

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACINETOBACTER* SPP.
KÖKENLERİNDE DİRENÇ GENLERİNİN
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

Aydan AYDIN HİZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACINETOBACTER* SPP.
KÖKENLERİNDE DİRENÇ GENLERİNİN
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI

Aydan AYDIN HİZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr.Mete EYİĞÖR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-4006 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;


Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 31 Ocak 2020

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mete EYİĞÖR
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Derya MUTLU
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç.Dr.Yeşim ÇEKİN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun...../...../..... tarih ve/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
EnstitüMüdürü

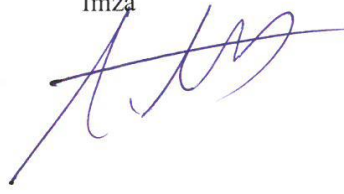
ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

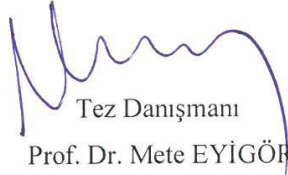
Aydan AYDIN HİZEL

İmza



Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mete EYİĞÖR

İmza



TEŞEKKÜR

Eđitimim süresince çok değerli bilgilerini ve mesleki tecrübelerini esirgmeden paylaşan her zaman kendisine saygı ve minnettarlık duyduğum bana danışmanlık eden Sayın Prof. Dr. Mete EYİGÖR'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Hořgörölü bir ortamdaengin tecrübeleriyle bizlere yön veren, ufkumuzu genişleten, vizyonumuza önderlik eden, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan çok kıymetli öğretim üyelerim ve çalışma arkadaşlarıma, eğitim sürem boyunca kapısını aşındırdığım SBAUM laboratuvarı hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma canı gönülden teşekkürlerimi sunarım. Yine her konuda tecrübelerini, yardımlarını ve bilgilerini esirgmeden idari her türlü işimizde bize yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Enstitüsü idari personel ve çalışanlarına teşekkür ederim.

En başta bana bu fırsatı tanıyan, eğitim hayatımda önemli bir kademe atlamama destek olan, azmine ve çalışkanlıklarına hayran olduğum Özel Antalya Medical Park Hastane Kompleksi Laboratuvar doktorları Sayın Dr. Öğretim Üyesi Meltem DEMİR ve Uzm.Dr.Bekir UYGUN'a, yine beraber çalıştığım her konuda bana destek olan, o olmasa asla bu yola çıkamayacağım çalışma arkadaşım Özlem Dönmez'e, tüm Medical Park çalışma arkadaşlarıma ve laboratuvar sorumlusu Levent Yeşilyurt'a canı gönülden teşekkür ederim.

Her türlü sıkıntımı dinleyen, çözüm arayan, destek olan, ben pes ettiğimde bile asla pes etmeyen, beni mental olarak pozitifliğe iten yakın arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında sevgilerini ve desteklerini asla esirgemeyen aileme, eğitim sürem sonuna doğru büyük bir kayıpla baş etmek zorunda kalsamda varlığını her zaman hissettiğim babama canı gönülden sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Hayatı beraber paylaştığım, her zaman, ihtiyacım olduğu heranda çok büyük bir sabır ve destekle yanımda olan eşime ve büyürken yanında olamadığım her dakika için affına sığındığım anlayışlı oğlum Ali Aras'a sevgi, minnet ve şükranla çok teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: *Acinetobacter* spp. çoklu antimikrobiyal direnç gösterebilen ve hastaneden kazanılmış enfeksiyonlarda önemli olan bir patojendir. Çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter* spp. suşlarının tedavisinde karbapenemler önemli bir seçenektir. Çalışmamızda, karbapenem dirençli *Acinetobacter* spp. suşlarında karbapenem direncine neden olan genlerin PCR yöntemiyle araştırma amaçlanmıştır.

Yöntem: Özel Antalya Medical Park Hastane Kompleksinde Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji bölümünde değerlendirilen kültür sonuçlarında üremesi olan izolatlar Vitek 2 (Biomerioux) otomatize sistemde karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanan, 48 adet köken çalışmaya dahil edildi. İmipenem ve meropenem direnci için ayrıca E-test yapıldı ve MİK değerleri belirlendi. Örnekler -20°C'de saklandı. DNA eksraksiyonu kaynatma yöntemi ile yapıldı. In-house PCR yöntemi ile karbapenem direnç genleri araştırıldı.

Bulgular: Hastaların 16 sı kadın (% 33,3), 32 si erkektir (% 66,7). Yaş ortalaması 51,83'tür. Çalışmaya dahil edilen hasta numunelerinde altı trakeal aspirat (% 33,33), on dört kan (% 29,17), bir plevra (% 2,08), altı katater (% 10,42), üç yara yeri (%6,25), iki dren (% 4,17), iki balgam (% 4,17),) , üç idrar (% 6,25), bir bos kültürü (%2,08) vardır. OXA- 23 ve OXA-51 genine 48 hastanın hepsi sahiptir. IsabA1 genine sahip otuz iki köken, VIM direnç genine sahip sekiz köken (% 16,6) ,OXA-58 genine sahip iki köken (% 4,16), GIM genine sahip iki köken (% 4,16), SIM genine sahip iki köken (% 4,16) tespit edilmiştir. OXA-24, NDM-1, SPM-1 genine sahip hiçbir köken bulunmamıştır.

Sonuç: *Acinetobacter baumannii* direnci giderek artmaktadır. Direncin moleküler epidemiyolojisinin saptanması gerekli izolasyon önlemlerinin kesintisiz bir şekilde uygulanması bu bakterinin sebep olduğu enfeksiyonların önlenmesinde etkili olur. Her hastanenin direnç profili değişiklik gösterdiğinden benzer çalışmaların ülke çapında yapılması faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter* spp., karbapenem direnç geni, E-test, PCR, Jel elektroforezi

ABSTRACT

Objective: *Acinetobacter* spp. is an important pathogen for hospital acquired infection known for its resistance for multiple antimicrobial agents. Carbapenem is an important option in the treatment of infection caused by multidrug resistant *Acinetobacter* spp. In our study, genes causing carbapenem resistance of *Acinetobacter* spp. strains were investigated by a PCR method.

Method: The isolates with culture results evaluated in Microbiology Department of Private Antalya Medical Park Hospital Complex Central Laboratory were included in 48 Vitek 2 (Biomérioux) automated system identified as carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. E-test was also performed for imipenem and meropenem resistance and MIC values were determined. Samples were stored at -20°C. DNA extraction was performed by boiling. Carbapenem resistance genes were investigated by in-house PCR method.

Results: Sixteen patients were female (33.3%) and 32 were male (66.7%). The mean age is 51.83 years. Six tracheal aspirate (33.33%), fourteen blood (29.17%), one pleura (2.08%), six catheter (10.42%), three wound (6.25%), two drain (4.17%), two sputum (4.17%), three urine (6.25%), one CSF culture (2.08%) were included in the study. All 48 patients had the OXA-23 and OXA-51 genes. Thirty-two strains had ISAbA1 gene, 8 strains had VIM resistance gene (16.6%), two strains had OXA-58 gene (4.16%), two strains had GIM gene (4.16%), two strains had SIM gene (4.16%). OXA-24, NDM-1, and SPM-1 genes were not found in any strain.

Conclusion: *Acinetobacter baumannii* resistance is gradually increasing. Continuous application of isolation measures required to determine the molecular epidemiology of resistance is effective in preventing infections caused by this bacterium. As each hospital's resistance profile varies, it would be beneficial to conduct similar studies throughout the country.

Key words: *Acinetobacter* spp., Carbapenem resistance gene, E-test, PCR, Gel electrophoresis

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLOLAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Tarihçe ve Taksonomi	3
2.2. Genel Özellikleri	3
2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri	4
2.4. Mikrobiyolojik Özellikleri	4
2.5. Epidemiyoloji	5
2.6. Virülans	5
2.7. Tanımlayıcı özellikleri	6
2.8. Antibiyotiklere Karşı Direnç	6
2.8.1.İntrinsik Direnç (Doğal Direnç)	9
2.8.2. Kazanılmış Direnç	9
2.8.3. Çevre ve Koşullara Bağlı Direnç	9
2.9. <i>Acinetobacter</i> Türlerinde Antibiyotiklere Direnç Sorunu	10
2.9.1. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	10
2.9.2. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları	19
2.9.3. Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı	19
2.10. E-TEST	22
2.10.1. İnokulum Hazırlanması	23
2.10.2. Test Şeritlerinin Plaklara Yerleştirilmesi	24

2.10.3. Plakların Okunması ve Sonuçların Yorumlanması	25
2.11. PCR	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarının tanımlanması ve karbapenem direncinin saptanması	33
3.2. DNA İzolasyonu	35
3.3. PCR	35
3.4. Jel Elektroforezi	37
3.5. Sekans Analizi	39
3.6. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Karbapenem EUCAST 2018 sınır değerleri	34
Tablo 3.2.	PCR iğeriği	35
Tablo 3.3.	Kullanılan primerlerin isimleri ve baz dizilimleri	36
Tablo 3.4.	Termal cyclusler siklusları	37
Tablo 4.1.	Direnę genlerinin birlikte bulunma durumları	42
Tablo 4.2.	<i>Acinetobacter baumannii</i> kökenlerinin antibiyotik direnę oranları	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Beta-laktam halkası	10
Şekil 2.2.	Beta-laktam grubu antibiyotikler	10
Şekil 2.3.	Penisilin ve sefalosporin antibiyotiğinin beta-laktamaz enzimi ile parçalanması	12
Şekil 2.4.	Gram negatif bakteri hücre duvar yapısı	14
Şekil 2.5.	Değişik beta-laktam halkası içeren bileşikler	17
Şekil 2.6.	Karbapenem grubu kimyasal yapısı	18
Şekil 2.7.	E-test stripleri dizilim seçenekler	24
Şekil 3.1.	E-test uygulaması	34
Şekil 3.2.	E-test <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 suşu	34
Şekil 3.3.	Wealtec elite 300 plus Elektoroforez cihazı	38
Şekil 3.4.	Wealtec UV transsilluminatör	38
Şekil 3.5.	Jel Eletroforez UV görünümü	38
Şekil 3.6.	Sekans analizi	39
Şekil 4.1.	Çocuk ve yetişkin hasta dağılımı	40
Şekil 4.2.	Cinsiyet dağılımı	41
Şekil 4.3.	Materyal dağılımı	41
Şekil 4.4.	Kliniklerden gelen örneklerin dağılımı	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	:	ATP-Binding Cassette
AbOmpA	:	Dış Membran Protein A
ATCC	:	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CDC	:	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	:	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPS	:	Kapsüler Polisakkaritler
ÇİD	:	Çoklu İlaç Direnci
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EUCAST	:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GN	:	Gram Negatif
GP	:	Gram Pozitif
GSBL	:	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar
GIM	:	German imipenemase
IMI	:	İmipenem-Hydrolyzing Beta-Lactamase
KPC	:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemaz
LPS	:	Lipopolisakkarid
MATE	:	Multidrug and Toxic compound Extrusion
MBL	:	Metallo-beta-laktamazlar
MDR	:	Multi-Drug Resistance

MFS	:	Major Facilitator
MHA	:	Müller Hinton Agar
MİK	:	Minimum Engelleyici Konsantrasyonunu
NDM -1	:	New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz
NMC	:	Not metallo enzyme Karbapenemaz
OMP	:	Outer Membrane Protein
OMV	:	Dış Zar Kesecikleri
OXA	:	Oxacillin-Hidroliyzing
PBP	:	Penisilin bağlayıcı protein
PCR	:	Polimeraz Zincir (Chain) Reaksiyonu
PDR	:	Pan-Drug Resistance
PLD	:	Fosfolipaz D
RND	:	Resistance-Nodulation-Division
SME	:	<i>Serratia marcescens</i> Enzimi
SMR	:	Small Multidrug Resistance
SPM-1	:	Sao Paulo MBL
TBE	:	Tris Borik Asit EDTA
TSB	:	Triptik Soy Broht
VIM	:	Verona İntegron–Encoded Metallo-Beta-Lactamase
XDR	:	Extreme-Drug Resistance

1. GİRİŞ

Antibiyotik direnci kontrolsüz ve yaygın antibiyotik kullanımına sonucunda günümüzde büyük sorun haline gelmiştir (Ragbetli, Güdücüoğlu, ve Parlak. 2019). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde sıkça görülen hastane enfeksiyonlarında çoklu ilaç direnci (ÇİD) belirlenen mikroorganizmalar daha fazla önem kazanmıştır (Ragbetli, Güdücüoğlu, ve Parlak. 2019). Genelde hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen mikroorganizmaların başında *Acinetobacter baumannii* yer almaktadır (Kızırlarlanoğlu ve ark. 2016). Hastane ortamında çok uzun süre canlı kalması ve hastadan hastaya kolaylıkla bulaşabilmesi sebebiyle son yıllarda hastane kaynaklı bir patojen olarak önemi artmıştır (Kızırlarlanoğlu ve ark. 2016). Dirençli *Acinetobacter baumannii*'nin sebep olduğu enfeksiyonlar mortalitenin artmasına, tedavi maliyetinde artış ve hastane yatış süresinin uzamasına gibi sorunlara sebep olmaktadır (Ragbetli, Güdücüoğlu ve Parlak. 2019).

Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* oranı tüm dünyada ve ülkemizde giderek artmaktadır. Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan yıllık analizlerde *Acinetobacter baumannii* 2014 yılında listeye dahil edilmiştir. Karbapenemlere direnç 2014-2015 yılında %89 iken, 2016 yılında %92,3, 2018 yılında ortalama olarak %95 civarındadır (https://www.tmc-online.org/images/37_kongre/gokhan_guzel.pdf).

Acinetobacter türlerinde karbapenemleri de içeren beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin ana mekanizması ya kromozom ya da plazmid tarafından kodlanan beta-laktamaz üretimidir (Çiftçi ve ark. 2011). *Acinetobacter* türlerinde karbapenemlere direnç; beta-laktamaz üretimi, dış membran porin (omp) kaybı, efflux pompası ve penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik gibi çeşitli mekanizmalar ile olmaktadır (Telli ve ark 2017).

Direncin moleküler temelinde, kombine biçimde hem oksasilinaz (OXA) tipi karbapenemazların sentezlenmesinde artış, hem de enzimatik olmayan mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. OXA tipi karbapenemazlar, karbapenem direnciyle ilişkili beta-laktamaz üretimine neden olan grup 2 (Ambler sınıf D) enzim kümeleridir. Bu kümeyi temsilen de karbapenem hidrolize eden enzimlerle ilişkili, genellikle doğal olarak

bulunan OXA-51 ve kazanılmış OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 öne çıkmaktadır (Demirci ve Yiğın 2019). Ayrıca sınıf A (TEM, SHV ve GES), sınıf B (IMP, VIM ve SIM), sınıf C (AmpC) tipi beta laktamazlar da karbapenem direncinden sorumludur.

Karbapeneme dirençli suşlar, mortalite hızı yüksek ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olduğu için dirence sebep olan karbapenemaz genlerinin dağılımının incelenmesi önemlidir (Demirci ve Yiğın. 2019).

Ayrıca klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri, çoklu dirence sahip suşlar için güvenilir olmayabilmekte ve sonuçların alınması için günler gerekmektedir. Moleküler biyoloji temelli tekniklerle suşun taşıdığı gen, genotipik olarak, klasik yöntemlere göre daha hızlı belirlenebilmektedir (Demirci ve Yiğın. 2019).

Bu bilgiler ışığında, karbapenem direnci saptanan *A. baumannii* suşlarında sınıf D ve Sınıf B karbapenemaz genlerinin de içinde bulunduğu 11 adet gen dağılımını In-house polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile incelemeyi ve epidemiyolojik veri sunmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Taksonomi

İlk olarak 1911 senesinde Beijerinck topraktan izole ettiği bu bakteriyi *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırmıştır. Daha sonra 1954 senesinde Brisou ve Prevot adındaki bilim insanları *Acinetobacter* spp. adını önermişlerdir (Parker.1983). Bu bakteri geçmişten günümüze dek 15 farklı isimle adlandırılmış ve birçok kez taksonomik değişikliğe uğramıştır (Bergogne-Bérézin ve Joly-Guillou 1991). Bunlardan en iyi bilinenleri, *Herellea vaginicola/Mima polymorpha*, *Bacterium anitratum*, *Achromobacter*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes*, *B5W* ve *Moraxella lwoffii*, *Moraxella glucidolytica*'dir (Berezin BE 1996). *Acinetobacter* spp. türü günümüzde taksonomik araştırmalar sonucu *Psychrobacter*, *Moraxella* ve ilgili başka türlerle beraber *Moraxellaceae* ailesi içinde bulunmaktadır (Berezin BE. 1996).

Bouvet-Grimont 1986 yılında DNA-DNA hibridizasyonu ile beraber, beslenme karakterlerini dikkate alarak 12 değişik grupta sınıflandırmıştır (Bouvet ve ark. 1990).

