

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

II. Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN

***Acinetobacter baumannii* İZOLATLARINDA DNA Gyrase  
DİRENÇ GENLERİ OLAN gyrA, gyrB ve parC  
MUTASYONLARININ REAL TIME PCR  
YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Uğur KAYIŞ**

Referans no: 10058101

EDİRNE – 2015

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

II. Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN

***Acinetobacter baumannii* İZOLATLARINDA DNA Gyrase  
DİRENÇ GENLERİ OLAN gyrA, gyrB ve parC  
MUTASYONLARININ REAL TIME PCR  
YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Uğur KAYIŞ**

**Destekleyen Kurum : TÜBAP 2014/129**

**Tez No :**

EDİRNE – 2015

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Tammam SİPAHİ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Uğur KAYIŞ tarafından tez başlığı “*Acinetobacter baumannii* izolatlarında DNA Gyrase Direnç Genleri Olan *gyrA*, *gyrB* ve *parC* mutasyonlarının Real Time PCR yöntemiyle araştırılması” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 17/12/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “Yüksek Lisans Tezi” olarak kabul edilmiştir.

  
İmza

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

  
İmza

Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

İmza

Yrd. Doç. Dr. Nevra ALKANLI



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tezim süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı değerli danışman hocam Doç. Dr. Tammam SİPAHI'ye, Temel Eczacılık Bilimleri Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli eş danışman hocam Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN'e, Temel Eczacılık Bilimleri Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ'a, Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'a, Ar. Gör. Mustafa YILDIZ'a ve tüm arkadaşlarıma, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, maddi manevi desteğini tüm yaşamım boyunca benden esirgemeyen çok değerli aileme, Biyolog Kader AKBAŐ'a ve projemizin gerçekteşmesinde desteklerinden dolayı TÜBAP birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>ACINETOBACTER CİNSİ</b> .....	3
<b>MORFOLOJİK MİKROBİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ</b> .	5
<b>EPİDEMİYOLOJİ</b> .....	6
<b>PATOGENEZ VİRÜLANS</b> .....	7
<b>ACINETOBACTER ENFEKSİYONLARI</b> .....	8
<b>ACINETOBACTERLERDE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ</b>	
<b>MEKANİZMASI</b> .....	10
<b>KİNOLONLAR</b> .....	13
<b>KİNOLONLARA KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI</b> .....	16
<b>ANTİMİKROBİYAL DİRENCİN SAPTANMASI</b> .....	18
<b>POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU</b> .....	22
<b>MUTASYON TARAMA YÖNTEMLERİ</b> .....	25
<b>REAL TIME PCR</b> .....	27
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	29
<b>BULGULAR</b> .....	34
<b>TARTIŞMA</b> .....	45
<b>SONUÇLAR</b> .....	48

<b>ÖZET .....</b>	<b>53</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>55</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ.....</b>	<b>62</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>64</b>
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

*A. baumannii* : *Acinetobacter baumannii*

**CLSI** : Clinical Laboratory Standarts Institute

**CFU** : Colony Forming Unit

**Ct** : Döngü Sayısı

**DNA** : Deoksiribonükleik asit

**FİK** : Fraksiyonel İnhibitor Konsantrasyonu

**MDR** : Multi-drug resistant

**kDa** : Kilodalton

**mRNA** : Messenger Ribonucleic acid

**nm** : Nanometre

**MBK** : Mininum Bakterisidal Konsantrasyonu

**MHA** : Mueller-Hinton Agar

**MİK** : Minimum İnhibasyon Konsantrasyon

**PDR** : Pan-drug resistant

**RNA** : Ribonükleik asit

**PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**RT-PCR** : Sayımsal Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu

**tRNA** : Transfer Ribonucleic acid

**Tm** : Erime sıcaklığı

**QRDR** : Quinolone resistance Determining Region

**GSBL** : Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz

## GİRİŞ VE AMAÇ

Antimikrobiyal ajanlara karşı direnç kazanan patojen bakteri suşlarının özellikle hastane ortamında gelişerek topluma yayılabildiği bilinir. Çoğu antibiyotiğe karşı direnç kazanmış *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar, tedavisi zor ölümcül hastalıklara neden olur (1-4). *A. baumannii*, antibiyotiklere direnç gelişimi nedeniyle tedavi edilmesi zor bir fırsatçı patojendir. Bazı suşları florokinolonlar dahil olmak üzere birçok antimikrobiyal ajana dirençlidir. Bu nedenle antibiyotik tedavilerine cevap alınamaz. Son zamanlarda, *A. baumannii*'nin birçok klinik izolatının florokinolonlara dirençli olduğu gösterilmiştir. *A. baumannii*'de kinolon direncinin belirlenmesi, DNA Gyrase ve topoizomeraz IV genlerindeki mutasyonların saptanmasıyla gerçekleştirilir. Kinolonlara karşı direnç DNA Gyrase alt ünitesi olan *gyrA* veya topoizomeraz alt ünitesi olan *parC* genleri ile ilişkilendirilmiştir. Kinolonlar DNA replikasyonu sırasında enzim kompleksine hızla bağlanarak DNA replikasyonunu engeller. *A. baumannii* *gyrA* geni belirleyen bölgelerindeki mutasyonların yüksek kinolon direnci ve siprofloksasin dirençli ara madde ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (5-8). *A. baumannii*'ye normal insan florasında nadiren rastlanır (9). *A. baumannii* hareketsiz, oksidaz negatif, katalaz pozitif, Gram negatif, fermentasyon yapmayan bakterilerdir. *Acinetobacter* içinde yer alan bakteriler normal florada, toprakta doğada veya suda izole edilebilir (10). *Acinetobacter* içinde yer alan bakteriler fırsatçı patojen olup hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olur ve *A. baumannii*'nin çok ilaca dirençli (MDR) suşlarının hastane ortamında yayılması son yıllarda önemli bir problem haline gelmiştir (11,12). *A. baumannii* izolatları kromozomal ve



plazmid kaynaklı farklı mekanizmalar ile antibiyotiklere direnç geliştirebilir. Beta-laktamaz üretimi (13), aminoglikozid modifiye edici enzimlerin üretimi (14), hedef bölge mutasyonları (15) ve dışa atım pompa proteinleri (16) direnç gelişiminde rol oynayan mekanizmalardır. Bu çalışmamızda enfeksiyonlara yol açan *Acinetobacter baumannii* DNA Gyrase direnç genleri olan *gyrA*, *gyrB* ve *parC*'lerdeki mutasyonların neden olduğu ilaç direncini araştırmayı amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### ACINETOBACTER CİNSİ

*Acinetobacter*'lerin adı morfolojik özelliklerini bulan iki bilim adamının isimlerine atfen 'Morax-Axenfeld basilleri' olarak adlandırılmıştır. 'Beijerinck' 1911 yılında *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirmiş topraktan izole etmiş ve daha sonra 'DeBord' üretral örnekten Gram negatif kokobasilleri izole etmesiyle tanımlanmıştır. 'Brisou ve Prevot' aynı morfolojide olan mikroorganizmalar içinde bazılarının hareketsiz olduklarını göstermiştir. Yunanca hareketsiz anlamına gelen 'Akinetos' kelimesinden alıntı yaparak bu bakterilere '*Acinetobacter*' olarak adlandırmıştır. 1968 yılında *Acinetobacter*'lerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini tüm ayrıntılarıyla açıklanmıştır. 1971'de *Acinetobacter*'de yer alan bakteriler *Moraxellaceae* ailesi içinde sınıflandırılmıştır. *Acinetobacter* üyeleri 1986'da DNA-DNA hibridizasyon yöntemiyle 12 türe ayrılmıştır. Takip eden yıllarda bu türlere yenileri eklenmiş ve *Acinetobacter* bakteriler 25 farklı tür olarak sınıflandırılmıştır. *Acinetobacter baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU sakkarolitik özelliktedir (Tablo 1).

**Tablo 1. *Acinetobacter* bakterilerinin genomik tipleri ve tür isimleri (9)**

	Tür adı	Genomik tipi		Tür adı	Genomik tipi
İsmlendirilen türler	<i>A. baumannii</i>	2	İsmlendirilemeyen türler	-	3
	<i>A. baylyi</i>	-		-	6
	<i>A. bauvetii</i>	-		-	10
	<i>A. calcoaceticus</i>	1		-	11
	<i>A. gernerii</i>	-		-	13TU <sup>1</sup>
	<i>A. grimontii</i>	-		-	14BJ <sup>2</sup> ,14TU <sup>1</sup>
	<i>A. haemolyticus</i>	4		-	14BJ <sup>2</sup>
	<i>A. johnsonii</i>	7		-	15 BJ <sup>2</sup>
	<i>A. junii</i>	5		-	15 TU <sup>1</sup>
	<i>A. lwoffii</i>	8/9		-	16
	<i>A. parvus</i>	-		-	17
	<i>A. radioresistens</i>	12		-	1-3 arasındaki tür
	<i>A. schindleri</i>	-		-	13TU <sup>1</sup> benzeri
	<i>A. tandoii</i>	-			
	<i>A. tjernbergia</i>	-			
	<i>A. townneri</i>				
	<i>A. ursingii</i>	-			
<i>A. venetianus</i>	-				

**TU<sup>1</sup>**: Tjenberg ve Ursing tarafından gösterilen genomik tipler

**BJ<sup>2</sup>**: Bouvet ve Jeanjean tarafından gösterilen genomik tipler

DNA dizi analizi, DNA hibridizasyon ve genetik transformasyon çalışmalarında en az 17 genotip belirlenmiş ve 7 tanesi farklı tür olarak tanımlanmıştır (*A. radiorezistens*, *A. haemolyticus*, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*). Tanımlanan yedi tür içinden dört tanesi birbirine çok yakın olduklarından *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi olarak isimlendirilmiştir. İki yeni tür 2001 yılında tanımlanmıştır. Yeni tanımlanan türler ile beraber son yıllarda genotip sayısı 20'den fazladır. Tanımlanan türlerin içinde *A. baumannii* en önemli klinik tablolara yol açan türdür. *A. baumannii* doğada yaygın olarak görülmekte ve insan deri florasında bulunabildiğinden klinik örneklerden sıklıkla izole edilir (9,17-19).

## MORFOLOJİK, MİKROBİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

*Acinetobacter* içinde yer alan bakteriler; 35-37°C'de üreyen, Gram negatif, nonfermentatif, hareketsiz, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve zorunlu aerob bakterilerdir (18). *Acinetobacter* üyeleri içinde *A. baumannii* klinik tablolara en sık yol açan türdür (17). Mikroskoptaki şekilleri diplokok, kokobasil veya Gram negatif basildir. Gram pozitif şeklinde görünüşleri taze kültürlerinde olabilir (9). Üremeleri esnasının logaritmik fazında 1-1.5 x 1.5-2.5 µm boylarında basil, duraklama fazında kokobasil ve subkültürlerinde veya penisilinli ortamda basil şeklindedir (18,19). Gram boyandığında *Haemophilus* ve *Neisseria* ile karıştırılabilir (18). *Acinetobacter* içinde yer alan bakteriler rutin olarak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında triptik soy agar, koyun kanlı agar ve MacConkey agar gibi besiyerlerinde ürerler. Koyun kanlı agardaki koloni şekilleri zeminden kabarık 0,5-2 mm çapında, şeffaf veya opak (9). MacConkey agar besiyerinde S tipi koloniler oluşturur ve pigmentsizdir. Opak şeklinde ve *Enterobacter*'lerden daha küçüktür (18). Çoğu zaman düzgün şekillidir. Rengi ise yeşil, soluk sarı veya beyazdır. Bazen mukoid oluşturabilir. Kahverengi pigment oluşturanlar genellikle çevresel kaynaklıdır (19). Seçici-ayırıcı besiyerleri klinikte kullanabilmek için geliştirilmiştir ve en çok Herellea agar ve Leeds *Acinetobacter* Medium kullanılır. Amonyum tuzu, asetat veya nitrat tuzları içeren, pH'ı 5.5-6.0 olan çoğaltıcı sıvı mineral besiyeri kontamine örneklerden (dışkı, toprak vb.) izole etmek amaçlı kullanılabilir (18,19). Mikrobiyoloji laboratuvarlarında *A. baumannii* tanımlanması geleneksel yöntemler ile olur. Ayrıca tanımlanması karbon kaynaklarının asimilasyonu temeline dayanan yarı otomatize ve otomatize sistemlerle de olabilir (9). DNaz ve indol negatiftir. Flajellaları yoktur yani hareketsiz bir bakteridir. Oksidatif fermentatif besiyerinde ve üç şekerli demirli besiyeri içinde asit oluşturmaz, nitratları redükte etmezler.

*Acinetobacter* tür ayrımı rutin laboratuvarlarda üreme özelliklerine ve biyokimyasal reaksiyonlara göre yapılır. Glukoza oksidatif etki, 44°C'de üreyebilme ve hemoliz özellikleri bu ayırmada yeterlidir. *A. baumannii* hemoliz yapamayan, glukozu oksitleyen izolatlar olarak tanımlanır. 44°C'de üreyebilme yeteneğiyle *A. baumannii* diğerlerinden ayırt edilir (18). *A. baumannii* Trakya Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi (TÜEAUH)'nde otomatize mikrobiyal identifikasyon sistemiyle tanımlanır.

**Tablo 2. *Acinetobacter* türlerinin tanımlanması için basitleştirilmiş şema (19)**

TEST	1- <i>A. calcoaceticus</i>	2- <i>A. baumannii</i>	3- <i>Acinetobacter</i> spp.	4- <i>A. haemolyticus</i>	5- <i>A. junii</i>	6- <i>Acinetobacter</i> spp.	7- <i>A. johnsonii</i>	8- <i>A. wolffii</i>	9- <i>Acinetobacter</i> spp.	10- <i>Acinetobacter</i> spp.	11- <i>A. radioresistens</i>
Üreyebildiği ısı											
44°C'de	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41°C'de	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
37°C'de	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Glukozdan asit	+	+	+	D	-	D	-	D	+	-	D
Jelatin Hidrolizi	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Karbonhidrat											
d1-Laktat	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
d1-4- aminobutirat	+	+	+	+	D	-	D	D	+	+	+
Trans- akonitat	+	+	+	D	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	+	+	+	+	D	+	+	-	+	+	-
Glutarat	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Aspartat	+	+	+	D	D	D	D	-	+	D	-
Azelat	+	+	+	-	-	-	-	+	D	D	+
B-Alanin	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
I-Histidin	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
d-Malat	-	+	+	+	+	D	D	D	+	+	-
Malonat	+	+	D	-	-	-	D	-	-	-	+
Histidin	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+	-
I-Fenilalanin	+	D	D	-	-	-	-	-	-	-	+
Fenilasetat	+	D	D	-	-	-	-	+	D	D	+

3, 6, 9, 10: İsimlendirilmemiş Türler, +: %90-100 pozitif, -: %0-10 pozitif, D: (değişken) %11-89 pozitif.

## EPİDEMİYOLOJİ

*Acinetobacter*, son otuz yıl içinde patojen olup olmadığı sorgulanan bir bakteri olmaktan çıkıp tüm dünyada sık görülen ve kontrol altına alınması zor olan bir hastane enfeksiyonu etkeni haline gelmiştir. *Acinetobacter* enfeksiyonlarının bu kadar hızla yaygınlaşmasının iki önemli nedeni vardır; birincisi *Acinetobacter* türlerinin kuruluk da dahil dış ortam koşullarına dayanıklı olması; ikincisi ise birçok antibiyotiğe dirençli olabilmesidir (20).

*Acinetobacter* türleri kuru, cansız nesnelere yaşayabilir. *Acinetobacter*'lerin kuruluğa karşı dirençli olduğu farklı ısı ve pH derecelerinde canlı kalabilir ve böyle ortamlarda yaklaşık 21-30 gün yaşayabilir (18,21). *Acinetobacter* üyeleri solunum yollarında, ağız florasında, sağlıklı insanların derisinde, alt gastrointestinal sistemde ve genitoüriner sistemde bulunmuştur. *A. baumannii* deri florasında nadir olarak bulunan bir tür olmasına rağmen sağlıklı gönüllülerinin %40'ının derilerinde çeşitli *Acinetobacter* türleri taşıdığı bulunmuştur (19,12). Ayrıca pastörize süt, donmuş yiyecekler, hastane havası, hasta yatakları, kontamine eldivenler, hastanede kullanılan aletler ve sabun gibi birçok ortamdan izole edildikleri de gösterilmiştir.

Son yıllarda, özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlar yaparak dikkatleri üzerine çeken bu bakteri başta ülkemiz olmak üzere tüm dünyanın başına dert olmakta; 'multi-drug resistant' (MDR) ve hatta 'pan-drug resistant' (PDR) *A. baumannii* ile gelişen ağır enfeksiyon insidansı her geçen gün artmaktadır (22).

Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olur ve *Acinetobacter* üyelerinden bir tanesi hastane ortamında bir kez izole edilirse, yoğun bakım ünitesindeki hastalar için büyük risk oluşturur. Hastaneye yatırılmış bireylerde salgın dönemlerinde %7-18 oranında boğaz taşıyıcılığı görülmekte iken trakeostomi sürüntülerinde bu oran %45'dir (12,19,23).

*Acinetobacter* bakterileri Türkiye'de yoğun bakım ünitelerinde yapılan çok merkezli bir çalışmada Gram negatif çomaklar arasında üçüncü sıradadır ve antibiyotik direnci oldukça yüksek çıkmıştır (18).

Direnç, tıp ve veteriner hekimliği alanında yaygın bir şekilde antimikrobiyal ilaç kullanılması sonucu gelişebildiği gibi, antimikrobiyal ilaç kirliliğine bağlı olarak çevrede de gelişebilir ve yaygınlaşabilir (24).

## **PATOGENEZ VİRÜLANS**

*A. baumannii* nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan önemli bir türdür. Normal olan bireylerde konak savunma mekanizmaları enfeksiyon oluşturmazlar. Genelde hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olur. Enfeksiyon gelişimini kolaylaştıran faktörler konağın savunma sistemini baskılayan durumlar, konağın yaşı, malignite ve yanıktır. Uzun süreli antibiyotik kullanımı, trakeostomi varlığı, endotrakeal tüp, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, ağır cerrahi girişim, damar içi kateterizasyon, enteral beslenme, idrar sondası ve uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma en başta gelen risk faktörleridir (18,25).

*Acinetobacter* türlerinin bilinen bir sitotoksini olmamasına rağmen düşük ısıda asidik pH ortamında devitalize dokulara yerleşme özelliği vardır. Bakterinin virülans hale gelebilmesi için insan vücudunda gerekli olan demiri sağlayabilmelidir. Bazı *Acinetobacter*'lerin siderofor ürettikleri gösterilmiştir. Sideroforlar demirle ve aerobaktin ile baskılanabilen dış membran reseptör proteinleridir (21).

- 1- Polisakkarit kapsül: D-mannoz, D-glukoz, L-ramnoz, D-glukronik asitten oluşan polisakkarit yapıdadır. Bu kapsül bakteriyi fagositozdan korur ve yüzeyinin hidrofilik özelliğini sağlar.
- 2- Kapsüler polisakkarit veya fimbria: İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar.
- 3- Lipid A ve lipopolisakkarit: Lipid A hücre duvarında bulunur ve toksik etki göstererek patojenite özelliğini artırır.
- 4- Ürettikleri enzimler dokulardaki lipidleri yıkar.
- 5- Siderofor ve aerobaktin gibi demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir sağlar (9,17,18).

*Acinetobacter* ile ilgili esas tehlikenin bakterinin virülansından değil birçok direnç mekanizmasını aynı anda edinebilmesinden kaynaklanır (20).

