chemother.***2010**;65:233-238.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1987 yılında Adana’da doğdu. İlköğretimi Cebesoy İlköğretim okulunda tamamladı, İncirlik Lisesi’nde okudu. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başladı.