

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARINDA**  
**KARBAPENEM DİRENCİNE YOL AÇAN SINIF-D BETA-**  
**LAKTAMAZLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Programı**

**Yüksek lisans Tezi**

**Iskandar DAVANDEH**

**DANIŞMAN : Yrd. Doç. Dr. Bayrı ERAÇ**

**İzmir**

**2014**



**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARINDA**  
**KARBAPENEM DİRENCİNE YOL AÇAN SINIF-D BETA-**  
**LAKTAMAZLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Programı**

**Yüksek lisans Tezi**

**Iskandar DAVANDEH**

**DANIŞMAN : Yrd. Doç. Dr. Bayrı ERAÇ**

**İzmir**

**2014**



## **DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**

**(Adı Soyadı)**

**(İmza)**

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Bayrı ERAÇ

**(Danışman)**

**Üye** : Prof. Dr. Mine HOŞGÖR-LİMONCU

**Üye** : Prof. Dr. M. Emin LİMONCU

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 13.03.2014

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı ve destek olan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Bayrı ERAÇ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca bana yardımcı olan Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine, görevlilere ve diğer çalışanlara teşekkür ederim.

Tez çalışmamızın klinik *A. baumannii* kökenlerini temin eden Prof. Dr. Şöhret Aydemir'e ve pozitif kontrol kökenleri bize hediye eden Prof. Dr. Safar Farajnia'ya teşekkür ederim.

İzmir

2014

Iskandar DAVANDEH

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ .....	VIII
KISALTMALAR .....	IX
<b>BÖLÜM I</b> .....	1
1.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. GİRİŞ .....	1
1.2. GENEL BİLGİLER .....	3
1.2.1. <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .....	3
1.2.1.1 VİRÜLANS VE PATOGENEZ .....	5
1.2.1.2 ENFEKSİYONLAR VE EPİDEMİYOLOJİ .....	7
1.2.1.3. <i>A. baumannii</i> ve antibiyotik direnci .....	9
1.2.2. Sınıf-D Beta-Laktamazlar (OXA Enzimleri) .....	15
1.2.2.1. <i>A. baumannii</i> 'de görülen Beta-laktamaz enzimleri .....	17
1.2.2.1.1. AmpC tipi sefalosporinazlar .....	18
1.2.2.1.2. Metallo-beta-laktamazlar (MBL) .....	18
1.2.2.1.3. Karbapenemleri hidrolize eden sınıf-D Beta-laktamazlar (OXA tipi enzimler) .....	21
1.2.2.1.3.1. OXA-51-grup genler .....	22

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.2.2.1.3.2. OXA-23-grup genler .....	23
1.2.2.1.3.3 OXA-24-grup genler .....	24
1.2.2.1.3.4 OXA-58-grup genler .....	24
1.2.2.2. Non-A. <i>baumannii</i> türlerde görülen OXA genleri .....	25
<b>BÖLÜM II</b> .....	<b>27</b>
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1. GEREÇ</b> .....	<b>27</b>
2.1.1. Bakteri Kökenleri .....	27
2.1.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler .....	27
<b>2.2. YÖNTEMLER</b> .....	<b>29</b>
2.2.1. Mikrodilüsyon Yöntemiyle İmipenem MİK Değerlerinin Belirlenmesi ...	29
2.2.2. DNA EKSTRAKSİYONU .....	30
2.2.3. IMP Dirençli A. <i>baumannii</i> izolatlarının Klonal Yakınlıklarının İncelenmesi .....	31
2.2.4. Multipleks PCR İLE OXA-51-grup , OXA-23-grup , OXA-24-grup ve OXA-58-grup Genlerinin Araştırılması .....	32
2.2.5. OXA-51-grup GENİNİN ARAŞTIRILMASI .....	33
2.2.6. OXA-23-grup GENİNİN ARAŞTIRILMASI .....	34
2.2.7. OXA-58-grup GENİNİN ARAŞTIRILMASI .....	35



## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.8. OXA-24-grup GENİNİN ARAŞTIRILMASI .....	36
2.2.9. Elektroforez.....	37
2.2.10. DNA Dizi Analizi .....	38
<b>BÖLÜM III</b> .....	<b>39</b>
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>39</b>
3.1. İMP MİK Değerleri.....	39
3.2. <i>A. baumannii</i> Kökenlerinin Klonal İlişkisi .....	39
3.3. KHO GENLERİNİN VARLIĞININ SAPTANMASI .....	42
<b>BÖLÜM IV</b> .....	<b>45</b>
<b>4. TARTIŞMA</b> .....	<b>45</b>
<b>BÖLÜM V</b> .....	<b>52</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>52</b>
<b>BÖLÜM VI</b> .....	<b>55</b>
ÖZET .....	55
ABSTRACT.....	57
<b>BÖLÜM VII</b> .....	<b>59</b>
KAYNAKLAR .....	59
ÖZGEÇMİŞ .....	71

## ŞEKİL, TABLO VE REŞİMLER DİZİNİ

Sayfa

<b>Şekil 1.</b> Mueller Hinton Agar'da <i>A. baumannii</i> kolonileri .....	5
<b>Şekil 2.</b> Bazı <i>A. baumannii</i> suşlarının ERIC PCR sonucu oluşan bant paternleri	40
<b>Şekil 3.</b> <i>A. baumannii</i> izolatlarının dendogramı .....	41
<b>Şekil 4.</b> Her klon ve subtipi temsil eden 22 <i>A. baumannii</i> izolatında multipleks PCR ürünlerinin jel görüntüsü. ....	42
<b>Şekil 5.</b> Klon ve subtipleri temsil eden bazı kökenlerde, sadece <i>bla<sub>OXA-23</sub>-grup</i> , <i>bla<sub>OXA-51</sub>-grup</i> ve <i>bla<sub>OXA-58</sub>-grup</i> 'a özgü primerler ile elde edilen PCR ürünleri .....	43
<b>Şekil 6.</b> K (34, 62) ve L (35, 81) klonlarını temsil eden kökenlerde <i>bla<sub>OXA-58</sub>-grup</i> 'a özgü primerler ile elde edilen PCR ürünleri .....	44
<b>Tablo 1.</b> <i>A. baumannii</i> 'nin sahip olduğu antibiyotik direnç mekanizmaları .....	14
<b>Tablo 2.</b> Beta-Laktamazların sınıflandırılması (Ambler, 1980).....	17
<b>Tablo 3.</b> <i>A. baumannii</i> 'de Kazanılmış Karbapenem-hidrolize edici beta-laktamazlar .....	20
<b>Tablo 4.</b> Primer dizileri .....	29
<b>Tablo 5.</b> <i>A. baumannii</i> 'de MİK değerlerine göre imipenem duyarlılık sınırları.	30
<b>Tablo 6.</b> <i>A. baumannii</i> kökenlerine ait İMP MİK sonuçları.....	39

## KISALTMALAR

<b>ACB</b>	: <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i>
<b>AME</b>	: Aminoglikozid modifiye edici enzim
<b>Bp</b>	: Baz çifti
<b>BAP</b>	: Biyofilm ile ilişkili protein
<b>ÇİD</b>	: Çok ilaca dirençli
<b>ddNTP</b>	: Di deoksi ribonükleozit Trifosfat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleozit Trifosfat
<b>ERIC</b>	: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
<b>EMB</b>	: Eosine Metilen Blue Agar
<b>F-primer</b>	: forward-primer
<b>GSBL</b>	: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
<b>HS Taq polymerase</b>	: Hot start Taq polimeraz
<b>İMP</b>	: imipenem
<b>Kb</b>	: Kilobaz
<b>KHO</b>	: Karbapenem hidrolize eden oksasilinazlar
<b>MHB</b>	: Mueller Hinton Broth
<b>MBL</b>	: Metallo-beta-laktamazlar
<b>MHA</b>	: Mueller Hinton Agar

<b>MİK</b>	: Minimum inhibitör konsantrasyon
<b>mM</b>	: mili molar
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>OXA</b>	: oksasilinaz
<b>OMP</b>	: Dış membran proteini (outer membrane protein)
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>PFGE</b>	: Pulsed field gel electrophoresis
<b>PBP</b>	: Penisilin bağlayıcı proteinler
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>pmol</b>	: piko mol
<b>RAPD</b>	: Random Amplification of Polymorphic DNA
<b>RE</b>	: Restriksiyon Enzimleri
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>R-primer</b>	: reverse- primer
<b>rep</b>	: repetitive extragenic palindromic
<b>tRNA</b>	: taşıyıcı RNA
<b>μM</b>	: mikro molar
<b>μl</b>	: mikro litre

# BÖLÜM I

## 1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

### 1.1. GİRİŞ

“Acinetobacter” ismi, Yunanca’da “hareketsiz” anlamındaki “akinetos” sözcüğünden türemiştir ve hareketsiz basil anlamına gelmektedir. Asinetobakter türleri gram-negatif non-fermentatif kokobasiller olup, zorunlu aerop, oksidaz-negatif ve katalaz pozitif mikroorganizmalardır. Saprofit olarak her yerde bulunabilirler. Sağlıklı popülasyonda deri ve orofaringeal florada da yer alabilirler. Asinetobakter türleri, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen gram negatif non-fermentatif mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas aeruginosa*’dan sonra ikinci sırada yer almaktadırlar (5,29). *Acinetobacter baumannii*, insan enfeksiyonlarında en çok izole edilen Asinetobakter türü olup, fırsatçı patojen olarak genellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda enfeksiyonlara neden olmaktadır. Çoğunlukla pnömoni, sepsis, idrar yolu ve yara enfeksiyonlarından sorumlu olup, birçok antibiyotiğe direnç geliştirebildiğinden tedavide problemler yaşanmaktadır (45).

Karbapenem grubu antibiyotikler Asinetobakter enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan ajanlardır. Bunun bir sonucu olarak bu grup antibiyotiklere direnç gittikçe artmaktadır. Karbapenem direncinde; karbapenemaz özelliğindeki enzimlerin üretimi, membran geçirgenliğinde azalma, penisilin bağlayan proteinlerde değişim ve eflüks pompalarının aşırı ekspresyonu gibi birçok farklı mekanizma rol almaktadır. Ancak bunların arasında Asinetobakter türlerinde en sık rastlanan mekanizma, karbapenemaz niteliğindeki sınıf-D beta-laktamazların (OXA enzimleri) üretimidir. Bu tip enzimler; OXA-23-grup; OXA-40-grup; OXA-51-grup; OXA-58-grup ve

OXA-143-grup olarak gruplandırılabilir. Karbapenemaz niteliğindeki OXA enzimlerinin türü ve sıklığı çeşitli ülkeler ve merkezler arasında farklılık gösterebilmektedir.

Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* izolatlarının, imipenem MİK değerleri belirlenmiş ve klonal ilişkileri moleküler yöntemlerle belirlenen bu izolatlarda karbapenemaz aktivitesindeki başlıca OXA tipi enzimlerin prevalansı PCR ile araştırılmıştır.

## 1.2. GENEL BİLGİLER

### 1.2.1. ACINETOBACTER BAUMANNII

Asinetobakter türleri gram-negatif kokobasiller olup, zorunlu aerob, hareketsiz, non-fermentatif, oksidaz-negatif ve katalaz pozitif mikroorganizmalardır. Gram boyamada dekolorizasyon zorluğu nedeniyle gram pozitif olarak değerlendirilebilir. Bu bakterilerin DNA'sında G +C içeriği % 39 - % 47'dir (48).

35-37 °C'de ürerler ve S tipi koloniler oluştururlar. Asinetobakter kolonileri, opak ve pigmentsizdir. Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar. Üremenin logaritmik fazında 1-1,5 x 1,5-2,5 µm boyutlarında basil, üreme dışında ise kok veya kokobasil şeklinde olup, ikiye bölünebilir veya küme halinde olarak görüldüğünden, gram boyalı preparatların incelenmesinde *Haemophilus* ve *Neisseria* türleri ile karıştırılabilir. Pozitif kan kültür tüpünden hazırlanan preparatlarda kristal violeyi tutmaya yatkındırlar ve böylece yanlışlıkla gram pozitif kok olarak tanınabilirler (5).

İlk kez 1911 yılında Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck tarafından izole edilen Asinetobakter türleri, *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiştir. 1939'da DeBord'un gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesiyle bir kaç isim daha almıştır. Günümüze kadar *Micrococcus calco-aceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella Iwoffii*, *Herellea vaginicola* ve *Bacterium anitratum* gibi farklı isimlerle anılan bakteriler "Acinetobakter" cinsi altında toplanmışlardır (5,29).

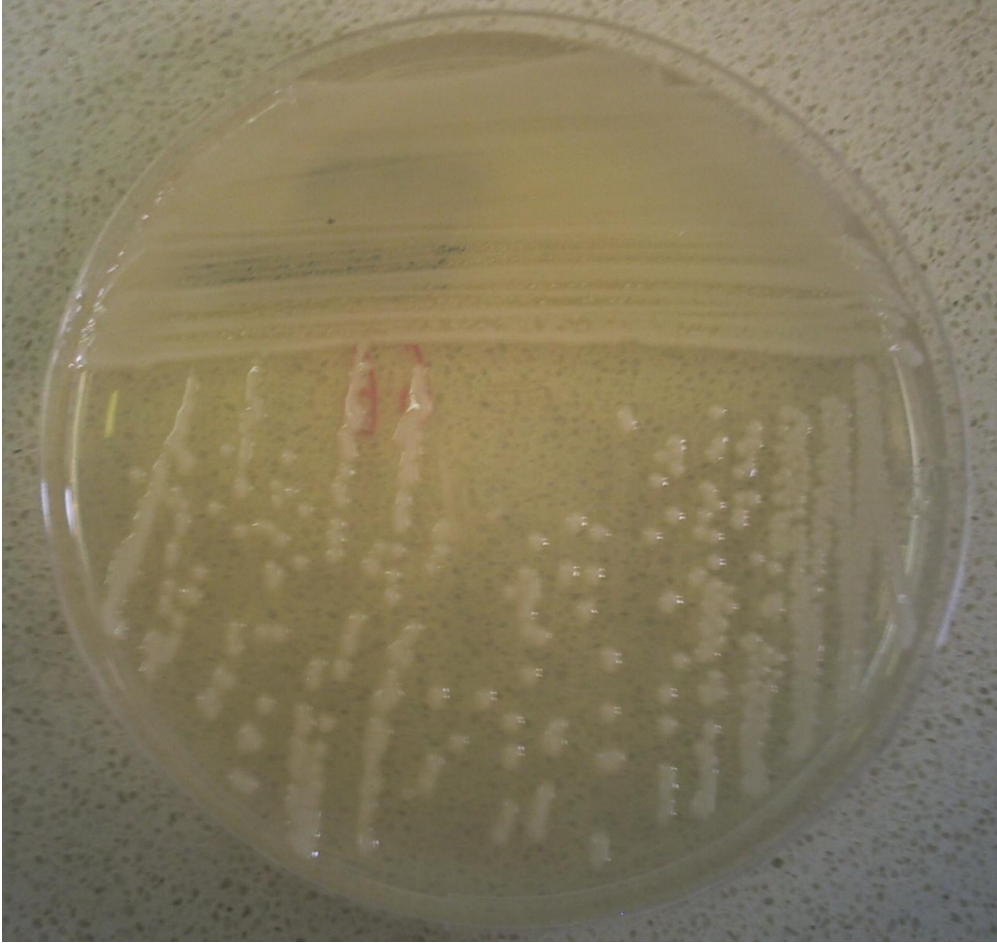
1986 yılında Bouvet ve Grimnot tarafından yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına göre, Asinetobakter genusunda şu anda toplam 26 tür ve 9 genomik tür bulunmaktadır (44). Asinetobakterlerin 4 türü (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*,

*Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU) fenotipik olarak benzerlik göstermekte olup birbirlerinden ayrımı zordur. Bu yüzden sıklıkla *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* (ACB) kompleksi adı altında incelenmektedir (24). Ayrıca son yıllarda nonfermentatif bakterilerin tanımlanmasında otomatize yağ asidi analizi ve 16S rRNA gen dizi analizi de denenmektedir (5). Gelişmiş moleküler tanı yöntemleri *Acinetobacter* tür düzeyinde tanımlanması için kullanılabilir: “Amplified 16S rRNA gene restriction analysis” (ARDRA), “amplified fragment length polymorphism” (AFLP) ile yüksek çözünürlükte parmak izi analizi, “ribotiplendirme”, “tRNA spacer fingerprinting”, 16S-23S rRNA intergenik “spacer” dizilerinin restriksiyon analizi, 16S-23S rRNA geninin “spacer” bölgesinin dizi analizi, *RpoB* (RNA polimeraz  $\beta$ -alt-birimi) geni ve “spacer” bölgesinin dizi analizi (29). 2011 yılında, klinik örneklerden elde edilen 118 *Acinetobacter spp* önce klasik yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Aynı izolatlar, Higgins ve arkadaşlarının belirttiği gibi, birkaç modifikasyon ile *gyrB* multipleks PCR kullanarak da tür düzeyinde tanımlanmıştır (60).