## **ACINETOBACTER ENFEKSİYONLARI**

*Acinetobacter* türleri doğada bulunabilir. İnsanın doğal florasında da bulunur ve genellikle fırsatçı patojen olarak tanımlanır (17). *Acinetobacter* türlerinden biri olan *A. baumannii* en fazla klinik tablolara yol açar (18). Ülkemizde yapılan bir çalışmada *A. baumannii*, hastane kökenli pnömoni nedenleri arasında %24 oran ile ilk sıradadır. Ventilatorle ilişkili pnömoni bu olguların önemli bir kısmını oluşturur (19). Pnömoni, menenjit, üriner sistem enfeksiyonları türleri septisemi, endokardit ve yara gibi çeşitli enfeksiyonlardan *Acinetobacter* izole edilir (26).

Hastane enfeksiyonları genellikle başka bir nedenle hastaneye başvuran hastada, hasta hastaneye yattığı zaman inkübasyon döneminde değilse hastanede kalma süresince gelişen enfeksiyonlardır veya bir diğer deyişle enfeksiyon belirtileri hastanede çıkmışsa bu olgu hastane enfeksiyonudur (27).

Hastane enfeksiyonları, kuluçka süresi hastanede yattığı dönemde oluşan, hasta hastaneye yattığında kuluçka döneminde olmayan, klinik bulguları saptanmayan, hastaneye başvurduktan 48–72 saat sonra klinik bulguları oluşan ya da hastanede gelişip hasta taburcu olduktan sonra 10 gün içinde ortaya çıkan enfeksiyonlardır (17,18). Hastane enfeksiyonları

yüzünden hastaneye yatırılan hastaların iyileşmesi beklenirken bu süreç uzamakta, tedavi maliyeti artmakta ve hatta bazı hastalar yaşamını yitirmektedir (28).

Hastane enfeksiyonlarının meydana gelmesinde hastane işleyişine, mikroorganizmalara ve konağa bağlı birçok etken vardır. Başta el yıkama olmak üzere alışılmış hijyen davranışları, tıbbi prosedür hataları, altta yatan hastalıklar, bağışıklık, invaziv tanı sisteminin baskılanması ve tedavi girişimleri bu etkenler arasında yer alır (29).

Trakya Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi (TÜEAUH)'nde hastane enfeksiyonu geliştiği bildirilmiştir. Durumu ağır olan hastalar genellikle yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardır. Antibiyotiklerin en fazla kullanıldığı ve yapılan tıbbi girişimlerin sıklığı en fazla olan yine durumu ağır hastalardır (17,18,30).

### **Solunum Sistemi Enfeksiyonları**

Yoğun bakım ünitelerinde nozokomiyal pulmoner enfeksiyon salgınları çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bunların başında ventilatör kaynaklı pnömoniler ilk sırada yer alır. En önemli risk faktörleri endotrakeal ve gastrik tüp, cerrahi girişim, geniş spekturumlu antibiyotik kullanımı, mekanik ventilasyon, ileri yaş, kronik akciğer hastalığı ve bağışıklık sisteminin baskılanmasıdır. Hastane kaynaklı bulaşmadan eldivenler, beslenme sıvıları, kolonize sağlık çalışanları, ventilatör cihazları ve kontamine parenteral neden olmuştur. Ventilatör kaynaklı *Acinetobacter* hastane enfeksiyonu pnömonisi olan hastalarda ölüm oranı %30-75'dir (18,19,26).

### **Bakteriyemi**

İntravenöz kateterler, batın içi enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonları, yara ve deri enfeksiyonları bakteriyeminin kaynaklarını oluşturur (17,18). Yetişkinlerde bakteriyemi ile sonuçlanan cerrahi yara ve yanık enfeksiyonları sıklıkla görülür. En önemli ikinci grup hastaları yenidoğanlar oluşturur. Predispozan faktörler; doğum ağırlığı düşük olan bebekler, daha önce antibiyotik tedaviler ve neonatal konvülsiyonlar olarak sayılabilir (26).

### **Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları**

Beyin cerrahisi girişimi, ventrikülografi, travma, lomber ponksiyon ve myelografi *Acinetobacter* bakterilerinin yaptığı enfeksiyonlara neden olur. Başlıca risk faktörlerini beş günden fazla tutulan ventriküler kateterler, serebrospinal sıvı kaçağı, ventrikülostomi, beyin-



omurilik sıvısı fistülleri, beyin cerrahisi yoğun bakım ünitelerinde aşırı antibiyotik kullanımı ve ventrikülostomi oluştur (18,19,26).

### **Üriner Sistem Enfeksiyonları**

*Acinetobacter* türleriyle oluşan üriner sistem enfeksiyonları oldukça nadirdir. Yoğun bakım ünitesinde kalan genellikle yaşlı, böbrek taşı olan ve uzun süredir sondalı erkek hastalarda görülür. Prostatik genişleme nedeniyle kateter kullanımına bağlı olarak hastaların %80'i erkektir. Başlıca risk faktörleri; yanık, travmatik yaralar, cerrahi insizyon bölgeleri, bağışıklık sisteminin baskılanması ve venöz kateter uygulamalarıdır (17-19,26).

### **Diğer Enfeksiyonlar**

İnfektif endokardite azda olsa sebebiyet verebilir. İnfektif endokardite açık kalp ameliyatları veya dental girişimler neden olabilir. Peritonitler ambulatuvar peritoneal diyaliz uygulanan hastalarda meydana gelebilir. Osteomyelit ve ekstremitte enfeksiyonları genellikle kazalardan sonra olur. Travma, keratoplasti ve kontakt lens uygulamalarında *Acinetobacter* ile oluşan oftalmik enfeksiyonlar söz konusudur. Yoğun bakım ünitesinde 5 yılda görülen nozokomiyal enfeksiyonlarının en sık etkeni *Acinetobacter* türleridir. Diğer nadir olgular; Protez kalp kapağı endokarditi, otolog kemik iliği transplantasyonundan sonra gelişen tiflit, periton diyalizi ile ilişkili peritonit, perkütan safra drenajıyla ilişkili kolanjit, perkütan transhepatik kolanjiografi, osteomyelit, septik artrit endoftalmittir (17-19,26).

*A. baumannii* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı gün geçtikçe artan direnç tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de ciddi sağlık sorunu olmaya başlamıştır ve birçok antibiyotikle hastalıklar tedavi edilebilirken çoğul antibiyotik direncinin artmasıyla tedavi olanağı azalır (31,32). *Acinetobacter* türlerinin %10'unun in vitro duyarlılığı %99, %50'si karbapenemlere duyarlı ve kolistin dışındaki aminoglikozid, karbapenem, sefalosporin, kinolon grubu gibi diğer antibiyotiklere karşı çok yüksek dirençlidir (31,33).

### **ACINETOBACTERLERDE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI**

1970'lerden itibaren gelişen Gram negatif mikroorganizmaların meydana getirdiği direnç sorunu günümüzde oldukça önemli hale gelmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde yatan ve immün sistemi bozulmuş hasta sayısının artması, antibiyotiklerin düzensiz kullanımının artması ve gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı gibi çeşitli nedenlerle

mikroorganizmalarda meydana gelen antibiyotiklere direnç gün geçtikçe artar. Direnç sorunu en çok hastanelerde meydana gelir çünkü antibiyotik kullanımı en fazla olduğu yerdir. Türkiye’de nozokomiyal olarak en sık direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalar; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, Koagülaz Negatif *Stafilokoklar*, *Enterobacter spp*, *Enterokoklar*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.*’dir (19,21).

Pek çok klinik izolat in vitro çalışmalarda gentamisin, ampisilin, nalidiksik asit ve kloramfenikol gibi fazla kullanılan antimikrobial ajanlara duyarlı bulunmuştur. *A. baumannii*’ye ait klinik izolatların direnci zaman içinde artmıştır. *A. baumannii* doğal direnç gösterdiği antibiyotikler; amoksisilin, ampisilin, ve birinci kuşak sefalosporinlerdir. *A. baumannii* yoğun bakım ünitelerindeki mortalitenin %19-25’ini oluşturur ve diğer türlerden daha dirençlidir (17,34).

### **Antibiyotik Direnci**

Bir bakterinin antimikrobiyal ajanın üremeyi engelleyici veya öldürücü etkisinden korunabilme kapasitesidir. Bakterilerin antibiyotiklere direnci çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir.

**A. Doğal Direnç:** Bazı antibiyotikler bakterinin genetik özelliği sebebiyle bakteriyi etkilemez bu özellik bakterinin doğal direnci olarak tanımlanır.

**B. Kazanılmış Direnç:** Bakteride ki genetik özelliklerin değişimi transpozon veya plazmid DNA’sında meydana gelen mutasyonlarla olur. Dirençli bakteri tarafından konjugasyon, transformasyon ya da transdüksiyon aktarılmasıyla meydana gelen dirençtir.

**C. Çevre ve Koşullara Bağlı Direnç:** Antibiyotikler in vivo ve in vitro koşullarda farklı etkinlik gösterir. Bu da bakteride dirence sebep olur. Oksijen basıncı değişiklikleri, dokudaki pH değişiklikleri ve antibiyotiğin enfeksiyon bölgesine ulaşamaması gibi nedenlerle in vitro testlere yanıt veren antibiyotik in vivo ortamda yanıt vermeyebilir (19).

Bakterilerin antimikrobiyal ilaçlara karşı gösterdiği biyokimyasal direnç mekanizmaları üç grup altında toplanabilir:

1. İlaç hedefindeki değişiklik
2. İlacın enzimatik inaktivasyonu
3. Hücre içindeki ilaç dozunun azaltılması
  - a) Permeabilitenin azaltılması
  - b) Aktif pompa ile ilacın dışarı atılması (35).

**1. İlaç hedefindeki değişiklik:** Birçok bakteri DNA Gyrase ve topoizomeraz IV esansiyel enzimlerinin ikisine de sahip olmakla birlikte, az sayıda bakteride sadece DNA Gyrase enzimi bulunur. Gram negatif bakterilerde Gyrase enzimi, topoizomeraz IV'den daha fazla kinolon inhibisyonuna duyarlıdır. Kinolon direncinden sorumlu mutasyonların birçoğu Gyrase enzimini kodlayan genlerde görülür. Günümüzde en çok bilinen kromozomal mutasyonlar gyrA alt ünitesinde meydana gelen mutasyonlardır. Dirençli bakterilerin gyrA'daki aminoasit değişikliklerinin genellikle enzimin amino ucundaki aktif bölgesinde bulunan tirozin molekülünün (Tyr-122) etrafında yer alır. gyrA'da Ala67-Gln106, gyrB'de ise Asp426-Lys447 aminoasitleri 'kinolon direnci belirleyici bölge' (QRDR) olarak bilinir (36).

Bazı bakterilerde hedef değişimlerinden farklı olarak ilaca duyarlı hedefe gereksinimi ortadan kaldıracak yeni bir metabolik yol geliştirebilir. Örneğin, Trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonu, bakterinin yaşamsal önemi olan kromozomun replikasyonunda rol oynayan enzimleri inhibe eder. Bakteriler folat sentez etme yerine ortamdan hazır folat alarak alternatif bir metabolik yol kullanır (35).

**2. İlacın enzimatik inaktivasyonu:** İlacın enzimatik inaktivasyonu antibiyotiği parçalayan ya da modifiye edici enzimler oluşturarak meydana gelir. Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler antibiyotikleri parçalayan enzimler sentezler. Örneğin beta laktam antibiyotiklerini parçalayan beta laktamaz enzimi, amin glikozitleri inaktive eden fosforilaz, asetilaz ve adenilaz enzimleri, kloramfenikolu inaktive eden asetil transferaz enzimi ve eritromisini inaktive eden esteraz enzimi direnç gelişiminde oldukça önemli enzimlerdir (35,37).

### **3. Hücre içinde ki ilaç dozunun azaltılması:**

a) Permeabilitenin azaltılması: Antibiyotiklerin etkili olabilmesi için bakteri hücrelerine penetre olması gerekir. Gram negatif bakterilerde antibiyotiklerin hücre içine girmesi, dış membrandaki porinler aracılığı ile olur. Mutasyonlar ile dış membran porinlerindeki değişim

sonucu geçirgenlik azalır ve dirençli suşlar ortaya çıkar. Kinolonlar, sitoplazmadaki hedeflerine ulaşabilmek için, Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı ve sitoplazmik membranı, Gram negatif bakterilerde ise ek olarak dış membran engelini aşmak zorundadır.

**b) Aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması:** Gram negatif ve Gram pozitif, bakteriler özgül olmayan, enerjiye bağımlı aktif pompa (efluks) sistemlerine sahiptir. Aktif pompa sistemlerinden bazıları yapısal olarak ifade edilirken, bazıları mutasyonla indüklenebilir. Aktif pompalama sistemleri düzenleyici genler tarafından kontrol altında bulunur. Düzenleyici genlerdeki mutasyonlar aktif dışa atım pompa sistemlerinin fazla çalışmasına ve antimikrobiyal ajanların dışarı atılmasına sebep olur (35,36).

*Acinetobacter*'lerde bulunan antibiyotik direnç mekanizmalarının bazıları Tablo 3'de gösterilmiştir (17).

**Tablo 3. *Acinetobacter*'lerde bulunan antibiyotik direnç mekanizmaları (17)**

<b>ANTİBİYOTİKLER</b>	<b>MEKANİZMA</b>
Beta laktamlar	Beta laktamaz (plazmid ve/veya kromozom kökenli) Penetrasyonun azalması Hedef molekülde değişiklik
Aminglikozidler	Enzim ile modifikasyon İçeri alınmanın azalması
Florokinolonlar	Hedef molekülde değişiklik Penetrasyonun azalması, aktif dışarı atım

### **KİNOLONLAR**

İlk kinolon grubu nalidiksik asittir ve antimalaryal ajan olan klorokininin saflaştırılması ile elde edilmiştir. Enoksasin, siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin, levofloksasin kinolonlar arasında en fazla kullanılanlardır. Bu kinolon antibiyotiklerini lomefloksasin, pefloksasin ve moksifloksasin izler. Çok sayıda yeni kinolon türevi elde edilmesine rağmen az bir kısmı insan enfeksiyonlarında kullanılır. Kinolon grubu antibiyotikler tamamen sentetiktir ve temel yapısı, 1. pozisyondaki nitrojen, 3. pozisyondaki karboksil grubu ve 4. pozisyondaki karbona çift bağla bağlanmış oksijenin bulunduğu ikili halkadan oluşur. Bazılarında 6. pozisyonda bazılarında 8. pozisyonda flor vardır. 7. karbona piperazinil halkası bağlıdır (35,36,38).

İkili halka yapısının 6. karbonuna bazı türevlerde flor ilavesi yapılarak antibakteriyel etkinlikte artış sağlanmıştır. Bu türevlerde 7. karbona eklenen piperazinil, metil piperazinil ya da dimetil piperazinil halkası Gram negatif bakterilere karşı etkinliği artırmıştır. Yeni kinolonların çoğunda bulunan piperazinil halkasına bağlı olan metil grubu oral biyoyararlanımın artmasını sağlamıştır. Gemifloksasin, klinofloksasin, moksifloksasin ve travofloksasin gibi yeni kinolonlarda, 7. pozisyona pirolidinil ya da ikili halka eklenmesi ile Gram pozitif bakterilere karşı etkinlik arttırılmıştır. 8. pozisyonlarına halid ya da metoksi gurubunun bağlanması ile anaerob bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik sağlanır. Birinci azota değişik türevlerde değişik gruplar bağlanarak Gram negatif bakterilere etkinlik güçlendirilmiştir (39).

Genellikle kendi aralarında ufak farklılıklar olmasına rağmen kinolon grubundaki ajanların tümü *Enterobacteriaceae* ailesine çok iyi etkinlik gösterir. *P.aeruginosa*'ya karşı en iyi etkili olan kinolon siprofloksasindir (40). Kinolonlar arasındaki antibakteriyel etkinlik, farmakokinetik ve bazı yan etkiler yönünden farklılıklar kimyasal yapılarındaki farklılıklardan kaynaklanır. Kinolon grubu antibiyotikler farmakodinamik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır (Tablo 4.). Bu grup antibiyotiklerin kuşakları arttıkça yeni bakteri gruplarına etkileri ve vücutta dağılabildiği bölgeler de artmıştır. Etki özelliklerine göre dört farklı kuşağa ayrılır. Birinci kuşakta, nalidiksik asit, oksolinik asit ve sinoksasin; ikinci kuşakta florokinolon olarak nitelendirilen, siprofloksasin, enrofloksasin, marbofloksasin, danofloksasin, difloksasin, norfloksasin ve enoksasin; üçüncü kuşakta orbifloksasin, levofloksasin, sparfloksasin ve grepafloksasin; dördüncü kuşakta ise travofloksasin, gatifloksasin, moksifloksasin, gemifloksasin ve sitafloksasin yer alır (24,35,40).

**Tablo 4. Kinolon grubu antibiyotiklerin farmakodinamik özelliklerine göre sınıflandırılması (40)**

1. kuşak	2. kuşak		3. kuşak	4. kuşak
NA	NOR	OFX	LEV	TVA
	PEF	CIP		MXF

**CIP:** Siprofloksasin, **PEF:** Peflofloksasin, **MXF:** Moksifloksasin, **LEV:** Levofloksasin, **OFX:** Oflofloksasin, **NOR:** Norfloksasin, **TVA:** Travofloksasin **NA:** Nalidiksik asit

Florokinolonlar aerobik Gram negatif basillere (*Enterobacteriaceae*, *Haemophilus*, *P.aeruginosa*), Gram negatif koklara (*Neisseria* spp., *Moraxella* spp.) ve stafilokoklara

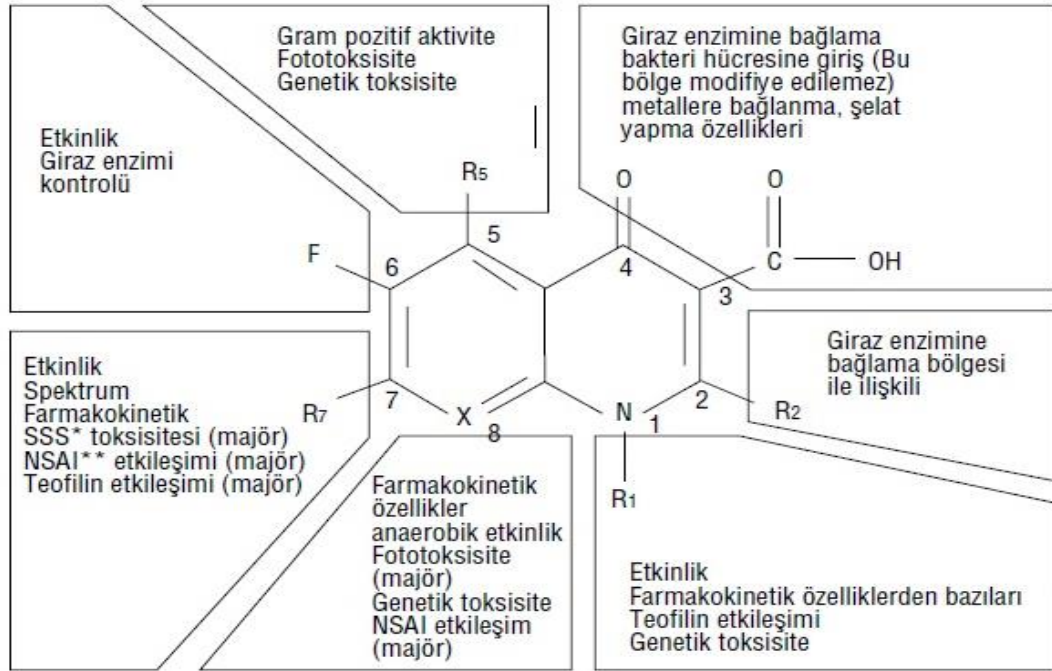
etkilidir. Anaerobik bakterilere ve streptokoklara karşı etkinlikleri sınırlıdır. Fakat yeni kuşak kinolonlar bu konuda oldukça geniş bir spektruma ulaşmıştır (41).