Geçmişten günümüze dek DNA-DNA hibridizasyonu tekniğine dayalı araştırmalara göre 33 genomik *Acinetobacter* spp. türü tanımlanmıştır (Peleg AY, Seifert H. 2008). *Acinetobacter* türleri arasında en önemli ve en sık klinik tablolara sebep olan etken *A.baumannii*'dir. Rutin laboratuvar şartlarında, üreme özelliklerinin yanında biyokimyasal reaksiyonlara göre de *Acinetobacter* türleri ayırt edilmektedir.

2.2. Genel Özellikleri

Acinetobacter türü bakteriler gram-negatif kokobasil olarak görünürler. Laboratuvarında kültür ortamında 35-37°C'de çoğalıp büyüebilirler. Fimbriaları vardır. Hareketsizdirler. Üreme döngülerinin logaritmik fazında 1-1,5 x 1,5-2,5 µm ebatında basil şeklinde fakat duraklama fazında kokobasiller şeklinde görülürler. Genellikle düzgün, renksiz ve bazen mukoid koloniler oluşturur.

2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Acinetobacter türü bakteriler fermentasyon yapmayan, zorunlu aeroptur. İndol, DNaz ve oksidaz negatif bunun yanında katalaz pozitifdir. Birçok *Acinetobacter* türü nitratları nitritlere indirgeyemez (Schreckenberger PC ve ark. 2007).

Diğer nonfermantatif olan bakterilerden ayırt etmede yapılacak olan ilk test oksidaz testidir. *Acinetobacter* spp. laboratuvarlarda genel olarak rutinde kullanılan koyun kanlı agar, MacConkey besiyeri ve triptik soy agar besiyerinde kolaylıkla ürerler. Koyun kanlı agarda 0,5 ile 2 mm çapında opak görünümlü veya şeffaf, zeminden kabarık koloniler oluştururlar.

Acinetobacter türlerini çevreden ve klinik örneklerden ayırt edip izole edebilmek için, nitrat ve asetat içeriğine sahip zenginleştirici sıvı mineral besiyeri kullanılabilir (Baumann. 1968). Polimikrobiyal etkene sahip enfeksiyonlardan *Acinetobacter* türlerini ayırt edip izole etmek için, sık olarak seçici-ayırt edici besiyerleri olan Herellea agar (Difco) ve Leeds *Acinetobacter* spp besiyerleri kullanılmaktadır (Jawad ve ark. 1994). *Acinetobacter* türlerini tanımlamak için kullanılan tekniklerden DNA-DNA hibridizasyon metodu, standart referans yöntem olarak tercih edilmektedir.

2.4. Mikrobiyolojik Özellikleri

Solunum aygıtı ile ilişkili bakteriyemi ve pnömonileri de içinde bulunduran genel enfeksiyonların etiyolojik etkenleridir. Suşlar genel olarak florokinolon; aminoglikozid, sefalosporin ve karbapenemler gibi sıkça kullanılan antibiyotiklere karşı dirençlidirler. Salgınlara yol açabilirler. Karbapenemaz aktivitesine sahip olan *A. baumannii*' nin enzimleri, kromozom ya da plazmidle dizgelenmiş ve birbirinden bağımsız OXA-58, OXA-24 ve OXA-23 simgeleri ile belirtilen klavulanik aside dirençli olan üç beta-laktamazdır. *A. baumannii* karbapenem direncinde payı olan karbapenemi hidrolize edebilen oksasilinaza da sahiptir. Beta-laktamazlara ilaveten, *A. baumannii* karbapenem direnci penisilin bağlayan proteinlerde ya da porinde oluşan değişiklikler neticesinde de gelişebilir. Bazı toplumlarda en etkili ilaçlar minosiklin ve kolistin olmasına rağmen, bu ilaçlara da artık direnç bildirilmeye başlanmıştır (Hawley ve ark. 2008).

2.5. Epidemiyoloji

A. baumannii, dünyada nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olan büyük yayılış gösteren 10 gram negatif bakteri arasındadır. Avrupa ve Amerika'daki tüm nozokomiyal enfeksiyonların % 2-10 'unu oluşturabilmektedir. *A. baumannii*' nin sebep olduğu hastane enfeksiyonlarının oranı geride kalan on yılda artış göstermiştir, benzer bir artış gösteren diğer hiçbir gram negatif bakteri yoktur (Johnson ve ark. 2016).

Doğada saprofitik olarak yaşayan *Acinetobacter* spp.'lerin beslenme ihtiyaçlarının basitliği, antiseptiklere ve dezenfektanlara karşı gelişen yüksek direnç, biyotik yüzeylerde olduğu gibi abiyotik ortamlarda da biyofilm geliştirebilme yeteneğiyle (çevre yüzeyleri ya da katater gibi tıbbi cihazlar), beş aya kadar kuru ve katı yüzeylerde hayatta kalma yeteneğiyle hastane enfeksiyonlarının sık nedeni oldukları düşünülmektedir (Nowak ve Paluchowska. 2015).

Acinetobacter spp. salgınları personellerin elleri ve kontamine aletler yardımıyla oluşabileceği gibi toplum kaynaklı enfeksiyon etkenlerinin hastaların eli yoluyla yayılması da etkili olabilir. *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarında kolonizasyon enfeksiyon oranı 10:1 iken MRSA enfeksiyonlarında bu oran 2:1 'dir. (Zeana ve ark. 2003). Bir *Acinetobacter* spp. enfeksiyonu ortaya çıktığında muhtemelen aynı klinikte çok sayıda kolonize hasta da mevcuttur. Yani bir salgın durumunda alınacak önlemler çok sayıda kolonize hasta olduğu için yetersiz kalabilecektir (Joly Guillou. 2005).

2.6. Virülans

Geçmişten bu güne kadar, *A. baumannii*' de tarif edilen yalnızca birkaç virülans faktörü olmuştur (Nowak and Paluchowska 2015). Virülans belirleyicileri arasında *A.baumannii* patojenitesinden sorumlu olan, lipopolisakkarid (LPS), kapsüler polisakkaritler (CPS), *A.baumannii* dış membran protein A (AbOmpA), dış zar kesecikleri (OMV), fosfolipaz D (PLD) ve biyofilm belirtilebilir (Nowak ve Paluchowska. 2015).

Acinetobacter baumannii, özellikle hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde, tüm gram negatif bakterilerinin neden olduğu hastane enfeksiyonlarının % 2 ile %10'undan sorumlu olduğu bildirilmektedir (Nowak ve Paluchowska 2015).

Acinetobacter baumannii, *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarının büyük çoğunluđuna neden olur, bunu *Acinetobacter pittii* ve *Acinetobacter nosocomialis* takip etmektedir (Novović ve ark. 2018).

Son yıllarda yapılış olan alışmalar, *A.baumannii*'nin daha virülan ve dirençli hale gelerek temel hastane enfeksiyonlarında tehdit oluşturduğunu göstermektedir. *Acinetobacter baumannii*'nin sebep olduğu enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisi sırasında yaşanan zorluklar; bu bakterinin tıbbi cihazlarda ve hastane ortamında kısıtlı şartlar altında bile hayatta kalabilme ve yaygın antibiyotik direnci geliştirebilme kabiliyetlerinden kaynaklanmaktadır. Birden farklı mekanizmalar ile birden çok antibiyotik grubuna direnç geliştirebilen *A.baumannii*'de meydana gelen bu direnç, beklenmedik fizyolojik ve fenotipik değişikliklere neden olabilmektedir (Gülşah. 2011).

2.7. Tanımlayıcı özellikleri

Gram boyamada kok ve veya kokobasil olarak görünür. MacConkey agarda iyi büyür. Hareketsizdir. Penisiline dirençlidir. Asit üretmesi glukozu hızlı bir şekilde kullandığını gösterir.

2.8. Antibiyotiklere Karşı Direnç

Acinetobacter spp. bakterileri, 1970'li yılların ilk zamanlarında nozokomiyal patojenler içinde yerini almıştır (ifti ve ark. 2011). Bunun yanında antimikrobiyal direncinin 1970'lerden beri kademeli olarak arttığı ifade edilmiştir (Nowak ve Paluchowska. 2015). Sonuç olarak da *A. baumannii* türü bakteriler Center for Disease Control and Prevention'de (CDC) belirtildiği üzere Amerika'nın en önemli hastane patojenlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, *A. baumannii*'ni sağlıkla ilişkili olan enfeksiyonların mortalite riskini % 8'den % 40'a kadar arttırmıştır (Nowak ve Paluchowska 2015).

Dirençli *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarının direnç mekanizmaları, epidemiyolojisi, risk faktörleri, tedavi etkinliği ve seçenekleri ile ilgili çok fazla çalışma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda dirençli *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarında antimikrobik direnci ifade edebilmek ve tanımlamakta "extreme-drug resistance (XDR)", "multi-drug resistance (MDR)"ve "pan-drug resistance (PDR)" gibi farklı terimler kullanılmaktadır.

Fakat bu terimler ile alakalı kabul edilmiş ulusal standart bir ifade ve tanım yoktur. Bunun yanında tıbbi literatürlerde farklı ifadeler kullanılmaktadır. Değişik yerlerde dirençli izolat oranlarındaki farklılıklar ve bunun yanında yeni potent antimikrobik ilaçların tercih edilmesiyle direnç tanımlamaları devamlı değişmektedir. Bu, araştırmacılar ve hekimler arasında bir dizi karışıklığa sebep olabilecek önemli derecede bir sorundur. Dünyada kabul görmüş sadece tek tip tanımlama olması gerektiği düşünülmektedir (Tünay, Tuna Demirdal. 2012). Yine 2006 ile 2011 yıllarında yapılan çalışmalara bakıldığında, zaman geçtikçe mikroorganizmaların değişik direnç mekanizmaları geliştirmesi, bunun yanında sahip olunan antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirmesine bağlı olarak XDR, PDR ve MDR direnç terimleri ile alakalı tanımların da değiştiği görülmüştür. İlk zamanlarda yapılan araştırmalarda MDR terimi mevcut antibiyotiklerden en az birine direnç olarak tanımlanmıştır. Zaman geçtikçe direnç oranlarında meydana gelen artışa bağlı MDR terimi sahip olunan antibiyotiklerin üçten fazlasına direnç ve hatta bazı araştırmalarda tigesiklin ve kolistin hariç tutularak mevcut antimikrobik ilaçlara karşı direnç olarak tanımlanmıştır. Bir süre sonra, PDR teriminin kullanılmasıyla, direnç tanımlamaları bir kez daha yeniden şekillenmiştir. MDR terimi mevcut antibiyotiklerin üçten fazlasına direnç olarak, PDR terimi de mevcut tüm antibiyotiklere direnç şeklinde tanımlanmıştır. Yeni antimikrobiklerin kullanılmaya başlanmasıyla ve ayrıca mikroorganizmaların bunlara karşı geliştirdiği direnç sebebiyle “extreme drug resistance (XDR)” gündeme gelmiştir. PDR terimi, tigesiklin, aminoglikozitler ve kolistin hariç tüm antibiyotiklere karşı direnç şeklinde ifade edilirken, XDR terimi de tüm mevcut antimikrobik olan ajanlara direnç olarak tanımlanmıştır. Fakat bazı yazarların ifadesine göre “pan” terimi Yunan dilinde hepsi, tüm veya her şey sözcükleri ile eş anlamlarda kullanılmakta ve İngilizce dahil başka dillerde de aynı anlamda kullanılmaktadır. Bu sebeple “extreme” teriminin pan terimi ile eş anlamda kullanılmaması gerektiği ifade edilerek direnç tanımlamalarına “extensive drug resistance (XDR)” terimi ilave edilmiştir. Bundan dolayı “extensive drug resistance (XDR)” terimi bir ya da iki antibiyotik dışında tüm antibiyotiklere direnç ve PDR terimi ise mevcut tüm antibiyotiklere direnç biçiminde tanımlanmıştır (Tünay, Tuna Demirdal. 2012).

İlk in-vitro araştırmalarda pek çok klinik izolat gentamisin, ampisilin, nalidiksik asit ve kloramfenikol gibi sıkça tercih edilen antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlı bulunmuş, fakat zaman içerisinde *Acinetobacter baumannii*'ye ait klinik izolatların direnç oranlarında artma gözlenmiştir. Günümüzde izolatların büyük bölümü üreidopenisilinler aminopenisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler, kinolonlar, çoğu aminoglikozidler, tetrasiklinler ve kloramfenikol gibi sık tercih edilen antibakteriyel ilaçlara dirençlidir (ifti ve ark. 2011).

Son yıllarda *Acinetobacter* spp.'de meydana gelen çoklu ilaç direnci (İD) *Acinetobacter*'in sebep olduğu enfeksiyonların tedavi süresinde karbapenemlerin (meropenem, imipenem) yoğun kullanımına sebep olmuştur. Fakat günümüzde *Acinetobacter* spp. klinik izolatlarında yüksek derecede karbapenem direnci dünyanın her yerinden bildirilmekte, bunun yanında da bazı izolatlar bütün geleneksel antibiyotik ilaçlara karşı dirençli bulunmaktadır. Son zamanlarda *A.baumannii* suşlarında polimiksin B ve kolistin direnci de bildirilmeye başlamıştır. Bu bildirimler bakterinin direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasının önemini ortaya koymuştur (ifti ve ark. 2011). *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarının tedavisindeki öncelikli zorluk, antibiyotik direncinin üstesinden gelmeye odaklanmaktadır. *Acinetobacter* spp. klinik tıpta etkili ampirik tedaviyi başlatan organizmalardan biridir (Wong ve ark 2017).

Acinetobacter spp.'nin antibiyotiklere olan genel direnci, nispeten dış zarında bulunan küçük boyuttaki ve çok az sayıda bulunan porinden kaynaklanır. Azalan dış zar porin içeriği nedeniyle *Acinetobacter* spp.'nin antibiyotiklere karşı geçirgenliği, diğer gram negatif organizmalara oranla çok daha düşüktür.

Acinetobacter spp. lerin antibiyotiklere karşı genel direnci, kısmen dış zarındaki çok az sayıda ve büyüklükteki porlardan kaynaklanmaktadır. Azalan dış zar porin içeriği, antibiyotiklere diğer gram negatif organizmalardan çok daha düşük bir geçirgenlik kazandırır. *Acinetobacter* spp.'lerde sefalosporin için geçirgenlik katsayısı (dışarıdan bakteri içinee difüzyon oranı) *P. aeruginosa*' ya oranla 2^7 kat daha büyüktür. Ayrıca *A. calcoaceticus*'tan türetilen saflaştırılmış dış zar içeren lipozomların karbapenem difüzyon hızı, *Escherichia coli* dış membranına göre % 1 ila 3'tür. Ek olarak, *Acinetobacter* spp. bir veya daha fazla aktif akış sisteminin (örneğin AdeABC ve

AdeIJK) yapısal düşük seviyeli ekspresyonuna sahiptir. Antimikrobiyallere düşük geçirgenlik ve konstitütif akıntı arasındaki bu etkileşim, sınırlı sayıda terapötik seçenekle sonuçlanan geniş bir antibiyotik dizisine içsel bir direnç sağlar. İlâveten, *Acinetobacter* spp. genomu içinde 45 direnç geni olan büyük bir direnç adası vardır. Ayrıca, diğer farklı bakteri çeşitlerinden direnç almak için hızlı bir şekilde ek genetik varlıkları kazanma ve tedavi sürecinin ortasında kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirme yeteneğine sahiptir (Wong ve ark. 2017).

Acinetobacter baumannii' de bulunan karbapenem direncine esas oksasiazlar (OXA) ama daha az sıklıkla da metallo-beta-laktamazlar (MBL'ler) aracılık eder.

Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnci çeşitli sebeplerden oluşabilir.

2.8.1. İntrinsik Direnç (Doğal Direnç)

Bazı bakterilerin genetik yapısı sebebiyle farklı antibiyotiklere karşı duyarlılığını kaybetmesi doğal direnç olarak tanımlanır. Örneğin vankomisin molekülüne sahip antibiyotik dış membran porlarından geçerek peptidoglikan tabakaya ulaşmak için gerekenden büyük olduğundan gram negatif bakterilere etkisizdir (Gülay. 1999).

2.8.2. Kazanılmış Direnç

Bakterinin genetik yapısındaki değişimlere bağlı olarak; kromozom, plazmid ya da transpozon DNA'sındaki mutasyonlarla veya direnç geni bulunduran DNA parçalarının bir başka bakteriden transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla alınmasıyla oluşan dirençtir (Gülay. 1999).

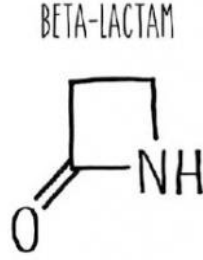
2.8.3. Çevre ve Koşullara Bağlı Direnç

Bazı durumlarda (dokudaki pH değişiklikleri, antibiyotiğin enfeksiyon bölgesine ulaşamaması ve oksijen basıncı değişiklikleri gibi) antibiyotiklerin invitro-invivo etkinlikleri değişiklik gösterir. İnvitro testlerde duyarlı olarak değerlendirilen antibiyotik invivo koşullarda etki göstermeyebilir (Cunha, Mandell, Bennet 2014).