*Acinetobacter* türlerinin tanımlanması karbonhidratlardan asit oluşumu, hareket, indol ve oksidaz testleri ve mikroskobik morfolojileri ile yapılabilmektedir. *Acinetobacter*ler indol negatif, nitratları redükte etmeyen bakterilerdir. Besiyerinin içeriğine göre de bazı özelliklerinin değişim gösterdiği, örneğin; aderansın, minimal medyum gibi basit besiyerinde oluşan kok formlarında arttığı, kompleks besiyerlerinde oluşan basil formlarında ise azaldığı saptanmıştır. D-glikoz eklenen kanlı agarda oluşan kahve rengi görünüm ile *Acinetobacter*lerin tanımlanmasına çalışılmaktadır. Bazı suşlarda bulunabilen polisakkarit yapısındaki kapsül, grup B ve G streptokoklar ve pnömokok kapsül tip XX'den hazırlanan anti-serumlarla, bazı suşlar ise anti-*Chlamydia* antikorlarıyla çapraz tepkime verebilir (5).



Glukozy okside eden *A. baumannii*, glukozy okside etmeyen *A. lwoffii* ve hemoliz yapan *A. haemolyticus*, laboratuvar da en sık karşılaşılan Asinetobakter turleridir. Oksidaz negatif olmaları ile *Moraxella* ve *Neisseria* turlerinden, anaerobik şartlarda urememesi ve nitratları redükte etmemesi ile *Enterobacteriaceae* uyelerinden ayırt edilirler (5).



**şekil 1.** Mueller Hinton Agar'da *A. baumannii* kolonileri

#### **1.2.1.1. Virulans ve patogenez**

Geniş araştırmalara rağmen bu bakterinin virulans faktörleri ile ilgili bilgi azdır. Çeşitli faktörlerin *A. baumannii*'nin virulans potansiyeline katkıda bulunabileceği düşünölmektedir. Özellikle dış membran proteinlerinin (Outer

membrane protein-OMP) bir üyesi olan OmpA'nın, hastalık oluşturma potansiyeline önemli katkıda bulunduğu saptanmıştır (11). *A. baumannii*'nin OmpA proteini konağın epitelyal hücre ve mitokondrisine bağlanarak, mitokondriyal disfonksiyonu indükler ve şişmesine neden olur. Bu olayları sitokrom C'nin serbest bırakılması takip eder ve apoptozis tetiklenebilir (11). Patojende en çok bulunan yüzey proteini olan OmpA, ayrıca komplemana karşı direnç ve biyofilm oluşmasında rol oynar. Bunlar bakterinin stres altında hayatta kalma stratejileri ve virülansla ilişkili faktörler olup, konağın içinde ve dışında bakterinin hayatta kalmasına yardımcı olur.

*A. baumannii*'nin biyofilm oluşturma yeteneği olumsuz koşullarda ve ortamlarda çoğalmasına olanak sağlar. *A. baumannii*'nin cam, yoğun bakım ünitelerinde kullanılan ekipmanlar gibi cansız yüzeylerde ve epitelyal hücreler gibi canlı yüzeylerde biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Biyofilm oluşumunu kontrol eden en yaygın faktörler arasında; ortamdaki besin maddeleri, pili ve dış membran proteinleri ve makro moleküler salgılar sayılabilir. *A. baumannii* bir yüzeye tutunduktan sonra, pili ve biyofilm ile ilişkili protein (BAP) biyofilm üretiminin başlamasına ve olgunlaşmasına katkıda bulunur. Pili cansız yüzeylere tutunup mikrokolonilerin oluşumunu başlatır ve ardından biyofilm yapıları tam olarak gelişir. BAP bakteriyel hücrelerin yüzeyindedir, cansız ve canlı yüzeylerde olgunlaşmış biyofilmi sabitleyerek biyofilmin gelişmesine ve olgunlaşmasına katılır. Ayrıca metal katyonları gibi çevresel sinyaller, *A. baumannii*'nin özel yüzeylere yapışma yeteneğini artırarak, biyofilm oluşumunun kontrol edilmesinde rol oynar.

*A. baumannii*'nin virülansında diğer önemli proteinler, fosfolipaz D ve C'dir. Fosfolipaz D insan serum direnci, epitelyal hücre evazyonu ve patogenezinde önemli rol oynarken, fosfolipaz C'nin epitelyal hücreler üzerine toksik etkisi vardır (29).

### 1.2.1.2. Enfeksiyonlar ve Epidemiyoloji

Asinetobakter türleri toprak ve suda yaygın olan, zaman zaman deriden, mukoza zarlarından, sekresyonlardan ve hastane ortamından izole edilen bakterilerdir. *A. baumannii* en sık izole edilen türdür. *A. Iwoffii*, *A. haemolyticus* ve *A. johnsonii* ve diğer türler de nadiren izole edilir. Bazı izolatlara tür ismi verilmemiştir (30). Yapılan bir çalışmada, nüfusun sadece % 3'ünde bu bakterinin deride kolonize olduğu tahmin edilmektedir. İlginç şekilde, evsiz insanların vücut bitinden alınan örneklerin % 22'sinde Asinetobakterler izole edilmiştir.

Toplum kaynaklı enfeksiyonlar da bildirilmiş olmasına rağmen *A. baumannii*, primer olarak yoğun bakım ünitelerinde kalan immün sistemi baskılanmış hastalarla ilişkili hastane enfeksiyonlarına yol açar. Temel olarak ventilatör ilişkili pnömoni, kateter kaynaklı kan ve idrar yolu enfeksiyonları ile yara enfeksiyonlarına neden olur. Fırsatçı bir patojen olan *A. baumannii* spesifik olarak, mukozal membranlar ve kaza veya yaralanma ile maruz kalınan deri gibi nemli dokuları hedefler. *A. baumannii* ile enfekte olan cilt ve yumuşak dokular başlangıçta portakal kabuğu benzeri bir görünüm alır. İlerleyen aşamada ciltte veziküller oluşur. Yapısı bozulan cilt bölgelerinde gözle görülebilen nekrotizan bir süreçle birlikte hemorajik büller ortaya çıkabilir ve ardından bakteriyemi görülebilir. Bu enfeksiyon tedavi edilmediği takdirde, sepsis ve ölüme yol açabilmektedir. Solunum yolu, kan, plevra sıvısı, idrar yolu, cerrahi yaralar, santral sinir sistemi, deri ve göz, *A. baumannii* ile enfekte veya kolonize olabilir. Ayrıca *A. baumannii* endotrakeal tüp yüzeyinde biyofilm oluşturabildiğinden, mekanik ventilasyona gerek duyan hastalarda pnömoni riski vardır.

*A. baumannii* enfeksiyonlarına yakalanmayı kolaylaştıran risk faktörleri:

1. Yanıklar ve cerrahi girişim gibi major travmalar
2. Önceden antimikrobiyal tedavi görme
3. Diyalize girme
4. Hastane veya yoğun bakım ünitesinde uzun süre kalma
5. Mekanik ventilatör, drenaj tüpü ve kalıcı kateter varlığı

Olumsuz koşullarda görev yapan askerler de diğer bir risk grubunu oluşturmaktadır. Kuru ve kumlu hava koşullarının hakim olduğu çöl kampları, dayanıklı *A. baumannii* için uygun bir ortam oluşturup, yaralı askerlerde gelişen enfeksiyonlarda başlıca etken olmasını sağlar. 2003’de ABD’nin deniz kuvvetleri hastane gemisine getirilen yaralı askerlerin deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından alınan örneklerin % 4.1’inin *A. baumannii* ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada koltuk altı, kasık ve ayak parmak arası en yüksek kolonizasyon alanları olarak bulunmuştur. Ayrıca, *A. baumannii* ile kolonize olan bu askerler daha sonra ülkelerine döndüklerinde önemli bir enfeksiyon kaynağı olmaktadır (29).

Avrupa’daki farklı merkezlerde salgına neden olan *A. baumannii* kökenlerinin tiplendirilmesi sonucu üç klonun ön plana çıktığı saptanmıştır. Bu üç klonun dünya çapında da yaygın oldukları belirlendiğinden “International clones I-III” olarak adlandırılmışlardır. Bazı diğer klonların da yaygın bir coğrafi dağılım gösterdiği anlaşılmıştır. Bu klonların *A. baumannii* enfeksiyonlarının dünya genelinde yaygınlaşmasında önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (32).

### 1.2.1.3. *A. baumannii* ve antibiyotik direnci

*A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde en çok tercih edilen antibiyotikler; aminoglikozitler, florokinolonlar, polimiksinler (kolistin) ve karbapenemlerdir (32). Ancak *Asinetobakter* türleri beta-laktam, tetrasiklin, aminoglikozit ve florokinolon gibi farklı antibiyotik gruplarına karşı hızla direnç geliştirebilmektedir (4). Çoklu veya tüm ilaçlara dirençli olan *Asinetobakter* kökenlerinin hızla ortaya çıkması, bakterinin seçici ortam koşullarının baskısına uyum yeteneğini ortaya koymaktadır (29).

Karbapenem direncine, *A. baumannii*'de esas olarak karbapenem-hidrolize edici enzimlerin üretimi aracılık etmektedir. Karbapenem hidrolize edici beta-laktamazların; Sınıf A (*bla<sub>GES-14</sub>* ve *bla<sub>KPC</sub>*), sınıf B (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>SIM-1</sub>*, ve *bla<sub>NDM</sub>*), ve sınıf D'ye (*bla<sub>OXA-23-grup</sub>*, *bla<sub>OXA-24-grup</sub>*, *bla<sub>OXA-51-grup</sub>*, *bla<sub>OXA-58-grup</sub>*, *bla<sub>OXA-104</sub>*, *bla<sub>OXA-143</sub>*, *bla<sub>OXA-164</sub>* ve *bla<sub>OXA-182</sub>*) ait olan çeşitli genleri *A. baumannii*'de tanımlanmıştır. Sınıf D OXA-tipi karbapenemazlar *A. baumannii*'de en yaygın olarak rastlanan karbapenemazlardır. Sınıf B beta-laktamazlar yüksek seviyelerde karbapenem direnci oluşturmakta, aztreonam dışında tüm diğer beta-laktamlara direnç geliştirmektedir (32).

ABD'de, imipenem dirençli veya orta duyarlı *Asinetobakter* izolatların oranı 1999 yılında % 6.3'den 2001 yılında % 11.4'e yükselmiştir (50). Batı Afrika'da yapılan bir moleküler epidemiolojik araştırmada, 15 karbapenemaz-kodlayan gen araştırılmış ve izolatların % 60'ının birden fazla karbapenemaz geni barındırdığı belirtilmiştir (35). Ayrıca, karbapenem direnci ile ilişkili 33-36 kDa'lık bir OMP de *A. baumannii*'de saptanmıştır (62). Bazı çalışmalar, saptanabilir karbapenemaz aktivitesi göstermeyen *Asinetobakter* klinik izolatlarında 20-kDa'luk OMP kaybının imipenem direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir (36). CarO (ısıyla değişebilen ve

25-29 kDa'luk OMP) proteininin kaybı da imipenem ve meropenem direnci ile ilişkilendirilmiştir (56). Ayrıca *A. baumannii* 43-kDa'luk D2 porin (*P.aeruginosa*'daki karbapenem direnci ile ilişkilidir) homologuna (OprD) sahip olduğu gösterilmiştir. Karbapenem direncinin araştırıldığı çalışmalarda; dirençli mutant *A. baumannii* suşlarının 24-kDa'luk Penisilin-bağlayıcı proteinleri (PBP) aşırı ürettiği, aynı zamanda duyarlı suşlar ile karşılaştırıldığında bakterinin sahip olduğu diğer altı PBP'nin dirençli mutant suşlarca daha düşük düzeylerde eksprese edildiği bildirilmiştir (14).

Asinetobakter türlerinde kinolonlara direnç çoğunlukla, diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi topoizomeraz enzimlerini kodlayan kromozomal bölgede meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Mutasyonlar sıklıkla DNA giraz (topoizomeraz II) veya topoizomeraz IV'de yapısal değişikliğe yol açar (4,32). DNA giraz *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanmaktadır. Benzer şekilde topoizomeraz IV enzimi *parC* ve *parE* genleri tarafından kodlanmaktadır. Kinolon dirençli *A. baumannii*'lerde çoğu zaman, *gyrA*'nın 83.kodonunda Ser yerine Leu değişimi gözlenmiştir ve bu mutasyon siprofloksasinin MİK değerinin >4 mg/L olmasına neden olur (4). *A. baumannii*'nin kinolonlara karşı yüksek düzeyde direnç göstermesi için hem *gyrA* hem de *parC* genlerinde mutasyon oluşması gereklidir. Kinolon dirençli izolatlarda en çok, *gyrA*'da Ser-83 ve *parC*'de Ser-80 bölgeleri mutasyona uğramıştır. Bununla birlikte, azalmış giriş ve / veya artan dışarı atım (efluks) da dirence neden olabilir (32).

Aminoglikozid direncine sebep olan aminoglikozid modifiye edici enzimler (AME), Asinetobakter türlerinde de görülmektedir (48). Adenil-transferaz, fosfotransferaz ve asetiltransferaz gibi AME'lerin Asinetobakter türlerinde varlığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, *A. haemolyticus* ile ilişkili genomik grupların, doğal N-

asetil-transferazların sentezi nedeniyle aminoglikozidlere doğal olarak dirençli olduğu vurgulanmıştır (14). Ayrıca *A. baumannii* kökenlerinde 16S rRNA metilaz ArmA enzimi, yüksek düzeyde çoklu aminoglikozid direnci ile ilişkilidir (18).

Tetrasiklin direnci ile ilgili olarak gram negatif bakterilerde *tetA*'dan *tetE*'ye kadar farklı genler tanımlanmıştır. Diğer bakterilerde olduğu gibi Asinetobakter türlerinde de söz konusu olan genlerin plazmid veya transpozonla ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi, *A. baumannii* klinik izolatlarında en sık rastlanan tetrasiklin direnç genleri *tetA* ve *tetB*'dir. Ek olarak bu genler genellikle spesifik olmayan efluks pompası geni *adeB* ile kombine olarak bulunurlar (14).

Asinetobakter türlerinde yüksek düzey rifampisin direnci, diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi RNA polimerazın (*rpoB* geni)  $\beta$  alt ünitesinde aminoasit değişikliklerine yol açan kromozomal mutasyonlar nedeniyle oluşur. Ancak Asinetobakter izolatlarında integron yapısındaki gen kasetinde yer alan (rifampisin ADP- riboziltransferaz enzimini kodlayan) *arr-2* geni saptanmıştır (28). Bu gen rifampisin direncinin major etkileyicisi gibi görünmektedir. *arr-2* pozitif izolatlarda rifampisin için yüksek MİK değeri ve disk difüzyonla azalmış inhibisyon zonu (<14 mm) saptanırken *arr-2* negatif izolatlarda durumun tam tersine olduğu gözlenmektedir (61). Benzer şekilde Asinetobakter türlerinde kloramfenikol direnç genleri, özellikle konakçı kromozomuna entegre olmuş Tn21 ailesine ait transpozonlarla ilişkilidir (10). Trimetoprim direnci Asinetobakter türlerinde düşük seviyededir. Ancak dihidrofolat redüktaz geni kazandıklarında yüksek düzeylerde direnç göstermektedirler (14).

Dışarı atım (efluks) sistemleri, antimikrobiyal ajanların etkilerinin azalmasına ya da etkilerini yitirmelerine sebep olurlar. *A. baumannii*'de RND (resistance-

nodulation-division) ailesinden *adeABC* dışarı atım sistemi tanımlanmıştır. Bu sistemin aminoglikozidlere direnç ve kloramfenikol, florokinolonlar, trimetoprim ve sefotaksim'e karşı azalmış duyarlılıkla ilişkili olduğu açıkça ortaya konmuştur (38). Yine RND ailesine dahil olan *adeDE* de *Asinetobakter* izolatlarında saptanmıştır. *adeE* genindeki aktivasyonun amikasin, seftazidim, kloramfenikol, siprofloksasin, eritromisin, etidyum bromür, meropenem, rifampisin ve tetrasikline azalmış duyarlılık ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. *adeXYZ* olarak adlandırılan aktif dışarı atım sistemi de *Asinetobakter* izolatlarında saptanmıştır. Ancak bu sistemin antibiyotik direncindeki rolü tam olarak ortaya konamamıştır (14).