Günümüzde florokinolonlar genitoüriner, kemik-eklem, yumuşak doku, gastrointestinal sistem ve solunum yolu sistemlerini ilgilendiren çoğu enfeksiyonun tedavisinde kullanılır. Ayrıca florokinolonlar veterinerlikte de sıklıkla kullanılır (38).

### **Etki Mekanizması**

Bakterilerde çoğalma kromozomal DNA replikasyonuna dayanır. Bakteri kromozomu hücre uzunluğundan daha fazla olduğu için iki kıvrılma olayı gerçekleştirir; birincisi kendi etrafında oluşturduğu kıvrımlar ikincisi ise RNA çekirdeği etrafında ters yönde yaptığı kıvrımlardır. Bu iki kıvrılma olayına süpersarmal oluşumu adı verilir. Bu süpersarmal oluşumunu gerçekleştiren enzim DNA Gyrase enzimidir. Replikasyon sırasında da bu kıvrımları açan enzim DNA Gyrase enzimidir ve ATP yardımıyla işlemi tamamlar. DNA Gyrase aynı zamanda, DNA replikasyon çatalı boyunca yığılan süper helikslerin ilerlemesinden de sorumludur. İşte kinolonlar bakteri hücrelerine girdiklerinde DNA Gyrase enzimine bağlanır ve enzim fonksiyonlarını inhibe eder. Böylelikle DNA'nın negatif yöndeki 'supercoiling'i engellenerek bölünemeyerek ölürler (36,39).

Kinolonların etki mekanizması çoğunlukla birbirine benzer. Yukarıda belirtildiği üzere kinolonlar DNA replikasyonunda rol oynayan iki topoizomeraz (DNA Gyrase ve topoizomeraz IV) ile reaksiyona girip enzimi inhibe ederek DNA sentezini durdurur. DNA Gyrase, tetramerik bir enzimdir ve iki gyrA ve iki gyrB alt birimlerinden oluşan gyrA ve gyrB genleriyle kodlanır. A alt birimi 97.000 dalton, B alt birimi 90.000 dalton ağırlığındadır. DNA Gyrase molekülünün toplam ağırlığı 374.000 daltondur. DNA Gyrase DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve onarımında görev alır. Topoizomeraz IV, parC ve ParE alt birimlerinden oluşur ve replikasyon sırasında oluşan yeni DNA iplikçiklerinin birbirinden uzaklaşarak yavru hücrelere geçmelerini sağlar. gyrA ve parC DNA'yı keserken gyrB ve parE bu reaksiyon için gereken enerjiyi karşılar. parC 75 kDa (kilodalton), ParE 70 kDa'dır. Her iki enzim de büyük homoloji gösterir. Florokinolonlar Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde farklı enzimleri hedefler. Gram pozitif bakterilerde topoizomeraz IV, Gram negatif bakterilerde ise birincil hedef DNA Gyrase'dir (17,35,38,39,41).



**Şekil 1. Kinolon halkası (41)**

Topoizomeraz IV, florokinolonların Gram pozitif bakterilerde birincil, Gram negatif bakterilerde ise ikincil hedef bölgesidir. Gatifloksasin, moksifloksasin ve trovafloksasin gibi yeni kuşak florokinolonlar ikili olarak bağlandıklarından hem DNA Gyrase hem de topoizomeraz IV enzimini eş zamanlı olarak inhibe eder. Böylece florokinolonlar, DNA Gyrase ve topoizomeraz IV'ün oluşturduğu kırılmaları durdurarak DNA'nın sentezlenmesini baskılar (24).

İnsan hücrelerinde DNA Gyrase bulunmayıp aynı işlevi bu enzime benzeyen başka bir topoizomeraz II türü yerine getirir. Klinik kullanımda olan kinolonların bu enzimlere etkinliği, bakteri DNA Gyrase'ı üzerindeki göre 54-2460 kez daha düşüktür. Bu durum, kinolonların bakterisidal etkilerini seçici olarak bakteride oluşturmalarını ve insan hücrelerinde belirgin bir toksik etki yapmamalarını açıklar (36).

## **KİNOLONLARA KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI**

Kinolonlar 1988-1990'lı yıllara kadar *Acinetobacter* türlerine karşı oldukça etkiliyken daha sonra klinik izolatlar bu antibiyotiklere hızla direnç geliştirmiştir. Gram negatif bakterilere kinolonlar hücre içine dış membrandaki porinlerden ya da fosfolipitten difüzyon yoluyla girer. Kinolonlara direncin mekanizması; kromozomal mutasyon yolu ile ve iki

temel mekanizma vardır; hedef enzimde değişiklik ve hücre içine ilacın girişinin azaltılmasına neden olan temel mekanizmalardır. Kinolonlara karşı plazmid yoluyla direnç gelişimi pek görülmez.

*Acinetobacter* türlerinde dış membran geçirgenliği *E.coli*'dekinin %1-3'ü kadardır çünkü porin sayısı küçük ve azdır. Mutasyonlarla porinlerin kaybı bu geçirgenliği daha da azaltır fakat tek başına porin kaybı yeterli değildir. Direnç gelişiminde porinlerdeki azalma ile birlikte dışa atım pompaları da gereklidir. Başka bir mekanizma ise ilacın hücre içinde birikiminin engellenmesidir. *P. aeruginosa*'da mex ABopr M operonu aktif dışa atım sistemini kodlar ve florokinolonlar, tetrasiklin, kloramfenikola karşı direnç gelişimine neden olur. Bu direnç *norA* geni mutasyonu ile Gram pozitif koklarda da belirlenmiştir. Bu mekanizma ile direnç gelişmesi halinde ise sadece kinolonlara değil başka antibiyotiklere karşı da direnç gelişmesi söz konusudur. Aynı mekanizmanın *Acinetobacter* türlerinde de etkili olduğu düşünülmektedir.

*A. baumannii* suşları pek çok antimikrobiyal ajanlara dirençlidir, florokinolon dahil çok ilaca direnç genellikle antibiyotik tedavisinin başarısızlığından sorumludur. Genlerdeki ilaç hedefi değişiklikleri DNA Gyrase alt biriminin A (*gyrA*) ve topoizomerez IV alt biriminin C (*parC*) florokinolon karşı yüksek direnç seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (5).

*A. baumannii* türünde en çok meydana gelen kinolon direnci mutasyon tipi *gyrA*'nın 83. kodonunda Ser yerine Leu değişimidir ve siprofloksasinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerinin >4 µg/mL olmasının sebebidir.

*gyrA* ve *parC* genlerinde çiftli mutasyon gerçekleştiğinde siprofloksasine yüksek direnç (MİK >64 µg/mL) meydana gelir. *parC*'de en çok meydana gelen mutasyon 80. kodonunda Ser yerine Leu değişimidir.

Mutasyon lokalizasyonu sıklıkla *gyrA* biriminde Ala 67-Gln 106, *gyrB* biriminde ise Asp 426- Lys 447 bölgesi amino asitleridir. Mutasyonun sık görüldüğü bu amino asitler, DNA Gyrase'ın aktif bölgesine yakın olarak konumlanmış 83 ve 87 numaralı kodonlara karşılık gelir. 83. kodonda meydana gelen nükleotid değişimi laboratuvar ve klinik olarak en yaygın karşılaşılan *gyrA* mutasyonudur. Mutasyon sonucu florokinolonların bağlandığı aktif bölgelerin yapısı değişir ve buna bağlı olarak direnç gelişir (24).

*gyrA* geninin Ser-83 kodundaki tek mutasyonu ile klinik izolatlarda siprofloksasin için MİK değerini 32 µg/mL'ye kadar çıkarırken moksifloksasin için MİK değerinin 1 µg/mL düzeyinde kaldığı, tümü moksifloksasin dirençli (MİK >2 µg/mL) klinik izolatların *parC* geninde 80. kodonunda ikinci bir mutasyon olduğu bilinir (34).



Ser 83 kodonunda meydana gelen bir mutasyon, Asp 87 kodonunda meydana gelen mutasyondan daha etkili bir direnç oluşturur. Bu durum yüksek etkili florokinolon direncinde Ser 83 mutasyonuna daha sık rastlanmasının nedenini açıklar. gyrA biriminin daha nadir rastlanan mutasyonları Ala 67, Gly 81, Ala 84, Tyr 122 Gln 106'dır. Bu mutasyonlar sadece in vitro mutant suşlarda görülebilir. Kinolon direnci belirleyici bölge (QRDR) mutasyonları Ala 196'nın glutaminle ve Ala 51'in valinle yer değiştirmesi şeklindedir. Genel olarak gyrA birimi mutasyonları gyrB birimi mutasyonlarından daha yaygındır.

Topoizomeraz IV, DNA Gyrase kadar kinolonlara karşı duyarlı olmadığından florokinolonların Gram negatif bakterilerde ikincil hedef bölgesidir. parC ve parE birimlerindeki mutasyonlar sıklıkla gyrA birimi mutasyonları ile birlikte meydana gelir. Bu nedenle parC biriminde meydana gelen bir mutasyon tek başına bakterinin florokinolon duyarlılığını değiştirmez. Buna rağmen, parC ve parE birimlerindeki mutasyonlar yüksek etkili direncin oluşması bakımından önemlidir (24,39)

Sonuç olarak yalnızca gyrA'da meydana gelen mutasyon orta düzey kinolon direncine neden olurken; gyrA ve parC'de meydana gelen mutasyon yüksek düzey kinolon direncine neden olur ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üretimi ile kinolon direnci arasında güçlü bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (9,40).

### **Hücreyi İlacın Letal Etkilerinden Koruyan Plazmidler**

Plazmid aracılığıyla aktarılan bu direnç genine *qnr* (*qnrA1*) ismi verilmiştir. *qnr* geni, 219 aminoasitten oluşan tekrarlayan pentapeptid ailesine ait bir Qnr proteinini kodlar. In vitro çalışmalarla, saflaştırılmış Qnr proteinin DNA Gyrase veya topoizomeraz IV'e bağlanarak siprofloksasinin inhibisyonundan korur (36).

### **ANTİMİKROBİYAL DİRENCİN SAPTANMASI**

Laboratuvarda, besiyerlerinde üretilen enfeksiyon etkeninin, in vitro olarak antibiyotiklerle muamele edilmesi ve enfeksiyonun tedavisi için en etkili ilacın seçilmesi amacıyla yapılan teste yani antibiyotiğin antimikrobiyal aktivitesinin saptanmasına antibiyotik duyarlılık testi denir. Duyarlılık testinin amacı, hastanın tedavisinde kullanılacak antimikrobiyalin in vitro şartlardaki etkinliğini tahmin etmektir (35,30).

Maddelerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek için bakteriler ile antibakteriyel aktivite çalışmaları yapılır. Bakterilerin üremelerini durduran veya inaktive eden en düşük dozdaki madde konsantrasyonuna MİK denir. Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK)

ise mikroorganizmayı öldüren en düşük konsantrasyon olarak ifade edilir. Yöntemin belirlenmesinde, denenecek maddelerin sayısı, miktarı, çözünürlüğü, kullanılacak mikroorganizmanın cinsi ve özelliği de rol oynar. Antibakteriyel aktivite yöntemleri antimikrobiyal miktarının saptanmasıyla kantitatif olarak, antimikrobiyal içeren diskler kullanılarak duyarlı, orta duyarlı, dirençli gibi değerlerin verilmesiyle kalitatif olarak ya da moleküler olarak saptanır (35,42).

### **Konvansiyonel Yöntemler**

Bakterinin önce besiyerinde üretilmesi esasına dayanır ve bu bakterininin değişik konsantrasyonlarda etkili madde içeren antimikrobiyal maddelerle uygun koşullarda test edilir (35). Dilüsyon ve difüzyon yöntemleriyle yapılır. Dilüsyon ve difüzyon yöntemleri, uygun standart test organizmalarının kullanılarak ilaçla karşılaştırılması ve mikroorganizmanın duyarlılığının araştırılması esasına dayanır. Klinik Labaratuvar Standartları Endüstrisi (Clinical Laboratory Standarts Institute- CLSI), antimikrobiyal duyarlılık testleri için farklı mikroorganizma gruplarına yönelik uygulama standartları önerir (42).

### **Dilüsyon Yöntemleri**

**Sıvı dilüsyon yöntemi:** Sıvı besiyerinde duyarlılığı saptama yöntemi en hassas yöntemdir. Mueller Hinton buyyonu besiyeri olarak kullanılır. Antibiyotiğin seri sulandırılmaları hazırlanır. Yapılan sulandırılmaların her birine, son yoğunluğu  $5 \times 10^5$  CFU/ml (Colony forming unit) olacak şekilde bakteri ekimi yapılır. 18-24 saat inkübasyonun ardından MİK ve MBK değerleri belirlenir (35).

**Sıvı makrodilüsyon yöntemi:** Özel çözücülerinde içinde teste tabi tutulacak olan antibiyotikler hazırlanır ve daha sonra sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırılmaları yapılır. Mikroorganizmaların standart inokulumu vardır ( $5 \times 10^5$  CFU / ml). Bu standart inokulum hazırlandıktan sonra antimikrobiyal madde değişik dilüsyonlarını içeren her tüpe eşit bir şekilde eklenir. Kontrol tüpüne antimikrobiyal madde eklenir bu da üremenin göstergesidir. Bakteri inoküle edilmemiş, sadece besiyeri konmuş tüp besiyeri kontrolü olarak hazırlanır. Besiyerleri  $35^\circ\text{C}$ 'de bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenir. Bakterinin üremesini önleyen, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilir. Sıvı besiyerinde bulanıklık görülmediği halde bu tüplerden yapılan ekimlerde üreme görülmesi o tüplerde

bakteriyostatik etkinliğin olmasına rağmen, bakterisidal etkinliğin olmadığı anlamına gelir. Antibiyotiğin katı besiyerinde üremeyen son tüpteki konsantrasyonu o antibiyotiğin MBK değerini verir (35,43).

**Sıvı mikrodilüsyon yöntemi:** Makro dilüsyon yönteminin plaklarda hazırlanmış halidir. Mikrodilüsyon plaklarının tüm kuyucukları 100 µl besiyeri içermelidir. Antimikrobiyal maddeden en az 10 ml hacminde hazırlanan stok sölüsyonlarından, mikrodilüsyon plaklarının ilk kuyucuklarına 100 ml eklenir ve daha sonra CLSI'da sıvı dilüsyon ile yapılan duyarlılık testleri için önerilen dilüsyon şeması kullanılarak çift katlı olarak sulandırılır. McFarland eşeliğine göre hazırlanmış olan inokülüm, sıvı besiyerine ekildiğinde son konsantrasyon 10<sup>4</sup> CFU/ml olacak şekilde dilüe edildikten sonra kuyucuğa 10 µL eklenir. 16-24 saat 35-37 °C'de inkübe edilen mikrodilüsyon plaklarında üremeyi inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak bildirilir. MİK kuyucuklarından alınan örnekler katı besiyerlerine ekilerek üremenin olup olmadığı araştırılır. Üremenin olmadığı sıvı örnekteki ilaç konsantrasyonu MBK değerini gösterir (42).

**Agar dilüsyon yöntemi:** Antimikrobiyal madde içeren çözeltilerin uygun dilüsyonları, 45-50°C'ye soğutulmuş Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine eklenir ve iyice karıştırıldıktan sonra besiyerinin kalınlığı 3-4 mm olacak şekilde petri plaklarına dökülür. Agar dilüsyonda 5-8 mm bir alan için damlatılan inokülümde 10<sup>4</sup> CFU/mL bakteri olması istenir. En düşük konsantrasyondan başlanarak farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plaklara inokülasyon yapılır. İnokülasyon damlaları kuruduktan sonra plaklar ters çevrilerek inkübasyonuna kaldırılır. 16-20 saat 35-37°C'de inkübe edilen plaklarda üremeyi inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak kabul edilir.

### **Difüzyon Yöntemleri**

**Disk difüzyon yöntemi:** Disk difüzyon yönteminde esas, katı besiyerine inoküle edilen mikroorganizmaların, besiyerinin yüzeyine konan disklerden yayılan antimikrobiyal madde ile birlikte üremeleridir. Antimikrobiyal maddenin etkinliği, disklerin çevresinde oluşan üremenin engellendiği zonların ölçülmesiyle belirlenir. McFarland 0.5 yoğunluğu kullanılarak hazırlanan bakteri inokülümünden steril eküvyon ile alınarak MHA içeren plaklara sürülür. Eküvyon plağa sürülürken plak çevrilerek her yerine eşit inokülasyon

yapılması sağlanır. Ticari olarak sağlanan ya da 5-6 mm çapında iyi emici özelliği olan kağıtlardan hazırlanan ve belirli miktarda antibiyotik içeren diskler bu besiyeri üzerine birbirlerine ve petrinin duvarına yakın olmayacak şekilde steril penslerle yerleştirilir. 16-20 saat 35-37°C inkübe edilen plaklar çıkarılır ve disklerin etrafında oluşan zon çapları ölçülür. CLSI standartı kullanılarak zon çapları değerlendirilir ve duyarlı, orta duyarlı, dirençli şeklinde sonuç bildirilir.

**Kuyucuk difüzyon yöntemi:** Besiyerinin yüzeyine açılan standart çaptaki kuyucuklara konan etken maddenin değişik sulandırımındaki çözeltilerinin katı besiyerine difüzyonu ve katı besiyeri yüzeyine inoküle edilmiş mikroorganizmaların üremelerine olan etkisinin araştırılmasıdır.

**Oluk yöntemi:** Katı besiyerine açılan uzunca bir oluk içine antimikrobiyal madde çözeltisi konur. Açılan oluğa farklı noktalardan degecek şekilde çeşitli mikroorganizmaların öze ile çizilerek ekilmesi esasına dayanır. Oluktan difüze olan antimikrobiyal maddenin, çizilen mikroorganizmanın üremesine etkisi saptanır. Tek antimikrobiyal madde ve çok sayıda mikroorganizma kullanılır (42).

**E-test:** Bakteri 0.5 McFarland yoğunluğuna ayarlanıp steril bir eküvyonla MHA yüzeyine yayılır. Daha sonra agar yüzeyine, her noktasında farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plastik şeritler yani E-test şeritleri yerleştirilir. Şeritler üzerinde giderek azalan konsantrasyonda antibiyotik emdirilmiş plastik bulunur. Plaklar 35°C'de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakılıp MİK değeri belirlenir. Şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta MİK değeridir (35,43).

**Otomatik ve hızlı direnç saptama yöntemi:** Mikroorganizmaların otomatik aletlerle hızlı identifikasyonları ve antibiyotiklere karşı direncini ölçme temeline dayanır. Mikroorganizmaların uygun konsantrasyonlarda süspansiyonları, belirli miktarlarda antibiyotik bulunduran mikroplaklara ekimi yapılır. Otomatik cihazların yöntemine ve incelenen mikroorganizmanın özelliğine göre sonuçlar 4-24 saat sonra MİK değerleri ile birlikte değerlendirilerek verilir (35).