2.9. *Acinetobacter* Türlerinde Antibiyotiklere Direnç Sorunu

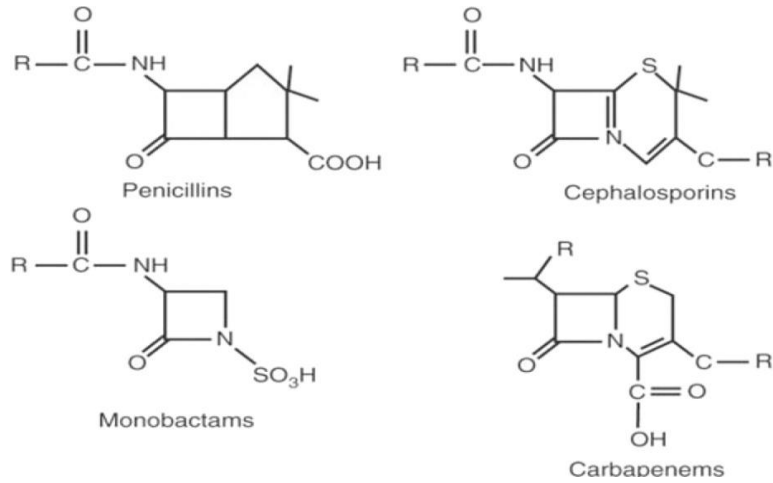
Acinetobacter baumannii'de direnç mekanizması enzimin üretimi veya aktivasyonu, integron yapımı, dış membran geçirgenliği, biyofilm oluşumu, ilaç atım pompaları gibi faktörlere bağlı olarak karmaşıklık göstermektedir.

2.9.1. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları



Şekil 2.1. Beta-laktam halkası

Beta-laktam grubu antibiyotikler, ortak beta-laktam halkası ile birlikte antibakteriyel etkilerini gösterirler. Başlıca beta-laktam antibiyotikler: Penisilinler, monobaktamlar, karbapenemler ve sefalosporinlerdir. Bakterilerin hücre duvarında peptidoglikan komponentlerin birleşmesini sağlayan transpeptidasyon olayının aktivatör enzimi transpeptidazın aktivitesini bloke ederek hücre duvarı sentezini bozarlar ve bakterileri öldürücü bir etki oluştururlar (Dökmeçi.1992).



Şekil 2.2. Beta-laktam grubu antibiyotikler

Acinetobacter türlerinde karbapenem grubu antibiyotikleri de içeren beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşan direncin temel mekanizması ya plazmid ya da kromozomca kodlanan beta-laktamaz enzim üretimidir. Beta-laktam grubu antibiyotiklerin etki göstermeleri için penisilin bağlayıcı proteinlere yeterli düzeyde bağlanmalıdır. Bakteriler, bu basamakların her aşamasında engeller oluşturarak dirençli hale gelebilirler. Bakterilerde beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşan direnç dört yolla oluşabilir.

İlacın hedef bölgesindeki değişiklikler

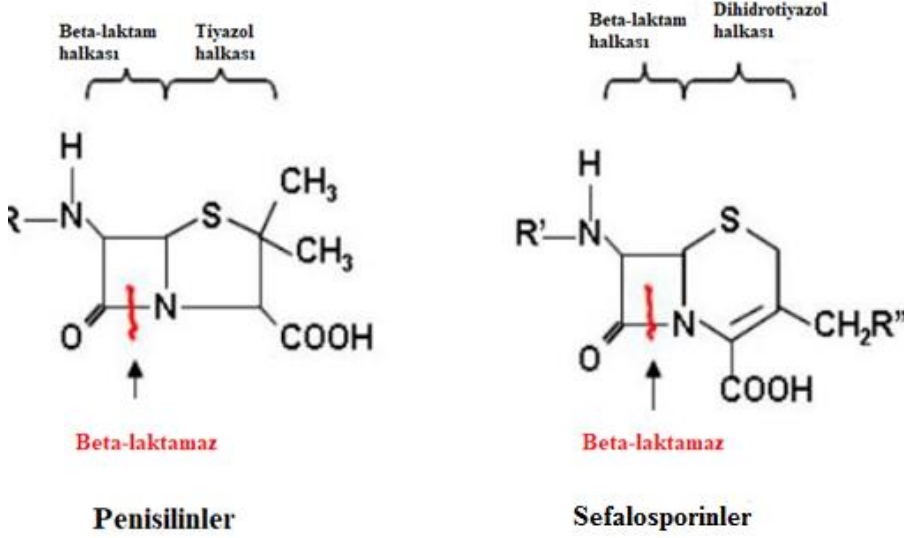
PBP kromozomal mutasyonlar sonucunda yeni oluşan penisilin bağlayıcı proteinin beta-laktam antibiyotiği çekim gücünün azalması, PBP'lerin sayısının azalması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük afiniteli yeni olan penisilin bağlayıcı proteinler sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir (Livermore 1991; Malouin and Bryan 1986).

Dış membran geçirgenliğinin bozulması

Gram negatif bakteriler için özellikle hücre zarının geçirgenliğinin azalması önemlidir. Beta-laktam antibiyotikler, gram negatif bakterilerde dış membranda bulunan 'outer membrane protein' (OMP) adı verilen porlar vasıtasıyla hücre içine girer. Beta-laktam antibiyotikler dış membrandan, esas olarak porin C ve porin F diye isimlendirilen iki kanal vasıtasıyla ile geçerler. Ayrıca İmipenem D2 proteini adlı özel bir porini ile dış membrandan geçer. Dolayısıyla bir gram negatif bakteri porin C ve porin F proteinlerini mutasyona uğratarak bütün beta-laktamlara direnç geliştirebilirken, imipeneme duyarlı kalabilir. Diğer bir taraftan, özellikle *Enterobacter* ve *P. aeruginosa* suşlarında dış membranda bulunan D2 proteinin kaybolması da bakteriyi imipeneme dirençli duruma getirebilir (Bradford 2001; Livermore. 1991). Porinlerin sayıları ve özellikleri ile antibiyotiğin büyüklük, yük, çözünürlük gibi özellikleri hücre içine giriş hızına etki etmektedir (Livermore. 1991). Geçirgenliğin azalmasıyla ilgili olan direnç özellikle enzimatik dirençle beraber ise yüksek düzeyde dirence sebep olmaktadır. Bu direnç zor üreyen gram negatif basillerde ve *P.aeruginosa* da daha fazla klinik problem meydana getirmektedir.

Beta-laktamaz enzimleri ile antibiyotiklerin inaktive edilmesi

Beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençte en çok karşılaşılan yol bu antibiyotikleri inaktive edebilen beta-laktamaz enzimlerini sentezlemesidir. Beta-laktamazlar, sefalosporinler ve penisilin benzeri beta-laktam grubu antibiyotikleri hidrolize ederek etkisiz hala getirir ve direnç gelişmesine sebep olur.



Şekil 2.3. Penisilin ve sefalosporin antibiyotiğinin beta-laktamaz enzimi ile parçalanması
(http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132019000100902)

Bakteride beta-laktamaz enzimi yapısal olabilir ya da indüklenebilir. Gram pozitif bakterilerde enzim çoğunlukla indüklenebilir özellikteyken, gram negatif bakterilerde beta-laktamaz enzimleri indüklenebilir veya yapısal özelliktedir. Beta-laktam halkası içindeki karbonil grubu, beta laktamaz enzimleri ile ester köprüsü oluşturup siklik amid bağını bozarak bir açıl-enzim türevi meydana getirir.

Daha sonra enzim bu molekülden ayrılarak rejenere olur. Bakteriler beta-laktamaz genlerini kromozomda, plazmid, integron veya transpozon gibi aktarılabılır genetik yapılarında bulundurabilir (Bradford. 2001). Yapısal olarak PBP'lerle aynı özellikleri gösterirler. Beta-laktamazlar, hem gram negatif hem de gram pozitif anaerop ve aerop bakteriler tarafından sentez edilirler. Stafilokoklar; gram pozitif bakteriler içinde beta-laktamaz üretebilen en önemli patojenlerdir. Beta-laktamazlar, anaeroblardan

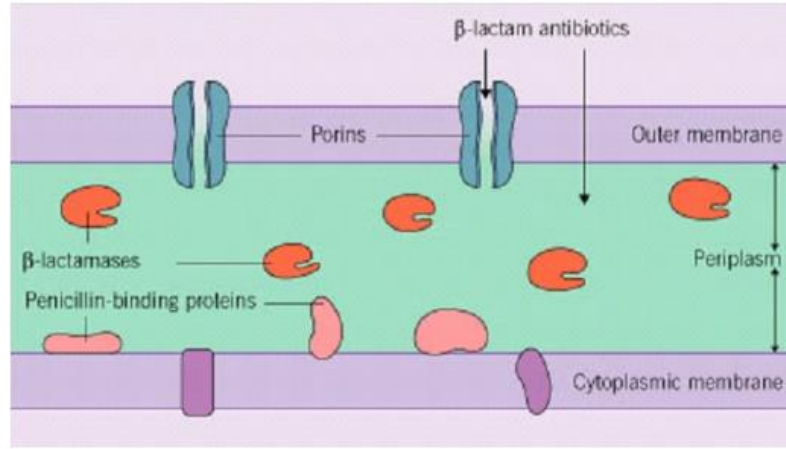
Fusobacterium ve *Clostridium* cinsi bakterilerde temel olarak penisilini parçalarken *Bacteriodes* cinsi bakterilerde de çoğunlukla sefalosporinleri etkiler. Gram negatif bakterilerin beta-laktam direnci oluşturmadaki en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir ve sitoplazmik membran ile dış membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunur. Gram pozitif bakterilerde direk olarak hücre dışına salınmaktadır. Bu sebeple gram negatif bakterilerde beta-laktamazlara bağlı dirençte çoğunlukla antibiyotik geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol oynamaktadır (Cornaglia, Mazzariol, ve Fontana. 2000).

Efluks Pompası

Efluks pompası, transport proteinlerinden oluşan bir diğer direnç mekanizmasıdır. Pompalar oldukça geniş bir substrat özgülüğüne sahip ve seçici olabilir. Bu pompaların birçoğu sitoplazmik zar da bulunmaktadır. *Acinetobacter* türlerinde, bazı özel antibiyotiklere özgü efluks pompalarına ek olarak gram negatif bakterilerde kromozomal olarak kodlanan çoklu ilaç efluks sistemi de tanımlanmıştır (Sanders. 1992). Gram-negatif bakterilerde bu olaydan benzer şekilde tek bir pompa proteini ya da üç parça proteinden oluşan pompa sistemi sorumludur. Antibiyotik direncinde rol oynayan temel efluks sistemleri; (1) ATP-Binding Cassette (ABC), (2) Major Facilitator (MFS), (3) Multidrug and Toxic compound Extrusion (MATE), (4) Resistance-Nodulation-Division (RND) süper aileleri ve (5) Small Multidrug Resistance (SMR) ailesi şeklinde ifade edilmiştir (Chau, Chu, and Houang 2004; Poole 2004). Ancak bu direnci oluşturabilen bakteri, diğer beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı çapraz direnç geliştiremez (Sanders 1992). RND tipi pompa proteinleri sadece gram-negatif bakterilerde bulunurken, diğerlerine gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerde sıkça rastlanabilir. En büyük grup olan MFS tipi pompa proteinleri sekonder aktif transport sistemleri içerisindedir. Pompaların işlevsel olması için genel olarak en az 12 transmembran segmentini bulundurması gerektiğinden, SMR grubu pompa proteinleri muhtemelen trimerler olarak organize olurlar. RND tipi pompalar da fusidik asidi, beta-laktamları ve sülfonamidleri tanırlar. Süper ailelerin bütünü etkinlik açısından düşünüldüğünde, en geniş substrat çeşitliliğine ve proteine sahip olan grup RND tipi pompalardır (Aygül. 2015).

Beta-Laktamazlar

1940 yılında Abraham ve Chain bilim insanları bildirdikleri penisilinaz ile birlikte β -laktamazların ilk sınıflandırması yapmışlardır (Gür. 1996). Bu tarihten sonra yavaş yavaş yeni beta-laktamazların bulunması ve direnç kazanımlarının artmasıyla birçok bilim adamı farklı yapılara göre sınıflandırma yapmışlardır. Moleküler yapı ile ilgili sınıflandırma ilk kez 1980 yılında Ambler tarafından yapılmış, Class C sefalosporinazlar 1981 yılında Jaurin ve Grundstrom tarafından tanımlanmıştır. Oksasilini hidroliz eden Class D enzimler ise 1980'lerin sonunda diğer serin enzimlerinden ayrılmıştır (Bush. 1989).



Şekil 2.4. Gram negatif bakteri hücre duvar yapısı (<http://www.istanbulsaglik.gov.tr/>)

Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması, 1995 yılında yapılan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasıdır (Bush, Jacoby ve Medeiros. 1995).

Ana Hatları ile Bush-Jacoby-Medeiros Sınıflandırmasındaki β -Laktamazlar;

Grup 1 (Amp C) Beta-Laktamazlar

Klavulanik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlar bu gruptadır. Çoğunluğu kromozomal enzimlerdir. İndüklenebilen veya deprese β -laktamazlar olarak ortaya çıkmaktadırlar. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz ederler, klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler, buna karşın aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Moleküler grup olarak Sınıf C'dedirler (Gür.1996).

Grup 2

Tümü moleküler sınıf olarak A ve D' de yer almaktadır. Plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar. Substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır (Keyik. 2013).

2a

Bu alt grupta penisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır. *Staphylococcus aureus*'un enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *Bacillus cereus*'un kromozomal β -laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler de bu gruptadır (Bush ve ark. 1995). Bu gruptaki enzimler sefalosporinlere göre penisilini daha hızlı hidrolize eder (Keyik. 2013).

2b

Hem sefalosporinleri hem penisilinleri hidroliz eden (geniş spektrum) klavulanik asite duyarlı beta laktamazları içerirler. Plazmidlerce kontrol edilen TEM-1, TEM-2ve SHV-1 enzimlerini bulundurur. Ayrıca OHIO-1 ve *Haemophilus influenzae*'da saptanan ROB-1 enzimini de içermektedirler. Yeni kuşak sefalosporinler, aztreonam ve imipeneme karşı düşük hidrolitik aktivite göstermektedirler. Moleküler sınıfları A'dır (Bush ve ark. 1995).

2be

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları (GSBL) bulunduran gruptur. Monobaktamlar ve oksimino beta laktamlar gibi antibiyotiklerin sıklıkla kullanımı neticesinde TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği sonucunda geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleride etkileyen, oksimino-aminotiazolil sefalosporinleri hidrolize eden yeni beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır. Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır (Yuluğ. 1997). Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimi ilk kez Türkiyede saptanmıştır (Vahaboglu ve ark. 1997).

2br

Geniş spektrumlu beta-laktamazlardan klavulanik asitten etkilenmeyenler bu gruba alınmıştır. İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) olarak adlandırılır. TRC-1 enzimi, TEM enzimleri (TEM-30'dan TEM-36'ya kadar) bu gruptadır (Bush. 1989).

2c

Bu grup içinde karbenisilini hidroliz edebilen ve aynı zamanda, klavulanik aside duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 β -laktamazları, *Vibrio cholerae*'nin SAR-1 *Moraxella catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *Aeromonas hydrophila*'nın AER-1 enzimi de bu gruptadır (Bushet ve ark. 1995).

2d

D grubu beta-laktamazlardır aynı zamanda da A veya C grubuna %16 aminoasit düzeyinde benzerlik gösterirler. OXA genlerinin plazmid ya da integron üzerinde bulunması yayılımını kolaylaştırmıştır (Helfand and Bonomo 2003). Günümüzde protein düzeyinde 121 farklı tür D grubu beta-laktamaz tanımlanmıştır. (Hall ve ark. 1993).

2e

Bu grup beta-laktamazlar da, sefalosporinaz olmalarına rağmen, klavulanik asit ile inhibe olarak grup 1'dekilerden farklılık gösterirler. *B. vulgatus* ve *B. uniformis*'un kromozomal CblA ve CfxA enzimleri ve *Bacteroides fragilis*'in CepA enzimi, *S. maltophilia*'dan izole edilen L2, *E. coli*'de bulunan FEC-1 enzimleri de bu gruptadır. Önceden Richmond Sykes'in 1.grubunda yer alan *P. vulgaris*'in indüklenebilen sefalosporinazı son sınıflamada bu gruba alınmıştır (Bush. 1989; Bush ve ark. 1995).

2f

Son sınıflandırmada eklenen bu grupta *Serratia marcescens*'in Sme-1 *E.cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *Enterobacter cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi yer almaktadır. Bunların hepsi moleküler yapılarına göre sınıf A'dadır. Karbapenemleri hidroliz etmekte ve klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (Bush ve ark. 1995).

Grup 3

Klavulanik asit ile inhibe olmayan metallo enzimleri bulundurmaktadır. Bunlar EDTA ile inhibe olan enzimlerdir. Aktivite gösterebilmeleri için çinko iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Bu gruptaki en önemli enzimler, *Aeromonas hydrophila*'nın kromozomal enzimleri *S. maltophilia*'nın L1 enzimi ve *Bacteroides fragilis*'in CcrA enzimidir. Molekül sınıfı B'de yer almaktadır (Bush ve ark. 1995).