*A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi, bu mikroorganizmanın birçok antibiyotiğe direnç kazanmış olmasından dolayı son derece güçtür (29). Bu yüzden *Asinetobakter*lerin tedavisi için kültür sonuçları, antibiyotik duyarlılık sonuçları ve MİK düzeyleri dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. *Asinetobakter*lerin karbapeneme duyarlı kökenlerinin tedavisinde karbapenem (özellikle imipenem) veya ampisilin-sulbaktam kullanımı uygundur. Ancak *Asinetobakter* türlerinde tedavi sırasında antibiyotiklere direnç gelişebilmektedir. Yapılan bir çalışmada *Asinetobakter* suşlarının % 98'i in-vitro olarak kolistine duyarlı bulunmuştur (4). Çok ilaca dirençli (ÇİD) kökenlerin tedavisinde kolistin kullanılmalıdır. Kolistin tedavi amacıyla kullanılacağı zaman önce MİK düzeyleri belirlenmelidir. Kolistin en önemli yan etkisi nefrotoksisite olmasından dolayı kullanımı sınırlıdır. Ayrıca ÇİD *Asinetobakter*lerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin kombine kullanımı önemlidir. Kolistin ile rifampisin veya kolistin ile imipenem kombinasyonu Metallo-beta-laktamaz (MBL) negatif karbapenem direnci olan *Asinetobakter* kökenlerine bağlı enfeksiyonlarda değerlendirilmelidir. MBL pozitif karbapenem dirençli *Asinetobakter* enfeksiyonlarında ise kolistin ile rifampisin



ve/veya tigesiklin kombinasyonu düşünölmelidir. Ayrıca ventilatör ilişkili pnömöni geliştiiği zaman nebulize kolitsin, kombinasyon tedaviye ilave edilebilir (4).

Yeni tedavi yöntemlerinin ortaya çıkması için alternatif stratejiler geliştirilerek çeşitli girişimler yapılmıştır. Örneğin; bakteriofaj ile tedavi (*A. baumannii*'ye karşı spesifik bakteriofaj *ABI*), bakterisidal gen transfer terapisi, “cathelicidin”ler, radyo-immüno terapi, fotodinamik terapi, ve nano-partikül teknolojisi (29).

Tablo 1. *A. baumannii*'nin sahip olduğu antibiyotik direnç mekanizmaları (14,32,49)

Antibiyotik/Direnç mekanizması	Grup/Gen	Antibiyotik/Direnç mekanizması	Grup/Gen
<b>Beta-laktamlar için</b>		<b>Aminoglikozidler için</b>	
Beta-laktamaz		Enzimatik yıkım	
Doğal		Asetiltransferaz	AAC-2, -3, -6
Sınıf A/sık görülen	<i>ampC</i> (ADC1-7) VEB-1,-2 PER-1,-2 TEM-92,-116 SHV-5,-12 CTX-M-2-3	Nükleotidiltransferaz	ANT-2,-3
Sınıf A/nadir görülen	SCO-1	Fosfotransferaz	APH(3')-I, -II,-III,-IV APH(3'')-I
Karbapenemaz		Efluks pompası	adeABC , adeM
Sınıf D oksasilinaz	OXA-51 - grup OXA-23 OXA-24 OXA-27 OXA-37 OXA-40 OXA-58 - grup	16s rDNA metiltransferaz	armA
Metallo-beta- laktamaz	VIM IMP SIM	<b>Kinolonlar için</b>	
Sınıf A karbapenemaz	GES-11	DNA giraz/topoizomeraz	gyrA/parC
Dış membran proteinleri	carO HMP-AB 33-36 kDa protein 43 kDa protein	Efluks pompası	adeABC adeM, abes
Efluks pompası	adeABC PBP2 değişimi	<b>Kloramfenikol için</b>	
<b>Tetrasiklinler için</b>		Efluks pompası	adeABC adeIJK, cmlA craA , abeS
	tetA, tetB	<b>Trimetoprim/sulfametoksazol için</b>	
Efluks pompası	adeABC	Efluks pompası	adeABC , adeIJK
Ribozomal hedef değişimi	tetM	Dehidrofolat sentetaz	sul-I,-II
		Dehidrofolat reduktaz	folA
		<b>Makrolitler için</b>	
		Efluks pompası	adeM
		<b>Glisilsiklin için</b>	
		Efluks pompası	adeABC
		<b>Polimiksin için</b>	
			pmrAB
		<b>Rifampisin için</b>	
			arr-2

### 1.2.2. Sınıf-D Beta-Laktamazlar (OXA Enzimleri)

Beta-laktam antibiyotikler, bakterilerde hücre duvarının yapımını engellemektedir (5). Beta-laktam antibiyotikler yarı sentetik ve sentetik olarak 6 farklı yapısal alt tipe ayrılabilir:

1. Penisilinler (örneğin, benzilpenisilin, ampisilin);
2. Sefalosporinler; klasik sefalosporinleri, 2. kuşak sefalosporinleri (örn. sefotiam, sefuroksim), ve aynı zamanda 3. kuşak sefalosporin temsilcilerini içerir (örn. sefotaksim, seftazidim);
3. Sefamisinler (örn. sefoksitin);
4. Monobaktamlar (örn. aztreonam)
5. Penemler; tiyazolin halkasında 2,3-çift bağ içerenler (örn. Faropenem), ve
6. Karbapenemler (örn. imipenem)

Genellikle, beta-laktam antibiyotiklere karşı bakterilerin direnci 3 temel mekanizmaya dayanır. Bunlardan ilki, değiştirilmiş ya da kazanılmış penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) ile beta-laktamlara düşük afinite gösterme (örneğin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta PBP2a), ikincisi dışarı atım pompaları (örneğin *P. aeruginosa*'da mex sistemi) ve üçüncüsü beta-laktamaz enzimleri ile beta-laktam halkasının amid bağını parçalayarak antibiyotik ajanın etkisiz hale getirilmesidir (49).

Beta-laktamaz enzimleri beta-laktam antibiyotiklerin temel yapısında bulunan beta-laktam halkasını parçalarlar. Böylece antibiyotiklerin bakteri hücre duvarında bulunan PBP'lere ulaşmadan inaktive edilmesini sağlarlar. Enzimler gram pozitif bakterilerde doğrudan dış ortama salınırken gram negatif bakterilerde periplazmik aralıkta bulunurlar. Beta-laktamaz üretiminden sorumlu olan genler bakteri

kromozomunda veya plazmit gibi serbest genetik materyalde bulunabilirler (5). Beta-laktamazlar hidroliz etme özellikleri, inhibitörlere duyarlılıkları, kromozom veya plazmid kontrolünde olmaları gibi özelliklerine göre çeşitli şekilde sınıflandırılmışlardır (3). 1980 yılında beta laktamazlar Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır (Tablo 2). Ambler'in sınıflandırmasına göre; aktif bölgelerinde serin aminoasiti taşıyan, penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlar (sınıf A), aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallo-beta-laktamazlar (sınıf B), kromozomal AmpC sefalosporinazlar (sınıf C), ve oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlar (sınıf D) olarak sınıflanmıştır. 1995 yılında Bush ve arkadaşları tarafından beta-laktamazlar için önerilen fonksiyonel sınıflandırma şeması yaygın olarak kullanılmaktadır (49).

Oksasilinazlar yapısal ve biyokimyasal özelliklerine göre heterojen bir grup oluştururlar. Bu enzimler genellikle oksasilini benzilpenisilinden daha verimli bir şekilde hidrolize ederler. Buna ek olarak, amoksisilin, metisilin, sefaloridin ve bir ölçüde, sefalotini hidrolize ederler. Sadece birkaç varyantı genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilir ve bu enzimler *P. aeruginosa*'da saptanmakla birlikte, *A. baumannii* izolatlarında şu ana kadar görülmemiştir. Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilen enzimler çoğu zaman dar spektrumlu enzimlerin nokta mutant türevleridir. Bunun aksine karbapenemaz aktivitesi, nokta mutasyondan kaynaklanmayan ve bazı oksasilinazlar için kendine özgü bir özellik olarak görülmektedir. Karbapenemaz niteliğindeki sınıf-D beta-laktamazların karbapenemlere karşı hidrolitik etkinliğinin MBL'lere göre çok daha düşük (100 – 1000 kat) olması, saptanmalarını güçleştirmektedir (50).

**Tablo 2.** Beta-Laktamazların sınıflandırılması (Ambler, 1980)

	$\beta$ -Laktamazların sınıfı	$\beta$ -Laktamazlar	Önemli örnekler	Sıklıkla rastlandığı bakteriler	Önemli fenotipik direnç özellikleri	
Serin- $\beta$ -Laktamazlar	A	Geniş spektrumlu beta laktamazlar	TEM-1, TEM-2 SHV-1, SHV-11	<i>Enterobacteriaceae</i> ve nonfermenterler	ampisilin, sefalotin	
		ESBL TEM-tipi	TEM-3, TEM-52		penisilinler, 3. kuşak sefalosporinler	
		ESBL SHV-tipi	SHV-5, SHV-12			
		ESBL CTX-M-tipi	CTX-M-1, CTX-M-15			
		karbapenemazlar	KPC, GES, SME		tüm $\beta$ -laktamlar	
	C	AmpC sefamisinazlar (kromozomal)	AmpC	<i>Enterobakter spp.</i> <i>sitrobakter spp.</i>	sefamisinler (sefoksitin), 3. kuşak sefalosporinler	
	D	AmpC sefamisinazlar (plazmid-kodlanan)	CMY, DHA, MOX FOX, ACC,	<i>Enterobacteriaceae</i>	sefamisinler (sefoksitin), 3. Kuşak sefalosporinler	
		Geniş-spektrumlu $\beta$ -laktamazlar	OXA-1, OXA-9		oksasilin, ampisilin sefalotin	
		ESBL OXA-tipi	OXA-2, OXA-10		<i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>A. baumannii</i>	penisilinler, 3. kuşak sefalosporinler
		karbapenemazlar, karbapenemazlar	OXA-48; OXA-23, -24, -58			ampisilin, imipene; tüm $\beta$ -laktamlar
Metallo- $\beta$ -laktamazlar	B	Metallo- $\beta$ -laktamazlar (karbapenemazlar)	VIM IMP	<i>Enterobacteriaceae</i> ve nonfermenterler	tüm $\beta$ -laktamlar	

### 1.2.2.1. *A. baumannii*'de görülen Beta-laktamaz enzimleri

Son zamanlarda gerçekleştirilen birçok genetik ve biyokimyasal çalışmaya dayanarak, *A. baumannii*'de karbapenem direncinin çoğunlukla beta-laktamaz üretimi

ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Beta-laktamazların iki ana tipi *A. baumannii* izolatlarının hepsinde değilse de çoğunda saptanabilir. Bunlar; AmpC tipi sefalosporinazlar ve OXA-51/69 varyantları ile temsil edilen oksasilinazlardır. MBL'ler ve "carbapenem hydrolysing oxacillinase"ler (karbapenemleri hidroliz eden oksasilinazlar-KHO) klavulanat ve tazobaktam inhibisyonuna karşı dirençlidir. KHO'lerin çoğu NaCl inhibisyonuna duyarlı iken, MBL'ler in-vitro ortamda EDTA inhibisyonuna duyarlıdır. Laboratuvarında tanımlanmaları için enzimlerin bu özelliklerinden yararlanılabilir. Karbapenemlere karşı direnç başka mekanizmalar ile de ortaya çıkabilir. Örneğin; porin kaybı veya değişikliği, CarO proteini ve nadiren PBP'lerin modifikasyonu (50).

#### **1.2.2.1.1. AmpC tipi sefalosporinazlar**

Kromozomal AmpC tipi sefalosporinazların normal düzeydeki ekspresyonu geniş spektrumlu sefalosporinlerin etkinliğini azaltmamaktadır. Bununla birlikte *ISAbal* insersiyon sekanslarının (IS-Elementleri) *bla<sub>AmpC</sub>* geninin ön kısmına eklenmesi, promotör sekansları sağlayarak önemli ölçüde beta-laktamaz ekspresyonunu artırır, ancak karbapenemlere değil, seftazidime karşı dirençle sonuçlanır (14,50).

#### **1.2.2.1.2. Metallo-beta-laktamazlar (MBL)**

Bu enzimler monobaktamlar haricindeki tüm beta-laktam antibiyotikleri hidroliz edebilirler. MBL'lerin bir kısmı, özellikle çevresel örneklerden izole edilen bazı bakterilerde, intrinsik olarak bulunurken bazıları sonradan kazanılır. Bugüne kadar saptanan "kazanılmış" MBL'ler beş grup altında toplanabilir: IMP-grup, VIM-

grup, SIM-1, SPM-1 ve GIM-1 enzimleri. Şu ana kadar bu grupların ilk üçü *A. baumannii*'de tanımlanmıştır. IMP grubu şu anda 19 varyant ve yedi filogrup oluşturmaktadır. Üç farklı filogruba ait altı IMP varyantı *A. baumannii*'de saptanmıştır (66). IMP-4 Avustralya'da bir klinik *A. junii* izolatında saptanmıştır (47). Ayrıca *A. baumannii*'de VIM enzimleri çok nadir saptanmıştır. IMP ve VIM varyantları *A. baumannii* izolatlarında yüksek düzeyde karbapenem direncine neden olurlar. SIM-1 üreten izolatların imipenem MİK değerleri 8-16 mg/L arasındadır (14,50). MBL üretiminin karbapenem direncindeki rolü, IMP veya VIM enzimleri üreten izolatlarda E-test tekniği kullanarak kolayca saptanır (66). Bu testi kullanarak, imipenem MİK'leri tek başına ve EDTA ile birlikte bir agar plak üzerinde karşılaştırılması, *A. baumannii*'de MBL üretiminin tanımlamasını sağlar. Sadece sefepim ve sefpirom, daha az bir ölçüde piperasilin-tazobaktam, MBL üreticilerine karşı bir miktar aktivitelerini koruyabilir (50).

*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* veya *bla<sub>SIM</sub>* genleri sınıf-1 integronlar ile ilişkili olduğundan, *A. baumannii*'de tanımlanmış MLB-kodlayan genlerin çevresinin genetik analizi çok benzer yapılar ortaya koymuştur. Diğer antibiyotik direnç gen kasetleriyle birlikte (çoğunlukla aminoglikozid modifiye edici enzimleri kodlayan genler) MBL genleri, 5'-korunmuş segment (5'-CS) ile 3'-CS arasına eklenirler, ve gen kasetlerinin bir parçasını oluştururlar. MBL genlerinin plazmid üzerinde olması, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşları arasında spesifik alanlarda yayılmasını açıklar, örneğin, İtalya ve Kore (Tablo 3) (14,45,50).

**Tablo 3.** *A. baumannii*'de Kazanılmış Karbapenem-hidrolize edici beta-laktamazlar

$\beta$ -laktamaz	Ambler sınıfı	Plazmid veya kromozomal	coğrafi köken
IMP-1	B	Plazmid	Japonya, Güney Kore, İtalya
IMP-2	B	Plazmid	Japonya, İtalya
IMP 4	B	?	Hong Kong
IMP-5	B	?	Portekiz
IMP-6	B	?	Brezilya
IMP-11	B	?	Japonya
VIM-2	B	Plazmid	Güney Kore
SIM-1	B	?	Güney Kore
OXA-23	D	Plazmid	İngiltere, Fransız Polinezya'sı, Brezilya, Irak
OXA-24	D	kromozomal	İspanya, ABD, Portekiz
OXA-25	D	kromozomal	İspanya
OXA-26	D	kromozomal	İspanya
OXA-27	D	?	Singapur
OXA-40	D	kromozomal	Fransa, İspanya, Portekiz
OXA-58	D	Plazmid veya kromozomal	Fransa, İspanya, İtalya, Yunanistan, İngiltere, Avusturya, Romanya, Irak, Arjantin, Kuveyt



### 1.2.2.1.3. Karbapenemleri hidrolize eden sınıf-D Beta-laktamazlar (OXA tipi enzimler)

Sınıf D oksasilinazlar, oksasilinleri hidrolize eden ve sık rastlanmayan beta-laktamazlar olup, karbapenemaz aktivitesi gösterenler “karbapenem hidrolize eden oksasilinazlar” (KHO) olarak adlandırılır. Şu ana kadar tanımlanmış olan 120’den fazla D grubu beta-laktamazdan 45’i KHO aktivitesi gösterir. Sınıf-D oksasilinazlardan olan OXA-51-grup enzimler, çoğu *A. baumannii* tarafından doğal olarak üretilir. Bu enzimler zayıf karbapenemaz aktivitesi gösterirler (14,50). Ayrıca karbapenemlere karşı aktivite gösteren üç kazanılmış sınıf-D oksasilinaz kümesi (OXA-23, OXA-58 ve OXA-24) de tanımlanmıştır (14,41). Son zamanlarda *bla<sub>OXA-104</sub>*, *bla<sub>OXA-143</sub>*, *bla<sub>OXA-164</sub>* ve *bla<sub>OXA-182</sub>* gibi yeni sınıf-D beta-laktamazlar da *A. baumannii*’de saptanmıştır (32). Ayrıca, *A. radioresistens bla<sub>OXA-23-grup</sub>* ve *A. lwoffii bla<sub>OXA-134-grup</sub>* genleri kromozomal olarak taşımaktadırlar.