**Sinerji testleri:** Antibiyotik kombinasyonlarının etkinliklerinin test edilmesine sinerji testleri denilir.

**Dama tahtası testi:** Farklı ilaçların, farklı konsantrasyonları 96 kuyucuklu plak üzerinde karşılaştırılarak kombinasyon etkinlikleri test edilir. İlaçların kombinasyondan elde edilen MİK değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanır ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) bulunur. Ardından kombinasyondaki ilaçların FİK değerleri toplanır ve FİK indeksi (FİKİ) hesaplanır. Sinerji  $FİKİ \leq 0.5$ , aditif etkileşim  $FİKİ = 1$  ve antagonizma  $FİKİ = 2$  baz alınarak tanımlanır.

**Time kill yöntemi:** Antibiyotik yoğunluğuna ve zamana bağlı antibiyotiğin bakterisidal etkisini gösteren bir yöntemdir. Bakteri miktarındaki azalma zamana bağlı olarak her bir bakteri yoğunluğu için ayrı verilir. Zamana bağlı azalma için farklı zamanlarda canlı bakteri sayımı yapılır. Dama tahtasıyla birlikte yapılır (44).

### **Moleküler Yöntemler**

Gelişmekte olan teknolojiyle birlikte mikrobiyoloji alanında meydana gelen en önemli yeniliklerden biri moleküler yöntemlerdir. Moleküler yöntemlerin kendisine özgü avantajlara ve dezavantajlara sahiptir ve tüm dünyada yaygın olarak yararlanılmaya devam edilir. Antimikrobiyal direnç saptanması amacıyla kullanılan moleküler yöntemlerin pek çoğu üç aşamadan meydana gelir;

a) DNA saflaştırılması: Kaynatma ve mekanik parçalama gibi basit teknikler DNA'yı elde etmek için yeterlidir.

b) Hedef DNA'nın amplifikasyonu: Çoğu kez Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılır.

c) Mutasyonların Saptanması: Uygun primerlerle amplifiye edilen hedef DNA'daki mutasyonlar çeşitli yöntemlerle saptanır (35,45).

### **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU**

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1985 yılında Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen yöntem, nükleik asitlerin, uygun in vitro koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) hem bilimsel araştırmalar

hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahiptir. PCR geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle Kary Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü'nü almaya hak kazanmıştır. PCR bir çeşit in vitro klonlamadır (46).

Otomatize termal siklus cihazları '*Thermus aquaticus*' bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanklı polimerazın (Taq polimeraz) kullanımı sayesinde geliştirilmiştir. Floresan ışığa tekniklerinin kullanımıyla birlikte kinetik revers transkriptaz-PCR başlamıştır (47).

Real Time PCR DNA'nın veya mRNA örneklerinin ürünlerinin miktarını bir tüpte tespit edebilen ve çoğaltan son yıllarda popüler olmuş bir yöntemdir. Floresan işaretli prob ile monitörize edebilen ve boyaların kullanıldığı PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla "Sayımsal Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)", "İzlenebilir PCR, "Floresan Sayımsal RT-PCR" gibi değişik adlarla da isimlendirilir (48).

Klinik mikrobiyoloji alanında öne çıkmasının nedeni; hızlı sonuç vermesi, konvansiyonel yöntemlerle saptanması zor veya imkansız mikroorganizmaları saptayabilmesi ve yüksek duyarlılığıdır. Hastalardan alınan örnekler içinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın nükleik asitlerinin varlığının saptanması rutin mikrobiyolojik tanıda PCR yönteminin kullanım amacıdır (49).

### **PCR Basamakları**

PCR reaksiyonu; çift zincirli DNA'nın yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılıp tek sarmal hale gelmesi (denatürasyon), sonra sırasıyla sentetik oligonükleotidlerin yani primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon),  $Mg^{+}$  iyonu varlığında katalizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenerek zincirin uzamasını (polimerizasyon) ve bütün bu siklusların belli sayıda tekrar etmesini kapsar. Otomasyon olarak PCR tekniği; ısıtma ve soğutma işlemlerini her bir siklusta yazılım programları doğrultusunda gerçekleştiren thermocycler adında PCR cihazları yardımıyla sağlar.

Firmalar artık siklus sayısı, inkübasyon süresi ve sıcaklığın ayarlanabildiği thermocycler cihazlarını ticari olarak piyasaya sürmektedir (46,50).

### **DNA'nın Denatürasyonu**

Hücre DNA'sı PCR yönteminde 94°C civarında yüksek bir ısı uygulanarak zincirlerin birbirlerinden ayrılıp tek sarmal hale gelmesi sağlanırken bakterilerde bu işlem helikaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Denatürasyonda yüksek sıcaklık dereceleri G+C yönünden zengin

olan hedef zincirler için daha uygun olsa da, sık kullanılan denatürasyon sıcaklıkları 95°C’de 30 saniye veya 97°C’de 15 saniyedir. DNA üzerinde polimerazın bağlanacağı RNA dizisi bakterilerde primaz enzimi ile gerçekleştirilirken PCR’da sentetik olan yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda DNA primer dizileri kullanılır. PCR yönteminde yüksek sıcaklıklarda çalışabilen Taq polimeraz enzimi replikasyon için kullanılır. Normalde bakteriyel replikasyon, uygun çalışma sıcaklığı 37°C olan DNA polimeraz enzimi tarafından yapılır (46,49).

### **Primerlerin Bağlanması (Hibridizasyon, Annealing):**

Prob veya primerler hedef diziyi tamamlayan ve spesifik bir DNA veya RNA bölgesini tespit etmek için kullanılan nükleotid dizisidir. Bu dizi birkaç baz çifti veya binlerce baz çifti olabilir. Primerler genellikle daha kısadır (15-20 nükleotid). Bu aşamada, primerler ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotidler, denatürasyonda elde edilen tek sarmallı DNA üzerinde kendisine komplementer olan diziyeye hidrojen bağlarıyla bağlanır. Programlanan thermocycler sıcaklığı 37-65°C’ye indirmesinin nedeni ortamda bulunan iki tür primerin her birinin komplementeri olduğu tek iplikçikli hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelere bağlanması içindir. Primerlerden birinin kendine ait olan 5’ ucu, hedef DNA’nın birinin 3’ ucuyla, diğer primer de ikinci tek iplikçik DNA’nın anti paralel olan diğer ucunda bulunan 3’ ucuna DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5’→3’) bağlanır. Yaklaşık 0.5-1 dakikada bu işlemlerin tamamlanması sürer. Sıcaklık ve sürenin uzunluğu Primerlerin bağlanması aşamasında değişir bunun nedeni ise; primerlerin uzunluğuna, nükleotid yapısına ve PCR solüsyonundaki konsantrasyonlarına bağlıdır (46,49,51).

### **Primerlerin Uzatılması**

Bu aşama genellikle 72°C’de gerçekleştirilir. Primerlerin bağlanması tamamlandığında, DNA polimeraz tarafından primerlerin hibritleştiği tek sarmalların karşılığı sentezlenir. Ortalama her baz için (DNA fragmanlarının çoğaltılabilmesi için) bir dakika eklenmesi önerilir. Taq polimeraz enzimi 5’→3’ yönünde aktifleşerek, primerlerin 3’ uçlarından başlar ve ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA dizisinin kopyasını yapar. Son uzama sıcaklığı 95°C’ye yükseltilip reaksiyon sıcaklığı tekrar arttırılır. Böylelikle PCR’ın yaklaşık olarak 10-15 dakika kadar devam eden üç aşamadan oluşan birinci amplifikasyon aşaması, tekrar sıcaklığın 95°C’ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25-30 kez tekrarlanmasıyla sonlandırılır (46,50).

## **MUTASYON TARAMA YÖNTEMLERİ**

### **Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)**

İlk aşamada genomik DNA saf olarak elde edilir. Agaroz kalıpları karbonhidrat, protein ve hücre içeriklerinden arındırılmak için yıkanır. Nadir kesim yapan bir restriksiyon enzimi ile agaroz içerisine gömülü olan kromozomal DNA muamele edilir. Katı matrikse (agaroz ya da poliakrilamid) DNA örneklerinin yerleştirilmesi ve jel içindeki moleküllerin statik elektrik alanında göç ettirilmesi esasına dayanır (45,52).

### **Heterodupleks Analiz**

Normal ve mutant DNA'lar arasında heterodupleksler oluşturulur. Mutasyonun olduğu bölgede DNA yanlış eşlenme nedeni ile bükülür veya balonlaşır. Denatüran içermeyen poliakrilamid jellerde homodupleksler ve heterodupleksler farklı hareket ederler. Tek baz değişikliklerinin, küçük delesyon ve insersiyonların taranmasında sıklıkla kullanılır.

### **Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi Yöntemi (DGGE)**

DNA üre veya formamid gibi denatüre edici bir ajanın artan konsantrasyonlarında ve 60°C'de elektroforeze uygulanır. Erime sıcaklıklarına göre DNA'da bulunan domainler ayrılır. DNA'daki 1 baz değişikliği bile erime sıcaklığını 1°C veya daha fazla değiştirir ve zincirlerin ayrılması için gerekli denatüran konsantrasyonunu değiştirir. Domainlerdeki ipliklerin ayrılması DNA'nın elektroforezdeki hızını azaltır. Heteroduplekslerde bazların yanlış eşlenmeleri elektroforezde homoduplekslerle aralarında 6°C'ye kadar farklılık yaratır. Bu nedenle nokta mutasyonlarını analiz etmek için sıklıkla normal ve mutant DNA'lardan oluşan heterodupleksler kullanılır. DGGE ile en fazla 1000 baz çifti büyüklükteki DNA analiz edilebilir.

### **Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi Yöntemi (SSCP)**

Çift iplikli PCR ürünleri formamid gibi denatüran maddeler ile ısıtılarak denatüre edilir ve poliakrilamid jellerde elektroforetik olarak ayrılır. Gümüş veya floresan boyalarla boyanarak görüntüleme yapılır. Herhangi bir baz değişikliği konformasyonda değişikliğe neden olabilir. Çoğu konformasyonlar, mutant dizi aynı yüke sahip olsa bile fiziksel şekil veya büyüklüğü yeterince değiştirirler ve akrilamid gibi bir matriks ile yapılan elektroforezde



hareket farklılığına neden olur. Elektroforezdeki farklı hareket, tek zincirli DNA parçalarının ikincil yapılarında değişik şekillerin oluşumuna bağlıdır (35,53).

### **Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)**

Prokaryotlarda bulunan restriksiyon endonükleazlar, ökaryotlarda bulunmayan çift zincirli olan ve DNA'daki iç fosfat bağlarını rastlantısal kıran endonükleazlardan (DNaz, fosfodiesteraz) farklı olarak 4, 6 ve 8 nükleotidden oluşan ve çoğunlukla genomda iki yönlü simetri oluşturan polindromik bölgelerdeki baz dizilerini tanıyıp kesen endonükleazlardır. Bu yöntemde standart PCR işlemi ile üzerinde durulan lokus çoğaltılmakta ve çeşitli kesim enzimleri ile elde edilen PCR parçacığı kesilir. Kesim sonucu oluşan kesim parçacık modellerine göre kesim noktasının varlığı veya yokluğuna göre bireyler arasındaki farklılıklar tespit edilir (54,55).

### **Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi Yöntemi**

Akademi ve sanayinin işbirliği ile DNA analizleri için geliştirilmiş HRM; 2002'de ortaya çıkan, Real Time PCR cihazında bulunan yeni bir metottur. Real Time PCR başlangıç miktarına göre oluşan son PCR ürününün kantifikasyonu için kullanılan hassas, özgün ve kolay bir yöntemdir. Reaksiyon karışımında kullanılan floresan özellikteki boyalar ya da propların oluşturdukları sinyaller sayesinde çift zincirli DNA oluşumu eş zamanlı olarak görülür. Yüksek çözünürlüklü erime analizinde önce çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan boya ile hedef DNA bölgesine özgül primerler kullanılarak çoğaltılır. Kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlanarak ışımaya verir tek zincirli DNA ile etkileşim göstermez. Floresan özellikteki boya ile hem amplifikasyon sırasında DNA konsantrasyonundaki artış hem de HRM analiziyle DNA'nın erimesi görüntülenir. Amplifikasyon basamağından sonra gerçekleşen erime analizinde başlangıçta floresan ışımaya yüksektir. Sıcaklığın artmasıyla çift zincirli DNA'ya satüre olmuş floresan boya ortamdaki solüsyona geçeceği için floresan şiddetinde azalma görülecektir. Belirli DNA örneği için gözlenen erime profili karakteristiktir. Yani; mutasyonun yer aldığı bölgede kullanıcının DNA'yı çoğaltmak için HRM analizden önce gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanır. Daha sonra HRM analizi başlar. Amplikon DNA sıcaklığı 55°C den 95°C'ye çıkar. Bu işlem sırasında bir noktada amplikon erime sıcaklığına ulaşır ve DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. HRM'nin sırrı bu süreci eş zamanlı olarak izlemesidir (56-58).

## REAL TIME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT PCR)

### SYBR Green I

SYBR Green I yöntemi spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılmasında kullanılır. Floresan boya yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandığı için çoğalmış olan DNA miktarındaki artış ile birlikte Real Time PCR cihazındaki floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. En fazla kullanılan boya çeşidi 'SYBR Green I'dir ve 497 nm (nanometre) dalga boyunda yükseltgenir, 520 nm dalga boyunda indirgenir. DNA'nın küçük oluşuna bağlanan çift sarmal boya 30 amplifikasyon döngüsünden sonra yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder.

DNA'ya bağlanan boya miktarı DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle artar böylelikle yayılan floresans miktarı da artar. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile sonucunda mı gerçekleştiği, yoksa non spesifik bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için 'melting curve' (erime eğrisi; Tm) analizi yapılır. Tm analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğaltılmasında (primer dimerlerinde) aradığımız DNA parçasının Tm derecesi arasında farklılık olacaktır. Tm derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindedir. Bu yüzden Tm sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir.

Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir (48,59).

### TaqMan® Probe Yöntemi

Çoğaltılmak istenen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engeller. Prob hedef DNA'ya bağlandığı zaman bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primer bağlanma bölgeleri arasında 'Taq Man' problemler bağlanır. Primerler bağlandıktan sonra yeni zincir oluşmaya başlar. Probin bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz

aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder.

### **Moleküler Boncuk Yöntemi**

Bu yöntem yapısı ve çalışma prensibi ile 'TagMan® probe' ve 'SYBR Green I' yönteminden farklıdır. Saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımları 2 adet florokrom boya içerir. Bunlardan baskılayıcı florofor diğer boyanın floresansını engeller. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre dizayn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz hale geçer. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar.

### **Hibridizasyon Prob Yöntemi**

İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunur. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur. Enerji floresans işaretli boyadan alıcı boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artar (59).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### GEREÇLER

Bu çalışmada, *Acinetobacter baumannii* izolatlarında DNA Gyrase direnç genleri olan gyrA, gyrB ve parC mutasyonlarının Real Time PCR yöntemiyle araştırılması amacıyla “Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu” izni alındı. İlgili belge Ek’te sunulmuştur.

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji laboratuvarı’na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilip otomatize sistem ile *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanmış ve stoklanmış *Acinetobacter baumannii* dirençli klinik izolatlar boncuklu bakteri saklama tüplerine alındı ve 37°C’de bir gece üremeleri sağlandıktan sonra -20 °C’de saklandı. DNA izolasyonu için -20°C’de saklanan bakteriler, petrilere konulmuş olan katı besiyerlerine alındı. Bir gün etüvde 37°C’de bekletildi. Üremesi sağlanan bakteriler petri içinden öze ile bir koloni alındı ve DNA izolasyonu yapıldı. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak DNA Gyrase direnç genleri olan gyrA, gyrB ve parC gen bölgeleri çoğaltıldı. RT-PCR sonuçlarına göre istatistiksel olarak mutasyon değerlendirmesi yapıldı.

## **KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER**

### **Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

- dH<sub>2</sub>O
- Tris (Appllichem)
- Binding buffer (Bioeksen)
- İzopropanol (Sigma)
- Wash buffer (Bioeksen)
- Elisyon solüsyonu (Bioeksen)
- Eva green (BioRad)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Gene On)
- Primerler (Macrogen)
- Taq DNA polimeraz Seti (Gene On)
- Besiyeri (Merck)

### **Çalışmada Kullanılan Cihazlar**

- Otoklav (Nüve)
- Otomatik Mikro Pipetler (Axygen)
- Piper ucu (Axygen)
- Santrifüj (Vwr)
- Terazı (Ohaus)
- Vortex (VELP)
- ETÜV (Redline by binder)
- Petri kabı (Fıratpen)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- Manyetik Karıştırıcı (VELP)
- Boncuklu Bakteri Saklama Tüpü (Or- Bak)

## **YÖNTEMLER**

### **DNA İzolasyonu**

DNA izolasyon yöntemi diğer sayfadaki adımlar uygulanarak gerçekleştirildi.

- 50 mg *Acinetobacter baumannii* izolatu, içerisinde 100 µl steril deiyonize su bulunan tüplerin içerisine transfer edildi.
- Pipetajla süspans edilen koloniler 10 dk 95 °C inkübe edildikten sonra 13000 RPM’de 1 dk santrifüj edildi.
- Üst sıvı yeni bir tüpe aktarılmış ve daha sonraki aşamalarda RT-PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.
- Ekstrakte edilen DNA’lar analize kadar -20 °C’de saklandı.

## **Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)**

### **A. baumannii RT-PCR Uygulaması**

#### **RT-PCR’ da kullanılan Primer Dizileri**

gyrA, gyrB ve parC alt ünitesini kodlayan genlerin amplifikasyonu, RT-PCR yöntemiyle özgün primerler kullanılarak çoğaltılmaya başlandı.

#### **RT-PCR’de kullanılan Primer Dizileri:**

##### **gyrA için:**

gyrA Forward: 5’-AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT-3’

gyrA Reverse: 5’-GCCATACCTACGGCGATACC-3’

##### **gyrB için:**

gyrB Forward: 5’-CGTGCGCGCTTTGATAAAAAT-3’

gyrB Reverse: 5’-ACAGTTACACGTGGCCAGTA-3’

##### **parC için:**

parC Forward: 5’-ATGAGCGAGCTAGGCTTAAA -3’

parC Reverse: 5’-TTAAGTTGTCCTTGCCATTCA-3’

#### **PCR Koşulu**

PCR karışımı, aşağıdaki ürünler kullanılarak 780 µl’lik PCR tüpleri içerisinde hazırlandı.

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.2 mM dNTP mix

1x Reaksiyon Tamponu

## 0.1U Proof Reading Rekombinant Taq DNA Polimeraz

1x Eva Green

4 ng/μl kalıp DNA

Her bir primerden 0.5 μM

Toplam hacim: 10 μl

### PCR Döngüsü

Her üç gen bölgesi için (gyrA, gyrB, parC)'de 95°C'de 1 dk denatürleme, 55°C'de 1dk tutunma, 72°C'de 1dk uzamadan oluşan toplam 45 döngülük bir PCR programı uygulandı.