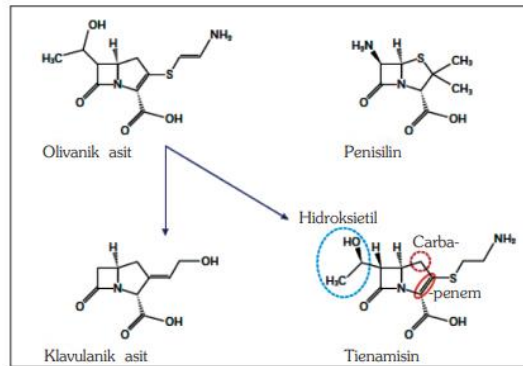
Grup 4

Bu grupta da yine klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar bulunmaktadır. Molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir. *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *Alcaligenes faecalis*, *Campylobacter jejuni*, *B. fragilis*'den izole edilen enzimler, *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazı bu grupta yer alır.

Sıklıkla bir bakteride birden fazla beta-laktamaz tipi birlikte görülebilir. Böylece plazmid kökenli ve kromozomal beta-laktamazlar bazen iç içe geçerler. Grup 1'deki kromozomal beta-laktamazlar, Grup 2'deki ESBL enzimleri ve Grup 3'deki beta-laktamazlar hastane enfeksiyonlarında sıklıkla karşımıza çıkarlar. (Keyik. 2013).

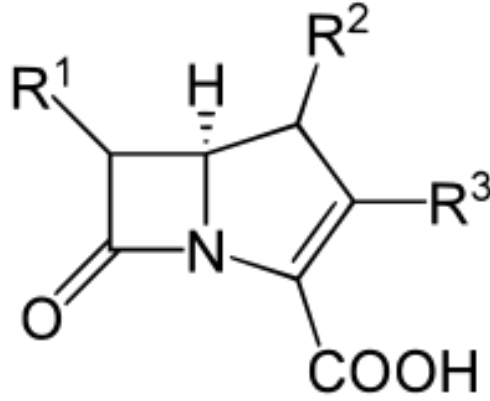
Karbapenemler

İntrensek beta-laktamaz inhibitörleri olarak kabul edilir, 1976'da üretilmiş ilk beta-laktamaz olan klavulanik asit gibi olivianik asit türevidir. Tienamisin ilk karbapenemdir, toprak bakterisi olan *Streptomyces cattleya*'dan elde edildi. (Kahan ve ark. 1979).



Şekil 2.5. Değişik beta-laktam halkası içeren bileşikler (Akçam. 2019.)

Tienamisin, altıncı karbona eklenmiş bir hidroksietil (etoksi) grubuna sahiptir ve beta-laktamların temel yapısından farklı olarak ilk sülfür bir karbonla yer değiştirmiştir. Ayrıca karbonlararasındaki 2. ve 3.bağ doyurulmamıştır. Sülfürün yerini alan ilk sıradaki karbon (carba-) ve içerdiği doymamış çifte bağ (penem), bu yapıya “carba + penem” karbapenem ismini verdirmiştir (Yoo. 2018).



Şekil 2.6. Karbapenem grubu kimyasal yapısı

Mikobakteriler, nadir nonfermentatifler, hücre duvarından yoksun organizmalar, gram pozitif, gram negatif ve anaerop mikroorganizmaların etken olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlara ve toplumdan kazanılmış enfeksiyonlardaki bakteriyel patojenlere etkilidir. Karbapenem grubunun ikincisi olan meropenem 1996 yılından sonra kullanıma girmiştir. Karbapenem halkasına 1- β -metil grubu eklenerek meropenem elde edilmiştir. Gram negatif, gram pozitif ve anaerop bakterilere karşı etkindir. Meropenem, dihidropeptidaz enziminden etkilenmez (Bonfiglio, Russo, ve Nicoletti 2002).

2001 yılında geliştirilen diğer karbapenem de Ertapenemdir. Diğer iki karbapeneme göre daha dar spektrumludur. Anaeroblara ve *Enterobacteriaceae*'ye etkilidir, fakat özellikle *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, penisilin dirençli pnömokoklara ve enterokoklar etkili değildir (Shah 2008).

Bir diğer karbapenem ise Doripenemdir. *P. aeruginosa*'ya invitro olarak daha etkili ve meropeneme benzer aktivite göstermektedir. Komplike üriner sistem, hastane kaynaklı pnömonide ve intra-abdominal enfeksiyonlarda kullanılmaktadır (Mandell. 2009; Paterson ve DePestel. 2009).

2.9.2. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter baumannii'de karbapenem direncinin en önemli nedeni; sınıf A (TEM, SHV ve GES), sınıf B (IMP, VIM ve SIM), sınıf C (AmpC) ve sınıf D'yi (OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA58) içeren karbapenem hidrolize eden beta-laktamaz ile ilişkili enzimatik hidrolizdir. Karbapenem grubu antibiyotiklere karşı üç farklı etki mekanizması ile direnç gelişebilir.

İlacın Hücre İçinde Etkin Konsantrasyona Ulaşamaması

Porin Değişimleri

Dış zar porinleri *Acinetobacter* cinsi bakterilerin antibiyotik direnci ve virülansında rol oynar. *Acinetobacter* spp.'de yer alan porinler karbapenem direnci ile ilişkili dış zar proteini (CarO) ve Omp33-36'dır (Novović ve ark. 2018). Bu grup antibiyotiklere karşı direnç oluşmasının nedeni, *P. aeuriginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybıdır ve özellikle imipenem tedavisi sırasında ortaya çıkmaktadır (Rasmussen ve Bush. 1997).

Aktif Pompa Sistemlerinin İndüklenmesi

Bakteri hücre membran porin kaybına uğradıktan sonra geçirgenliği azalmakta ve neticesinde ilaç hücre içerisine girememektedir (Aygül. 2015).

2.9.3. Karbapenemleri Hidroliz Eden Enzimlerin Varlığı (Karbapenemazlar)

Karbapenemlerden en azından imipenem veya meropenemden birini, bariz bir şekilde hidrolize uğratan beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Bu enzimlerin birçoğu sadece karbapenemlere değil, aynı zamanda diğer beta-laktam grubu ilaçlara da etkilidirler (Bonfiglio ve ark. 2002; Rasmussen ve Bush. 1997).

Karbapenemleri hidrolize eden karbapenemazlar, karbapenem kullanımına paralel olarak son yıllarda artan oranlarda bildirilmektedir. Karbapenemazlar da kazanılmış (ekstrinsik) ya da doğal olarak bulunan kromozomal kaynaklı (intrinsik) olabilirler (Poirel ve ark. 2004).

Ekstrinsik (kazanılmış) karbapenemazlar

Karbapenemlerle birlikte diğer beta-laktam antibiyotikleri de hidroliz edebilme yeteneklerine sahiptirler. Ambler moleküler sınıf A, B veya D'ye ait olabilirler. Bu enzimler, penisilinler, imipenem, meropenem, geniş spektrumlu sefalosporinler, aztreonama direnç oluşumuna sebep olur. Tazobaktam başta olmak üzere beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Sınıf A tipleri birkaç *Enterobacteriaceae* izolatında bulunurken, sınıf D tipleri sadece *Acinetobacter* spp.'de bulunurlar. Sınıf A karbapenemazları “not metalloenzyme carbapenemase” (NMC) “*Serratia marcescens* enzyeme” (SME), “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” (KPC) “imipenem-hydrolyzing beta-lactamase” (IMI), ve GES enzimleri oluştururlar. Sınıf B karbapenemazları IPM, “German imipenemase” (GIM), “Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase” (VIM), “Sao Paulo MBL” (SPM), “New Delhi metallo-beta-laktamaz” (NDM 1) ve SIM enzimleri, sınıf D karbapenemazları ise oksasilinleri hidroliz eden “Oxacillin-hidroliyzing”(OXA) enzimleri oluştururlar (Queenan ve Bush. 2007).

İntrinsik (kromozomal) karbapenemazlar

Aktif bölgelerinde çinko iyonları bulundurdıklarından ve moleküler sınıf B'de yer aldıklarından bu enzimler kendine ait özgün özelliğe sahiptir. Serin bazlı mekanizmalara sahiptirler. Ancak birkaç istisna dışında önemli kromozomal karbapenemaz duyarlılıkları bulunmaz. Bu grupta, *S. maltophilia*'nın L1, *B. fragilis*'in CcrA, *B. cereus* II, *C. indologenes*'in IND-1-4, *C. meningosepticum*'un BlaB ve *B. cepacia*'nın PCM-1 enzimleri sayılabilir. Bunların tümü Bush sınıflandırmasında grup 3'te yer alan metallo beta-laktamazlardır (Keyik. 2013).

Hedef PBP değişimleri

Diğer mekanizmalar ile beraber görülebilir fakat tek başına nadir görülürler. Gram pozitif bakterilerde daha fazla görülmektedir (Gülay. 2003). PBP'ler ile ilgili olarak 4 direnç mekanizması tanımlanmıştır; bakterinin beta-laktam afinitesi düşük yeni bir PBP geni kazanması (örneğin, metisiline dirençli *S. aureus*), yakın türlerden gen alınması ile

mozaik PBP genlerinin oluşması (örneğin, *S. pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*), düşük afiniteli bir PBP'nin aşırı yapımı (örneğin, *E. faecium*'da PBP 5 aşırı üretimi), PBP'lerin aktif bölgelerindeki korunmuş bölgelerde aminoasit değişimleri (örneğin, *E. faecium* PBP 5'i ve *S. pneumoniae*'nin çeşitli PBP'leri ve *Haemophilus influenzae* PBP) (Çiftçi.2015).

Metallo-Beta-Laktamazlar

Metallo-beta-laktamazlar, 1980 yılında Ambler tarafından sınıf B, daha sonra Bush tarafından da fonksiyonel özelliklerine göre farklı bir grup olan grup 3 içerisinde 1989 yılında sınıflandırmıştır. Yapılan bu sınıflandırma 1995 yılında yenilenmiş ve 1997 yılında daha geliştirilip güncellenmiştir (Bush ve ark 1995; Rasmussen ve Bush 1997). Diğer beta-laktamazlardan farklı bir özelliği, aktif bölgelerinde kısımlarında çinko iyonu bulduran enzimlerdir. EDTA gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar fakat klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam gibi serin beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler. En önemli özelliği monobaktamlar dışında tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilmeleridir (Massidda, Rossolini, ve Satta. 1991; Rasmussen ve Bush. 1997).

Kromozomal Olarak Kodlanmış Metallo-Beta-Laktamazlar

İndüklenebilir özellikte olmaları en önemli özellikleridir. Doğada bulunan bazı bakteriler de aynı anda MBL enzimi de bulundurmaktadırlar. Bu enzimleri bulduran bakterilerin çoğu da genellikle beta-laktam antibiyotiklere dirençlidir ya da direnç kazanabilir. Bu bakterilerin birçoğu fırsatçı patojenlerdir. *B. anthracis* ve *S. maltophilia* dışında nadiren ciddi enfeksiyonlara neden olurlar (Tetik. 2008).

Aktarılabılır Metallo-Beta-Laktamazlar

Metallo beta-laktamazlardan olan IMP tipi, ilk olarak Japonya'da 1988 yılında *P. aeruginosa* suşunda konjugatif bir plazmidle taşınan metallo beta-laktamaz geni tanımlanmıştır (Watanabe ve ark. 1991). Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere dirençlidir. Beta-laktam antibiyotiklerle birlikte imipenemi hidrolize ettiğinden dolayı bu enzime IMP-1 adı verilmiştir (Arakawa ve ark. 1995).

VIM-tip Metallo Beta-Laktamazlar

Kazanılan metallo beta-laktamazlardan VIM-tipi enzimler ikinci dominant grubu oluşturmaktadırlar. İlk olarak Verona İtalya'da 1997 yılında *P. aeruginosa* izolatında bulunmuşlardır. Bu izolatın imipenem MIC değeri >128µg/ml iken beta-laktam antibiyotiklerden piperasilin, aztreonam, seftazidime dirençliydi. VIM-1 (Veronese imipenemaz) diğer metallo enzimlerle yapısal benzerlikler gösteriyordu (Cornaglia ve ark. 1999). Sırasıyla farklı yerlerde *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-2, VIM-3, VIM-4 genleri identifiye edildi. VIM-5 ise ilk defa Türkiye Ankara'da *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* kökenlerinden izole edilmiştir ve sadece VIM-1'den 5 aminoasit değişikliği ile ayrılmaktadır (Bahar ve ark. 2004). İtalya'dan VIM-11 bildirilmiştir. En son VIM-13 bildirim yapılmıştır.

SPM-1 Metallo Beta-Laktamaz

SENTRY araştırma programı parçası olarak 1997 yılında Brezilya Sao Paulo'da *P. aeruginosa* izolatı tanımlanmış, bir gen taşıdığı gösterilmiş ve SPM-1 (Sao Paulo MBL) olarak adlandırmıştır (Simm ve ark.2002). İzolatın, kolistin dışında standart bütün gram negatif bakterilere etkili antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir (Laurent Poirel ve Nordmann. 2006,Simm ve ark.2002).

GIM Metallo Beta-Laktamaz

2002 yılında Almanya Dusseldorf'da farklı tıp merkezlerindeki farklı hastalardan GIM-1 diye isimlendirilen yeni bir sınıf B beta-laktamaz bulunduran beş *P. aeruginosa* izolatı elde edilmiştir. (German imipenemase).

2.10. E-Test

E-test, agar difüzyon ve Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerini kantitatif olarak belirleme esasına dayanır. E-test orijinal dereceli MİK stripleri birçok kişi tarafından altın standart olarak değerlendirilmektedir. E-test daha önce tanımlanmış, plastik bir strip üzerinde 15 farklı konsantrasyonda antibiyotik bulunur. Otomatik veya Kirby-Bauer antibiyotik duyarlılık testleri (AST) sonuçlarından daha kesin bir neticeye

ihtiyaç duyduğunuzda uygun maliyetli ve basit bir araçtır (<https://www.biomerieux.com.tr/urun/etestr>).

E-test, dilüsyon ve disk difüzyon testlerinin bir takım özelliklerini taşıyan duyarlılık testidir. Ülkemizde ticari olarak MİK test strip (Liofilchem, İtalya) , M.I.C.E. testleri (Oxoid, A.B.D.) ve E-test (Bio-Mérieux, Fransa) mevcuttur. E-testin en önemli özelliği ve üstünlüğü ise 150 mm lik bir agar plak içinde beş farklı türden antibiyotik için MİK değerlerinin elde edilip belirlenebilmesidir (Gür. 2016).

Duyarlılık testi için özel olarak hazırlanmış ticari E-test şeritlerini kullanmadan önce derin dondurucuda (en az -20°C de) depolanmalı ve saklanmalıdır. Kullanmak için ambalajı açılmış olan E-test şeritleri özel steril tüp veya kaplara yerleştirilmeli, kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmeleri için bir süre beklenmeli ve kullanımın hemen ardından arta kalan şeritler dışarıda bekletilmeden hemen tekrar derin dondurucuya kaldırılmalı ve depolanmalıdır (Gür.2016).

E-test şeritleri son kullanım tarihlerinden önce mutlaka kullanılmalıdır. Çalışılacak olan izolat için CLSI veya EUCAST Standartları bünyesinde öneride bulunan inkubasyon koşulları, test edilecek antibiyotikler, besiyerleri ve kalite kontrol ATCC izolatları belirlenir (Gür. 2016).

2.10.1. İnokulum Hazırlanması

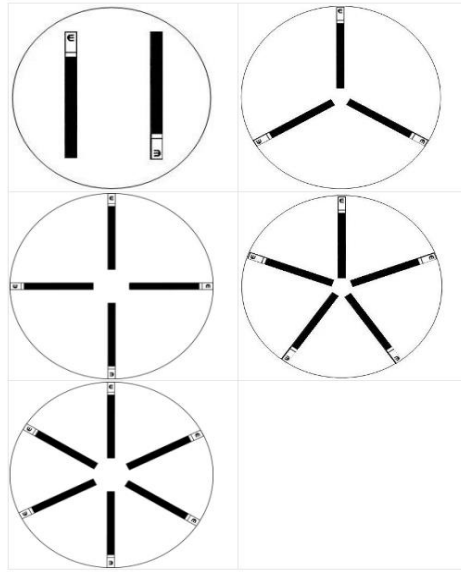
Doğrudan koloni süspansiyon metodu ile hazırlanır. İnokülasyon işlemi inokulum süspansiyonu hazırlandıktan 15-23 dakika içinde MHA'a inoküle edilmelidir. Ekim yapmadan hemen önce besiyerinin yüzeyinin tamamıyla kuru olduğundan mutlaka emin olunmalıdır. Gerek görülürse etüvde kapakları açık olmadan 10-30 dakika bekletildikten sonra kullanılmalıdır. Steril pamuklu eküvyon kullanılarak inokulum süspansiyonuna daldırılıp fazla sıvı sızdırıldıktan sonra inokülasyona geçilir. Agar yüzeyinin tümüne gelecek şekilde yaklaşık 60 derecelik açıyla 3 defa yayıldıktan sonra eküvyon son olarak plağın çevresinde gezdirilir. Bu işlemin ardından şeritler 15 dakika süresi içinde yerleştirilmelidir. Yerleştirilmeden hemen önce 3-5 dakika nemin absorbe olması için beklenmelidir (Gür. 2016).