OXA-211, OXA-213 ve OXA-214 beta-laktamazlar sırasıyla, *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* ve *A. haemolyticus*’da tanımlanmıştır. OXA-211, OXA-213 ve OXA-214 beta-laktamazları, *A. baumannii*’de doğal OXA-51-grup KHO ile, % 53 - % 76 arasında amino asit benzerliği gösterirler. Bu beta-laktamazlar, çoğunlukla penisilin ve karbapenemler dahil, kendine özgü bir hidroliz profili gösterirler (23).

MBL’ler ile karşılaştırıldığında, *A. baumannii*’de KHO’lar tarafından sağlanan karbapenem direnç seviyesi çok daha düşüktür. Bu enzimler ile, özellikle meropenem hidrolizi her zaman saptanamaz (27). Yapılan bir çalışmada, *bla<sub>OXA-23</sub>* ve *bla<sub>OXA-58</sub>* genleri barındıran doğal plazmidler karbapeneme duyarlı bir referans *A. baumannii* suşuna aktarılmış, daha sonra imipenem MİK’inde gösterilen artış, OXA-23 üretiminin dirençte önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir. *bla<sub>OXA-58</sub>*, aynı referans *A. baumannii* suşunda eksprese edildiğinde, bu etkinin daha düşük olduğu

gözlenmiştir. Aynı deney, doğal AdeABC dışarı atım (efluks) pompası sistemini aşırı eksprese eden bir izogenik *A. baumannii* alıcı suşu kullanılarak tekrarlanmıştır. Ortaya çıkan MİK'ler OXA-23'ün karbapenem direncine aracılık etmede önemli bir rol üstlendiğini onaylamıştır. Ancak OXA-58 paradoksal bir biçimde daha düşük katkı göstermiştir (50). Buna karşılık, karbapeneme dirençli bir *A. baumannii* izolatında kromozomal *bla<sub>OXA-40</sub>* geninin inaktivasyonu ile imipenem ve meropenem duyarlılığının tekrar sağlanması, karbapenem direncinde OXA-40'ın önemli bir rol oynadığını göstermiştir (50). Latin Amerika'da yapılan bir çalışmada, aktif sirküle suşların karbapenemaz içeriğini daha iyi anlamak için, Mercy Hastanesi'nde izole edilmiş güncel bir köken koleksiyonunda PCR ve DNA sekanslama yöntemleri kullanarak, 15 karbapenemaz geni araştırılmıştır (*bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>OXA-51-grup</sub>*, *bla<sub>OXA-58-grup</sub>*, *bla<sub>AIM</sub>*, *bla<sub>BIC</sub>*, *bla<sub>DIM</sub>*, *bla<sub>GIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*, *bla<sub>SMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*). Bu 15 genden 11'i test edilen izolatların hiçbirinde tespit edilemezken, Ambler sınıf B (*bla<sub>VIM</sub>* ve *bla<sub>DIM-1</sub>*) ve D (*bla<sub>OXA-51-grup</sub>* ve *bla<sub>OXA-58-grup</sub>*) karbapenemaz genleri saptanmıştır. İlginç olarak, izolatların % 60'ında bu genlerin bir arada bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *bla<sub>OXA-51-grup</sub>* ve *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* genleri *Asinetobakter* türlerinin dışında *Enterobacteriaceae* üyelerinde de bulunmuştur (35).

#### **1.2.2.1.3.1. OXA-51-grup genler**

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *bla<sub>OXA-51-grup</sub>* Beta-laktamazları kodlayan genler tüm *A. baumannii*'lerde kromozomal olarak bulunmuştur (8,9,64). Ayrıca OXA-51-grup'ın çeşitli coğrafi bölgelerden gelen izolatlardan 18 varyantı tanımlanmıştır (9,14,64). Bu varyantlar arasında, OXA-51 ve OXA-69 beta-laktamazların karbapenemaz aktiviteleri ayrıntılı olarak araştırılmıştır. *Bla<sub>OXA-51/69-grup</sub>* genlerinin ön kısmında *ISAbal* elemanlarının varlığı, oksasilinazların aşırı eksprese

olması ve karbapenem duyarlılığın azalması ile ilişkili bulunmuştur. *ISAbal A. baumannii*'nin doğal *bla<sub>AmpC</sub>* geni ve *bla<sub>OXA-51/69-grup</sub>* genleri için promotör dizileri sağlayarak ilgili genlerin eksprese olmasını hızlandırır. *ISAbal* dizileri *A. baumannii*'de son derece etkili olduğundan, *bla<sub>OXA-51-grup</sub>* genlerin ön kısmına bu promotör yapıların eklenmesi karbapenem direncine yol açmakta ya da duyarlılığını azaltmaktadır (14,50).

#### 1.2.2.1.3.2. OXA-23-grup genler

KHO kodlayan bir genin tanımlanması ilk kez 1995 yılında *A. baumannii*'de rapor edilmiştir. Başlangıçta ARI-1 olarak adlandırılan bu enzim, İskoçya'da tespit edilmiş ve plazmid üzerinde olduğu saptanmıştır (19,50,53,57). Enzimin genetik ve biyokimyasal karakterizasyonu sonucu, OXA-23 olarak yeniden adlandırılmış ve OXA-51/69 ile % 56 amino asit benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. OXA-23 geni çoğunlukla plazmid üzerinde saptanmıştır. OXA-23 ayrıca OXA-27, OXA-49 ve OXA-73'ü de içeren bir KHO alt grubun bir temsilcisidir. Bu grubun tüm üyeleri *A. baumannii*'de saptanmıştır (2). Son zamanlarda OXA-73 de *A. baumannii*'de tespit edilmiştir (45). OXA-27 karbapeneme dirençli bir *A. baumannii* izolatından Singapur'da saptanmıştır (2), Ala 95 Thr ve Asn 247 Lys substitüsyonlarıyla OXA-23'den farklılık gösterir. OXA-49 ise Çin'de tek bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmış, ve Lys 178 Glu substitüsyonu ve 222 pozisyonda ek bir Ala grubu ile OXA-23'ten farklılık gösterdiği belirlenmiştir (8,9,14,50). *Bla<sub>OXA-23</sub>* geni, 2003 ve 2004 yıllarında İngiltere'nin hastanelerinde hızla yayılmış olan iki karbapeneme dirençli klonda saptanmıştır (63). Başka bir klon Fransa'nın Güneyinde geniş bir alanda tanımlanmıştır (50).

Buna ek olarak, bazı OXA-23 üreticileri Romanya (39), Brezilya (16), Güney Kore (31) ve Fransız Polinezyası'nda (42) salgın dönemlerinde saptanmıştır. Aynı zamanda *bla<sub>OXA-23</sub>*, Fransa'da klinik bir *Proteus mirabilis* izolatında kromozomal olarak saptanmıştır (7). IS elemanlarının (IS<sub>Aba1</sub> ve IS<sub>Aba4</sub>) *bla<sub>OXA-23</sub>* geninin ön kısmında bulunması, promotör sekansları sağlayarak *bla<sub>OXA-23</sub>*'ün ekspresyonunda ve belki de bu genin bakteriye kazanılma sürecinde rol oynayabileceğini göstermektedir (50, 52).

#### **1.2.2.1.3.3. OXA-24-grup genler**

KHO'lerin OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-72 ve OXA-40'ı içeren ikinci bir grubu vardır. Bu grubun tüm üyeleri *A. baumannii*'de gözlenmiştir (6,45,53,55). OXA-51/69 ve OXA-23 ile amino-asit düzeyinde sırasıyla, % 63 ve % 60 benzerlik gösterir. OXA-26 ilk olarak Belçika'daki bir izolatta gösterilmiştir. OXA-40'ın ise İspanya ve Portekiz'deki *A. baumannii* izolatlarında yaygın olduğu bildirilmiştir (2,6). *Bla<sub>OXA-23</sub>* ve *bla<sub>OXA-58</sub>* genleri plazmit üzerinde tanımlanmasına rağmen *bla<sub>OXA-24</sub>* grubu KHO'lar sadece kromozom kaynaklı gibi görünmektedir. Birçok izolatta *bla<sub>OXA-40</sub>*'ı çevreleyen dizilerin incelenmesi, insersiyon sekansları (IS), transposonlar veya integronlar gibi mobilize elemanlarla ilişkili olmadığını ortaya koymuştur. Bunun aksine. *P. aeruginosa*'da oksasilinaz genlerin çoğu integron gibi hareketli genetik yapılar üzerinde bulunmaktadır (50).

#### **1.2.2.1.3.4. OXA-58-grup genler**

KHO'lerin üçüncü grubu OXA-58, OXA-96 ve OXA-97'yi içermektedir. Ancak OXA-58 *A. baumannii*'de saptanmıştır (45,55,57). İlk olarak, Fransa'nın

Toulouse şehrindeki hastanenin yanık ünitesindeki bir salgın sonrasında karbapenem dirençli *A. baumannii*'de tanımlanmıştır (26,53). OXA-58'in OXA-51 / 69 ile % 59 ve başka KHO grupları ile % 50 amino-asit benzerliği vardır. Bir dizi epidemiyolojik araştırma İspanya, Türkiye, Romanya (39), Yunanistan (54), Avusturya, İngiltere, Arjantin, Kuveyt (13) ve İtalya gibi çeşitli coğrafi bölgelerden gelen *A. baumannii* klinik izolatlarında *bla<sub>OXA-58</sub>* geni tanımlamıştır. Ayrıca son zamanlarda, Irak'ta yaralanan ABD askeri personelinden izole edilen birçok *A. baumannii* izolatında *bla<sub>OXA-58</sub>* geni saptanmıştır (14,50). OXA-58 üreten çoklu karbapenem dirençli klonlara bağlı salgınlar Yunanistan'ın Atina şehrinde bir hastanenin yoğun bakım ünitesinde (54) ve bir çocuk hastanesinin birkaç ünitesinde bildirilmiştir. İlginç bir şekilde *bla<sub>OXA-58</sub>* geni Romanya ve Avustralya'da *A. junii* gibi farklı türlerin klinik izolatlarında da saptanmıştır (39). Non-klonal OXA-58 üreticileri ile yapılan birçok genetik çalışma, IS elemanlarının *bla<sub>OXA-58</sub>* geninin ekspresyonunda bir rol oynadığını göstermektedir. Özellikle *ISAb<sub>a2</sub>*, *ISAb<sub>a3</sub>* ve *IS18'in* de *ISAb<sub>a1</sub>* gibi, *bla<sub>OXA-58</sub>* ekspresyonunu arttıran promotör dizileri sağladığı gösterilmiştir (52). Ancak, bu IS elemanlarının muhtemelen *bla<sub>OXA-58</sub>'in* kazanılması ile ilgili olmadığı belirtilmektedir. 27-bp'lik tekrarlanmış diziler tarafından, *bla<sub>OXA-58</sub>* genini de içeren bir 5.5 kb'lık fragmanın çevrelenmiş olması, *bla<sub>OXA-58</sub>'in* kazanılmasında bir homolog rekombinasyon sürecinin rol oynayabileceğini göstermektedir (52).

#### **1.2.2.2. Non-A. baumannii türlerde görülen OXA genleri**

OXA-51-grup genler, *A. baumannii*'ye özgü oksasilinazlar olarak birçok araştırmacı tarafından tür tanımlanması ve suş tiplendirmesi amacıyla kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda OXA-51-grup genlerin mobilize olduğu ve konjugatif plazmidler aracılığı ile diğer Asinetobakter türlerine yayıldığı

gösterilmiştir. *Bla<sub>OXA-51-grup</sub>* ve *bla<sub>OXA-58</sub>* genleri ayrıca *Enterobacteriaceae* üyelerinde de bulunabilir. *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarında, sırasıyla *bla<sub>OXA-51-grup</sub>* ve *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* genlerin varlığı saptanmıştır (35).

*Bla<sub>OXA-23</sub>* geni, 2006 yılında İrlanda Cumhuriyeti'nde *A. pittii*'de (*Acinetobacter* genomik tür 3) ve 2012 yılında Güney Kore ve Tayland'da *A. nosocomialis*'de (*Acinetobacter* genomik tür 13TU) saptanmıştır. *Bla<sub>OXA-51</sub>*, *ISAbal* ile birlikte Tayvan'da karbapeneme dirençli bir *A. nosocomialis* kökeninde saptanmıştır. Güney Brezilya'nın Porto Alegre kentindeki hastalardan elde edilen bir dizi non-*A. baumannii* izolatıyla yapılan bir çalışmada, *ISAbal-bla<sub>OXA-23</sub>* ve *bla<sub>OXA-51</sub>* genleri karbapeneme dirençli iki *A. nosocomialis* izolatında saptanmıştır (60). Türkiye'de karbapeneme dirençli bir *K. pneumoniae* izolatında plazmit üzerinde kodlanan OXA-48 bulunmuş ve bu gen için *Shewanella oneidensis*'in doğal bir rezervuar olduğu gösterilmiştir (50).

## BÖLÜM II

### 2. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 2.1. GEREÇ

##### 2.1.1 Bakteri Kökenleri

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda, Ocak-Mart-2012 tarihleri arasında farklı klinik örneklerden izole edilen imipeneme (IMP) duyarlı olmayan 76 *A. baumannii* izolatu çalışmaya alındı. Kontrol kökeni olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Ayrıca, Tebriz üniversitesi'nden alınan 127 ve 128 numaralı *A. baumannii* kökenleri, *bla<sub>OXA-51</sub>* ve *bla<sub>OXA-23</sub>* genleri için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bakteriler çalışma zamanına kadar % 10'luk gliserinli buyyon besiyerinde -80°C' de saklandı.