Başlangıç:	95°C, 5 dakika	
95°C, 10 saniye	}	45 döngü
55°C, 10 saniye		
72°C, 20 saniye		
Sonlanma:	72°C, 5 dakika	

Cihazda optimizasyonu sağlanmış, 1 döngü 95°C-5 dk, 45 döngü 95°C-10 sn, 55°C-10 sn ve 72°C-20 sn ısı döngüsü programı uygulandı. RT-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek ve HRM analizi için 65°C-95°C arasında, 0.2 sn rampa hızı ile erime eğrisi analizi yapıldı. Erime eğrisi verileri HRM analizi yapan, Biospeedy HRM Analyzer (Bioeksen, Türkiye) yazılımı ile değerlendirildi. RT-PCR ürünlerinin HRM profilleri mutasyon spesifik olduğu için, farklı HRM profili veren ürünler farklı gruplara ayrıldı, her grubu temsilen 2 farklı RT-PCR ürününün DNA dizi analizi yapıldı. Dizi analizleri Sanger yöntemiyle, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) belirlendi. Dizi analizi çift yönlü gerçekleştirildi. Elde edilen diziler 4peaks yazılımı (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>) ile analiz edildi. Dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlendi. Elde edilen dizilerde gyrA (S83L), parC (S80L, S80W and S84K) ve gyrB (E479D, D644Y and A677V) mutasyonları, Clustal W2 yazılımı ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) kullanılarak yapılan karşılaştırmalar ile tarandı.

## **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Sonuçlar sayı (yüzde) veya ortalama standart sapma olarak ifade edildi. Yapılan çalışma için tanımlayıcı istatistik kullanıldı. Bu tür istatistiklerin genel olarak kullanım alanları verilerin sınıflandırarak özet tabloların oluşturulması ve eğilim ve dağılım ölçülerinin elde edilmesidir (60). Analiz için <http://www.tableau.com/> adresinden yararlanıldı.



## BULGULAR

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilip otomatize sistem ile *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanmış ve stoklanmış 73 dirençli klinik izolat kullanıldı. RT-PCR sonuçlarına göre benzer gen bölgesi olanlar gruplandırıldı.

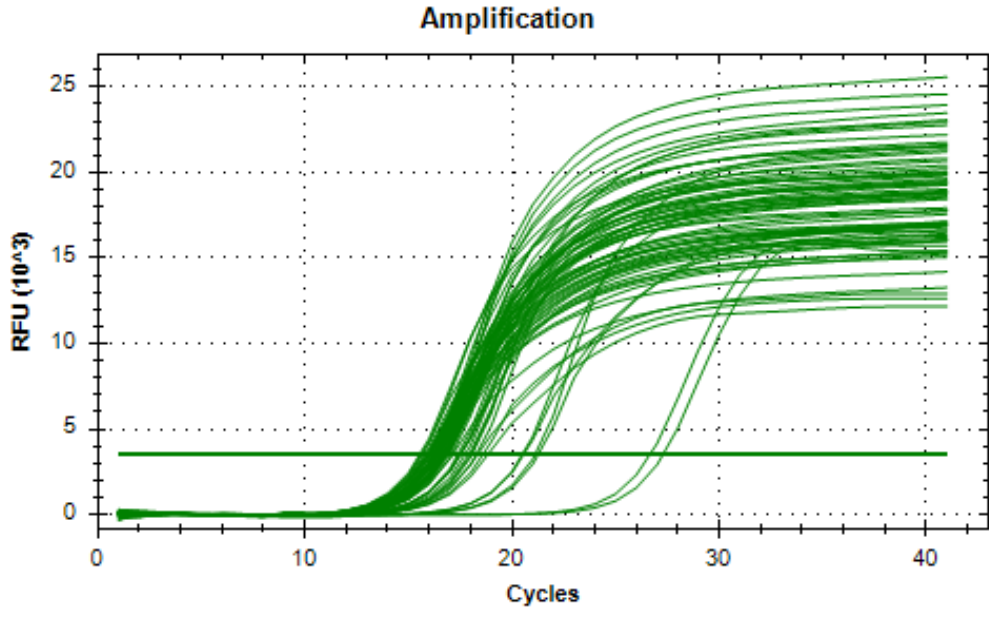
RT-PCR sonucu elde edilen eşik döngü sayısı (Ct) ve erime sıcaklığı (Tm) değerleri Tablo 5.'de verilmiş, çoğalma ve erime eğrileri ise Şekil 2-7'de gösterilmiştir. Negatif kontrol reaksiyonlarında çoğalma gözlenmedi. Deneysel RT-PCR'larda ise Ct değerlerinin 30'un altında olması ve çoğalma sonucunda beklenen sıcaklıklarda tek bir Tm değerinin elde edilmesi, hedef genlerin başarılı bir şekilde çoğaltıldığını gösterir.

**Tablo 5. Ct ve Tm değerleri**

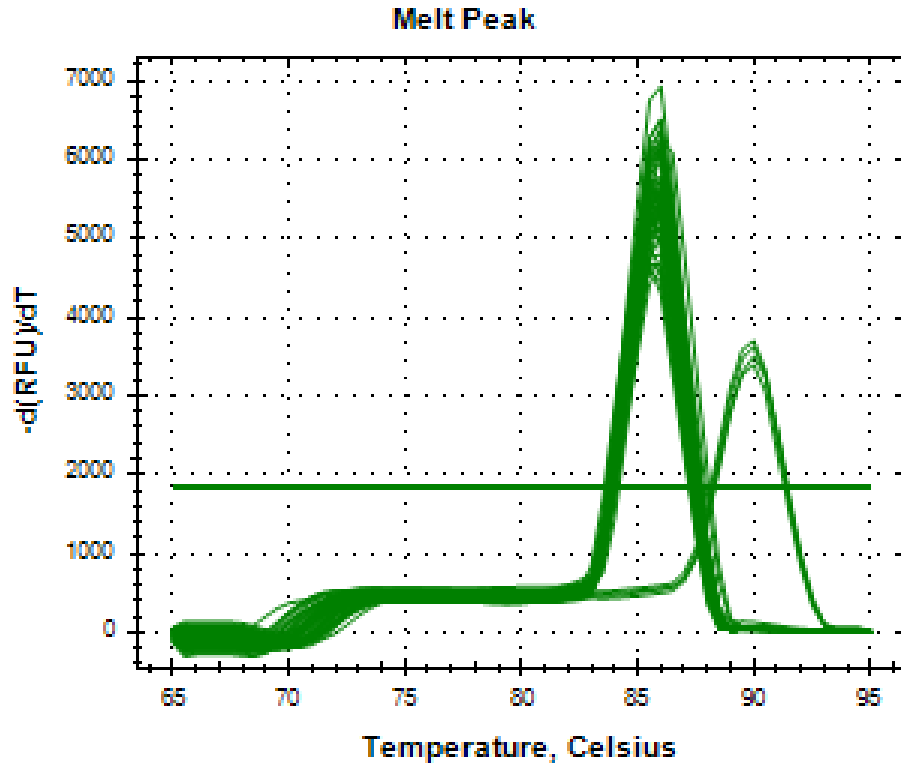
Numune No	Hedef Gen					
	gyrA		gyrB		parC	
	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
1	17,4	85	16,45	84,5	22,36	85
2	17,72	85	19,33	84,5	22,31	85
3	16,72	86	15,26	85	18,24	85
4	17,37	86	15,99	85	18,95	85
5	21,25	90	26,97	84,5	28,74	84
6	18,01	86	16,44	85	19,39	85
7	16,45	86	15,01	84,5	18,25	85
8	16,7	86	16,53	84,5	18,5	85
9	16,08	86	15,35	85	18,35	85
10	18,26	86	16,4	85	20,28	85
11	16,82	85,5	12,69	84,5	19,04	85
12	16,4	85,5	9,46	85	18,31	84,5
13	16,32	85,5	14,16	84,5	18	85
14	20,48	85,5	19,33	84	21,62	85
15	16,3	86	15,3	84,5	18,41	85
17	16,82	86	13,71	85	18,41	85
18	16,97	86	15,69	84,5	18,85	85
19	16,25	86	15	84,5	17,98	85
20	17,47	86	16,47	84,5	19,14	85

**Tablo 5 (devamı). Ct ve Tm değerleri**

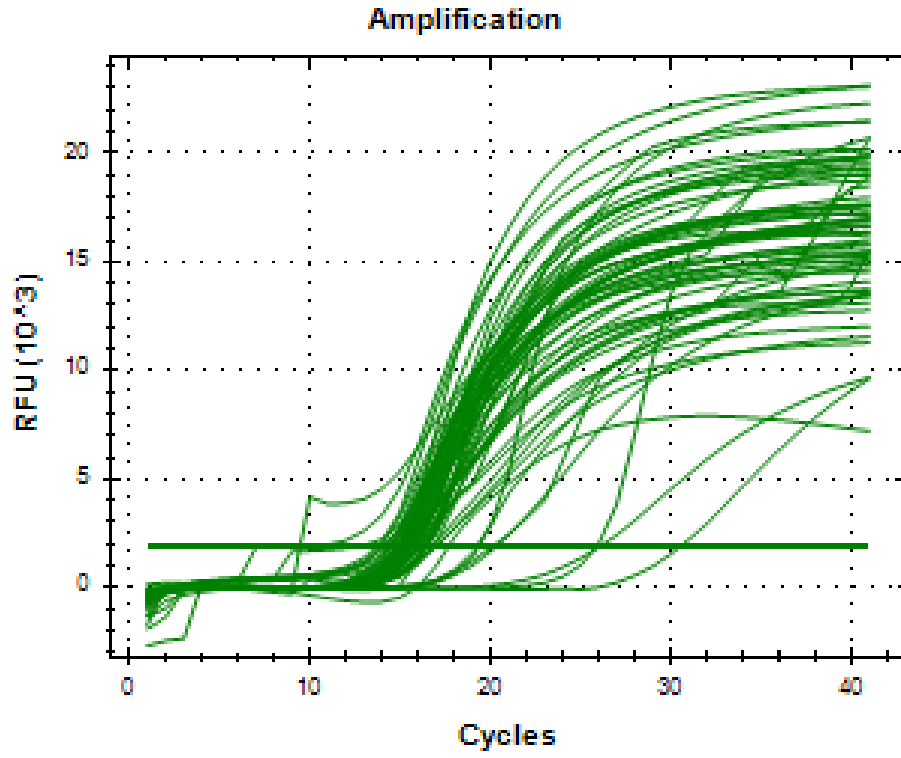
21	17,08	86	14,84	85	18,16	85
22	17,91	86	16,27	84,5	19,18	85
23	21,11	85,5	25,88	83,5	20,21	84,5
24	17,72	85,5	16,84	84,5	19,39	85
25	16,88	86	15,73	84,5	19,13	84,5
26	17,51	85,5	15,68	84,5	19,08	84,5
28	16,64	86	15,4	84,5	18,44	85
29	16,55	86	15,28	84,5	18,62	84,5
30	15,95	86	19,68	84,5	20,46	85
31	16,08	86	15,17	84	18,29	85
32	16,72	86	16,13	84,5	19,18	85
33	17,13	86	17,03	84,5	20,42	85
34	15,61	85,5	15,27	84,5	19,24	84,5
35	16,38	85,5	14,72	84,5	19,38	85
36	16,23	86	14,44	85	19,34	85
37	16,7	86	15,49	84,5	19,67	85
38	16,37	85,5	14,89	85	18,59	84,5
39	16,25	86	16,01	84,5	19,23	85
40	16,67	85,5	15,22	84,5	19,26	85
41	16,03	86	15,54	84,5	19,7	85
42	16,06	86	20,3	84,5	20,47	85
43	16,45	86	15,61	84,5	19,35	85
44	17,5	85,5	16,38	84,5	19,46	85
45	15,82	86	30,55	84,5	20,58	85
46	16,18	86	15,25	84,5	19,27	85
47	15,97	86	20,1	84,5	19,63	85
48	16,46	86	15,65	84,5	18,68	85
49	15,64	86	13,93	85	18,09	84,5
50	16,3	86	10,15	85	18,18	84,5
51	16,22	86	15,11	85	18,21	85
52	16,35	86	15,04	85	18,16	85
53	16,58	86	14,93	84,5	18,39	85
54	16,84	86	15,05	85	18,46	85
55	16,73	86	16,02	84,5	21,46	84,5
56	15,77	86	14,53	85	18,01	85
57	18,82	90	32,53	84,5	34,09	85
58	16,19	86	15,53	85	19,29	84,5
59	15,92	85,5	14,44	85	18,22	84,5
60	18,33	90	33,36	85	34,65	84,5
61	15,93	86	17,03	84,5	20,08	84,5
62	15,97	86	26,1	84,5	19,01	85,5
75	16,62	86	14,05	84,5	19,17	85
76	18,06	86	15,96	85	19,21	85
77	16,58	86	15,03	84,5	18,91	85
78	16,77	86	15,74	84,5	18,89	85
79	15,53	85,5	14,31	85	17,42	85
80	20,55	90	28,3	85	29,69	83,5
81	16,41	85,5	15,13	85	18,66	85
82	16,18	85,5	14,7	85	18,55	84,5
84	16,45	85,5	16,8	85	19,58	84,5
85	15,45	90	19,23	85	21,54	85
86	15,25	85,5	17,71	84,5	19,42	85,5
87	16,13	85,5	15,55	84,5	18,96	85,5
88	15,5	85,5	16,18	84,5	18,98	85,5



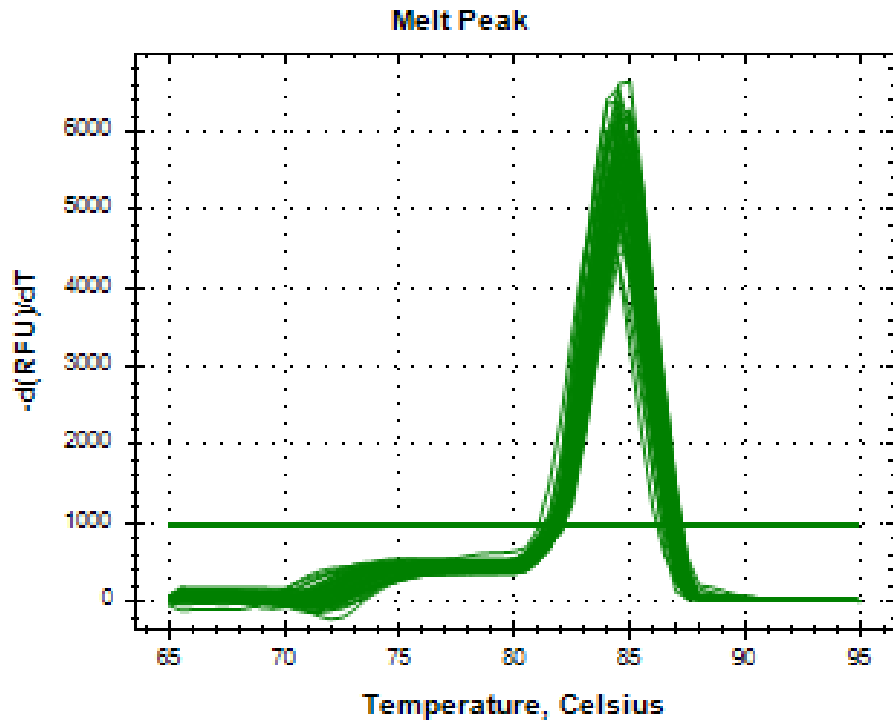
Şekil 2. gyrA hedefli RT-PCR çoğalma eğrisi



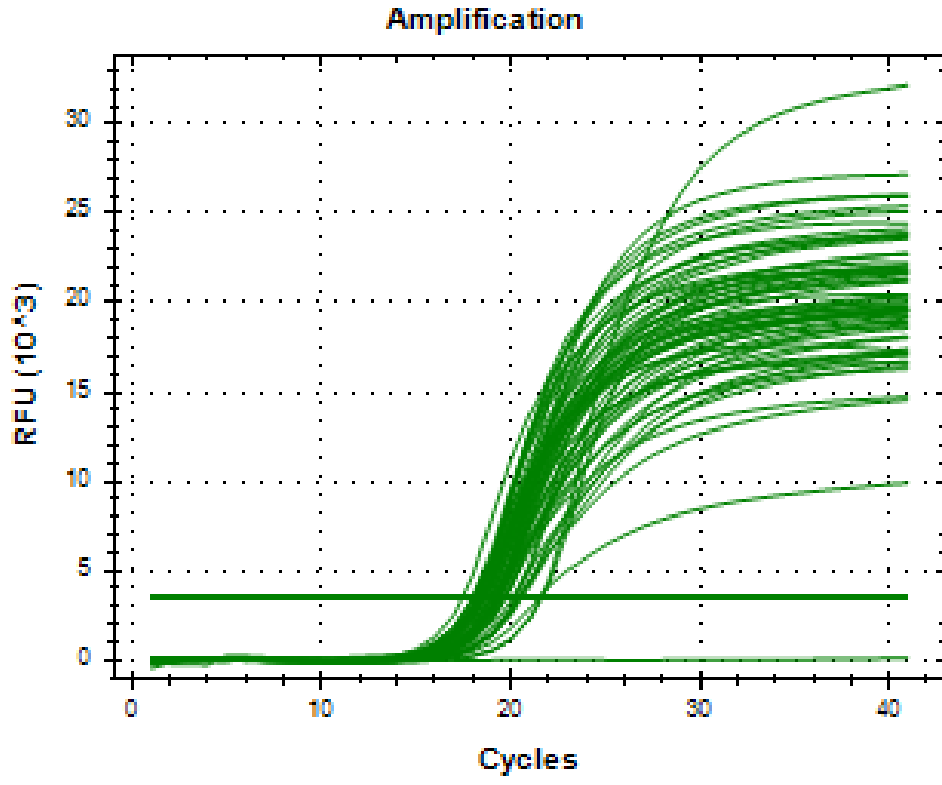
Şekil 3. gyrA hedefli RT-PCR erime eğrisi



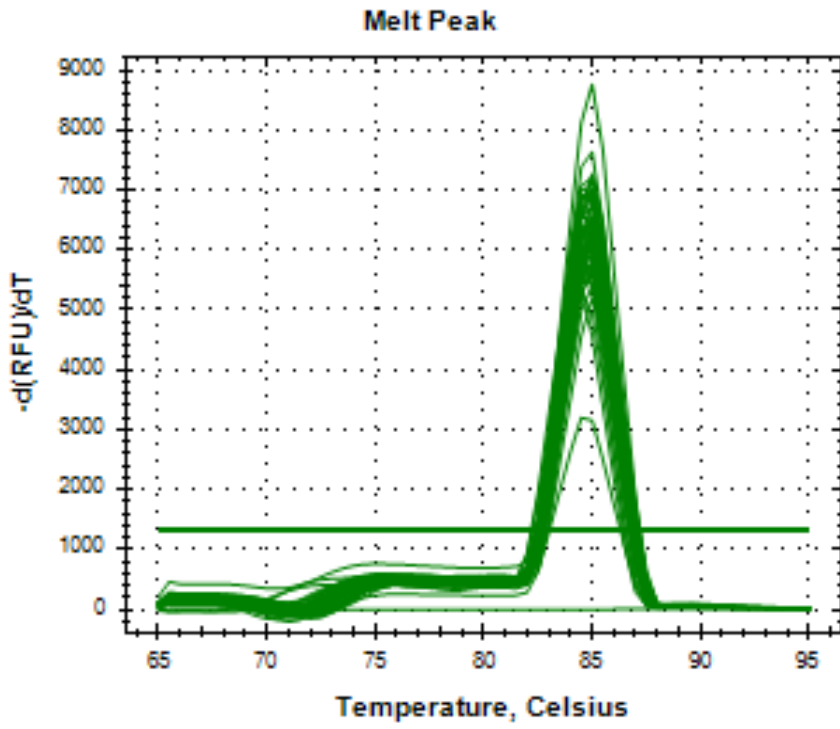
Şekil 4. gyrB hedefli RT-PCR çoğalma eğrisi