2.10.2. Test Şeritlerinin Plaklara Yerleştirilmesi

Derin dondurucuda depolanmış olan şeritler çıkarılarak oda ısısına geldikten hemen sonra, agar yüzeyine önceden belirlemiş olduğumuz listeye göre yerleştirilir. Paketi açılan ancak kullanılmayan şeritleri nemden korunacak için kapağı sıkı kapananan tüplere konulmalı ve saklanmalıdır. Bu tüpler dört hafta içinde tüketilmeli ve nem, ısı, ışıktan korunmalıdır.

Şeritler bir ince uçlu pensetle veya aplikatörle uç kısmından tutularak alınmalı ve agar yüzeyine yerleştirilmelidir. Bu işlem sırasında en düşük konsantrasyonun bulunduğu taraftan başlayarak bırakılmalıdır. Şeritin agar yüzeyine temas etmesinden emin olunmalıdır. Hava kabarcığı oluştuysa düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru pensetle hafifçe bastırarak çıkartılmalıdır.

100 mm'lik petri kullanıldığında 1-2 adet, 150 mm'lik petri kullanıldığında ise en fazla 6 şerit yerleştirilebilir.



Şekil 2.7.E-test stripleri dizilim seçenekleri (Gür, 2016)

Şeritlerin birbirlerine eşit uzaklıkta olması ve merkezden dışa doğru olacak şekilde ırsal bir dizilim şeklinde olması sağlanmalıdır. Şerit agara değ er deymez antibiyotik salınımı başlar. Bu sebeple bir kez konulduktan sonra kesinlikle yerinden alınmamalı ve

asla başka bir yere yerleştirilmemelidir. E-test şeritleri 15 dakika içinde plaklar kapakları altta olacak şekilde $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ inkübatöre kaldırılır. (Güç üreyen bakteriler için %5 CO_2 ortamı gereklidir ayrıca mikroaerofilik kavanoz içerisinde ya da CO_2 'li inkübatörde inkübe edilir). Plaklar 16-18 saat arasında inkübe edilir (Gür. 2016).

2.10.3. Plakların Okunması ve Sonuçların Yorumlanması

Plaklar şartlara uygun olarak inkübasyondan sonra; koyu renk bir zemin üzerinde aydınlık bir ortamda, göz ile değerlendirilerek inhibisyon zonunun E-test şeridine değdiği konsantrasyon belirlenir. Streptokoklarda olduğu gibi besiyerine kan eklenmişse, petri plağının kapağı açık olacak şekilde ve yansıyan ışık altında agar yüzeyinden ölçüm yapılır.

- Eğer zon şeridin alt kısmına kadar geliyorsa MİK değeri en düşük konsantrasyonun da altında demektir.
- Eğer zon hiç oluşmamışsa MİK değeri en yüksek konsantrasyonun da üstündedir.
- İnhibisyon zon sonucunun iki değer arasında kalması durumunda yüksek olan değer MİK olarak kabul edilir.
- Kanlı besiyeri kullanıldığında üremenin inhibe olduğu zon değerlendirmeye alınır.
- Eğer inhibisyon zonunun şeride temas ettiği noktalar iki tarafta farklı ise ve bu fark iki kat dilüsyonun yarısını aşmıyorsa yüksek olan sonuç değerlendirmeye alınmalıdır. Fark iki kat dilüsyonu aşarsa test tekrarlanmalıdır.
- İnokulum yoğun ise inhibisyon zonunun şeride temas ettiği yer çok belirgin olmayabilir ya da çift zon oluşabilir. Bu sonuçlar geçersiz olup test tekrarlanmalıdır.
- İnhibisyon zonunun içinde üreyen iri koloniler karışık kültürü ya da dirençli varyantları gösterir. Bu durumda test ilk plaktan inokulum alınarak tekrarlanmalıdır. Test sonucu yine aynı olursa zon içinde üreyen koloniler pasajlanıp tanımlanmalı ve E-test tekrarlanmalıdır. Bu tekrardan sonra da aynı sonucun alınması halinde dirençli olarak rapor edilmelidir.

- *Proteus* spp. test edildiğinde oluşan yayılma gözardı edilmeli, üreyen kolonilerin inhibisyon zonu dikkate alınmalıdır.
- Sulfonamidler, trimetoprim ya da trimetoprim/sulfametoksazol test edildiğinde oluşan zayıf üremeler gözardı edilmeli, %80 ve üzerindeki üremeler okunmalıdır
- Beta-laktam antibiyotikler işleme alındığında inhibisyon zonunun şeritle temas ettiği kısımda görülebilecek iri koloniler direnci gösterebilir.
- Bazı antibiyotiklerde çift uçlu inhibisyon zonu oluşabilir, bu durumda üstteki zon değerlendirilir (Gür.2016).

Sonuçların değerlendirilmesi neticesinde ölçülen MİK değeri, kullanılan standartta (CLSI/ EUCAST) yer alan sınır değer tablosundaki MİK sınır değerleri baz alınarak duyarlı, orta ve dirençli diye belirtilir. E-testinte kullanılan besiyerinin kalınlığının ve pH'sının uygunsuz olması, E-test şeritlerinin depolama koşullarının uygun olmaması ve inkubasyon koşullarının uygunsuzluğu test sonuçlarını etkileyebilir (Gür. 2016).

2.11. PCR

Biyolojik bilimlerde, disiplini altın keşif çağlarına sürükleyen teknolojik ilerlemeler olmuştur. Örneğin, mikrobiyoloji alanı, Anton van Leeuwenhoek'in mikroskopunun gelişmesiyle dönüştürmüştür ve bu, bilim adamlarının prokaryotları ilk kez görselleştirmelerine izin vermiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) gelişimi, biyolojideki sayısız alt disiplini kapsayan etkileriyle moleküler bilimin seyrini değiştiren yeniliklerden biridir. Teorik süreç 1971 yılında Keppe ve arkadaşları tarafından ana hatlarıyla belirtilmiştir. Bununla birlikte, tam PCR prosedürünün 1985'te Cetus Corporation'da iken Kary Mullis tarafından tanımlanması ve deneysel olarak uygulanması, 14 yıl daha sürdü. Bu tekniğin otomasyonu ve rafine edilmesi, bakteriden bir termal stabil DNA polimerazının sokulmasıyla ilerledi. *Thermus aquaticus*, dolayısıyla *Taq*DNA polimeraz adı.

Polimeraz zincir reaksiyonunun ortaya çıkışı (PCR), biyolojik bilimi ilk keşfedildiği andan itibaren kökten değişikliğe uğramıştır (Kary B. Mullis 1990). İlk defa, büyük

miktarda DNA'nın spesifik tespiti ve üretimi için izin vermiştir. PCR tabanlı stratejiler, İnsan Genom Projesi gibi devasa bilimsel çabaları teşvik etmiştir. Bu teknik şu anda klinisyenler ve araştırmacılar tarafından hastalıkları teşhis etmek, klonlamak ve gen sıralamak için yaygın olarak kullanılmaktadır ve sofistike nicel ve genomik çalışmaları hızlı ve çok hassas bir şekilde yürütmektedir. Klasik PCR yönteminin en önemli tıbbi uygulamalarından biri patojenlerin saptanmasıdır. Ek olarak, PCR analizi adli tıpta suçluları tanımlamak için kullanılır. Yaygın kullanımı nedeniyle, PCR'ın temel ilkelerini ve genlerin ve genomun karmaşık analizini sağlamak için kullanımının nasıl değiştirilebileceğini anlamak önemlidir (Lorenz. 2012).

PCR, spesifik bir DNA fragmanının karmaşık bir DNA havuzundan amplifikasyonunu sağlayan basit ama hassas, enzimatik bir analizdir. PCR testini keşfeden Dr. Kary Mullis, "İlgilendiğiniz DNA parçasını seçmenize ve istediğiniz kadar elde etmenize izin veriyor" (K. B. Mullis. 1990). PCR periferik kan, cilt, saç, tükürük ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere çeşitli doku ve organizmalardan kaynak DNA kullanılarak yapılabilir. Geleneksel laboratuvar yöntemleri kullanılarak analiz edilecek yeterli kopya üretmek için PCR da yalnızca az miktarda DNA gereklidir. Bu nedenle, PCR hassas bir analizdir.

Her PCR deneyi, şablon DNA, primerlerin, nükleotitlerin ve DNA polimerazın varlığını gerektirir. DNA polimeraz, PCR ürününü oluşturmak için ayrı ayrı nükleotitleri birbirine bağlayan anahtar enzimdir. Nükleotitler, DNA'da bulunan dört bazı (adenin, timin, sitozin ve guanin (A, T, C, G)) içerir. Bunlar, elde edilen PCR ürününü oluşturmak için DNA polimeraz tarafından kullanılan yapı taşları olarak işlev görür. Reaksiyondaki primerler, amplifiye edilecek tam DNA ürününü belirtir. Primerler, saptanacak ve büyütülecek olan hedef DNA'ya tamamlayıcı olarak tanımlanmış bir sekansa sahip kısa DNA fragmentleridir. Bunlar, DNA polimerazın üzerine inşa edilmesi için bir uzama noktası görevi görür.

DNA amplifikasyonu döngülerinin üç temel adımda gerçekleşmesini sağlayan bir makineye yerleştirilir. Makine aslında bir termal döngüleyicidir. Test reaksiyon tüplerinin veya PCR reaksiyon karışımını tutan plakaların yerleştirildiği delikli bir termal bloğa sahiptir. Makine, ayrı, kesin ve önceden programlanmış adımlarla bloğun

sıcaklığını yükseltir ve düşürür (Weier ve Gray. 1988). Reaksiyon çözeltisi ilk önce, hedef DNA'nın iki tamamlayıcı DNA zincirinin erime noktasının üzerinde ısıtılır, bu liflerin denatürasyon adı verilen bir işlemi ayırmalarını sağlar. Daha sonra, spesifik primerlerin, hibridizasyon veya tavlama olarak bilinen bir işlem olan hedef DNA segmentlerine bağlanmasına izin vermek için sıcaklık düşürülür. Primerler ve hedef DNA arasındaki tavlama, yalnızca sırayla tamamlayıcı olmaları durumunda meydana gelir (örn. G'ye bağlanma). Sıcaklık tekrar yükseltilir, bu sırada DNA polimeraz, gelişmekte olan DNA zincirine nükleotitler ekleyerek primerleri uzatabilir. Bu üç adımın her tekrarı ile kopyalanan DNA moleküllerinin sayısı iki katına çıkar (Garibyan ve Avashia. 2013). PCR ürünlerini görselleştirmek için iki ana yöntem vardır:

1. Güçlendirilmiş DNA ürününün, dubleksin iki ipliği arasında birbirine geçen etidyum bromür gibi kimyasal bir boya ile boyanması.
2. PCR primerlerinin veya nükleotitlerin, PCR amplifikasyonundan önce flüoresan boyalarla (flüoroforlar) etiketlenmesi.

İkinci yöntem, etiketlerin doğrudan PCR ürününe dahil edilmesini sağlar. PCR ürünü analiz etmek için en yaygın kullanılan yöntem, DNA ürünlerini büyüklük ve yüke göre ayıran agaroz jel elektroforezinin kullanılmasıdır. Agaroz jel elektroforezi, PCR ürünü görselleştirmek ve analiz etmek için en kolay yöntemdir. PCR ürününün varlığının ve boyutunun belirlenmesine izin verir. Bilinen ebatlara sahip önceden belirlenmiş bir DNA ürünleri seti, ürünün ebadının belirlenmesine yardımcı olmak için jelin standartlaştırılmış moleküler markörleri olarak eş zamanlı olarak çalıştırılır (Garibyan ve Avashia. 2013). PCR'nin temel bileşenleri şöyledir;

Kalıp DNA

Çoğaltılmak istenen, baz dizisine sahip olan genetik materyaldir. Eğer çoğaltılacak parça DNA yerine RNA ise reaksiyonu başlatmadan önce ters transkriptaz kullanılarak RNA, komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilir. Bu cDNA daha sonra PCR için kalıp olarak kullanılır (Arda 1995;Rodriguez. 1997).

Primer

Sentetik olarak zahmetsizce hazırlanabilen, 15-40 oligonükleotitden oluşan, tekrarlanan dizilerden oluşmayan ve kullanım amaçlarına göre farklılık gösteren dizilerdir. Primerlerin sahip olduğu baz sıraları, sadece hedef DNA üzerinde sadece bir bölgede bulunmalı, başka hedef DNA sekanslarında ve başka yerlerde bulunmamalıdır. Primer konsantrasyon aralığının genelde 0.1-0.5 μM arasında olması tavsiye edilmiştir. Yüksek primer konsantrasyonları ayrıca primer-dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan bantların oluşumuna yol açmaktadır. Primer-dimerler, küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirleriyle bağlanması ya da DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotitleri, kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlanması neticesinde oluşan bantlardır (Kahya ve ark. 2014).

Polimeraz Enzimleri

Sıcaklığa dirençli DNA polimeraz enzimleri arasında en yaygın kullanılan enzim *Thermus aquaticus*'tan elde edilen polimeraz enzimidir. Bu enzimin diğerlerine oranla daha kullanışlı olmasının sebebi, her denatürasyon döngüsünde ortama yeniden enzim ilavesini gerektirmemesidir. Ayrıca primerlerin bağlanması da yüksek sıcaklıkta daha özgül olmaktadır (Arda. 1995).

Deoksinükleotit-Trifosfat (dNTP) Karışımı

Yeni DNA sarmalının tamamlanmasında kullanılan; dATP, dTTP, dGTP ve dCTP olarak bilinen 4 tip dNTP'nin molaritesi belirlenmiş ve nötralize edilmiş dörtlü setleridir. Geleneksel PCR'da ayrı reagent olarak kullanılır. dNTP'lerde 4 nükleotit de aynı oranda bulunmalı ve final konsantrasyonları 20-200 μM arasında olmalıdır. Hedef alanların dışındaki yanlış bağlanmaları azaltmak için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu kullanılmalıdır (Kahya ve ark. 2014).

DNA'nın PCR ile çoğaltılması; sıcaklık, zaman ve döngü sayısı düzenlenerek aşağıda belirtilen aşamalarla gerçekleştirilir;

DNA Zincirinin Açılması (Denaturation)

Kalıp DNA (template DNA) 92-95°C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikler birbirinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma gerekebilir. Denatürasyonun tam olmaması halinde verim düşer (Kahya ve ark. 2014).

Bağlanma (Annealing)

Tek iplikli hale gelen DNA dizilimlerinden her birinin, 3' uçlarındaki nükleotitlere uygun sıcaklıkta primer bağlanır.

Uzama (Primer Extension)

Yüksek sıcaklığa dayanabilen polimeraz enzimi, primerler ve kalıp DNA'yı kullanarak yapay ortamda çift iplikli DNA sentezler (Türkyılmaz ve Esendal. 2002).

Sıraladığımız bu üç basamak (denaturation, annealing, primer extension) PCR'ın bir devrini oluşturur. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır. PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, ethidium bromide ile boyanarak gözlemlenir (Hadidi A, L. Levy. 1995).

PCR'ın avantaj ve dezavantajlarına bakacak olursak;

Avantajlar

- Kültürü zor ve uzun olan enfeksiyonların tanısı kısa sürede sonuçlandırılmaktadır. Bakteriyel dirence sahip bakterilerin saptanmasına uygundur.
- Hızlı ve özgüldür.

Dezavantajlar

- Ortamdaki istenmeyen DNA'nın primer ile ortak dizilime sahip olma riski vardır.
- Deneyimli personel gerektirir.
- Cihaz ve malzemeleri pahalıdır

- Eskimiş, kurumuş, az miktarda DNA içeren örneklere bile uygulanabilir.
- Toksin oluşturan etkenlerin, saptanması güç toksinlerin, bakteri alt tiplerinin, laboratuvar koşullarında üretilmesi güç virüslerin teşhisine uygundur.
- Babalık testinden, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalara varıncaya geniş kullanım alanı bulunmaktadır.
- Organ ve dokularda etkenin sayıca az olduğu durumlarda, inceleme örneğinin kültür için uygun olmayacak dercede eski olduğu durumlarda PCR ile etkenin DNA' sını saptamak ve tanı mümkün olmaktadır. Adli tıp çalışmalarında; DNA'daki tekrar dizilerinin PCR ile çoğaltılarak suçlu kişilere ait ya da babalık testi için gerekli olan DNA analizleri yapılabilir.
- Mikroorganizmalar, tümörler ve diğer çeşitli hastalıklarda gen ekspresyon düzeyi değişikliğini saptamakta kullanılabilir.
- Bunun yanında ilk kurulumunun masraflı olması, ekonomik yönden atlanmaması gereken bir durumdur.
- Atlanmaması gereken bir diğer nokta çalışma esnasında en küçük DNA kontaminasyonunun dahi yanlış sonuçların alınmasına sebep olabileceği durumudur.
- Test sonuçlarının yorumlama aşamasında deneyimli personel gerekmektedir.
- Primerlerin spesifitesindeki sorunlar nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar oluşabilmekte, ya da istenilenin dışında farklı bantlar oluşabilmektedir.
- Hedef DNA' da yer alan benzer fakat tamamen aynı olmayan gen dizilerine primerlerin bağlanması da yanlış negatifliklerin sebeplerinden birisidir (Maşlak ve Bağcıgil. 2018).
- PCR tekniği için başlangıçta pahalı laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç olması, çok iyi eğitilmiş eleman gerekliliği, kullanılan sarf malzemelerin pahalılığı ve

(Maşlak ve Bağcıgil. 2018).