##### 2.1.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler

###### A. Besiyerleri

1. Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck)
2. Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck)
3. Gliserinli Buyyon (Merck)
4. Eosine Metilen Blue Agar (EMB) (Merck)

5. Kanlı Agar (Blood Agar Base) (Merck)

## **B. Çözeltiler ve Tamponlar**

1. % 0,9 NaCl çözeltisi

2. Fosfat Tamponu (0.1 M)

3. Tris-Borik asit-EDTA (TBE) ( 1X )

## **C. Diğer Madde ve Malzemeler**

1. İmipenem monohydrate (Santa Cruz Biotechnology)

2. Agaroz (Sigma- Aldrich)

3. EDTA (ethylene diamine tetra acetate) (Sigma)

4. Safe view classic (Nükleik asit boyası) (ABM)

5. dNTP karışımı (25µmol her biri) (Thermo scientific)

6. Hot start Taq DNA polimeraz (5U/ µl , 500 U) (Thermo scientific)

7. Marker (50bp DNA Ladder) (Biolabs)

8. Oligonükleotid Primerler (Metabion International AG)



**Tablo 4.** Primer dizileri

Primer	Dizi (5' → 3')	Tm	Safıaştırma	Baz sayı
OXA-23-F	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	58 °C	HPLC	20
OXA-23-R	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	54 °C	HPLC	20
OXA-51-F	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	56 °C	HPLC	20
OXA-51-R	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	56 °C	HPLC	20
OXA-58-F	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	58 °C	HPLC	20
OXA-58-R	5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	63 °C	HPLC	20
OXA-24-F	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	58 °C	HPLC	20
OXA-24-R	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	56 °C	HPLC	20
ERIC - 2	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	-	-	22

## 2.2. YÖNTEMLER

### 2.2.1. Mikrodilüsyon Yöntemiyle İmipenem MİK Değerlerinin Belirlenmesi

IMP'e duyarlı olmayan 76 *A. baumannii* izolatının IMP MİK değerleri, CLSI önerileri doğrultusunda saptandı (43). Bu test için U tabanlı 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plakları kullanıldı. % 10'luk gliserinli buyyon besiyeri içinde -80°C'de stoklanan bakterilerden Mueller-Hinton agar besiyerine pasajlanarak 18-24 saat 36°C'de, etüvde inkübe edildi. Bu bakteri kültüründen 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde direkt koloni süspansiyonu yöntemiyle inokulum hazırlanıp,

mikrodilüsyon plağındaki son inokulum konsantrasyonu  $5 \times 10^6$  CFU /ml olacak şekilde sulandırım yapıldı. Steril plaklara 50 µl Mueller Hinton sıvı besiyeri dağıtıldı. Birinci kuyucuklara, membran filtrasyon ile steril edilmiş 50 µl stok IMP solüsyonu eklendi ve 12. kuyucuğa kadar seri dilüsyonlar yapıp, 12. kuyucuktan 50 µl dışarı atıldı. Bakteri süspansiyonlarından tüm kuyucuklara 50 µl dağıtıldı. Bu şekilde IMP'in kuyucuklardaki final konsantrasyonunun 256-0.125 µg/ml, arasında olması sağlandı. Her plakta, besiyeri ve bakteri üreme kontrollerine yer verildi. Kontrol kökeni olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Plaklar 35°C'de 16-20 saat enkübe edildi. Bu süre sonunda üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi.

**Tablo 5.** *A. baumannii*'de MİK değerlerine göre imipenem duyarlılık sınırları

IMP	DUYARLI	ORTA DUYARLI	DİRENÇLİ
MİK (µg/ml)	≤ 4	8	≥16

### 2.2.2. DNA ekstraksiyonu

Mueller-Hinton agar (Oxoid) besiyerinde bir gece 35 °C'de üreyen kolonilerden 4-5 tanesi 500 µl steril distile suda süspanse edilip, ardından kaynar su banyosunda 10 dakika tutuldu. Standart masa-üstü santrifüjde (Eppendorf-5415C) 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı (37). Tüm PCR uygulamaları "Techne-TC-312" ısı-döngü cihazında gerçekleştirildi.

### 2.2.3. IMP Dirençli *A. baumannii* izolatlarının Klonal

#### Yakınlıklarının İncelenmesi

IMP'e duyarlı olmadığı belirlenen 76 *A. baumannii* izolatının klonal yakınlıkları, "Enterobacterial repetitive intergenic consensus – ERIC" dizilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak PCR ile araştırıldı. Bu amaçla, 25 µl'lik PCR karışımı aşağıdaki bileşenlerle hazırlandı:

10 x PCR buffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
Mix dNTP karışımı	200 µM
ERIC-2	2 µM
Steril distile su	15.2 µl
Hot start Taq DNA polimeraz	1.5 U
DNA ekstraktı	2 µl

Uygulanan amplifikasyon protokolü:

95 C° - 5 dk.

94 C° - 1 dk.

40 C° - 1 dk.

72 C° - 1 dk.

72 C° - 10 dk.

} x 35

Tüm bantları bire-bir aynı olan izolatlar aynı suş (klon), bir veya iki bant farklılık gösteren izolatlar benzer (klonal ilişkili), iki banttan fazla farklılık gösteren izolatlar ise farklı suşlar olarak kabul edildi.  $S_J = n_{AB} / (n_{AB} + a + b)$  formülüne göre hesaplanan “Jaccard” katsayısı esas alınarak, *A. baumannii* izolatları için filogenetik analizler “MEGA version 4” programı ile yapıp, dendogramlar oluşturuldu (59). [ $n_{AB}$  = A ve B izolatlarında ortak olan bant sayısı, a = A izolatında olup B’de olmayan bant sayısı, b = B izolatında olup A’da olmayan bant sayısı].

#### **2.2.4. Multipleks PCR İLE OXA-51-grup, OXA-23-grup, OXA-24-grup ve OXA-58-grup Genlerinin Araştırılması**

Klonal yakınlıkları ERIC-PCR yöntemi ile araştırılan 76 *A. baumannii* izolatının, moleküler olarak 13 farklı klon altında toplandığı saptanmıştır. Her klon ve alt gruplardan birer temsilci seçilerek, bunlarda başlıca OXA tipi karbapenemaz gruplarının (OXA-23-grup; OXA-24-grup; OXA-51-grup ve OXA-58-grup) prevalansı PCR tekniği ile incelenmiştir.

Bu amaçla, 50 µl’lik PCR karışımı aşağıdaki bileşenlerle hazırlandı:

10 x PCR buffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	1.75 mM
Mix dNTP karışımı	200 µM
Primer Mix	200 nM
Steril distile su	29,3 µl
Hot start Taq DNA polimeraz	1 U

DNA ekstraktı 5 µl

Uygulanan amplifikasyon protokolü:

95 C° - 5 dk.

94 C° - 25 sn.  
52 C° - 40 sn.  
72 C° - 50 sn. } x 30

72 C° - 6 dk.

### 2.2.5. OXA-51-grup GENİNİN ARAŞTIRILMASI

Her klondan ve subtipten seçilen temsilci kökenlerde, kontrol amacıyla sadece OXA-51 grubuna özgü primerler ile PCR yapıldı. Ayrıca, multipleks PCR ile OXA-51 geni saptanan kökenlerde dizi analizi için ürünü çoğaltmak amacıyla da OXA-51 PCR tekrarlandı.

Bu amaçla, 50 µl'lik PCR karışımı aşağıdaki bileşenlerle hazırlandı:

10 x PCR buffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	1.75 mM
Mix dNTP karışımı	200 µM
F-Primer-OXA-51	500 nM
R-Primer-OXA-51	500 nM

Steril distile su	33.2	$\mu$ l
Hot start Taq DNA polimeraz	1.5	U
DNA ekstrakt	5	$\mu$ l

Uygulanan amplifikasyon protokolü:

95 C° - 5 dk.

95 C° - 1 dk.	}	x 30
50 C° - 1 dk.		
72 C° - 1 dk.		

72 C° - 10 dk.

### 2.2.6. OXA-23-grup GENİNİN ARAŞTIRILMASI

Her klondan ve subtipten seçilen temsilci kökenlerde, kontrol amacıyla sadece OXA-23 grubuna özgü primerler ile PCR yapıldı. Ayrıca, multipleks PCR ile OXA-23 geni saptanan kökenlerde dizi analizi için ürünü çoğaltmak amacıyla da OXA-23 PCR tekrarlandı.

Bu amaçla, 50  $\mu$ l'lik PCR karışımı aşağıdaki bileşenlerle hazırlandı:

10 x PCR buffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	1.75 mM
Mix dNTP karışımı	200 $\mu$ M







MgCl <sub>2</sub>	1.75	mM
Mix dNTP karışımı	200	µM
F-Primer-OXA-58	500	nM
R-Primer-OXA-58	500	nM
Steril distile su	33.2	µl
Hot start Taq DNA polimeraz	1.5	U
DNA ekstraktı	5	µl

Uygulanan amplifikasyon protokolü:

95 C° - 5 dk.

95 C° - 1 dk.  
50 C° - 1 dk.  
72 C° - 1 dk.

} x 30

72 C° - 10 dk.

### 2.2.9. Elektroforez

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi için elektroforez yapıldı. Bunun için 1X TBE içinde % 1,5 agaroz jel hazırlandı. 100 ml agaroz içine safe view (abm) çözeltilisinden 6,5 µl eklendi ve jel kasetine uygun taraklar yerleştirdikten sonra döküldü, 10 dakika donmaya bırakıldı. PCR ürünleri jel yükleme bufferi ile 1/6 oranında (2 µl jel yükleme buffer + 10 µl PCR ürünü ) karıştırılarak her bir kuyucuğa

12 µl, bir kuyucuğa da 50 bp DNA Ladder olacak şekilde jele yüklendi. Jel 1X TBE içinde 100 V uygulanarak 40 dakika yürütüldü.

Sonuçlar “Vilber Lourmat fusion FX-7” cihazı ile incelendi. Bant büyüklükleri DNA Ladder ile karşılaştırıldı ve OXA-51 için 353 bp, OXA-23 için 501 bp , OXA-24 için 246 bp ve OXA-58 için 599 bp büyüklüğünde bant izlenmesi bu genlerin varlığı için bir işaret olarak değerlendirildi.

### **2.2.10. DNA Dizi Analizi**

PCR ürünlerinde çift yönlü DNA dizi analizi yaptırıldı (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Elde edilen dizi analizi sonuçları hem nükleotid hem de aminoasit düzeyinde, National Center for Biotechnology Information (NCBI) ve European Bioinformatics Institute (EBI)'nin web tabanlı servisleri kullanılarak referans dizilerle (*bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>* ve *bla<sub>OXA-58</sub>* için sırasıyla; CP001182, AJ309734 ve AY665723) karşılaştırıldı.

## BÖLÜM III

### 3. BULGULAR

#### 3.1 İMP MİK Değerleri

İMP'e duyarlı olmayan 76 *A. baumannii* izolatının İMP MİK değerleri, CLSI önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Kökenlerden 72'sinin (% 94.74) imipeneme dirençli (MİK $\geq$ 16  $\mu$ g/ml), dördünün (% 5.26) ise orta duyalı (MİK=8  $\mu$ g/ml) olduğu saptandı. İncelenen *A. baumannii* izolatlarının İMP MİK değerleri Tablo 6 'da görülmektedir.

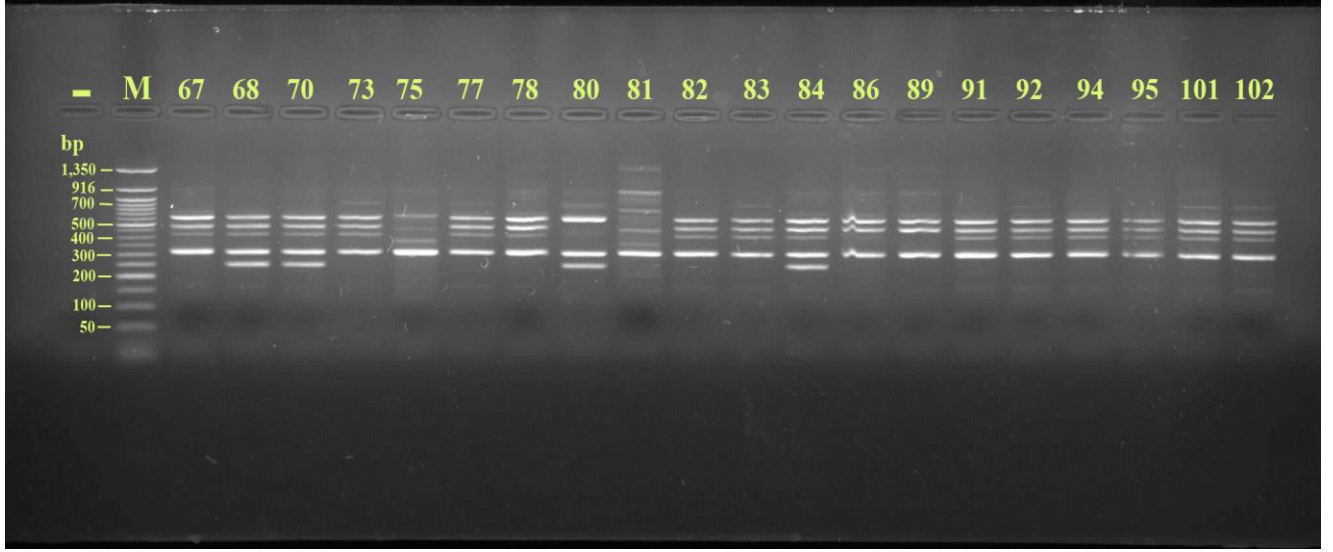
**Tablo 6. *A. baumannii* kökenlerine ait İMP MİK sonuçları**

MİK	128	64	32	16	8
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
İzolat sayısı	4	22	28	18	4

(toplam:76 *A. baumannii* kökeni)

#### 3.2. *A. baumannii* Kökenlerinin Klonal İlişkisi

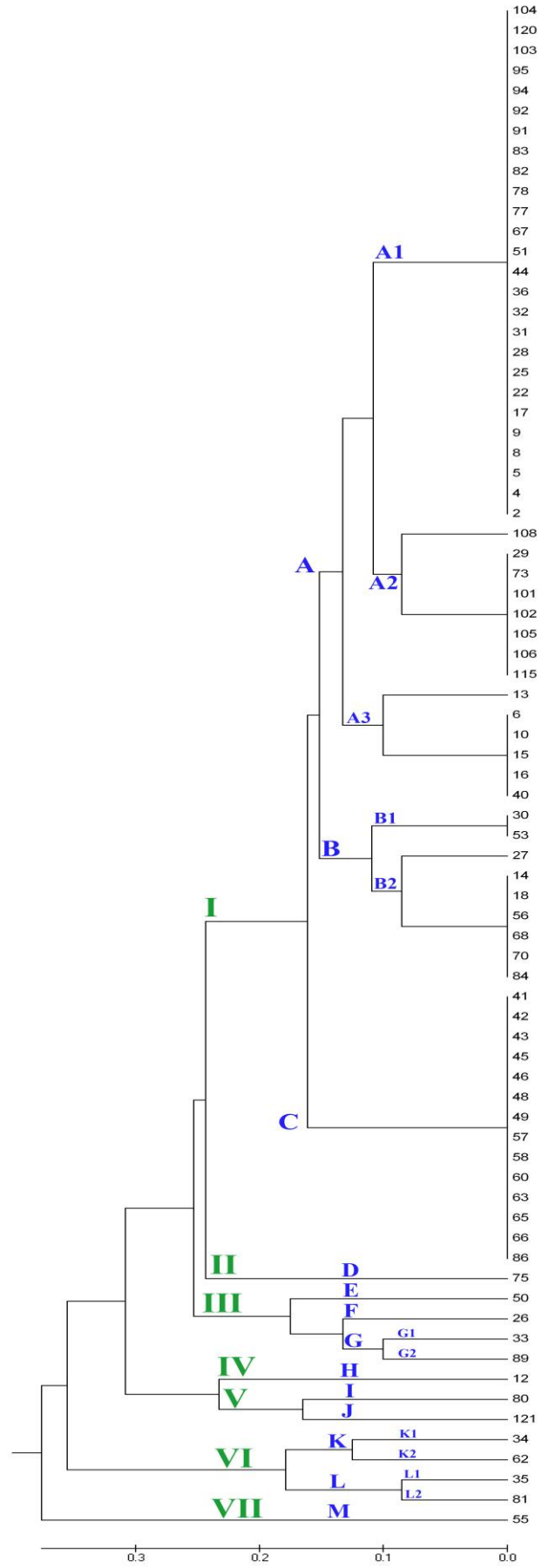
İmipenem duyarlı olmayan toplam 76 *A. baumannii* izolatının klonal yakınlıkları, ERIC dizilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak PCR ile araştırıldı. İncelenen kökenlerde, büyüklükleri 250 bp ile 1350 bp arasında değişen, 3 ile 9 adet bant oluştuğu gözlemlendi. *A. baumannii* izolatlarının hepsinde 300 bp, izolatların % 93.42'sinde (71/76) 550 bp ve izolatların % 92,1'inde (70/76) 500 bp büyüklüğünde bantlar belirlendi (Şekil-2).



**Şekil 2 .** Bazı *A. baumannii* suşlarının ERIC PCR sonucu oluşan bant paternleri (M: Marker, - : Negatif kontrol)

ERIC-PCR ile elde edilen bant paternlerine göre, incelenen suşların yedi ana grup (I – VII) ve 13 farklı klon (A-M) altında toplandığı belirlendi (Şekil 3). “A” klonu, 40 üyesi ile en büyük klondur (tüm izolatların % 52.63’ü). Bu klon içerisinde 3 subtip (A1-A3) tespit edildi. A1 subtipi 26 üyesi ile A klonunun en büyük subtipi olup, tüm suşları % 100 bant profil benzerliği gösterdi. A2 (8 üyeli) subtipinde 108 nolu izolatin, A3 subtipinde ise 13 nolu izolatin dışında tüm suşlar, kendi aralarında % 100 bant profil benzerliği gösterdi.