Şekil 5. gyrB hedefli RT-PCR erime eğrisi



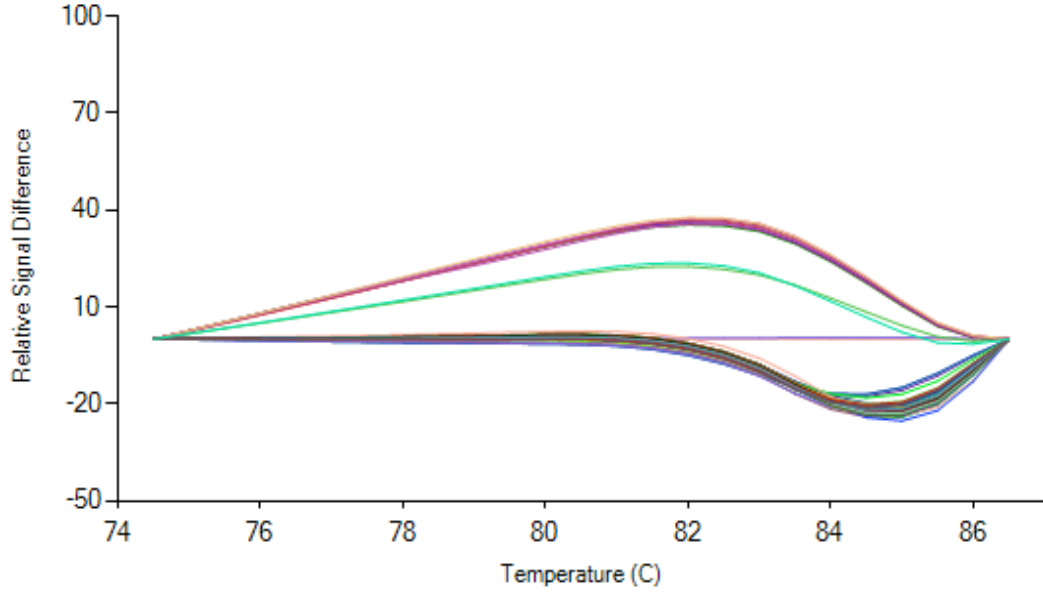
Şekil 6. parC hedefli RT-PCR çoğalma eğrisi



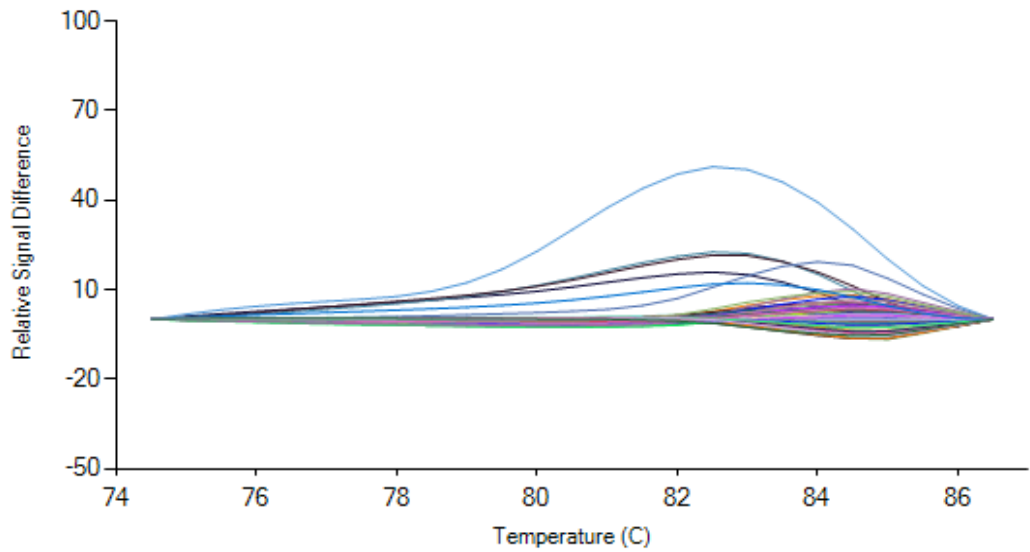
Şekil 7. parC hedefli RT-PCR erime eğrisi

### HRM Analizi

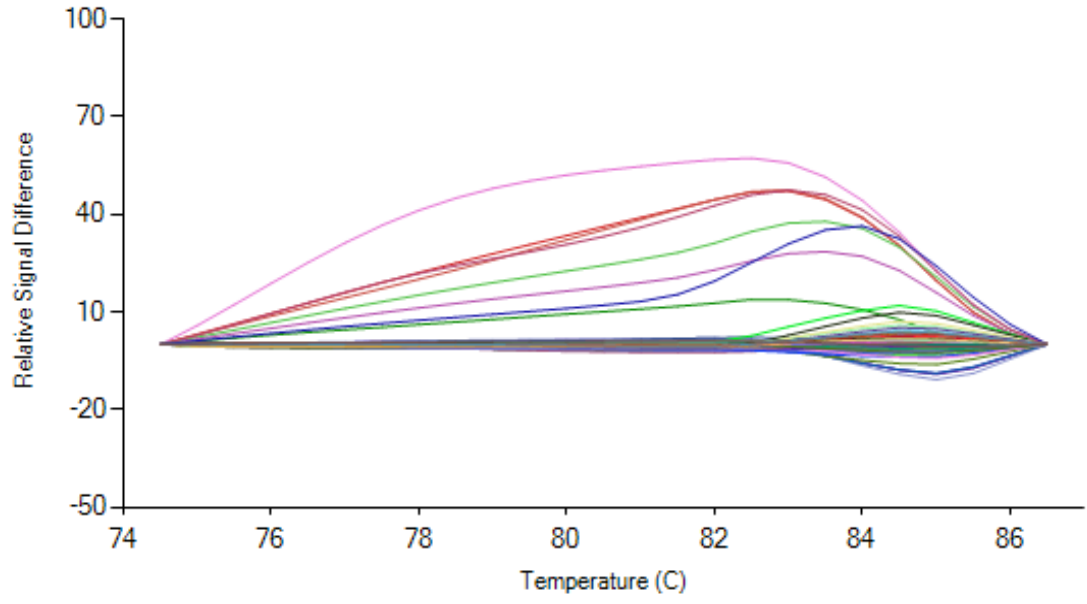
HRM analizleri, RT-PCR ile farklı izolatlardan çoğaltılan gen dizilerinin, DNA dizilimlerine göre gruplandırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. RT-PCR ampliconlarından elde edilen HRM profilleri Şekil 8-10'da gösterilmiş, gruplandırma sonuçları Tablo 6'da verilmiştir.



Şekil 8. gyrA geni RT-PCR ampliconlarının HRM profilleri



Şekil 9. gyrB geni RT-PCR ampliconlarının HRM profilleri



Şekil 10. parC geni RT-PCR ampliconlarının HRM profilleri

Tablo 6. gyrA, gyrB ve parC gen RT-PCR ampliconlarının DNA dizimlerine göre gruplandırılması

Numune	Genotip Grubu		
	gyrA	parC	gyrB
1	GA3	P1	GB1
2	GA3	P1	GB1
3	GA1	P1	GB1
4	GA1	P1	GB1
5	GA2	P3	GB1
6	GA1	P1	GB1
7	GA1	P1	GB1
8	GA1	P1	GB1
9	GA1	P1	GB1
10	GA1	P1	GB1
11	GA1	P1	GB1
12	GA1	P2	GB1
13	GA1	P2	GB1
14	GA1	P1	GB1
15	GA1	P1	GB1
17	GA1	P1	GB1
18	GA1	P1	GB1
19	GA1	P1	GB1
20	GA1	P1	GB1
21	GA1	P1	GB1
22	GA1	P1	GB1
23	GA1	P2	GB1
24	GA1	P1	GB1
25	GA1	P1	GB1
26	GA1	P1	GB1
28	GA1	P1	GB1
29	GA1	P1	GB1

**Tablo 6 (devamı). gyrA, gyrB ve parC gen RT-PCR ampliconlarının DNA dizilimlerine göre gruplandırılması**

30	GA1	P1	GB2
31	GA1	P1	GB1
32	GA1	P1	GB1
33	GA1	P1	GB1
34	GA1	P1	GB1
35	GA1	P1	GB1
36	GA1	P1	GB1
37	GA1	P1	GB1
38	GA1	P1	GB1
39	GA1	P1	GB1
40	GA1	P1	GB1
41	GA1	P1	GB1
42	GA1	P1	GB1
43	GA1	P1	GB1
44	GA1	P1	GB1
45	GA1	P1	GB1
46	GA1	P1	GB1
47	GA1	P1	GB1
48	GA1	P1	GB1
49	GA1	P1	GB1
50	GA1	P1	GB1
51	GA1	P1	GB1
52	GA1	P1	GB1
53	GA1	P1	GB1
54	GA1	P1	GB1
55	GA1	P1	GB1
56	GA1	P1	GB1
57	GA2	P1	GB2
58	GA1	P1	GB1
59	GA1	P1	GB1
60	GA2	P1	GB2
61	GA1	P1	GB1
62	GA1	P1	GB1
75	GA1	P1	GB1
76	GA1	P1	GB1
77	GA1	P1	GB1
78	GA1	P1	GB1
79	GA1	P1	GB1
80	GA2	P3	GB1
81	GA1	P1	GB1
82	GA1	P1	GB1
84	GA1	P1	GB1
85	GA2	P1	GB1
86	GA1	P1	GB1
87	GA1	P1	GB1
88	GA1	P1	GB1

Tablo 6’da verildiği üzere, oluşan gruplardan ikişer örneğin DNA dizi analizleri yapılmıştır. Yapılan DNA dizi analizleri her bir grup için aynı DNA dizilimi ile



sonuçlanmıştır. Elde edilen DNA dizileri, genotip isimlerine göre aşağıda verilmiştir. Bu dizilerin gen bankasında en çok benzediği DNA dizimleri ise Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7. Farklı genotiplerin DNA dizilimlerinin BLAST analizi sonuçları**

Genotip	Gen bankasında en çok benzediği DNA dizisi		
	Gen	Ulaşım No	Benzerlik
GA1	<i>Acinetobacter baumannii</i> gyrA geni	EU886740.1	289/289 (100%)
GA2	<i>Acinetobacter baumannii</i> gyrA geni	DQ270238.1	294/296 (99%)
GA3	<i>Acinetobacter baumannii</i> gyrA geni	AY596923.1	339/339 (100%)
P1	<i>Acinetobacter baumannii</i> parC geni	CP010779.1	288/294 (98%)
P2	<i>Acinetobacter baumannii</i> parC geni	CP010779.1	284/294 (97%)
P3	<i>Acinetobacter baumannii</i> parC geni	CP007549.3	285/294 (97%)
GB1	<i>Acinetobacter baumannii</i> gyrB geni	CP000863.1	653/653 (100%)
GB2	<i>Acinetobacter baumannii</i> gyrB geni	AP014649.1	649/653 (99%)

>GA1

CGCATGGTGACTTAGCTGTTTATGAAACCATTGTTTCGTATGGCTCAAGACTTTAGC  
TTACGTTATTTATTGGTTGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAG  
CGCTGCGGCAATGCGTTATAACCGAAGTCCGTATGACTAAGCTGGCACATGAGCTT  
CTTGCAGATTTAGAAAAAGACACAGTTGACTGGGAAGATAACTACGACGGTTCG  
GAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCAAACTTGTTAATTAACGGTG  
CTGCTGGTATCGC

>GA2

TATCACCCGCATGGTGACTTAGCTGTTTATGAAACCATTGTTTCGTATGGCTCAAGA  
CTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATG  
GTGATAGCGCTGCGGCAATGTGTTATAACCGAAGTCCGTATGAATAAGCTGGCACA  
TGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGACACAGTTGACTGGGAAGATAACTACGAC  
GGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCAAACTTGTTAATTA  
ACGGTGCTGCTGGTATCGC

>GA3

AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATATCACCCGCATGGTGACT  
TAGCTGTTTATGAAACCATTGTTTCGTATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTA  
TTGGTTGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGCGATAGCGCCGCGGCAA  
TGCGTTATACCGAAGTCCGTATGACTAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAAGTTT  
AGAAAAAGACACAGTTGACTGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCC  
TGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCAACTTGTTAATCAACGGTGCTGCGGGTATC  
GCCGTAGGT

>P1

ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACA  
GTGGGTGATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAG  
CCATGGTACTCATGGCTCAGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTCAG  
GGGAACTGGGGTTCACCAGATGATCCTAAATCTTTTGCTGCGATGCGTTATACCG  
AAGCCAACTCTCGGCTTATAGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTCAGGGCAC  
TAGTGAATGGCAGGACAAC

>P2

ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACA  
GTGGGTGATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAG  
CCATGGTCCTCACGGCTTAGCCATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGATGGTCAG  
GGGAACTGGGGTTCACCAGATGATCCTAAATCTTTTGCTGCGATGCGTTATACCG  
AAGCCAACTTTTCGGCTTATAGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTCAGGGCAC  
TAGTGAATGGCAGGACAAC

>P3

ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACA  
GTGGGTGATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAG  
CCATGGTACTCACGGCTTCGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTCAG  
GGGAACTGGGGTTCACCAGATGATCCTAAATCTTTTGCTGCGATGCGTTATACCG  
AAGCCAACTTTTCGGCTTATAGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTCAGGGCAC  
TAGTGAATGGCAAGACAAC

>GB1

CGTGCGCGCTTTGATAAAAATGATCTCTAGTCAGGAAGTGGGTACATTAATTACAG  
CACTTGGCTGTGGTATTGGCCGTGAAGAATATAACCCTGACAAGCTCCGTTATCA  
TAAAATTATTATTATGACCGATGCCGATGTTCGATGGTTCGCACATCCGTACATTGT  
TATTAACATTCTTCTTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACGTGGTCATATTTAT  
ATTGCACAGCCACCTTTGTATAAGCTCAAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATTA  
AAGATAACGACGCATTAGAACTTACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGC  
TTTATATATTAGTGCTGATGCGCCTGCAATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAGTA  
ATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTACAACGCTTAACGTTACGTTATC  
CAGCAAGCTTACTTGATGCATTACTCGAAGTCGACGCATTTAAAGCAGATCAAAA  
CCATGATCAAGCTTATGTACAACAATGGGCGGATCAAGTACGTGAAGCTGTACAA  
AGACTACAGCCAAGTTTGCGCCCTGAAATTACGCTTGAAACATTTGAACGCGAGA  
ATGCTCAAGGCGAGAAATCTGCGCATTACTGGCCACGTGTAAGTGT

>GB2

CGTGCGCGCTTTGATAAAAATGATCTCTAGTCAGGAAGTGGGTACATTAATTACAG  
CACTTGGCTGTGGTATTGGCCGTGAAGAATATAACCCTGACAAGCTCCGTTATCA  
TAAAATTATTATTATGACCGATGCCGATGTTGATGGTTCGCACATCCGTACATTGT  
TATTAACATTCTTCTTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACGTGGTCATATTTAT  
ATTGCACAGCCACCTTTGTATAAGCTCAAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATTA  
AAGATAACGACGCATTAGAACTTACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGC  
TTTACATATTAGTGCTGATGCGCCTGCAATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAGTA  
ATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTACAACGCTTAACGTTACGTTATC  
CAGCAAGCTTACTGGATGCATTACTCGAAGTAGATGCATTTAAAGCAGATCAAAA  
CCATGATCAAGCTTATGTCCAGCAATGGGCGGATCAAGTACGTGAAGCTGTACAA  
AGACTACAGCCAAGTTTGCGCCCTGAAATTACGCTTGAAACATTTGAACGCGAGA  
ATGCTCAAGGCGAGAAATCTGCGCATTACTGGCCACGTGTAAGTGT

## TARTIŞMA

*Acinetobacter* türleri yoğun bakım ünitelerinde nozokomiyal enfeksiyonlara neden olur (25). Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı nedeniyle artan dirençli patojenler hastane enfeksiyonlarına yol açar (26). *Acinetobacter* türlerinde çoğul antibiyotik direncinin ortaya çıkması ciddi enfeksiyonların tedavisini zorlaştırır (12). Gram Negatif bakterilerde olduğu gibi, enzimleri kodlayan ve kromozoma lokalize genleri kodlayan alanda meydana gelen mutasyonunun neden olduğu direnç; sıklıkla DNA Gyrase veya topoizomerez IV'ün yapısal değişikliğini içerir (34). Genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksektir. DNA problrı kullanılarak da bu direnç genleri tespit edilebilir (12).

Park ve ark. (5) 2011 yılında yaptıkları çalışmada 56 farklı *A. baumannii* izolatında *gyrA* (S83L), *parC* (S80L, S80W and S84K) ve *gyrB* (E479D, D644Y and A677V) mutasyonlarını taramıştır. Her üç gende de mutasyon içeren izolatların, iki gende (*gyrA* ve *parC*) mutasyon içeren izolatlara oranla siprofloksasin direncinin yüksek olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca *parC* S80L ve E84K mutasyonlarının *A. baumannii* dışa atım pompalarının aktivitelerini etkilediğini tespit etmiştir. Cheng-Hsun Chiu ve ark. (61) 2010 yılında yaptıkları çalışmada 35 *A. baumannii* klinik izolatta *gyrA* ve *parC* nokta mutasyonlarıyla dışa atım pompası gen ekspresyonuyla (AdeB) ilişkisi araştırmıştır. 4 orta dirençli izolatta *gyrA* ve *parC* nokta mutasyonu olmamasına rağmen yüksek AdeB gen ekspresyonu ifadesi gözlenmiştir. *gyrA* (S83L) ve *parC* (S80L, L59G) mutasyonlarını taranmış ve yeni mutasyona uğrayan izolatlar siprofloksasin tam direncine neden olmuştur. 18 duyarlı izolat, 4 orta dirençli izolat ve 13 tam dirençli izolatların hepsinde *parC* (S80L) mutasyonu gözlenmiştir.

Çoklu mutasyon siprofloksasin direncine neden olmuştur. 13 dirençli izolattan 11 izolatında gyrA (S83L) 9 izolatta ise parC (L59G) mutasyonu bulunmuştur. *A. baumannii* tam olarak dirençli olmasının ön koşulu parC (S80L) mutasyonu olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Park ve ark.(5) 2011 yılında yaptıkları çalışmada bulunan sonuçlar ile örtüşmektedir.

Liu Hongbo ve ark. (62) 2013 yılında yaptığı çalışmada 11 klinik izolat ve bir yabancı tip suşun gyrA ve parC gen dizisinde mutasyon incelenmiştir. Tüm suşlarda 1-2 nükleotid mutasyonu bulunmuş fakat bu mutasyon amino asit değişikliğine neden olmamıştır. İki izogenik mutant suş C transversiyonla bir G'ye dönüşmüştür ve bu gyrA gen bölgesi içinde Thr amino asidinden Ser-97 amino asit değişimine yol açar. Başka bir izogenik mutant suş transversiyonla G'ye dönüşmüştür ve bu gyrA içinde His amino asidinden Asp-150 amino asit değişikliğine neden olur. 11 klinik izolatta parC gen dizisi 3-4 nükleotid transversiyonlarına sahiptir. Sadece izogenik mutant suş Pro amino asidinden Ala-85 aminoasit değişimine yol açar. Bu mutasyonlar göz önünde bulundurularak MİK yükselmesinin nedeni izogenik mutant suşlarda meydana gelen mutasyonlardır sonucuna ulaşılır ve hastane enfeksiyonu izolatları kısmen çoklu ilaç direnci olan sebebini açıklar. Ahmed Hamouda ve ark. (15) 2004 yılında yaptıkları çalışmada 5 İskoçya hastanesinden 9 *A. baumannii* dirençli izolat üzerinde, gyrA ve parC genlerinin mutasyonu ile siprofloksosin arasındaki ilişki araştırmıştır. Tüm izolatlarda gyrA geninde mutasyon gözlenmiş, parC geninde ise 2 izolatta mutasyon gözlenmiştir. Yapılan çalışmada iki izolatta hem gyrA hem de parC genlerinde mutasyon bulunmuş ve MİK değeri yüksek çıkmıştır. gyrA ve parC'de gerçekleşen mutasyonun siprofloksasine dirence ve MİK değerlerinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmaya gyrB gen bölgesi dahil edilmediği için Park ve ark. (5) çalışmasından gyrA ve parC mutasyonu ile örtüşmektedir fakat Liu Hongbo ve ark. (62) yaptığı çalışmada ise iki gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar örtüşmektedir. Bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuç ise yalnızca gyrA'da meydana gelen mutasyonla örtüşmektedir.