- Kalıtsal hastalıkların teşhisi; (örn; hemofili) PCR ile gen dizileri çoğaltılır ve hasta genlerindeki bozukluk tespit edilir. Taşıyıcılarda da erken teşhis sağlanır.
- Kanseri araştırmalarında; onkogen ve tümör supresör genlerdeki mutasyonlar PCR temelli testler kullanılarak aydınlatılır.
- Biyoteknolojik alanda PCR; rekombinant aşılarda (insulin ya da büyüme hormonu) ve rekombinant proteinlerin geliştirilmesinde kullanılır.
- Bakteri ve virüslerin tespitinde; geliştirilmiş özel PCR yöntemleriyle karışımdan dahi türe spesifik bir seçim yapılmasına olanak sağlar. Bu da hastalıkların teşhisinde hız ve duyarlılık kazandırır (Okutucu, Pehlivan. 2003).

zaman, zaman bulaşmalar veya diğer faktörlerden dolayı hatalı sonuçlar alınabilmesi tekniğin en önemli dezavantajını oluşturmaktadır (Yılmaz ve Devran. 2016)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Eylül 2018- Şubat 2019 tarihleri arasında Özel Antalya Medicalpark Hastanesi (Organ nakli ve Kemik iliği transplantasyonu da yapılan tam teşekküllü bir hastane) Merkez laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümünde klinik örneklerden izole edilen ve *A. baumannii* olarak isimlendirilip karbapenem direnci olan 48 köken çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastadan birden çok üreme olduğunda sadece ilk köken çalışmaya dahil edilmiştir.

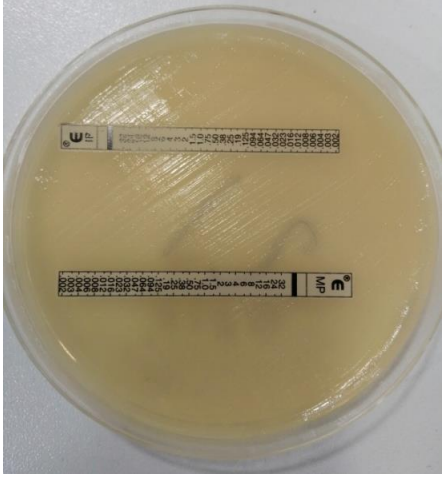
3.1. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının tanımlanması ve karbapenem direncinin saptanması

Çalışmaya dahil edilen 48 adet *A. baumannii* otomatize tür tayini ve karbapenem direnci Vitek 2 Compact (BioMerieux, Fransa) ile tespit edilmiştir. Sistem, tanımlama işlemini içerdiği biyokimyasal testlerle gerçekleştirmektedir. Vitek-2 otomatize sistemi için özel olarak kullanılan deney tüpüne (12x75 mm) 3 ml steril tamponlanmış tuzlu su (saline) (%0.45-0.50 NaCl, ph 4.5-7.0) konulmuş, saf koloniler öze ile alınmış, tüpe aktarılmış ve McFarland bulanıklığı 0,5 olacak şekilde bakteri süspansiyonları ayarlanmıştır. İncelenen her örnek için 2 tane tüp kullanılmıştır. Birinci tüpe saf bakteri kolonilerinden eklendi, ikinci tüpe ise sadece tuzlu su konuldu. Birinci tüp süspansiyonundan 2. tüpe 145 µl süspansiyondan aktarılmıştır. Kasete tanımlı gram negatif identifikasyon kartı (GN, BioMerieux SA-Fransa) 1 tüpdeki bakteri süspansiyonu için, gram negatif antibiyotik duyarlılık tayini için AST 326 (BioMerieux, Fransa) kartları 2. tüp süspansiyonu için kullanıldı. İmpenem ve meropenem dirençli olan izolatlar çalışmaya dahil edildi. İzolatlar bir sonraki aşamaya kadar 2 ml'lik ependorflarda Triptok Soy Agar sıvı besiyerinde -20°C'de saklandı.

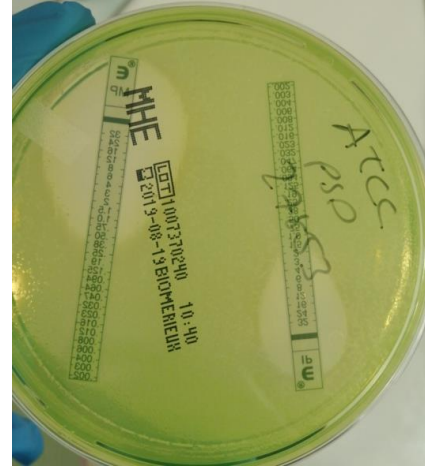
Triptok Soy Agar Sıvı Besiyeri Hazırlama: 100 cc distile su içine 3 gr toz besiyeri (Novatek İSTANBUL) ve 4 ml gliserol (Emir Kimya ANKARA) konuldu, 121°C de 15 dk otoklavda (Nüve OT 40L) steril edildi.

Örnek toplama aşaması bittikten sonra 48 izolat E-test ve DNA izolasyonu aşamaları için suşlar kanlı agar besiyerine pasaj yapıldı. 37°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra E-test yapıldı. Bakteri süspansiyonu 0.49 ve 0.59 McFarland aralığında ayarlandı ve ucu

pamuklu steril svaplar ile oda ısısındaki Müller Hinton Agar besiyerine yayıldı. E-test şeritleri yerleştirilmeden önce 15-20 dakika nemin emilmesi için beklenmiştir. Oda ısısına gelen E-test (BioMérieux, Fransa) stripleri pens yardımı ile dikkatli bir biçimde imipenem ve meropenem stripleri aynı plakta olacak şekilde yerleştirildi. Aerobik ortamda, normal atmosferde, 37 °C’de ve 16-20 saat inkübasyon sonucunda her bir antibiyotigin MIC değerleri üretici firma ve EUCAST 2018 önerilerine uygun olarak ölçülmüştür. Tüm izolatlar imipeneme ve meropeneme dirençliydi. E-test yönteminde kalite kontrol suşu olarak imipenem ve meropeneme duyarlı olan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 izolatı kullanıldı.



Şekil 3.1. E-test uygulaması



Şekil 3.2. E-test kalite kontrol

İmipenem ve meropenem MİK sonuçlarını değerlendirirken Tablo 3.1’de belirtilen değerler kullanıldı.

Tablo 3.1. Karbapenem EUCAST 2018 sınır değerleri

Karbapenemler	MİK sınır değeri (mg/L)	
	S ≤	R >
İmipenem	2	8
Meropenem	2	8

3.2. DNA İzolasyonu

- TSB besiyerinde -20°C de saklanan bakteriler izolasyon yapılmadan 2 gün önce kanlı agar (Biomerioux, FRANSA) besiyerine pasajlanarak canlandırıldı. Bir gün sonra plaklardan alınan bakteriler tekrar 800 ml TSB besiyeri içeren ependorflara pasajlandı. Bir gün etüvde bekletildi.
- Daha sonra 13.000 X g'de 5 dk santrifüj edildi (Mini Spin, Eppendorf). Süpernatant kısmı atıldı. 800 µl TE buffer (10 Mm Tris – HCl pH 8.0 1 mM EDTA içeren) ile pellet resüspanse edildi. 95°C de 15 dk su banyosunda bekletildi.
- 13.000 X g 'de 15 dk santrifüj ettikten sonra süpernatantın mümkün olduğunca yüzeye yakın kısmından dikkatlice 150 µl alıp steril ependorflara alındı ve -20°C de muhafaza edildi (Direkel ve ark. 2016).

3.3. PCR

OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, IMP, VIM, GIM, SPM-1, SIM, NDM-1, ISAbal genlerini saptamak için In-house PCR yöntemi kullanıldı. PCR içeriği her örnek için 50 µl olacak şekilde tablo 3.2'deki gibi hazırlandı.

Tablo 3.2. PCR içeriği

Reaksiyon İçeriği	Miktar
ddH ₂ O	27,70 µl
PCR tampon (Thermo Scientific 10x Deram to buffer includes 20 Mm Mg CL ₂)	9 µl
dNTP (Ampliqon dNTP mix 10 Mm)	2 µl
Primer F	3 µl
Primer R	3 µl
Taq Polimeraz (Thermo Scientific Deram Taq DNA polimerase)	0,30 µl
DNA	5 µl
Toplam Volüm	50 µl

Tablo 3.3. Kullanılan primerlerin isimleri ve baz dizilimleri

	Primer Adı	Gen Dizisi (3'-5')	Baz Çifti (bp)	Kaynak
1.	OXA23-F OXA23-R	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGA ATT TCC AT	501	(Woodford ve ark. 2006)
2.	OXA24-F OXA24-R	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA AGT TGA GCF AAA AGG GGA TT	246	(Woodford ve ark. 2006)
3.	OXA51-F OXA51-R	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	(Woodford ve ark. 2006)
4.	OXA58-F OXA58-R	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG CCC CTC TGC GCT CTA CAT AG	599	(Woodford ve ark. 2006)
5.	IMP -F IMP -R	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	188	(Telli ve ark. 2017)
6.	VIM-F VIM-R	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	390	(Telli ve ark. 2017)
7.	GIM-F GIM-R	TCA ACA CAC CTT GGT CTA AA AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	477	(Telli ve ark. 2017)
8.	SPM-1-F SPM-1-R	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	271	(Telli ve ark. 2017)
9.	SIM-F SIM-R	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	570	(Telli ve ark. 2017)
10.	NDM-1-F NDM-1-R	CC ATQ TTA TGC ACC CGG TGG ATG CGG GCC GTA TGA GTG ATT G	794	(Nordmann ve ark. 2011)
11.	ISAbal-F	CAC GAA TGC AGA AGT TG	-	(Telli ve ark. 2017)

Termal cycler (Biorad T100 Termal cycler) cihazına yerleştirildi ve tablo 3.4'de belirtilen sikluslar uygulandı.

Tablo 3.4. Termal cycler siklusları

Reaksiyon Koşulları		Siklus Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C 2 dk	1
Denatürasyon	95°C 1 dk	33
Bağlanma (Anneling)	55°C 1 dk	
Uzama	72°C 1 dk	
Son uzama	72°C 10 dk	1

3.4. JEL ELEKTROFOREZİ

Direnç geni tespiti için termal cycler'dan çıkarılan PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi yapılır.

Jelin Hazırlanması: İki gr toz agar hassas tartı ile tartıldıktan sonra 100 ml 1xTBE (Tris Borik Asit EDTA) tamponu balon joje yardımıyla hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyulur. Mikrodalga fırın kaynamaya başlayana kadar yüksek ayarda çalıştırılır. Ardından 6 µl SYBR Safe jel boyası (HibriGen Gel Dye) solüsyonu eklenir. Hafifçe balon joje karıştırılır. Denge ayarı kontrol edildikten sonra 17x3 kuyucuklu tanklara taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirilir. Sonra köşe kısmından yavaş bir şekilde sıvı agar dökülür ve iyice eşit oranda yayılması sağlanır. Jel yaklaşık 20-25 dk donmaya bırakılır.

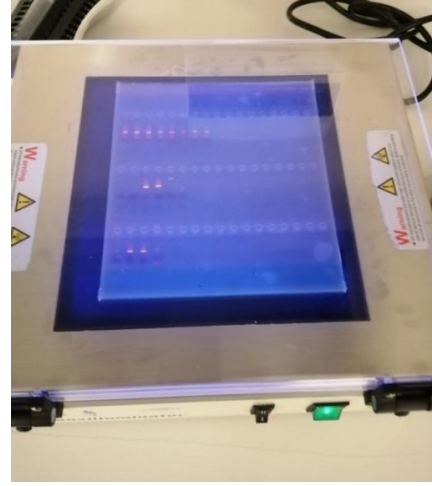
Donan jel tankıyla birlikte elektroforez cihazına (Wealtec elite 300 plus) alınır. Tank TBE tampon ile jelin üstünü geçecek şekilde doldurulur. İki µl loading dye (Thermo Scientific) 10µl DNA ile pipet yardımıyla karıştırılır ve kuyucuklara 10 µl olacak şekilde yerleştirilir. İlk kuyucuğa marker, 2. kuyucuğa negatif kontrol pipetlenir. Daha sonra sırasıyla birinci izolat, ikinci izolat ve sırasıyla 48. izolat kuyucuklara yüklenir.

160 V, 500 mA akımla 25 dakika yürütülür. Başlattıktan sonra tankların kenarlarından kabarcıklar çıktığına ve işlemin başladığından emin olunur.

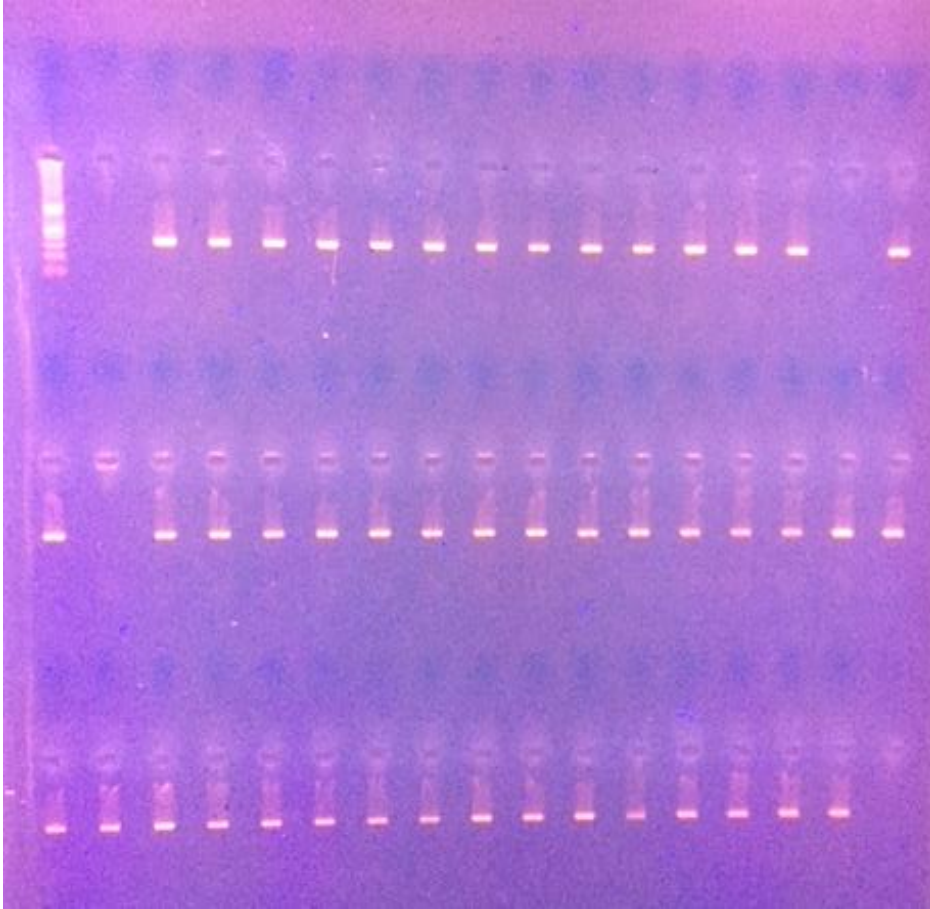
İşlem bittikten sonra tanktaki jel dikkatli bir şekilde çıkarılır. Fazla su peçete ile alınabilir. Bir UV (Wealtec UV transilluminatör) ışık yardımıyla jel görüntülenir. Fotoğraflanır veya görüntü kayıt edilir. Daha sonra baz uzunluğuna göre marker ile karşılaştırarak direnç genleri değerlendirilir.



Şekil 3.3. Wealtec elite 300 plus



Şekil 3.4. Wealtec UV transilluminatör



Şekil 3.5. Jel Elektroforez UV görünümü

3.5. Sekans Analizi

Direnç geni tespit edilen izolatlar primer dizileri ve PCR ürünleri ile birlikte sekansa gönderildi. Gen dizilimleri belirlendi ve çıkan dizilimler BLAST programında değerlendirildi.