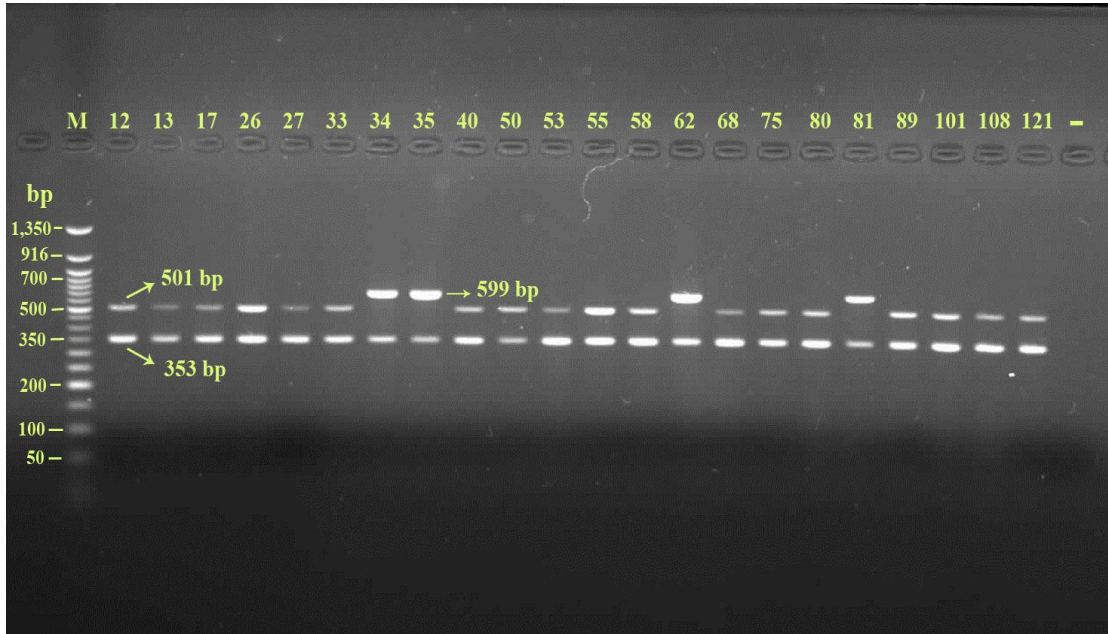
“A” klonu dışında, 9 üyeli “B” klonu (B1 ve B2 subtipleri), 14 üyeli “C” klonu, ikişer üyeli “G”, “K” ve “L” klonları tespit edildi. “B” klonu içerisinde değerlendirilen 9 suşun altısı ve C klonunun tüm üyeleri, kendi aralarında % 100 bant profil benzerliği gösterdi. Ayrıca tek üyeli 7 klon (D, E, F, H, I, J ve M) belirlendi



Şekil 3. *A. baumannii* izolatlarının dendogramı ( I-VII : Ana gruplar, A – M : Klonlar)

### 3.3. KHO Genlerinin Varlığının Saptanması

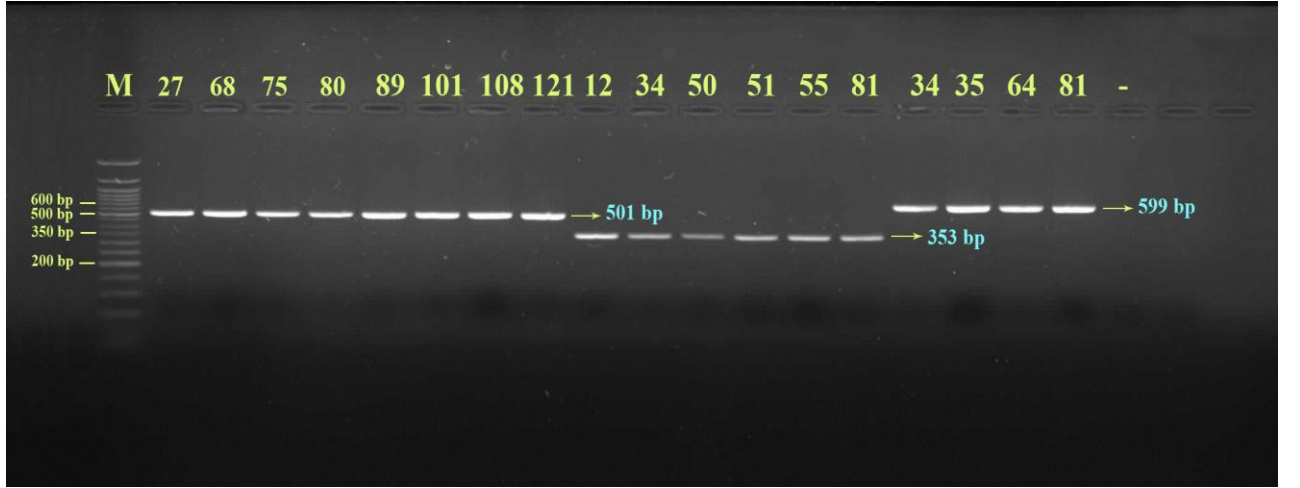
ERIC-PCR ile belirlenen tüm klonlardan, subtipler de dahil olacak şekilde birer temsilci alınarak, toplam 22 bakteride temel KHO gruplarının (OXA-51, OXA-23, OXA-24 ve OXA-58) varlığı multipleks PCR ile araştırıldı. Multipleks PCR sonuçlarına göre, incelenen izolatların tamamında *bla*<sub>OXA-51-grup</sub> geni tespit edildi. K ve L klonları hariç diğer klonların temsilcilerinde (18 temsilci suş) *bla*<sub>OXA-23-grup</sub> pozitifliği saptanmış olup, tüm kökenler dikkate alındığında 72 bakteri suşuna (% 94.74) karşılık gelmekteydi. K ve L klonlarını oluşturan dört (% 5.26) kökende ise *bla*<sub>OXA-58-grup</sub> geni belirlendi (Şekil 4). *bla*<sub>OXA-24-grup</sub> genine hiçbir izolatta rastlanmadı.



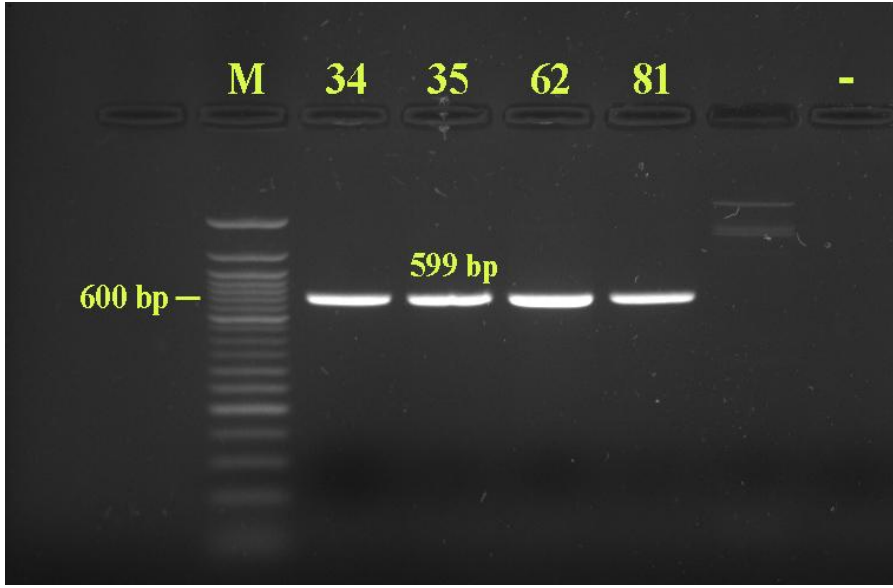
**Şekil 4.** Her klon ve subtipi temsil eden 22 *A. baumannii* izolatında multipleks PCR ürünlerinin jel görüntüsü. (M: 50 bp Marker, - : Negatif kontrol, OXA-51: 353 bp, OXA-23: 501 bp, OXA-58: 599 bp)

Multipleks PCR ile elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla, her klondan ve subtipten seçilen temsilci kökenlerde, her bir KHO grubuna (OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58) özgü primerler ile PCR yapıldı. Multipleks PCR sonuçlarıyla uyumlu bir şekilde; *bla*<sub>OXA-23-grup</sub>, *bla*<sub>OXA-51-grup</sub> ve *bla*<sub>OXA-58-grup</sub> genlerine ait PCR ürünleri elde edildi (şekil 5 ve 6).

PCR ürünlerinin çift yönlü DNA dizi analiziyle de bu genlerin varlığı doğrulandı. *bla*<sub>OXA-23-grup</sub> , ve *bla*<sub>OXA-58-grup</sub>'a ait dizi analizi sonuçları hem nükleotid hem de aminoasit düzeyinde ilgili referans dizilerle % 100 uyumlu bulundu. *bla*<sub>OXA-51-grup</sub>'a ait PCR ürünlerinin dizi analizinde ise referans dizilerle % 97-99 uyum belirlendi ve söz konusu ürünlerin OXA-51 grubundan bir enzime ait olduğu sonucuna varıldı.



**Şekil 5.** Klon ve subtipleri temsil eden bazı kökenlerde, sadece *bla*<sub>OXA-23</sub> (501 bp), *bla*<sub>OXA-51</sub> (353 bp) ve *bla*<sub>OXA-58</sub> (599 bp) özgü primerler ile elde edilen PCR ürünleri (M: 50 bp Marker, - : Negatif kontrol)



**Şekil 6.** K (34, 62) ve L (35, 81) klonlarını temsil eden kökenlerde *bla<sub>OXA-58</sub>* e özgü primerler ile elde edilen PCR ürünleri (M: 50bp Marker, - : Negatif kontrol)

*Bla<sub>OXA-58</sub>-grup* geni, sadece altıncı ana grubu oluşturan K (34, 62) ve L (35, 81) klonlarının tüm üyelerinde saptandı. *Bla<sub>OXA-23</sub>-grup* geni ise K ve L klonları hariç, tüm klonlardan seçilen temsilci suşlarda belirendi.



## BÖLÜM VI

### 4. TARTIŞMA

Karbapenemler klinik olarak en etkili beta-laktam antibiyotiklerden olup, dirençli gram negatif patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Karbapenemler dışındaki tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz genlerini barındıran bakteriyel patojenlerin artan yaygınlığı, kabapenem ailesinin önemini ve özellikle hastane ortamında kullanımını son on yıl içinde ciddi oranda artmıştır. Karbapenemlerin artan kullanımı ile oluşan pozitif seçim baskısı, sık karşılaşılan gram-negatif hastane patojenlerinde karbapenem direncinin ortaya çıkması ve yaygınlaşması ile sonuçlanmıştır (35). Metallo-enzimler özellikle Doğu Asya'da, yerel olarak yaygın olsa da, moleküler D sınıfına ait karbapenemazlar (KHO enzimleri) *A. baumannii* izolatlarındaki karbapenem direnciden sorumlu olan ana mekanizma olarak kabul edilmektedir (67).

Çalışmamızda incelenen 76 *A. baumannii* izolatının MİK değerleri 8-128 µg/ml arasında belirlendi. *Bla<sub>OXA-23</sub>-grup* genler pozitif bulunan izolatların MİK değerleri 8-128 µg/ml arasındayken, *bla<sub>OXA-58</sub>-grup* genler saptanan tüm izolatların MİK değerleri 64 µg/ml'di. ERIC-PCR tekniği *Asinetobakter* türlerinin genetik karakterizasyonu için iyi sonuçlar veren, düşük maliyetli ve hızlı bir yöntemdir (20). Çalışmamızda ERIC-PCR sonuçlarına göre hazırlanan dendogramda 13 klonun varlığı belirlendi. Bunlar arasında 40 üyeli (tüm kökenlerin % 52.63'i) "A" klonu en büyük klon olup, 9 üyeli "B" klonu ve 14 üyeli "C" klonu ile birlikte I. ana grubu oluşturdu. Bu baskın grubun dışında kalan izolatlar, diğer birçok küçük klon altında toplanmıştı.

Türkiye’de yapılan bir çok çalışma KHO saptanan *A. baumannii* kökenlerinin tedavi merkezlerinde çoğunlukla klonal olarak ilişkili bir dağılım gösterdiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, Türkiye’de iki büyük merkezden izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* kökenlerinde OXA-tipi karbapenemaz varlığı ile klonal ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, direncin her iki merkezde de büyük ölçüde klonal yayılım gösteren suşlara bağlı olduğu bildirilmiştir (25). Yedi yıllık bir süreçte, ÇİD *A. baumannii* izolatlarında “repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR” (rep-PCR) yöntemiyle moleküler yakınlıkların ve karbapenemaz aktivitesindeki oksasilinazların araştırıldığı bir çalışmada, incelenen 100 suştan 62’sinin, 13 ana paternden birine dahil olduğu belirtilmiştir (22). En çok üyesi olan klonlarda 9-10 suşun bulunduğu bu çalışmada, ÇİD *A. baumannii* sorununun uzun süreden beri varlığını sürdüren birkaç farklı klondan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Hacettepe Üniversitesi’nde yapılan bir çalışmada, hastanenin çeşitli birimlerinden izole edilen 51 ÇİD *Acinetobacter spp.* kökeni ERIC-PCR ile tiplendirilmiş ve 15 farklı patern saptanmıştır. Bu dirençli *Acinetobacter* suşları arasında 32’si (% 62.7) *A. baumannii* olarak tanımlanmıştır (33). Bu çalışmada ÇİD *A. baumannii* izolatları 8 klonu oluştururken, çalışmamızda 13 klon saptanmıştır. Yine söz konusu çalışmada *A. baumannii* kökenlerinin çoğunluğu bir klonda (F klonu = 17 suş) toplanmış, geri kalan kökenler diğer küçük klonlara dağılmıştır. Çalışmamızda da buna benzer bir dağılım söz konusudur.

Yapılan uluslararası bir değerlendirmede, belli bazı klonların (Uluslararası klonlar I-III), ÇİD ve imipenem duyarlı olmayan *A. baumannii* izolatlarının dünya genelinde yaygınlaşmasında rol oynadığı, ve bunların sıklıkla KHO enzimlerini taşıdığı rapor edilmiştir (32). Brezilya’nın Porto Alegre şehrinde 2006 - 2007 yılları arasında beş hastaneden 274 *Acinetobacter spp.* çalışmaya alınmıştır. Bu çalışmada

izolatların % 84'ü (n=230) OXA-51-grup genini taşıdığı için *A. baumannii* izolatı olarak tanımlanmıştır. İzolatların % 62'sinde *bla<sub>OXA-23-grup</sub>* geni tespit edilmiş, ve bunların % 98'inin karbapenemlere dirençli olduğu saptanmıştır. *Bla<sub>OXA-23</sub>* pozitif ÇİD Asinetobakter türlerinin moleküler tiplendirilmesi için ERIC-PCR kullanılmış ve 25 izolatın tek ERIC-PCR profili sergilediği, geriye kalan 124 izolatın 30 farklı klona ayrıldığı belirtilmiştir (toplam 55 klon). En büyük klonda dört farklı hastaneye ait 9 Asinetobakter izolatı gösterilmiştir (20). Bu çalışmadaki klon sayısının fazla olması, kökenlerin beş farklı hastaneden toplanması ve bir yıllık toplama süresi ile açıklanabilir. Ayrıca, bu çalışmada tüm klonlarda OXA-23 geni bulunurken, bizim çalışmamızda iki küçük klon haricindeki tüm klonlardan seçilen temsilcilerde bu gen gözlenmiştir. Brezilya'daki çalışmanın bulgularına göre beş OXA-51 negatif kökende OXA-23 saptanması da ilginç bir veridir.

Chuang ve ark. Tayvan'da yaptıkları bir çalışmada, 151 *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (ACB) kompleks izolatında (134 *A. buamannii*, 12 *A. pittii* , 5 *A. nosocomialis*) "Pulsed field gel electrophoresis" – (PFGE) analizi ile 75 pulsotip saptamışlardır (12). Bu çalışmadaki 75 pulsotipten 3 ana pulsotip (4, 5 ve 7 pulsotipleri) 51 *A. baumannii* izolatı içerirken, çalışmamızdaki *A. baumannii* izolatlarının 63'ü ( % 82.9) birbiriyle konal olarak ilişkiliydi. Tayvan'daki çalışmada tüm *A. baumannii* kökenlerinde ve bir *A. nosocomialis* kökeninde OXA-51 geni, üç *A. baumannii* kökeninde OXA-24, iki *A. baumannii* kökeninde OXA-23, ve bir *A. pittii* kökeninde hem OXA-23 hem de OXA-58 tespit edilmiştir. Çalışmamızda saptanan *bla<sub>OXA-23-grup</sub>* pozitif izolatların oranı (% 94.74'e karşılık gelmektedir) Tayvan'daki çalışmadan fazladır.