Wang-Huei Sheng ve ark. (6) 2009 yılında yaptığı çalışmada 2005-2006 yıllarında Tayvan Taipei hastanesinden 82 *A. baumannii* izolat toplamıştır. 82 izolatta siprofloksasin duyarlılık testleri yapılmıştır. 49 *A. baumannii* izolatında gyrA geninde Leu83 (TTA) mutasyon bulunmuştur. gyrA genindeki amino asidi olan Ser83 (TCA)'ün Leu83 (TTA)'ye yer değiştirmesi siprofiloksisin ile ilişkili bulunmuştur. Jordi Vila ve ark. (8) 1997 yılında yaptığı çalışmada İspanya hastanesinden alınan 21 dirençli *A. baumannii* suşunda gyrA ve parC mutasyonları incelemiştir. MİK değerleri ve diğer bakterilerin gen bölgeleriyle karşılaştırma yapılmıştır. gyrA ve parC gen bölgeleri QRDR içinde kalan bölgesi belli bir

fragment uzunluğundadır ve parC gen bölgesi *E.coli* ile %72, *Salmonella typhimurium* ile %71, *Haemophilus influenzae* ile %72 benzer. Bununla birlikte aynı türlerdeki gyrA geni ile sadece % 49 benzer olduğu görülür. *A. baumannii*'nin parC gen bölgesinden elde edilen amino asit dizisi *E.coli* ile %89, *S. typhimurium* ile %84 ve *Haemophilus influenzae* ile %84 benzer. Çalışmanın sonucunda gyrA ve parC'de meydana gelen mutasyonlar siprofloksasin ve nalidiksik asit direncini etkilemiştir. Bu çalışmayla Ahmed Hamouda ve ark. (15) ve Liu Hongbo ve ark. (62) yaptığı çalışmalarla örtüşmüş bizim çalışmamız ile gyrA gen bölgesinde meydana gelen mutasyon örtüşmektedir.

Jeom Kyu Lee ve ark. (7) 2005 yılında yaptıkları çalışmada Kore'de çeşitli hastanelerden elde edilen 59 izolat *A. baumannii*'de gyrA ve parC genlerinin mutasyonu ile siprofloksasin arasındaki ilişki araştırmıştır. parC geninde Ser80 amino asidinin Trp amino asidine dönüşmesi *A. baumannii*'de daha önce rapor edilmemiştir. Bu mutasyon sonucunda florokinolon MİK değeri diğerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Daha önce bu mutasyon *Pseudomonas aeruginosa*'da gösterilmiştir. Bu çalışmada gyrA mutasyonu kaynaklı (Gly81-Val, Ala24-Pro amino asit değişimleri) ve parC mutasyonu kaynaklı (Ser-Pro) amino asit değişimi siprofloksasin direnci kaydedilmemiştir. Çift mutasyonların siprofloksasin direnci tek mutasyonların siprofloksasin direncinden daha fazla bulunmuştur. *A. baumannii*'de çift mutasyonlar yüksek siprofloksasin direncine neden olur. Çift mutasyonların siprofloksasin direnci tek nokta mutasyonu olan izolatlarla göre daha fazladır. gyrB ve parE iş birliği ile olan mutasyonlar *A. baumannii*'de florokinolonlara direnç geliştirdiği düşünülür. *A. baumannii*'de florokinolon direncine nedenlerin arasında gen mutasyonlarının yanında enzimler, dışa atım pompaları AdeABC pompası gibi nedenlerde bulunur.

Bizim çalışmamızda direnç genleri olan gyrA, gyrB ve parC mutasyonu Real Time PCR ile tarandı ardından HRM analiziyle ile gruplandırıldı ve gruplardan örnekler alınarak sekans analizi yapıldı. Bunun sonucunda tüm izolatlarda gyrA (S83L) gen bölgesinde mutasyona rastlanmış diğer iki bölgede tüm izolatlarda mutasyona rastlanmamıştır. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak hipotezimiz doğrulanmış *A. baumannii* direncinin nedeni mutasyonardır diyebiliriz.

Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak yapılan çalışmaların sonuçları ile bizim elde ettiğimiz sonuçlar örtüşmektedir fakat araştırmanın daha kapsamlı olabilmesi için bu çalışmanın yanında bakterilerin MİK değerleri ve dışa atım pompalarının gen ekspresyonu araştırılması gerekmektedir.

## SONUÇLAR

Bizim çalışmamızda, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilip otomatize sistem ile *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanmış ve stoklanmış dirençli klinik izolatlarda DNA Gyrase direnç genleri olan *gyrA*, *gyrB* ve *parC*'nin RT-PCR yöntemiyle araştırılmış olup antibiyotiklere karşı direncin mutasyon kaynağını incelenmiştir.

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 73 klinik örnek araştırmaya dahil edilmiştir. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında, DNA izolasyonu ve RT-PCR teknikleri kullanılarak, *gyrA*, *gyrB* ve *parC* gen mutasyonları incelenmiştir.

Sonuç olarak; gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde edilen dizilerde *gyrA* S83(TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu; *parC* S80(TCG)'nin L80(TTG) veya W80(TGG) mutasyonu, E84(GAA)'nin K84(AAA) mutasyonu; ve *gyrB* E479(GAA)'nin D479(GAT) mutasyonu, D644(GAT)'nin Y644(TAT) mutasyonu, A677(GCG)'nin V677(GTG) mutasyonu taranmıştır. Mutasyon taramalarında, mutasyon içermeyen referans dizilerle, bu çalışmada elde edilen DNA dizileri Clustal W2 programı kullanılarak karşılaştırıldı. *gyrA* için referans dizi gen bankası ulaşım no DQ270238.1, *gyrB* için referans dizi gen bankası ulaşım no CU468230.2, *parC* için referans dizi gen bankası ulaşım no HM570038.1'dir. Referans gen dizilimleri ve DNA karşılaştırmaları şekil 11-13'te verilmiştir. DNA dizilimleri üzerinde analiz edilecek mutasyon noktaları sarı ile işaretlenmiştir. Aşağıdaki veriler incelendiğinde, GA1, GA2 ve GA3 genotipinin her üçünde de S83(TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu tespit edilmiştir. *parC* ve *gyrB* genotiplerinde mutasyon gözlemlenmemiştir.

>DQ270238.1 gyrA referans DNA dizisi

AAATCTGCCCGTGTCTGTTGGTGACGTAATCGGTAAATATCACCCGCATGGTGACT  
CA GCTGTTTATGAAACCATTGTTTCGTATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTA  
TTGGTTGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCGGCAA  
TGTGTTATACCGAAGTCCGTATGACTAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTT  
AGAAAAAGACACAGTTGACTGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCC  
TGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCAACTTGTTAATTAACGGTGCTGCTGGTATCG  
CCGTAGGTATGGC

```
GA2          -----TATCACCCGCATGGTGACTTAGCT 24
DQ270238.1  AAATCTGCCCGTGTCTGTTGGTGACGTAATCGGTAAATATCACCCGCATGGTGACTCAGCT 60
GA1          -----CGCATGGTGACTTAGCT 17
GA3          AAATCTGCCCGTGTCTGTTGGTGACGTAATCGGTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT 60
                *****

GA2          GTTTATGAAACCATTGTTTCGTATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGAT 84
DQ270238.1  GTTTATGAAACCATTGTTTCGTATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGAT 120
GA1          GTTTATGAAACCATTGTTTCGTATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGAT 77
GA3          GTTTATGAAACCATTGTTTCGTATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGAT 120
                *****

GA2          GGT CAGGTAACITTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCGGCAATGTGTTATAACCGAA 144
DQ270238.1  GGT CAGGTAACITTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCGGCAATGTGTTATAACCGAA 180
GA1          GGT CAGGTAACITTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCGGCAATGTGTTATAACCGAA 137
GA3          GGT CAGGTAACITTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCGGCAATGTGTTATAACCGAA 180
                *****

GA2          GTC CGTATGATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGACACAGTTGAC 204
DQ270238.1  GTC CGTATGACTAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGACACAGTTGAC 240
GA1          GTC CGTATGACTAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGACACAGTTGAC 197
GA3          GTC CGTATGACTAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGACACAGTTGAC 240
                *****

GA2          TGGGAGATAA C TACGACGTTCCGGACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA 264
DQ270238.1  TGGGAGATAA C TACGACGTTCCGGACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA 300
GA1          TGGGAGATAA C TACGACGTTCCGGACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA 257
GA3          TGGGAGATAA C TACGACGTTCCGGACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA 300
                *****

GA2          AACTTGTTAATTAACGGTGCTGCTGGTATCGC----- 296
DQ270238.1  AACTTGTTAATTAACGGTGCTGCTGGTATCGCCGTAGGTATGGC 344
GA1          AACTTGTTAATTAACGGTGCTGCTGGTATCGC----- 289
GA3          AACTTGTTAATTAACGGTGCTGCGGGTATCGCCGTAGGT----- 339
                *****
```

Şekil 11. gyrA DNA dizilimi karşılaştırılması



>HM570038.1 parC referans DNA dizisi

ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACA  
GTGGGTGATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAG  
CCATGGTACTCATGGCTCAGCCATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATTGAAGGTCAG  
GGAACTGGGGCTCACCTGATGATCCTAAATCTTTTGCTGCGATGCGTTATACCG  
AAGCAAAACTCTCGGGCTTATAGTGAAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTCAGGGCAC  
TAGTGAATGGCAAGACAAC

```
P3 ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT 60
P2 ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT 60
P1 ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT 60
HM570038.1 ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT 60
*****

P3 GATGTA CT TGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC 120
P2 GATGTA CT TGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTCTCTC 120
P1 GATGTA CT TGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC 120
HM570038.1 GATGTA CT TGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC 120
*****

P3 ACGGCTTCGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTCAGGGGAACTGGGGTTCA 180
P2 ACGGCTTAGCCATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGATGGTCAGGGGAACTGGGGTTCA 180
P1 ATGGCTCAGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTCAGGGGAACTGGGGTTCA 180
HM570038.1 ATGGCTCAGCCATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATTGAAGGTCAGGGGAACTGGGGCTCA 180
* * * * *

P3 CCAGATGATCCTAAATCTTTTGCTGCGATGCGTTATACCGAAGCCAAACTCTGGGCTTAT 240
P2 CCAGATGATCCTAAATCTTTTGCTGCGATGCGTTATACCGAAGCCAAACTCTGGGCTTAT 240
P1 CCAGATGATCCTAAATCTTTTGCTGCGATGCGTTATACCGAAGCCAAACTCTGGGCTTAT 240
HM570038.1 CCTGATGATCCTAAATCTTTTGCTGCGATGCGTTATACCGAAGCCAAACTCTGGGCTTAT 240
** *****

P3 AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTCAGGGCCTAGTGAATGGCAAGACAAC 294
P2 AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTCAGGGCCTAGTGAATGGCAGGACAAC 294
P1 AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTCAGGGCCTAGTGAATGGCAGGACAAC 294
HM570038.1 AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTCAGGGCCTAGTGAATGGCAAGACAAC 294
*****
```

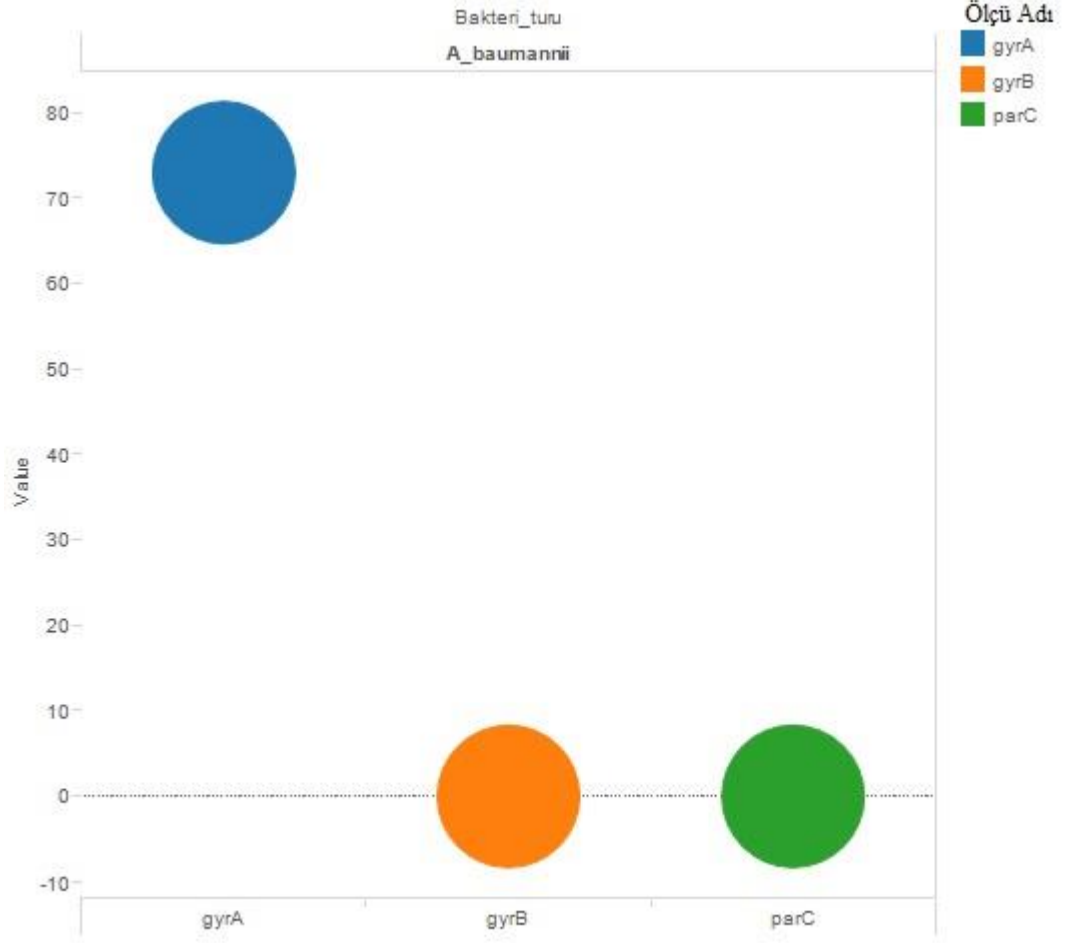
Şekil 12. parC DNA dizilimi karşılaştırılması

>CU468230.2 gyrB referans DNA dizisi

CGTGC GCGCTTTGATAAAAATGATCTCTAGTCAGGAA GTGGGTACATTAATTACAG  
 CACTTGGCTGTGGTATTGGCCGTGAAGAATATAACCCTGACAAGCTCCGTTATCA  
 TAAAATTATTATTATGACCGATGCCGATGTTCGATGGTTCGCACATTTCGTACATTGT  
 TATTAACATTCTTCTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACGTGGTCATATTTAT  
 ATTGCACAGCCACCTTTGTATAAGCTCAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATTA  
 AAGATAACGATGCATTAGAACTTACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGC  
 TTTACATATTAGTGCTGATGCGCCTGCAATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAGTA  
 ATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTACAACGCTTAACGTTACGTTATC  
 CAGCAAGCTTACTGGATGCATTACTCGAAGTCGACGCATTTAAAGCAGATCAAAA  
 CCATGATCAAGCTTATGTACAACAATGGGCA GAT CAAGTACGTGAAGCTGTAGA  
 GAAGTTGCAACCAAGCTTACGTCCGGAAATTACGCTTGAAACATTTGAACGTGAG  
 AATGCTCAAGGCGAGAAATCTGCG CATTACTGGCCACGTGTA ACTGT

GB1	CGTGC GCGCTTTGATAAAAATGATCTCTAGTCAGGAA GTGGGTACATTAATTACAGCAC TT	60
GB2	CGTGC GCGCTTTGATAAAAATGATCTCTAGTCAGGAA GTGGGTACATTAATTACAGCAC TT	60
CU468230.2	CGTGC GCGCTTTGATAAAAATGATCTCTAGTCAGGAA GTGGGTACATTAATTACAGCAC TT	60
GB1	GGCTGTGGTATTGGCCGTGAAGAATATAACCCTGACAAGCTCCGTTATCATAAAATTATT	120
GB2	GGCTGTGGTATTGGCCGTGAAGAATATAACCCTGACAAGCTCCGTTATCATAAAATTATT	120
CU468230.2	GGCTGTGGTATTGGCCGTGAAGAATATAACCCTGACAAGCTCCGTTATCATAAAATTATT	120
GB1	ATTATGACCGATGCCGATGTTCGATGGTTCGCACATCCGTACATTGTTATTAACATTCT TC	180
GB2	ATTATGACCGATGCCGATGTTCGATGGTTCGCACATCCGTACATTGTTATTAACATTCT TC	180
CU468230.2	ATTATGACCGATGCCGATGTTCGATGGTTCGCACATCCGTACATTGTTATTAACATTCT TC	180
GB1	TTCCGTCAAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTTCATATTTATATTGCACAGCCACCTT TG	240
GB2	TTCCGTCAAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTTCATATTTATATTGCACAGCCACCTT TG	240
CU468230.2	TTCCGTCAAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTTCATATTTATATTGCACAGCCACCTT TG	240
GB1	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCRAAGCCRAATATATTAAGATAACGACGCATTAGAAA CT	300
GB2	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCRAAGCCRAATATATTAAGATAACGACGCATTAGAAA CT	300
CU468230.2	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCRAAGCCRAATATATTAAGATAACGACGCATTAGAAA CT	300
GB1	TACTTGATTTCAAATGCCGATTTGATGACCTTGCTTTTATATATTAGTGCCTGATGCCGCTG CA	360
GB2	TACTTGATTTCAAATGCCGATTTGATGACCTTGCTTTTATATATTAGTGCCTGATGCCGCTG CA	360
CU468230.2	TACTTGATTTCAAATGCCGATTTGATGACCTTGCTTTTATATATTAGTGCCTGATGCCGCTG CA	360
GB1	ATTACAGGTGAAAGCCCTGCCAAAAGTAATCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCT TA	420
GB2	ATTACAGGTGAAAGCCCTGCCAAAAGTAATCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCT TA	420
CU468230.2	ATTACAGGTGAAAGCCCTGCCAAAAGTAATCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCT TA	420
GB1	CAACGCTTAAAGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTTGATGCATTACTCGAAGTGCAGG CA	480
GB2	CAACGCTTAAAGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTTGATGCATTACTCGAAGTGCAGG CA	480
CU468230.2	CAACGCTTAAAGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTTGATGCATTACTCGAAGTGCAGG CA	480
GB1	TTTAAAGCAGATCAAAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACRAATGGGCG GATCAAGTAC GT	540
GB2	TTTAAAGCAGATCAAAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACRAATGGGCG GATCAAGTAC GT	540
CU468230.2	TTTAAAGCAGATCAAAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACRAATGGGCG GATCAAGTAC GT	540
GB1	GAAGCTGTACAAGACTACAGCCAAAGTTTGGCCCTGAAAATTACGCTTGAACATTTGAA	600
GB2	GAAGCTGTACAAGACTACAGCCAAAGTTTGGCCCTGAAAATTACGCTTGAACATTTGAA	600
CU468230.2	GAAGCTGTACAAGACTACAGCCAAAGTTTGGCCCTGAAAATTACGCTTGAACATTTGAA	600
GB1	CGCGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGCG CATTACTGGCCACGTGTA ACTGT	653
GB2	CGCGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGCG CATTACTGGCCACGTGTA ACTGT	653
CU468230.2	CGCGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGCG CATTACTGGCCACGTGTA ACTGT	653