Source File: OXA 51-29-OXA 51-R
Creation Date: 22.Oct.2019 07:40:31 AM



Şekil 3.6. Sekans Analizi

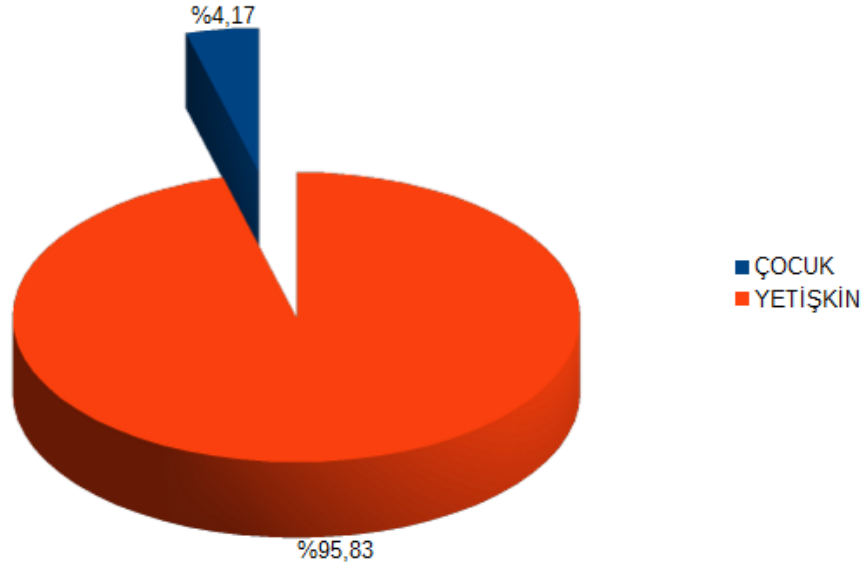
3.6.İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizi Akdeniz Üniversitesi İstatistik Danışmanlık Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından yapılmıştır. Analizlerde SPSS 23.0 programı kullanılmıştır. Grupların karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmış ve istatistiksel anlam için $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

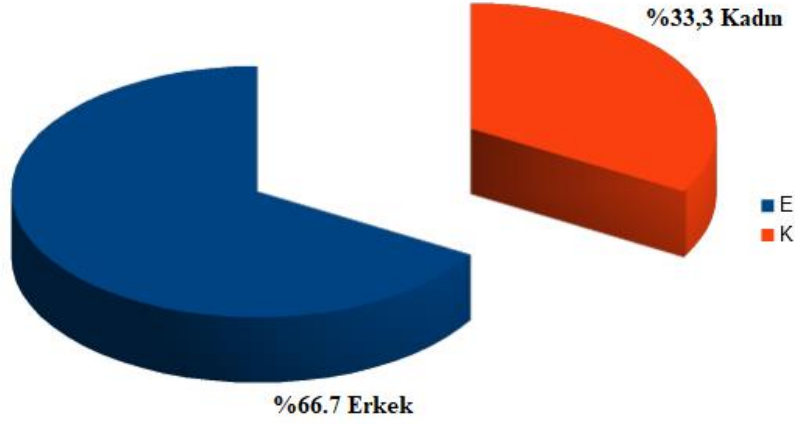
Eylül 2018 – Şubat 2019 tarihleri arasında organ nakli ve kemik iliği transplantasyonu da yapılan tam teşekküllü özel bir hastanede merkez laboratuvarı mikrobiyoloji bölümüne gönderilen klinik araştırmalar sonucunda aynı hastaya ait numuneler içinde ilk kez üreyen ve karbapenem direnci tespit edilen izolatlar dahil edilmiştir. Toplamda 48 adet izolat çalışmaya alınmıştır. İzolatların hepsi tür tayininde *A. baumannii* olarak belirlenmiştir. E-test yöntemi ile imipenem ve meropenem direnci teyit edilmiştir. Otomatize sistemde karbapenem direnci tespit edilirken, kolistin tüm kökenlerde duyarlı bulunmuştur. Ayrıca tigesiklin iki hasta da dirençli, onbeş hastada orta duyarlı, otuzbir hastada duyarlıdır.

Yaş dağılımı 3 ile 89 arasında değişmektedir. Yaş ortalaması $51,83 \pm 20,99$ 'dur. Çalışmamızda 18 yaş ve altında bulunan hastalar çocuk, 18 yaşından itibaren de yetişkin olarak kabul edilmiştir.



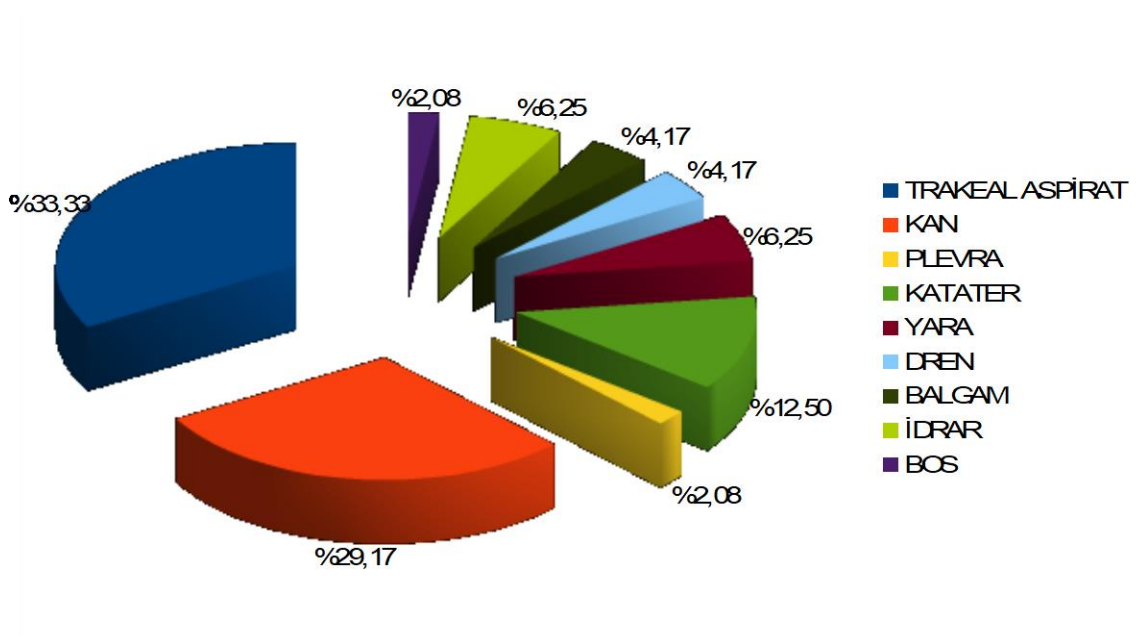
Şekil 4.1. Çocuk-yetişkin hasta dağılımı

Çalışma listesine alınan hastaların 16'sı kadın (%33,3), 32'si erkektir (%66,7).



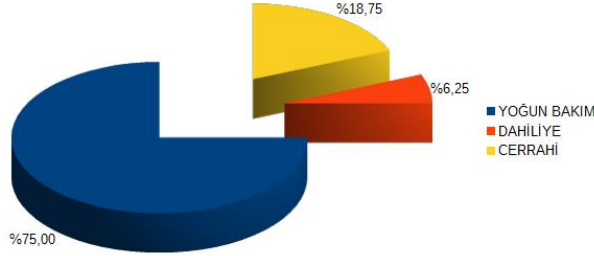
Şekil 4.2. Cinsiyet dağılımı

Çalışmaya dahil edilen hasta numuneleri, onaltı trakeal aspirat (% 33,33), ondört kan (% 29,17), bir plevra (% 2,08), altı katater (% 12,50), üç yara yeri (% 6,25), iki dren (% 4,17), iki balgam (% 4,17), üç idrar (% 6,25), bir BOS kültürü (%2,08) şeklindedir.



Şekil 4.3. Materyal dağılımı

Otuzaltı izolat yoğun bakım, dokuz izolat cerrahi, üç izolat ta dahiliye servisinden gelmektedir.



Şekil 4.4. Kliniklerden gelen örneklerin dağılımı

Çalışmaya dahil edilen 48 adet izolatta OXA 23, OXA 24, OXA 51, OXA 58, IMP, VIM, SIM, GIM, NDM-1, SPM-1 ve ISAbA1 genleri varlığı araştırılmıştır. İmipenem ve meropenem dirençli 48 izolata tümünde OXA- 23 ve OXA-51 genleri saptanmıştır. ISAbA1 geni otuziki (% 66,66) kökünde, VIM direnç geni sekiz (% 16,6) kökünde, OXA-58 geni iki (% 4,16) kökünde, GIM geni iki (% 4,16) kökünde, SIM geni iki (%4,16) kökünde bulunmuştur. OXA-24 genine sahip hiçbir köken bulunmamıştır.

Tablo 4.1. Direnç genlerinin birlikte bulunma durumları

Direnç Genleri	Sayı (n)	Yüzde(%)
Sadece OXA-23, OXA-51	13	27,04
OXA-23, OXA-51, VIM	3	6,24
OXA-23, OXA-51, ISAbA1	30	62,40
OXA-23, OXA-51, VIM, ISAbA1	3	6,24
OXA-23, OXA-51, OXA-58, ISAbA1	2	4,16
OXA-23, OXA-51, GIM, ISAbA1	2	4,16
OXA-23, OXA51, VIM, SIM	1	2,08
OXA-23, OXA51, VIM, SIM, ISAbA1	1	2,08

Yoğun bakım ünitesinde yatan 66 yaşındaki bir erkek hastanın trakeal aspirat kültüründen izole edilen kökende OXA-23, OXA51, VIM, SIM, ISAbA1 genleri birlikte saptanmıştır.

Cinsiyet ile direnç genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Kökenlerin izole edildiği klinik örnekler ile direnç genlerinin saptanması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Hastaların yattığı servisler ile direnç genlerinin saptanması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 4.2.'de çalışmaya dahil edilen kökenlerin antibiyotik direnç oranları verilmiştir.

Tablo 4.2. *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin antibiyotik direnç oranları

Antibiyotik	Duyarlı (%)	Orta duyarlı (%)	Dirençli (%)
Kolistin	100	0	0
Tigesiklin	62,5	33,3	4,1
Amikasin	47,9	1,08	50
Trimetoprim-Sulfametoksazol	20,83	0	79,16
Gentamisin	14,58	10,42	75
Levofloksasin	12,75	0	87,5
İmipenem	0	0	100
Meropenem	0	0	100
Seftazidim	0	0	100
Sefepim	0	0	100
Piperasilin-Tazobaktam	0	0	100

5. TARTIŞMA

Acinetobacter spp.'ler ülkemizde yoğun bakım üniterlerinde en sık rastlanan gram negatif enfeksiyon etkenleri arasında yer almakta ve bu izolatlar antibiyotiklere yüksek oranda dirençli saptanmaktadır (Leblebicioğlu ve ark. 2007).

Bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin, bakterilerin üremelerini durdurma veya bakterileri öldürme özelliklerini kaybetmeleri antibiyotik direnci olarak bilinmektedir. Artan antibiyotik direncinin temelinde gereksiz reçeteleme, aşırı antibiyotik kullanımı, gıda ve hayvancılıkta yaygın antibiyotik kullanımı birkaç neden olarak sayılabilir (Kılıç Esin. 2019).

Karbapenemler gibi *Acinetobacter* spp.'e karşı etkili son çare antibiyotiklerine karşı artan direnç, terapötik seçenekleri önemli ölçüde sınırlandırmıştır (Novović ve ark. 2018).

Karbapeneme dirençli suşlar, mortalite hızı yüksek ve tedavisi zor enfeksiyonlarla kendini göstermektedir. Bu nedenle bu dirence neden olan karbapenemaz genlerinin dağılımının incelenmesi de önemlidir. Karbapenemlere karşı gelişen direncin moleküler temelinde, birbiri ile kombine biçimde çalışan, hem oksasilinaz (OXA) tipi karbapenemazların sentezlenmesinde artış, hem de enzimatik olmayan mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır (Demirci, Akın. 2019). Gram negatif bakterilerde kinolon, karbapenem ve polimiksin antibiyotik direnci hızla artmaktadır. EARS-Net 2016 Raporuna göre, AB ülkelerinde invaziv *Acinetobacter* spp. izolatlarında karbapenem direnci % 0-95.4 arasındadır ve AB ortalaması %35.1'dir. Altı ülkede %10'un altında, üç ülkede %10-50 arasında, 12 ülkede ise %50'nin üzerinde bildirilmiştir. En yüksek direnç saptanan ülke Yunanistan'dır. Türkiyede Sağlık Bakanlığının yıllık sürvelans ve direnç verilerine bakarsak *Acinetobacter* spp. 2014 yılında listeye dahil edilmiştir, 2014-2015 yılında karbapenemlere direnç %89 iken 2016 yılında %92,3, 2018 yılında ortalama olarak %95 civarındadır. Yine kolistin için 2014-2015 yılında %2, 2016'da %6,7, 2018'de de yaklaşık olarak %6,74'dür. Tigesiklin 2018 verileri ise yaklaşık olarak %30'dur (Sağlık Bakanlığı. 2019).

İmipeneme 2007 ve 2008 yılı için direnç oranı %0 iken 2010 da %36, 2011 %88 ve 2012 yılında %96 olarak bulunmuştur. Ankara' da yapılan bir çalışmada meropenem direnç oranları da imipeneme benzer oranda hızla artmıştır. Kolistin için 2012 yılında ilk dirençli suş saptanmıştır (Savci ve ark 2015). Aynı çalışmada tigesikline %15, amikasin %65, trimetoprim-sülfametoksazole %66, sefepim ve seftazidime %93, ampisilin-sulbaktama %95 direnç bildirilmiştir.

Dünyadaki çalışmalara bakıldığında 2005-2016 yılları arasında İsviçre'de yapılan bir çalışmada karbapenem direnç oranları (%8.4 ± %13.9) arasında değişmektedir (A. Ramette. 2018). Yine Hong Kong'da yapılan bir çalışmada karbapenem grubu antibiyotiklere direnç % 55 bulunmuştur (Leung, Leung, ve Lai. 2019).

Direkel ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladığı bir çalışmada toplam 79 *A.baumannii* izolatının antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde, tüm izolatların kolistine duyarlı olduğu izlenmiş; piperasilin/ tazobaktam, siprofloksasin, imipenem, meropenem, sefaperazon/sulbaktam ve trimetoprim/sülfametoksazole %91,1 ile %97,5 arasında; seftazidim, levofloksasin ve gentamisin %83,6 ile %88,6 arasında; tetrasiklin, ampisilin/sulbaktam ve amikasin %55,7 ile %77,2 arasında direnç oranları saptanırken, tigesikline ise %3,8 oranında direnç bulunmuştur. Bu sonuçlar, imipenem ve meropenemin yer aldığı karbapenemlere karşı %94,9 gibi yüksek düzeyde direnç olduğunu göstermektedir (Direkel ve ark. 2016).

Ülkemizde 2017 yılında yapılan bir çalışma da antibiyotiklere direnç oranları şöyledir; Kolistin (%0), Amikasin (%38,9) Gentamisin (%64,0) Levofloksasin (%94,2) (Bilgisi ve ark. 2017). Uluslararası yayınları incelediğimizde, Li ve arkadaşları'nın 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada tigesikline %17,5, sefepime %96,3, amikasin %100, seftazidime %100 oranında direnç bildirildiği görülmektedir. Evans ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmalarında ise tigesikline %3, amikasin ve ampisilin-sulbaktama %81,6 direnç bildirmiştir.

Bizim çalışmamızda en duyarlı antibiyotikler kolistin (%100), tigesiklin (%62,5) ve amikasin (%47,9)'dir.

Giderek artan karbapenem direnç oranları nedeniyle biz de hastanemizden izole edilen karbapenemaz dirençli *Acinetobacter* spp. kökenlerinde direnç genlerini saptamayı amaçladık.

Çalışmamızda 11 farklı direnç genlerinin belirlenmesi için In-house PCR'dan yararlanıldı ve OXA-51 geni 48 suşun hepsinde saptandı. Zaten intrensek olarak bulunması nedeniyle OXA-51 PCR için pozitif kontrol olarak kullanılabilir. Çiftçi ve arkadaşları'nın 2013 yılında ülkemizde yaptıkları çok merkezli çalışmaya bakıldığında, 834 suşun tamamında OXA-51 saptandığı, fakat OXA-24 saptanmadığı görülmektedir (Çiftçi ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer şekilde 48 suşda OXA-51 bulunurken, hiçbir izolatta OXA-24 bulunmamaktadır. OXA-23 için yapılan çalışmalar incelendiğinde, Ning ve arkadaşları'nın 2017 yılında yaptıkları çalışmada, OXA-23 pozitifliğinin %94 (101 suşun 95'i) seviyesinde olduğu görülmektedir (Ning ve ark. 2017)'. Yine Aydın'da aynı yıl yapılan çalışmada 122 izolattan karbapenem dirençli olanların onsekizinde (%42) OXA-23 direnç geni, beşinde (%12) OXA-58 grup direnç geni pozitif bulunurken, OXA-24 grup direnç genine sahip suş bulunmamıştır. Aynı çalışmada diğer karbapenemaz enzimlerinden IMP, VIM, GIM, SPM-1, SIM hiçbir suşta bulunmamaktadır (Telli ve ark. 2017). Bizim çalışmamızda da OXA-23 genine 48 köken (%100) sahipken, GIM iki kökende, OXA-58 iki kökende, ISAbA1 otuziki kökende, VIM sekiz kökende, SIM iki kökende pozitif tespit edilmiştir.

Heba ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları bir çalışma da en yaygın direnç genini %90 ile OXA-23, ardından % 66,7 NDM, % 50 GES geni bulunmuştur. IMP, VIM, OXA-24, OXA-58 genleri hiçbir izolatta bulunmamıştır (Ramadan ve ark. 2018).

Direkel ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladığı bir çalışmada 79 izolatin tümünde OXA-51 geni pozitif tespit edilirken, OXA-23 izolatların 71'inde (%89.9) pozitif bulunmuştur. OXA-58 ve OXA-24 geni hiçbir izolatta tespit edilmemiştir (Direkel ve ark. 2016).

Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında *Acinetobacter baumannii*'nin en çok izole edildiği materyaller solunum solu örnekleri ve kan kültürleridir. Bu da bizim çalışmamız

ile paraleldir. Ayrıca izole edildiği bölüm olarak bakıldığında yoğun bakımlar en üst bölümde yer almaktadır.

Antibiyotik direnç oranlarındaki ve direnç genlerindeki değişiklikler nedeniyle her hastane kendi direnç oranlarını takip etmeli ve klinik ile bu sonuçları paylaşmalıdır. Bu şekilde antibiyotik seçimine yardımcı olarak tedavi başarısının artmasına katkıda bulunabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Çalışmamızda 48 adet karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* kökeninde In-house PCR yöntemi ile karbapenemaz direnç genleri (OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, IMP, VIM, SIM, GIM, SPM-1, NDM-1, ISAbA1) araştırılmıştır.
- Çalışma listesine alınan hastaların 16'sı kadın (%33,3), 32'si erkektir (%66,7). Yaş dağılımı 3 ile 89 arasında değişmektedir. Yaş ortalaması $51,83 \pm 20,99$ 'dur.
- Çalışmaya dahil edilen hasta numuneleri onaltı trakeal aspirat (%33,33), ondört kan (%29,17), altı katater (%12,50), üç idrar (%6,25), üç yara yeri (%6,25), iki dren (%4,17), iki balgam (%4,17), bir plevra (%2,08), bir BOS kültürü (%2,08) şeklindedir. Otuzaltı izolat yoğun bakım, dokuz izolat cerrahi, üç izolat ise dahiliye servisinden gelmektedir.
- Direnç genlerinin saptanma oranları; OXA-23 ve OXA-51 tüm kökenlerde, ISAbA1 geni otuz iki (%66,66) kökende, VIM geni sekiz (%16,6) kökende, OXA-58 geni iki (%4,16) kökende, GIM geni iki (%4,16) kökende, SIM geni iki (%4,16) kökende bulunmuştur. OXA-24, IMP, NDM-1, SPM-1 hiçbir kökende saptanmamıştır.
- Tüm kökenlerin antibiyogram sonuçları incelendiğinde en hassas antibiyotikler kolitsin (%100), tigesiklin (%62,5) ve amikasindir (%47,2).
- Antibiyotik direnç oranlarındaki ve direnç genlerindeki değişiklikler nedeniyle her hastane kendi direnç oranlarını takip etmeli ve klinik ile bu sonuçları paylaşmalıdır. Bu şekilde antibiyotik seçimine yardımcı olarak tedavi başarısının artmasına katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

Akçam F. Karbapenem Dirençli Enterobakterlerle: Nasıl Başa Çıkılır? Carbapenem-Resistant Enterobacteria: How to Cope? Flora the Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology 2019;24. 75-86.

Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M. A Novel Integron-like Element Carrying the Metallo- β -Lactamase Gene Bla(IMP). Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1995;39(7):1612-15.

Arda M. Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler). Kükem Derneği Bilimsel Yayınları. Ankara.1995.

Aşık Gülşah. Acinetobacter Baumannii Virülansının Açıklanmasında Güncel Yaklaşımlar. Mikrobiyol Bul 2011;45(2): 371-380

Aygül A. Antibiyotik Direncinde Dışa Atım Sistemlerinin ve Dirençle Mücadelede Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin Önemi. Mikrobiyoloji Bul. 2015;49(2):278-91.

Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, Cornaglia G. Detection of VIM-5 Metallo- β -Lactamase in a Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolate from Turkey. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2004;54(1):282-83.

Baumann P. Isolation of Acinetobacter from Soil and Water. Journal of Bacteriology 1968;96(1):39-42.

Berezin BE, Towner KJ. 1996. Acinetobacter Spp as Nosocomial Pathogens. Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. Clin Microbiol Rev. 9(2):148-165.

Bérézin BE, Joly-Guillou ML. Hospital Infection with Acinetobacter Spp.: An Increasing Problem. Journal of Hospital Infection 1991;18:250-55.

Bonfigli G, Russo G, Nicoletti G. Recent Developments in Carbapenems. Expert Opinion on Investigational Drugs 2002;11(4):529-44.

Bouvet M, Philippe J, Jeanjean Sylvie, Vieu Jean-francois, Dijkshoorn Lenie. Species, Biotype, and Bacteriophage Type Determinations Compared with Cell Envelope Protein Profiles for Typing Acinetobacter Strains. Journal Of Clinical Microbiolog 1990;170(2):170-76.

Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clinical Microbiology Reviews 2001;14(4):933-51.

Bush K. Characterization of β -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1989;33(3):259-63.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995;39(6):1211-33.

Chau Sze Lok, Yiu Wai Chu, Elizabeth TS. Houang. Novel Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux System AdeDE in Acinetobacter Genomic DNA Group 3. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004;48(10):4054-55.

Ciftci Alper, Aksoy Abdurrahman. Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics. 2015;1:1-10.

Ciftçi Hakkı İhsan, Aşık Gülşah *Acinetobacter Baumannii* 'nın Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. Ankem Dergisi. 2011;25(3):196.

Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. The Astonishing Complexity of Antibiotic Resistance. Clinical Microbiology and Infection. 2000; 6(S3):93-94.

Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 Metallo- β -Lactamase in Europe. Lancet. 1999;353(9156):899-900.

Demirci Mehmet, Akın Yiğın, Cemil Demir. Karbapeneme Dirençli Acinetobacter Baumannii Suşlarında OXA Tipi Karbapenemaz Genlerinin Dağılımının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle İncelenmesi. 2018;32:123-26.

Direkel Şahin. Bir Üniversite Hastanesinde İzole Edilen Çok İlaça Dirençli Acinetobacter Baumannii İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılığı ve Moleküler Karakterizasyonu. Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Acinetobacter Bau. 2016;50(4):522-34.

Dökmeci İ. Farmakoloji İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar'ında. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul.1992;705-86

Garibyan, Avashia LN. Polymerase Chain Reaction. The Journal of Investigative Dermatology. 2013;133(3):1-4.

Gülay Z. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç.Güneş Kitabevi. 1999;(12) 529-1532

Gülay Z. Hücre Duvar Sentezini Etkileyen Antibakteriyeller. ANKEM Dergisi. 2003; 17(3):192-204.

Gür Deniz. Antibiyotik Duyarlılık Testleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2016. Ek sayı,cilt:46

Hadidi A, Levy L, Podleskis E. Polymerase Chain Reaction Technology in Plant Pathology. In: Molecular Methods in Plant Pathology. 1995;167-187.

Hall LMC, Livermore D M, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an Extended-Spectrum Variant of OXA-10 (PSE-2) β -Lactamase from Pseudomonas Aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1993;37(8):1637-44.

Hawley Joshua, Clinton K, Jorgensen James. Colistin Heteroresistance in Acinetobacter and Its Association with Previous Colistin Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2008;52(1):351-52.

Helfand Marion, Robert A. β -Lactamases: A Survey of Protein Diversity. Current Drug Targets - Infectious Disorders 2003;3(1):92-3.

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. Journal of Clinical Microbiology 1994;32(10):2353-58.

Johnson J, Kristie Gwen, Robinson L, LiCheng Zhao, Anthony D. Harris, Stine Kerri A. Thom. Comparison of Molecular Typing Methods for the Analysis of Acinetobacter Baumannii from ICU Patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2016;86(4):345-50.

Joly-Guillou ML. Clinical Impact and Pathogenicity of Acinetobacter. Clinical Microbiology and Infection 2005;11(11):868-73.

Kahan J S, Kahan F M, Goegelman R, Currie S A, Jackson M , Stapley E O, Miller TW, Miller A.K, Hendlin D, Woodruff H B, Birnbaum J, Mochales S, Hernandez S. Thienamycin, a New β -Lactam Antibiotic Discovery, Taxonomy, Isolation and Physical Properties. The Journal of Antibiotics 1979;32(1):1-12.

Kahya Serpil, Buyukcangaz Esra, Carli Tayfun. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi . 2014;32(1):31–38.

Kalem Fatma, Ertuğrul Ömür ve Türk Dağı Hatice. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter Baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnci. Antibiotic Resistance in *Acinetobacter Baumannii* Strains Isolated from Various Clinical Specimens. Abant Medical Journal Özgün Makale / Original Article. 2017;Cilt 6 Issue Sayı 1

Keyik Şerafettin. *Acinetobacter Baumannii* Suşlarında OXA–23 ve OXA–58 Tipi Genişleniş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması ve PFGE Yöntemiyle Klonal Yakınlığının İncelenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2013.

Kılıç Esin, Yenilmez Fusun. Türkiye ve AB Ülkelerinde Antibiyotik Kullanımı, Antibiyotik Direnci ve Dış Ticaret Dengesi Üzerine Bir Değerlendirme. 2019;4(1):45-54.

Kızıllarslanoğlu Muhammet Cemal, Ergönül Önder , Çetinkaya-ŞardanYeşim, Akova Murat. Yoğun Bakım Ünitesinde Acinetobacter Baumannii Kolonizasyonu ve İnfeksiyonu: Risk Faktörleri, Bulaşma Yolları ve Bulaşma Dinamikleri. 2016.

Leblebicioğlu H, Rosenthal VD, Arikan ÖA, Özgültekin A, Yalcin NC, Koksall I, Usluer G, Sardan YC, Ulusoy S. Device-Associated Hospital-Acquired Infection Rates in Turkish Intensive Care Units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). Journal of Hospital Infection 2007;65(3):251-57.

Leung Eddie, Chi Man, Leung Polly Hang Mei, and Raymond Wai Man Lai. Emergence of Carbapenem-Resistant Acinetobacter Baumannii ST195 Harboring BlaOXA-23 Isolated from Bacteremia in Hong Kong. Microbial Drug Resistance 2019;25(8):1199-1203.

Livermore DM. Mechanisms of Resistance to β -Lactam Antibiotics. Pp. 7–16 in Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1991. Supplement. Vol. 22.

Lorenz Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol plus Troubleshooting and Optimization Strategies. Journal of Visualized Experiments : JoVE 2012;(63):e3998.

Malouin F, Bryan LEModifi. cation of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of Beta-Lactam Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1986;30(1):1-5.

Mandell Lionel. Doripenem: A New Carbapenem in the Treatment of Nosocomial Infection. Clinical Infectious Diseases 2009;49(s1):S1-3.

Massidda O, Rossolini GM, Satta G. The Aeromonas Hydrophila CphA Gene: Molecular Heterogeneity among Class B Metallo- β -Lactamases. Journal of Bacteriology 1991;173(15):4611-17.

Maşlak Begüm, Bağcıgil A. Funda. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İnhibitörleri Polymerase Chain Reaction Inhibitors. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi. 2018;Cilt 1, Sayı 1.31-36.

Mullis KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American 1990;262(4):56–65.

Ning, Nian zhi, Xiong Liu, Chun mei Bao, Su ming Chen, En bo Cui, Ju ling zhang, Jie Huang, Fang hong Chen, Tao Li, Fen Qu, and Hui Wang. Molecular Epidemiology of Bla OXA-23 -Producing Carbapenem-Resistant Acinetobacter Baumannii in a Single Institution over a 65-Month Period in North China. BMC Infectious Diseases 2017;17:14

Nordmann Patrice, Poirel Laurent, Carrër Amélie, Toleman Mark A, Walsh Timothy R, How to Detect NDM-1 Producers. Journal of Clinical Microbiology 2011;49(2):718-21.

Novović Katarina, Mihajlović Sanja, Dinić Miroslav, Malešević Milka, Miljković Marija, Kojić Milan, Jovčić Branko. Acinetobacter Spp. Porin Omp33-36: Classification and Transcriptional Response to Carbapenems and Host Cells. PLoS ONE 2018;13(8).

Nowak Pawel, Paluchowska Paulina. Acinetobacter Baumannii: Biology and Drug Resistance-Role of Carbapenemases. Folia Histochemica et Cytobiologica 2015; 54(2):61-74.

Okutucu Burcu, Pehlivan Sacide. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. Dergi Park 2003;12:2

Parker MT. Chromobacterium, Flavobacterium, Acinetobacter and Alkaligenes. In: Parker MT Editor, Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 1983;P. chapter 32: 263-271.

Paterson David L, DePestel Daryl. Doripenem. Clinical Infectious Diseases. 2009;49(2):291-98.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter Baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol.* 2008;21(3):538-82.

Poirel Laurent, Héritier Claire, Tolün Venus, Nordmann Patrice. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella Pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48(1):15-22.

Poirel Laurent, Nordmann P. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter Baumannii*: Mechanisms and Epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 2006;12(9):826-36.

Poole K. Efflux-Mediated Multiresistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 2004;10(1):12-26.

Queenan Anne Marie, Bush Karen. Carbapenemases: The Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2007;20(3):440-58.

Ragbetli Cennet, Güdücüoğlu Hüseyin, Parlak Mehmet. Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Çoklu İlaç Dirençli *Acinetobacter* and *Pseudomonas* İzolatlarında Karbapenem Direncinin Araştırılması. *Journal of Contemporary Medicine* 2016;275-79.

Ramadan Raghdaa A, Gebriel Manar G, Kadry Heba M, Mosallem Ahmed. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* and *Pseudomonas Aeruginosa*: Characterization of Carbapenemase Genes and E-Test Evaluation of Colistin-Based Combinations. *Infection and Drug Resistance* 2018;11:1261-69.

Ramette A. Prevalence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from 2005 to 2016 in Switzerland. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):159.

Rasmussen Beth A. Bush Karen. Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41(2):223-32.

Rodriguez JM. Detection of Animal Pathogens by Using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Veterinary Journal* 1997;153(3):287-305.

Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü ve Bulaşıcı Hastalıklar Dairesi Başkanlığı. Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Etken Dağılımı ve Antibiyotik Direnç Raporu 2018. 2019.

Sanders CC. β -Lactamases of Gram-Negative Bacteria: New Challenges for New Drugs. *Clinical Infectious Diseases* 1992;14(5):1089-99.

Savci Ünsal, Özveren Gülşen, Yenişehirli Gülgün, Bulut Yunus, Özdaş Sibel. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter Baumannii* Suşlarının In-Vitro Duyarlılık Durumları Specimens. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Hacettepe Üniversitesi.* 2015. (1):24-29.

Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram Negative Rods.* In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH. (Eds.). *Manuel of Clinical Microbiology.* 9 Th Ed. Washington. 2007.

Shah PM. Parenteral Carbapenems. *Clinical Microbiology and Infection* 2008;175-80.

Telli Murat, Eyigör Mete, Korkmazgil Berna, Aydın Neriman, Atalay Mustafa Altay. *Molecular Epidemiology Of Clinical Isolates Of Carbapenem Resistant Acinetobacter Spp.* *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2017;47(4):190-96.

Tetik Tülay. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde İzole Edilen Gram Negatif Nonfermenter Bakterilerde Metallo Beta-Laktamaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması. *Isparta.* 2008

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ. *Molecular Characterization of SPM-1, a Novel Metallo-Beta-Lactamase Isolated in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance programme.* 2002;50(5):673-9.

Tünay Havva, Demirdal Tuna, Demirtürk Neşe. *Acinetobacter Enfeksiyonlarında Dirençle İlgili Değişen Tanımlamalar ve Dirençte Güncel Durum.* *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi* 2012;42(4):123-126

Vahaboglu H, Oztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M. Widespread Detection of PER-1-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases among Nosocomial Acinetobacter and Pseudomonas Aeruginosa Isolates in Turkey: A Nationwide Multicenter Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41(10):2265-69.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable Imipenem Resistance in Pseudomonas Aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991;35(1):147-51.

Weier Heinz Ulrich, Gray Joe W. A Programmable System to Perform the Polymerase Chain Reaction. *DNA* 1988;7(6):441-47.

Woodford Neil, Ellington Matthew J, Coelho Juliana M, Turton Jane F, Elaina Ward M, Brown Susan, Amyes Sebastian GB, Livermore David M. Multiplex PCR for Genes Encoding Prevalent OXA Carbapenemases in Acinetobacter Spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006;27(4):351-53.

Yılmaz Zübeyir, Devran Suat. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Bitki Biyoteknolojisinde yaygın Uygulamaları. *Dergi Park*.2003;1:31-43

Yoo Jin Hong. The Infinity War: How to Cope with Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Korean Medical Science* 2018;33(40).

Yuluğ N. Beta-Laktamazlar ve Klinik Açısından Önemi. *ANKEM Dergisi* 1997;11. 205-7.

Zeana Cosmina, Larson Elaine, Sahni Jyoti, Bayuga SJ, Fann Wu, Della-Latta Phyllis. The Epidemiology of Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii Does the Community Represent a Reservoir? *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2003;24(04):275-79.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aydan	Uyruğu	T.C.
Soyadı	AYDIN HİZEL	Tel no	05438138612
Doğum tarihi	21.04.1987	e-posta	parpali0761@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Konyaaltı Lisesi	2004
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	-	-
Doktora	-	-

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Özel Antalya Yaşam Hastanesi	2011-2016
Biyolog	Özel Antalya Medicalpark Hastanesi	2016-devam ediyor

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
-	-	-
-	-	-

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)