Çalışmamızda *bla<sub>OXA-51-grup</sub>* tüm klonlarda saptanırken, *bla<sub>OXA-23-grup</sub>* K ve L klonları hariç tüm klon ve subtiplerin temsilcilerinde tespit edildi. *Bla<sub>OXA-58-grup</sub>* ise

sadece K ve L klonlarının tüm üyelerinde (toplam 4 suş) saptandı. Yapılan bir çalışmada, İstanbul ve Ankara'dan 2006 yılında toplanan karbapeneme dirençli 44 *A. baumannii* izolatından 26'sında (% 59.1) *bla*<sub>OXA-23-grup</sub> multipleks PCR ile saptanmış olup, bu kökenlerin 25'inin tek bir merkeze (İstanbul) ait olduğu bildirilmiştir (25). Bu veri merkezler arasında KHO genlerinin oranlarının çok farklı olabileceğini ortaya koyması açısından önemlidir. Sakarya Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada, 2008-2011 tarihleri arasında 13 üniversite ve devlet hastanesinden toplam 834 *A. baumannii* klinik izolatında multipleks gerçek zamanlı PCR (qPCR) yöntemi ile KHO genleri araştırılmıştır (15). İncelenen izolatların tümünde *bla*<sub>OXA-51</sub> grubu enzimler saptanırken, hiçbir izolatta *bla*<sub>OXA-24-grup</sub> bulunamamıştır. Karbapeneme dirençli izolatlarda *bla*<sub>OXA-23</sub> ve *bla*<sub>OXA-58</sub> grubu enzim pozitiflikleri, sırasıyla, % 74.4 ve % 17.3 olarak tespit edilmiştir. Yirmi beş izolat hem *bla*<sub>OXA-23-grup</sub> hem de *bla*<sub>OXA-58-grup</sub> gen pozitifliği göstermiştir. Çalışmamızın sonuçları, Türkiye genelinde yapılan bu çalışmanın sonuçları ile uyum içindedir. Bizim çalışmamızda da *bla*<sub>OXA-51</sub> grubu genler tüm izolatlarda gösterilmiş, hiçbir izolatta *bla*<sub>OXA-24</sub> grubu gen tespit edilememiş, ayrıca *bla*<sub>OXA-23</sub> grubu gen tespit edilen kökenlerin oranı *bla*<sub>OXA-58-grup</sub> tespit edilenlerden daha fazla bulunmuştur. Ancak bizim çalışmamızda hiçbir kökende OXA-58 ve OXA-23'e birlikte rastlanmamıştır. Meric M. ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir başka çalışmada, bir üniversite hastanesinin yoğun bakım ünitesinde 2005-2006 yılları arasındaki salgın sürecinde izole edilen imipenem dirençli 97 *A. baumannii* izolatında, *ISAbal* ile ilişkili *bla*<sub>OXA-23-grup</sub> pozitifliği tespit edilmiştir (40). Ayrıca bu çalışmada PFGE yöntemi ve plazmit analizi ile, bizim hastanemizde olduğu gibi, *bla*<sub>OXA-23-grup</sub> içeren imipenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının klonal bir yayılım gösterdiği ortaya konmuştur.

*Bla<sub>OXA-23-grup</sub>* üreten karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatları birçok ülkede saptanmış olup, bu genin dünya çapında yaygın olduğu düşünülmektedir (41). Nowak P. ve ark. Polonya’da kabapeneme dirençli izolatları multipleks PCR ile tarayarak % 47.11’inde OXA-23-grup geni tanımlamışlardır (45). Sohrabi N. ve ark. yaptıkları çalışmada, PCR ile imipenem dirençli izolatların % 88.7’sinde *bla<sub>OXA-23-grup</sub>* geni tespit etmişlerdir (57). Tebriz’de yapılan bu çalışmada elde edilen yüksek oran, bizim çalışmamızdaki sonuçlar ile benzerlik taşımaktadır. Daha düşük oranlarda *bla<sub>OXA-23-grup</sub>* rapor edilen çalışmalar da vardır. Örneğin Tayvan’da Chuang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 151 *A. calcoaceticuse* - *A. baumannii* (ACB) kompleks izolatı arasından (134 *A. buamannii*, 12 *A. pittii* , 5 *A. nosocomialis*) 26 karbapeneme dirençli *A. baumannii* saptanmıştır. Bu 26 suşun da sadece 2’sinde (% 7.7) OXA-23 geni tanımlanmıştır (12). Tayvan’da elde edilen OXA-23 oranı çalışmamızda ve birçok ülkeden bildirilen oranlardan oldukça düşüktür.

Çalışmamız kapsamında incelenen hiçbir izolatta *bla<sub>OXA-24</sub>* grubu gene rastlanmamıştır. Kulah C. ve ark. Zonguldak Karaelmas Üniversitesinde (Bülent Ecevit Üniversitesi) yaptıkları çalışmada, 145 karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatından hiçbirinde OXA-24 geni tespit etmemişlerdir (34). Türkiye genelinde yapılan çok merkezli bir çalışmada da hiçbir OXA-24 pozitif suş saptanmamıştır (15). Türkiye’de ilk kez Dokuz Eylül Üniversitesi’nde yapılan bir çalışmada, acil servis izolatlarında OXA-24/40 grubuna ait bir varyant (OXA-72) multipleks PCR ile tespit edilmiştir. Bu çalışmada bildirilen OXA-24/40-grup pozitif izolatların 2012-2013 yıllarında yoğun bakım ünitesinde bir salgına neden oldukları ortaya çıkmıştır. Ancak bu genin kromozomal veya plazmid yerleşimi araştırılmamıştır (46). Bu çalışmaların sonuçları, *bla<sub>OXA-24-grup</sub>* genlerin Türkiye’de henüz yaygın olmadığını ancak prevalanslarının dikkatle izlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. İspanya, Fransa,

İtalya, Polonya, Hırvatistan, ABD, Çin ve Güney Kore gibi pek çok merkezde saptanan *bla<sub>OXA-24/40</sub>* grubu enzimlerin ülkemizde de yayılma potansiyeli vardır (45, 55,57).

Türkiye'deki altı merkezden toplam 72 *Acinetobacter spp.* izolatının değerlendirildiği bir çalışmada, beş farklı merkezden 10 kökende *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* geni tespit edilmiştir (65). *Bla<sub>OXA-58-grup</sub>* pozitif bu 10 kökenden, aynı merkezden izole edilmiş olan ikisinde, bir OXA-51 alleli olan OXA-86 varlığı da bildirilmiştir. Gür, D. ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, İstanbul ve Ankara'daki iki merkezden izole edilen toplam 44 karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatından 18'inde (% 40.9) *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* saptanmıştır (25). Aynı çalışmada bu pozitif bulunan 18 kökenden 17'sinin tek bir merkezden izole edildiği ve tek bir klona ait oldukları da belirlenmiştir. Türkiye genelinde 13 merkezin katıldığı ve toplam 834 *A. baumannii* klinik izolatının incelendiği bir başka çalışmada *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* pozitiflik oranı % 17.3 olarak bulunmuştur (15). Tüm bu çalışmaların gösterdiği gibi Türkiye'deki merkezlerde *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* oranları çeşitlilik göstermektedir. Bizim çalışmamızda *bla<sub>OXA-58-grup</sub>*, sadece K ve L klonlarının üyelerinde (toplam 4 izolat, % 5.26) saptanmış olup, diğer çalışmalardaki oranlardan daha düşük olduğu gözlenmiştir.

*Bla<sub>OXA-58-grup</sub>* dünya genelinde bir çok farklı merkezden izole edilen klinik *A. baumannii* kökenlerinde bildirilmiştir (50). İspanya'da Ruiz ve ark. PCR ile 83 imipeneme dirençli *A. baumannii* izolatından % 20'sinde *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* saptamışlardır (55). Tayvan'da yapılan ve ülkedeki birçok merkezden toplanan 151 ACB kompleks izolatında PCR ile KHO genlerinin tarandığı bir çalışmada, sadece bir *A. pittii* izolatında *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* saptanırken, hiçbir *A. baumannii* izolatında bu gen belirlenememiştir (12). Başka bir çalışmada Sohrabı N. ve ark. Tebriz'de, imipeneme dirençli 62 *A. baumannii* izolatından % 3,2'sinde *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* tespit etmişlerdir (57).

Bu alışmalar, dünyada da merkezler arasında OXA-58 grubu enzim prevalanslarının büyük farklılıklar gösterebileceğine işaret etmektedir.

## BÖLÜM V

### 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hastane enfeksiyonlarına yol açan bakterilerde antibiyotiklere direnç gelişimi gündemde olan önemli bir konudur. *A. baumannii* nozokomiyal ve fırsatçı bir patojen olarak farklı antibiyotik gruplara hızla direnç geliştirebilmektedir. Karbapenemler, *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi için tercih edilen antibiyotiklerdendir. Ancak bu bakterilerde karbapenem direncinin yüksek orana ulaşması, bakterinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. *A. baumannii* kökenlerinde ortaya çıkan karbapenem direncinde, karbapenemaz niteliğindeki D-sınıfı beta-laktamazlar (KHO) önemli rol oynamaktadır. OXA-58-grup , OXA-23-grup ve OXA-24-grup genler için dünyanın birçok ülkesinde farklı sonuçlar bildirilmiş olup, özellikle OXA-58 geninin dünya çapında yaygın olduğu anlaşılmaktadır. OXA-58-grup ve OXA-23-grup genleri, Türkiye’de yaygın olarak farklı bölge ve şehirlerden izole edilmiştir. OXA-24-grup genler ise bazı ülkelerde yaygın olmasına rağmen Türkiye’de sadece Dokuz Eylül Üniversitesi’nde 2012-2013’de görülen bir salgında izole edilmiştir. Son zamanlarda KHO genleri ve yeni varyantları *A. baumannii* dışındaki bakteri türlerinde de ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı KHO genlerinin yaygınlığı ve çeşitliliği de giderek artmaktadır.

Çalışmamızda imipeneme duyarlı olmayan *A. baumannii* izolatlarında geniş bir yelpazede MİK değerleri (8-128 µg/ml) saptanmıştır. Bu kökenlerin klonal ilişkileri ERIC-PCR ile araştırılmış, ve oluşturulan dendogramda 13 farklı klon belirlenmiştir. Bunlardan A klonu üç subtip ve 40 üyesi ile en büyük klon olurken, B



klonu 9 üyeli, C klonu 14 üyeli ve G, K ve L iki üyeli klonlar olarak saptanmışlardır. Ayrıca tek üyeli 7 klon (D, E, F, H, I, J ve M) tespit edilmiştir. Tüm klonların temsilcilerinde OXA-51-grup genler belirlenmiş, OXA-23-grup genler ise K ve L klonları dışındaki diğer klonlarda gözlenmiştir. OXA-58- grup genler sadece K ve L klonlarına ait dört izolatta bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde; çalışma kapsamında incelenen 76 İMP dirençli *A. baumannii* izolatından 40 tanesinin aynı klonun üyesi olması, bu bakterilerin hastanemizde çoğunlukla klonal bir yayılım gösterdiğine işaret etmektedir. Tüm klon temsilcilerinde *bla<sub>OXA-51-grup</sub>* geninin ve iki küçük klon dışındaki diğer klonlarda *bla<sub>OXA-23-grup</sub>* geninin saptanmış olması, incelenen *A. baumannii* kökenlerindeki İMP direncinden çoğunlukla bu iki KHO grubunun sorumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca ikişer üyeli iki klonda *bla<sub>OXA-58-grup</sub>* varlığı da ortaya konmuştur.

Genel olarak *A. baumannii* enfeksiyonlarının uygun tedavisi için örneklerin hızlı bir şekilde laboratuvarda tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması önem taşımaktadır. Çıkan sonuçlara göre uygun bir tedavi düzenlenmelidir. Karbapenem dirençli *A. baumannii* kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri son derece kısıtlıdır. Çoğu zaman kolistin tek seçenek olarak kalmakta ve yan etkileri sorun oluşturabilmektedir. Duyarlı bulunması durumunda netilmisin gibi aminoglikozitlerin de dahil olduğu kombinasyon tedavileri söz konusu olabilmektedir. Tedavi için yeni stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Son zamanlarda *A. baumannii* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlarda moleküler tedavi üzerinde durulmaktadır. Örneğin; bakterisidal gen transfer terapisi, “cathelicidin”ler, radyo-immuno terapi, ve nano-partikül teknolojisi. Ancak bu tedavi yöntemleri sadece deneysel aşamadır.

Karbapenem dirençli *A. baumannii* kökenlerinin hastanede yaygınlaşmasını önlemek için enfeksiyon kontrol önlemleri sıkı bir şekilde uygulanmalı ve çalışan tüm personele bu konuda eğitim verilip, gerekli uyarılar yapılmalıdır. Hastaneler ve merkezler arasında hasta sevkinde de enfeksiyon kontrolüne dikkat edilmeli, bilgi aktarımı sağlıklı bir şekilde sağlanmalıdır. Yine aynı kapsamda, yatan hastalar ile ilgilenen refakatçiler bilgilendirilmeli, yakınlarının ziyaretleri sınırlandırılmalıdır. Tedavi merkezlerinde antibiyotik duyarlılık paternlerinin izlenmesi ve moleküler epidemiyolojik çalışmaların yapılması, *A. baumannii* gibi patojenlere karşı gerekli önlemlerin zamanında alınması için şarttır.

## BÖLÜM VI

### ÖZET

#### **Klinik *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Karbapenem Direncine Yol Açan Sınıf-D Beta-Laktamazların Araştırılması**

*Acinetobacter baumannii* hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Karbapenem grubu antibiyotikler *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmakta ve bunun sonucunda bu antibiyotiklere direnç gelişmektedir. *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direncinde rol oynayan başlıca mekanizma, karbapenem hidrolize eden oksasilinazların (KHO) üretimidir. Ege Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen imipeneme duyarlı olmayan 76 *A. baumannii* izolatının imipenem Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu izolatlarının klonal ilişkileri ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)-PCR yöntemi ile değerlendirilmiş ve başlıca KHO gruplarının (OXA-23-grup; OXA-24-grup; OXA-51-grup ve OXA-58-grup) varlığı multipleks PCR tekniği ile araştırılmıştır. Çalışmamız kapsamında incelenen *A. baumannii* izolatlarının ERIC-PCR paternlerine göre 13 farklı klona ayrıldığı gözlenmiştir. Bunlardan A klonu üç subtip ve 40 üyesi ile en büyük klon olurken, B klonunun 9, C klonunun 14, G, K ve L klonlarının ikişer üyesi olduğu saptanmıştır. Ayrıca tek üyeli 7 klon (D, E, F, H, I, J ve M) tespit edilmiştir. Tüm klonların temsilcilerinde *bla*<sub>OXA-51-grup</sub> belirlenmiş, *bla*<sub>OXA-23-grup</sub> ise K ve L klonları dışındaki diğer klonlarda gözlenmiştir. *Bla*<sub>OXA-58-grup</sub> sadece K ve L klonlarına ait dört izolatta bulunurken, incelenen hiçbir kökende *bla*<sub>OXA-24-grup</sub>'a rastlanmamıştır. Moleküler tiplendirme sonuçları, çalışmaya alınan imipenem

dirençli *A. baumannii* kökenlerinin çoğunun klonal olarak ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Tüm klon temsilcilerinde *bla*<sub>OXA-51-grup</sub> ve iki küçük klon dışındaki diğer klonlarda *bla*<sub>OXA-23-grup</sub> saptanmış olması, incelenen *A. baumannii* kökenlerindeki İMP direncinden çoğunlukla bu iki KHO grubunun sorumlu olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca iki küçük klonun üyesi olan dört kökende *bla*<sub>OXA-58-grup</sub> varlığı da gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, ERIC-PCR, karbapenemaz, OXA

## ABSTRACT

### Investigation of Class-D Beta-lactamases Causing Carbapenem Resistance in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates

*Acinetobacter baumannii* is an important causative agent of nosocomial infections. Carbapenems have been frequently used in the treatment of infections caused by *Acinetobacter spp.*, and as a result, resistance has been developed to these antibiotics. The primary mechanism involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter spp.* is the production of carbapenem-hydrolysing oxacillinases (CHO). Minimum inhibitory concentration (MIC) values of 76 imipenem non-susceptible *A. baumannii* strains isolated from Ege University Hospital were determined by microdilution method. The clonal relationship of the isolates was analyzed by “Enterobacterial repetitive intergenic consensus” (ERIC)-PCR and the presence of CHO major groups (OXA-23; OXA-24; OXA-51 and OXA-58 groups) was investigated by multiplex PCR technique. According to ERIC-PCR patterns, *A. baumannii* isolates examined in our study were distributed in 13 different clones. Clone A was the largest clone with three subtypes and 40 members. Clone B and clone C included, 9 and 14 members, respectively. Clone G, K and L had two members each. Additionally, seven clones (D, E, F, H, I, J and M) included only one member each, were detected. *Bla<sub>OXA-51-group</sub>* was found in representatives of all the clones, *bla<sub>OXA-23-group</sub>* was observed in representatives of all clones other than the clone K and L. While *bla<sub>OXA-58-group</sub>* was detected only in four members of clone K and L, *bla<sub>OXA-24-group</sub>* was not encountered in any of the examined strains. Molecular

fingerprinting revealed that most of the imipenem resistant *A. baumannii* strains were clonally related. Detection of *bla*<sub>OXA-51-group</sub> in representatives of all clones and *bla*<sub>OXA-23-group</sub> in representatives of all but two small clones indicated that, these two CHO were mostly responsible for the imipenem resistance of the examined *A. baumannii* strains. In our study, the presence of *bla*<sub>OXA-58-grup</sub> was also shown in four strains which were the members of two small clones.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, ERIC-PCR, carbapenemase, OXA

## BÖLÜM VI

### KAYNAKLAR

1. Adams-Haduch, J. M., Paterson, D. L., Sidjabat, H. E., Pasculle, A. W., Potoski, B. A., Muto, C. A., Harrison, L. H. ve Doi1 Y. (2008). Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates at a Tertiary Medical Center in Pennsylvania, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52: 3837–3843.
2. Afzal-Shah, M., Woodford, N., Livermore, D. M. (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, Molecular Class D  $\beta$ -Lactamases Associated with Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 583–588.
3. Aktaş, A. E., Yiğit, N., Kayserili, F., Ayyıldız, A. (2009). *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve Metallo-Beta Laktamaz üretiminin araştırılması, *İnfek Derg*, 23 : 57-62.
4. ARDA, B. (2010). Çok ilaca dirençli *acinetobacter baumannii* olgusu, *ANKEM Derg*, 24:78-81.
5. Bahar, H., Esen, N. (2007-2008). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Clit 2 bölüm XXVII: S. 1618-1619.

6. Bou, G., Oliver, A., Martinez-Beltran, J. (2000). OXA-24, a Novel Class D  $\beta$ -Lactamase with Carbapenemase Activity in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain, *Antimicrob. Agents Chemother*, 44: 1556–1561.
7. Bonnet, R., Marchandin, H., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De Champs, C., Jumas Bilak, E., Sirot, J. (2002). Chromosome-Encoded Class D  $\beta$ -Lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 46: 2004–2006.
8. Brown, S., Amyes, S. G. B. (2005). The sequences of seven class D  $\beta$ -lactamases isolated from carbapenemresistant *Acinetobacter baumannii* from four continents, *Clin Microbiol Infect*, 11: 326–328.
9. Brown, S., Amyes, S. (2006). OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far, *J. Antimicrob. Chemother.*, 57: 1–3.
10. Chopade, B. A., Wise, P. J., Towner, K. J., (1985). Plasmid Transfer and Behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65, *J. Gen. Microbiol*, 131: 2805-2811.
11. Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. A., Lee, S. K., Lee, J. C. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells, *Cell Microb*, 7: 1127–1138.
12. Chuang, Y. C., Sheng, W. H., Lauderdale, T. L., Li S. Y., Wang, J. T., Chen Y. C., Chang, S. C. (2013). Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility and carbapenemase resistance determinants among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan, *J Microbiol Immunol Infect* , xx:1-9.



13. Coelho, J., Woodford, N., Afzal-Shah, M., Livermore, D. (2006). Occurrence of OXA-58-Like Carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Collected over 10 Years in Three Continents, *Antimicrob. Agents Chemother*, 50: 756–758.
14. Çiftci, İ. H., Aşık, G. (2011). *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları, *ANKEM Derg*, 25:196-207.
15. Çiftci, İ. H., Aşık, G., Karakeçe, E., Öksüz, L., Yağcı, S., Sesli Çetin, E., Özdemir, M., Atasoy, A. R., Koçoğlu, E., Gül, M., Güzel Kurtoğlu, M., Köksal Çakırlar, F., Seyrek, A., Berktaş, M., Gültepe, B., Ayyıldız, A. (2013). *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında *bla*<sub>OXA</sub> Genlerinin Dağılımı: Çok Merkezli Bir Çalışma, *Mikrobiyol Bul*, 47: 592-602.
16. Dalla-Costa, L. M., Coelho, J. M., Souza, H. A. P. H. M., Castro, M. E. S., Stier, C. J. N., Bragagnolo, K. L., Rea-Neto, A., Penteado-Filho, S. R., Livermore, D. M., Woodford, N. (2003). Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil, *J Clin Microbiol*, 41: 3403–3406.
17. Di Popolo, A., Giannouli, M., Triassi, M., Brisse, S., Zarrilli, R. (2011). Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme, *Clin Microbiol Infect*, 17: 197–201.
18. Doi, Y., Arakawa, Y. (2007). 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides, *Antimicrob Resis*, 45:88–94.
19. Donald, H. M., Scaife, W., Amyes, S. G. B., Young, H. K. (2000). Sequence Analysis of ARI-1, a Novel OXA  $\beta$ -Lactamase, Responsible for Imipenem

- Resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92, *Antimicrob. Agents Chemother*, 44: 196–199.
20. Einsfeld Ferreira, A., Padilha Marchetti, D., Rosa da Cunha, G., Moreira de Oliveira, L., Bopp Fuentefria, D., Gehlen Dall Bello, A., Luis Barth, A., Corção, G. (2011). Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, *Brazil, Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 44:725-730.
  21. Endo, S., Yano, H., Hirakata, Y., Arai, K., Kanamori, H., Ogawa, M., Shimojima, M., Ishibashi, N., Aoyagi, T., Hatta, M., Yamada, M., Tokuda, K., Kitagawa, M., Kunishima, H., Kaku H. (2012). Molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in Japan, *J Antimicrob Chemother*, 67: 1623–1626.
  22. Ergin, A., Hascelik, G. ve Koseoglu, O. (2013). Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010, *Scand J Infect Dis*, 45 : 26 -31
  23. Figueiredo, S., Bonnin, R. A., Poirel, L., Duranteau, J., Nordmann, P. (2011). Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenemhydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*, *Clin Microbiol Infec* , 10:1469-0691.
  24. Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., Ursing, J. (1991). Reliability of Phenotypic Tests for Identification of *Acinetobacter* Species, *J Clin Microbiol*, 29: 277-282.

25. Gur, D., Korten, V., Unal, S., Deshpande, L. M., Castanheira, M. (2008). Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites, *J Med Microbiol*, 57: 1529–1532.
26. Heritier, C., Dubouix, A., Poirel, L., Marty, N., Nordmann, P. (2005). A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58, *J Antimicrob Chemother*, 55:115–118.
27. Heritier, C., Poirel, L., Lambert, T., Nordmann, P. (2005). Contribution of Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 49: 3198–3202.
28. Houang, E. T. S., Chu, Y., Lo, W., Chu, K. Y., Cheng, A. F. B. (2003). Epidemiology of Rifampin ADP-Ribosyltransferase (*arr-2*) and Metallo- $\beta$ -Lactamase (*blaIMP-4*) Gene Cassettes in Class 1 Integrons in *Acinetobacter* Strains Isolated from Blood Cultures in 1997 to 2000, *Antimicrob. Agents Chemother*, 47: 1382–1390.
29. Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R. D. (2012 ). *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen, *Landes Biosci*, 3: 243–250.
30. Jawetz, Melnick ve Adelberg Tibbi Mikrobiyoloji, Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA., 2010, S. 234-235.
31. Jeon, B. C., Jeong, S. H., Bae, Il. K., Kwon, S. B., Lee, K., Young, D., Lee, J. H., Song, J. S., Lee, S. H. (2005). Investigation of a Nosocomial Outbreak of

- Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23  $\beta$ -Lactamase in Korea, *J Clin Microbiol*, 43: 2241–2245.
32. Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., Samuelsen, Ø. (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*, *Drug Resis Updat*, 15: 237–247.
33. Köseoğlu Eser, Ö., Ergin, A., Tunçkanat, F., Haşçelik, G. (2008). In vitro activity of tigecycline as a therapeutic option against multidrug-resistant *Acinetobacter* spp., *New Microbiol*, 31: 535-542.
34. Kulaha, C., Mooijb, M.J., Comerta, F., Aktas, E., Celebi, G., Ozlu, N., Rijnsburger, M. C., Savelkoul, P. H. M. (2010). Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36: 114–118.
35. Leski, T. A., Bangura, U., Jimmy, D. H., Ansumana, R., Lizewski, S. E., Li, R. W., Stenger, D. A., Taitt, C. R., Vora, G. J. (2013). Identification of *bla*<sub>OXA-51</sub>-like, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>DIM-1</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> Carbapenemase Genes in Hospital Enterobacteriaceae Isolates from Sierra Leone, *J. Clin. Microbiol*, 10: 1-14.
36. Limansky, A. S., Mussi, M. A., Viale, A. M. (2002). Loss of a 29-Kilodalton Outer Membrane Protein in *Acinetobacter baumannii* Is Associated with Imipenem Resistance, *J Clin Microbiol*, 40: 4776–4778.
37. Luzzaro, F., Mantengoli, E., Perilli, M., Lombardi, G., Orlandi, V., Orsatti, A., Amicosante, G., Rossolini, G. M., Toniolo, A. (2001). Dynamics of a Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

- Producing the PER-1 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, *J Clin Microbiol*, 39: 1865–1870.
38. Magnet, S., Courvalin, P., Lambert, T. (2001). Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454, *Antimicrob. Agents Chemother*, 45:3375–3380.
39. Marque', S., Poirel, L., Heritier, C., Brisse, S., Dolores Blasco, M., Filip, R., Coman, G., Naas, T., Nordmann, P. (2005). Regional Occurrence of Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe, *J Clin Microbiol*, 43: 4885–4888.
40. MERIC, M., KASAP, M., GACAR, G., BUDAK, F., DUNDAR, D., KOLAYLI, F., EROGLU, C., VAHABOGLU, H. (2008). Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey, *FEMS Microbiol Lett*, 282 : 214–218.
41. Mugnier, P. D., Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P. (2010 ). Worldwide Dissemination of the bla<sub>OXA-23</sub> Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*, *Emerg Infect Diseases*, 16: 35-40.
42. Naas, T., Levy, M., Hirschauer, C., Marchandin, H., Nordmann, P. (2005). Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the Carbapenemase OXA-23 in a Tertiary Care Hospital of Papeete, French Polynesia, , *J Clin Microbiol*, 43: 4826–4829.
43. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.

Approved standard M7–A5 and informational supplement M100–S10.  
National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

44. Nocera, P. P. D., Rocco, F., Giannouli, M., Triassi, M., Zarrilli, R. (2011). Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains, *BMC Microbiology*, 11: 471-2180.
45. Nowak, P., Paluchowska, P., Budak, A. (2012). Distribution of bla<sub>OXA</sub> genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland, *New Microbiologica*, 35: 317-325.
46. Nur Sarı, A., Biçmen, M., Gülay, Z. (2013). The First Report on the Outbreak of OXA-24/40-Like Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey, *Jpn. J. Infect. Dis*, 66: 439-442.
47. Peleg, A. Y., Franklin, C., Walters, L. J., Bell, J. M., Spelman, D. W. (2006). OXA-58 and IMP-4 Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamases in an *Acinetobacter junii* Blood Culture Isolate from Australia, *Antimicrob. Agents Chemother*, 50: 399–400.
48. Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen, *Clin Microbiol Rev*, 21 : 538–582.
49. Pfeifer, Y., Cullik, A., Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens, *Int J Med Microbiol*, 300: 371–379.
50. Poirel, L., Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology, *Clin Microbiol Infect*, 12: 826–836.

51. Poirel, L., Heritier, C., Tolün, V., Nordmann, P. (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 48: 15–22.
52. Poirel, L., Nordmann, P. (2006). Genetic Structures at the Origin of Acquisition and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 50: 1442–1448.
53. Poirel, L., Marque', S., Heritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., Nordmann, P. (2005). OXA-58, a Novel Class D  $\beta$ -Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 49: 202–208.
54. Pournaras, S., Markogiannakis, A., Ikonomidis, A., Kondyli, L., Bethimouti, K., Maniatis, A. N., Legakis, N. J., Tsakris, A. (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit, *J Antimicrob Chemother*, 57: 557–561.
55. Ruiz, M., Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A. and Vila, J. (2007) High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain, *Clin Microbiol Infect*, 13: 1192–1198.
56. Siroy, A., Molle, V., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Pestel-Caron, M., Cozzone, A. J., Jouenne, T., De', E. (2005). Channel Formation by CarO, the Carbapenem Resistance-Associated Outer Membrane Protein of *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 49: 4876–4883.

57. Sohrabi, N., Farajnia, S., Akhi, M. T., Nahaei, M. R., Naghili, B., Peymani, A., Amiri, Z., Ahangarzadeh Rezaee, M., Saeedi, N. (2012). Prevalence of OXA-Type  $\beta$ -Lactamases Among *Acinetobacter baumannii* Isolates from Northwest, *Microb Drug Resist*, 18: 385-389.
58. Strateva, T., Markova, B., Marteva-Proevska, Y., Ivanova, D., Mitov, I. (2012). Widespread dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase and ArmA 16S ribosomal RNA methylase in a Bulgarian university hospital, *Braz J Infect Dis*, 16(3):307-310
59. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0, *Mol. Biol. Evol*, 24:1596–1599.
60. Teixeira, A. B., Martins, A. F., Barin, J. H., Djuli, M., Pormann, C., Luis Barth, A. (2013). Carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* harboring IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-23</sub> genes: first report in Latin America , *J. Clin. Microbiol*, 13:1-8.
61. Thapa, B., Tribuddharat, C., Rugdeekha, S., Techachaiwiwat, W., Srifuengfung, S., Dhiraputra, C. (2009). Rifampin resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Thailand, *Nepal Med Coll J.*, 11: 232-237.
62. Tomas, M. D., Beceiro, A., Perez, A., Velasco, D., Moure, R., Villanueva, R., Jesus Martinez-Beltran, J., Bou, G. (2005 ). Cloning and Functional Analysis of the Gene Encoding the 33- to 36-Kilodalton Outer Membrane Protein Associated with Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 11: 5172–5175.



63. Turton, J. F., Kaufmann, M. E., Glover, J., Coelho, J. M., Warner, M., Pike, R., Pitt, T. L. (2005). Detection and Typing of Integrons in Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* Found in the United Kingdom, *J Clin Microbiol*, 43: 3074–3082.
64. Turton, J. F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M. E., Pitt, T. L. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species, *J Clin Microbiol*, 44: 2974–2976.
65. Vahaboglu, H., Budak, F., Kasap, M., Gacar, G., Torol, S., Karadenizli, A., Kolayli, F., Eroglu, C. (2006). High prevalence of OXA-51-type class D  $\beta$ -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres, *J Antimicrob Chemother*, 58: 537–542.
66. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., Nordmann, P. (2005). Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? , *Clin Microbiol Rev*, 18: 306–325
67. Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Amyes, S. G. B., Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp, *Int J Antimicro Ag*, 27: 351–353.

## ÖZGEÇMİŞ



Iskandar Davanadeh

Tel: +905367811317

E-mail: [skandardavande@yahoo.com](mailto:skandardavande@yahoo.com)

- 1985 doğumlu, Tebriz
- 2005-2009 Lisans, Mikrobiyoloji, Azad Zanjaan Üniversitesi, Zanjaan
- 2011-2014 Y.Lisans öğrencisi, Farmasötik Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi, İzmir

### **Aldığı Sertifikalar ve Katılım Belgeler :**

- İlk yardım, genel eğitim sertifikası, Kızılay, Tebriz
- Geleneksel 4. Kök Hücre Sempozyumu, katılım belgesi, 2012-İzmir
- 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, katılım belgesi, 2012- İzmir