Şekil 13. gyrB DNA dizilimi karşılaştırılması



Şekil 14. gyrA, gyrB ve parC'de mutasyonun tabloda gösterilmesi

## ÖZET

*A. baumannii*, antibiyotik direnç genleri yüzünden tedavi edilmesi zor bir patojendir. Bazı suşları florokinolonlar dahil olmak üzere birçok antimikrobiyal ajanlara dirençlidir. *A. baumannii* kinolon direnci belirlenmesi, DNA Gyrase ve topoizomeraz IV genlerinin mutasyonlarının saptanmasıyla gerçekleştirilir. Kinolonlar DNA replikasyonu sırasında enzim kompleksine bağlanarak DNA çoğalmasını engelleyerek bakteri aktivitesini engeller. Bu çalışmada *A. baumannii* izolatlarında DNA Gyrase direnç genleri olan *gyrA*, *gyrB* ve *parC* mutasyonlarının Real Time PCR yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilip otomatize sistem ile *A. baumannii* olarak tanımlanmış ve stoklanmış 73 *A. baumannii* dirençli klinik izolatlar kullanıldı. *A. baumannii* izolatları boncuklu bakteri saklama tüplerine alınmıştır ve 37°C'de bir gece üremeleri sağlandıktan sonra -20 °C'de saklanmıştır. -20 °C'de saklanılan bakteriler, bir gün etüvde 37°C'de bekletilmiştir. Üremesi sağlanan bakterilerin DNA izolasyonu yapılmıştır. RT-PCR sonuçlarına göre benzer gen bölgesi olanlar gruplandırılmıştır (GA1, GA2, GA3, P1, P2, P3, GB1, GB2). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde edilen dizilerde *gyrA* S83(TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu; *parC* S80(TCG)'nin L80(TTG) veya W80(TGG) mutasyonu, E84(GAA)'nin K84(AAA) mutasyonu; ve *gyrB* E479(GAA)'nin D479(GAT) mutasyonu, D644(GAT)'nin Y644(TAT) mutasyonu, A677(GCG)'nin V677(GTG) mutasyonu taranmıştır. Mutasyon taramalarında, mutasyon içermeyen referans dizilerle, bu çalışmada elde edilen DNA dizileri Clustal W2 programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. *gyrA* için referans dizi gen bankası ulaşım no DQ270238.1, *gyrB* için referans dizi gen bankası

ulaşım no CU468230.2, parC için referans dizi gen bankası ulaşım no HM570038.1'dir. Veriler incelendiğinde, GA1, GA2 ve GA3 genotipinin her üçünde de S83(TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu tespit edilmiştir. parC ve gyrB genotiplerinde mutasyon gözlemlenmemiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, gyrA, gyrB, parC, Kinolon, Mutasyon, Direnç

***Acinetobacter baumannii* ISOLATES RESISTANCE GENES IN DNA  
Gyrase gyrA, gyrB ve parC INVESTIGATION OF THE MUTATION  
REAL TIME PCR**

**SUMMARY**

Resistance to antimicrobial agents against strains of pathogenic bacteria winner, especially in the hospital environment it is known to spread to the community developed. *A. baumannii* treating antibiotic resistance genes difficult because of a pathogen. Some strains are resistant to many antimicrobial agents, including fluoroquinolone. *Acinetobacter baumannii* quinolone resistance determining, DNA Gyrase and topoisomerase IV it is performed with the detection of mutations in genes. Modifications of gene dependent resistance to quinolones DNA Gyrase the subunits gyrA or topoisomerase the subunits parC it is associated with. Quinolones during DNA replication binds rapidly to the enzyme complex activity inhibits bacterial DNA replication by inhibiting and the bacterial activity. *Acinetobacter baumannii* mutations in the gyrA gene high quinolone resistance determining region of or ciprofloxacin resistant it was determined to be associated with intermediate. Therefore, it should be understood by this mechanism. In this study *Acinetobacter baumannii* isolates resistance genes in DNA Gyrase gyrA, gyrB and parC investigation of the mutation Real Time PCR intended.

In this study Trakya University Health Research Center Microbiology Laboratory sent isolated and automated systems from various clinical specimens *Acinetobacter baumannii* as

defined and stockpiled 73 *Acinetobacter baumannii* resistant clinical isolate was used. *Acinetobacter baumannii* isolates taken to Microbank and 37°C after a night reproductive supplied -20°C stored. For DNA isolation -20°C covert bacteriaone day in the oven was heated to 37°C. Providing bacteria growth petri through a colony was collected by self and DNA isolation was performed.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, gyrA, gyrB, parC, Quinolone, Mutation, Resistance.

## KAYNAKLAR

1. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug Resistant Tuberculosis: Molecular Perspectives, *Emerg. Infect. Dis* 1998;4:195-209.
2. Bax R, Mullan N, Verhoef J. The Millennium Bugs-The Need For and Development of New Antibacterials. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2000;16:51-9.
3. Vergnaud M, Allaire C, Berlie C, Bessis E, Bouillerot A. Antibiotic Resistance of *Streptococcus pneumoniae* in 1996 and 1997. Normandy Regional Observatory Results (France), *Med. Mal. Infect.* 2001;31:383-7.
4. Tillotson G.S, Watson S.J. Antimicrobial Resistance Mechanisms: What's hot and What's not in Respiratory Pathogens. *Semin. Respir. Infect* 2001;16(3):155-68.
5. Park S, Min Lee K, Sun Yoo Y, SikYoo J, Il Yoo J, Su Kim H. Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Public Health Res Perspect* 2011;2(3):164-170.
6. Sheng W, Lin Y, Wang J, Chen Y, Chang S, Hsia K, et al. Identification of distinct ciprofloxacin susceptibility in *Acinetobacter* spp. by detection of the *gyrA* gene mutation using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 2009;23:154-6.
7. Lee J, Lee Y, Park Y, Kim B. Mutations in the *gyrA* and *parC* Genes in Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiol. Immunol.* 2005;49(7):647-53.
8. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997;39:757-62.
9. Dal T, Dal M, Ağır İ. *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri: Literatürün Gözden Geçirilmesi. *Van Tıp Dergisi* 2012;19(3):137-48.



10. Xing L, Barnie P, Su Z, Xu H. Development of Efflux Pumps and Inhibitors (EPIs) in *A. baumannii*. *Clinical Microbiology* 2014;3:1.
11. Coyne S, Guigon G, Courvalin P, Pe'richon B. Screening and Quantification of the Expression of Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* with a Microarray. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;1:333–40.
12. Gülbudak H, Aslan G, Tezcan S, Ersöz G, Ülger M, Otağ F, et al. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan *Acinetobacter baumannii* İzolatları Arasındaki Klonal İlişkinin Rep-PCR ile Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014;48(2):316-24.
13. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3471-84.
14. Akers Kevin S, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X. Aminoglycoside Resistance and Susceptibility Testing Errors in *Acinetobacter baumannii* Calcoaceticus Complex. *Journal of Clinic Microbiology*. 2010;48(4):1132–8.
15. Hamouda A, Amyes S. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004;7:368.
16. Lin L, Ling B, Li X. Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeABC, adeDE and adeIJK, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*–*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;1:27-32.
17. Karagöl Ç. Hastane Kökenli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları ve İmipenem Dirençli İzolatların Genotiplemesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi;2008.
18. Yıldırım Mustafa İ. Sefaperazon-Sulbaktam, İmipenem ve Sefepimin Antibiyoterapi Etkinliklerinin Çoğul Dirençli ve Duyarlı *Acinetobacter baumannii* ile Oluşturulan Deneysel İkili Apse Modelinde Karşılaştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi;2006.
19. Keyik Ş. *Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA–23 ve OXA–58 Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması ve PFGE Yöntemiyle Klonal Yakınlığının İncelenmesi (tez). Konya: Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2013.
20. Azap Ö. MDR *Acinetobacter* İnfeksiyonlarında Epidemiyolojik Anlamda Güncel Durum. *ANKEM Derg* 2012;26:283-6.
21. Erbay A. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Hastaneden Edinilmiş *Acinetobacter baumannii* Bakteriyemilerinde Fatalite Hızı ve İlgili Risk Etmenleri (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2009.
22. Arslan H. *Acinetobacter* Moleküler Epidemiyolojisi. *ANKEM Derg* 2014;28:71-72.

23. Bayram Y, Gültepe B, Bektaş A, Parlak M, Güdücüoğlu H. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Araştırılması. *KlimikDergisi* 2013;26(2):49-53.
24. Cengiz M. Bakterilerde Kinolon Direncinin Genetiği. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* 2010;1:55-60.
25. Aşık G. *Acinetobacter baumannii* Virülansının Açıklanmasında Güncel Yaklaşımlar. *Mikrobiyol Bul* 2011;45(2):371-80.
26. Başustaoğlu A, Özyurt M. Nozokomiyal Patojen Olarak *Acinetobacter*'lerin Mikrobiyolojik, Klinik ve Epidemiyolojik Özellikleri. 1998. [http://www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/fu\\_folder/1998-02/html/1998-2-2-088-093.htm](http://www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/fu_folder/1998-02/html/1998-2-2-088-093.htm).
27. Ertek M. Hastane Enfeksiyonları: Türkiye Verileri. *Hastane Enfeksiyonları: Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi* 2008;60:9-14.
28. Özçetin M, Saz Eylem U, Karapınar B, Özen S, Aydemir Ş, Vardar F. Hastane Enfeksiyonları Sıklığı ve Risk Faktörleri. *Çocuk En Derg* 2009;3:49-53.
29. Özgüneş İ. Sık Karşılaşılan Hastane İnfeksiyonları ve Bunların Neden Olduğu Ekonomik Kayıplar. [sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/m07.pdf](http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/m07.pdf).
30. Karahocagil Mustafa K, Yaman G, Göktaş U, Sünnetçioğlu M, Çıkman A, Bilici A, Yapıcı K, Baran Ali İ, Binici İ, Akdeniz H. Hastane Enfeksiyon Etkenlerinin ve Direnç Profillerinin Belirlenmesi. *Van Tıp Dergisi* 2011;18(1):27-32.
31. Yolbaş İ, Tekin R, Güneş A, Kelekçi S, Şen V, Tan İ, Uluca Ü. Bir Üniversite Hastanesindeki *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2013;4(3):318-21.
32. Özseven Ayşe G, Çetin Sesli E, Arıdoğan Cicioğlu B. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotik Direnç Profilleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2012;42(2):55-60.
33. Saçar S, Turgut H, Cenger Hırçın D, Coşkun E, Asan A, Kaleli İ. Post Travmatik Çoklu İlaç Dirençli *Acinetobacter baumannii* Menenjitli Olguda Yüksek Doz Meropenem İle Başarılı Tedavi. *Pamukkale Tıp Dergisi*. 2008;1:39-41.
34. Çiftçi Hakkı İ, Aşık G. *Acinetobacter baumannii*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. *ANKEM Derg.* 2011;25(3):196-207.
35. Işık Y. *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Kinolon Direncinin Moleküler Olarak Saptanması (tez). Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2008.
36. Pazarlı O. Kinolon Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında Direnç Genlerinin Araştırılması (tez). Zonguldak: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı;2010.

37. Oğuz Kürşat H. Endodontide Sistemik İlaç Kullanımı (tez). İzmir: Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi;2013.
38. Nazik H, Öngen B. Türkiye’de Plazmit Aracılı Kinolon Direnci. ANKEM Derg 2010;24(1):46-54.
39. Baştürk S. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması (tez). İstanbul: Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği;2005.
40. Baştürk S, Şengöz G, Yaşar Kart K, Yıldırım F. Gram Negatif Bakterilerin Eski ve Yeni Kinolonlara Duyarlılığı. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg. 2008;38(2):56-60
41. Aygün G. Antibiyotikler II. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi 2002;31:39-54.
42. Abbasoğlu U, Çevikbaş A. Farmasötik Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara, Efil Yayınevi 2011; s.527-531.
43. Demirpek U. Anttimikrobiyal Duyarlılık Testleri. 2012. <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>
44. Özseven Gül A, Çetin Sesli E, Özseven L. Dama Tahtası Sinerji Testi Sonuçlarının Farklı Yöntemlerle Yorumlanması Sonuçlarımızı Etkiliyor mu? Mikrobiyol Bul 2012;46(3):410-20.
45. Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. Karaelmas Science and Engineering Journal 2 2012;(1):53-62.
46. Özmen M. Tavuk Trakelerinde *Mycoplasma gallisepticum*’un Real Time Pcr Tekniği ile Saptanması ve İstatistik Analizi (tez). Adana: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı;2011.
47. Aydın Sayitoğlu M. Hematoloji’de Real Time PCR. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu.
48. Günel T, Aydın K. “Real Time PCR” ve Uygulama Alanları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2009;2(2):43-5.
49. Pınar A. Pcr ve Real Time Pcr Hakkında Genel Bilgi. Real Time Pcr Kursu; 04-05 Haziran 2012.
50. Somma M, Quercy M. Gıda örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Analizleri. Bölüm 6.
51. Ergin M. Moleküler Patoloji. Aegan Pathology Journal 2004;1:103-7.
52. Günay Ö. Türkiye Kökenli *Lactococcus lactis* Suşlarının Kromozomal Farklılıklarının Tanımlanması (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü;2012.

53. Özkara A. Mutasyon Tarama Yöntemleri. Türk Klinik Biyokimya Derg 2003;1:47-53).
54. Özdil F. Mitokondriyel DNA PCR-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Markerleri Kullanılarak Türkiye'nin Farklı Bölgelerine Ait Bal Arılarının Tanımlanması (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü;2007.
55. Birben E. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi. Astım Allerji İmmünoloji 2007;5(1):53-5.
56. Akgün Tuğba M. Prostat Kanseri Hastalarında Pten Gen Mutasyonlarının Tanımlanması (tez). Konya: Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü;2012.
57. Sümer H. Nokta Mutasyonlarının Saptanmasında Yüksek Çözünürlüklü Erime Tekniğinin Verim ve Hassasiyetinin Değerlendirilmesi (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü;2008.
58. Yenilmez Ebru D. Anne Kanında Fetal Nükleik Asitlerle Prenatal Tanı Uygulaması (tez). Adana: Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı;2010.
59. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real Time PCR". Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007;27:763-7.
60. Boyacıoğlu H, Güneri P. Sağlık Araştırmalarında Kullanılan Temel İstatistik Yöntemler. Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi. 2006;30(3):33-9.
61. Chiu Cheng H, Lee Hao-Y, Tseng Li-Y, Chen Chyi-L, Chia Ju-H, Su Lin-H, Liu Shu-Y. Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. International Journal of Antimicrobial Agents 35 2010;382-6.
62. Hongbo L, Zhen S, Xiaoman X, Shengqi L. Mutations in the quinolone resistance determining region in isogenic mutant *Acinetobacter baumannii* strains. African Journal of Microbiology Research. 2013;7(27):3559-62.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### ŞEKİLLER

Şekil 1. Kinolon Halkası .....	16
Şekil 2. gyrA hedefli RT-PCR çoğalma eğrisi .....	36
Şekil 3. gyrA hedefli RT-PCR erime eğrisi .....	36
Şekil 4. gyrB hedefli RT-PCR çoğalma eğrisi .....	37
Şekil 5. gyrB hedefli RT-PCR erime eğrisi.....	37
Şekil 6. parC hedefli RT-PCR çoğalma eğrisi .....	38
Şekil 7. parC hedefli RT-PCR erime eğrisi.....	38
Şekil 8. gyrA geni RT-PCR ampliconlarının HRM profilleri.....	39
Şekil 9. gyrB geni RT-PCR ampliconlarının HRM profilleri.....	39
Şekil 10. parC geni RT-PCR ampliconlarının HRM profilleri .....	40
Şekil 11. gyrA DNA dizilimi karşılaştırılması.....	49
Şekil 12. parC DNA dizilimi karşılaştırılması .....	50
Şekil 13. gyrB DNA dizilimi karşılaştırılması .....	51
Şekil 14. gyrA, gyrB ve parC’de mutasyonun tabloda gösterilmesi .....	52

## TABLULAR

<b>Tablo 1.</b> <i>Acinetobacter</i> içinde yer alan bakterilerin tür adları ve genomik tipleri.....	4
<b>Tablo 2.</b> <i>Acinetobacter</i> türlerinin tanımlanması için basitleştirilmiş şema.....	6
<b>Tablo 3.</b> <i>Acinetobacter</i> 'lerde bulunan antibiyotik direnç mekanizmaları .....	13
<b>Tablo 4.</b> Kinolon grubu antibiyotiklerin farmakodinamik özelliklerine göre sınıflandırılması	14
<b>Tablo 5.</b> Ct ve Tm değerleri.....	34
<b>Tablo 6.</b> gyrA, gyrB ve parC gen RT-PCR ampliconlarının DNA dizilimlerine göre gruplandırılması.....	40
<b>Tablo 7.</b> Farklı genotiplerin DNA dizilimlerinin BLAST analizi sonuçları.....	42

## ÖZGEÇMİŞ

**Uğur KAYIŞ**

**Doğum Tarihi:** 15.03.1987

### **EĞİTİM:**

**1993-2001:** Babaeski Cumhuriyet İlköğretim Okulu

**2001-2004:** Babaeski İMKBÇPL Lisesi

**2009-2013:** Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

**2013- :** Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik A.D.

## **EKLER**



## Ek 1

### BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

<b>ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ</b>	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2014/175	
	PROTOKOL ADI	Acinetobacter Baumannii İzolatlarında DNA Gyrase Direnç Genleri Olan gyrA, gyrB ve parC Mutasyonlarının Real Time PCR Yöntemiyle Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI / ADI	Doç. Dr. Tammam SIPAHI	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Karar No: 19/06		Tarih: 22.10.2014
	Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Doç. Dr. Tammam SIPAHI'nin sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Uğur KAYIŞ'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>			
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

#### ÜYELER

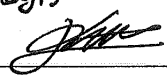
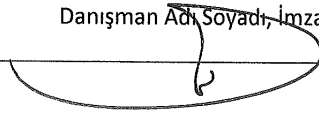
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Salim DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Bakı KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

\*Araştırma ile ilişki  
\*\*Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Recep YAĞIZ  
Dekan V.

Ek 2

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI  
ORJİNALLİK RAPORU

Öğrencinin Adı Soyadı: Uğur KAYIŞ										
Numarası:1138303102										
Anabilim Dalı: BİYOFİZİK										
Programı: <input checked="" type="radio"/> Yüksek Lisans <input type="radio"/> Doktora										
Tez başlığı/Konusu: <i>Acinetobacter baumannii</i> İzolatlarında DNA Gyrase Direnç Genleri Olan <i>gyra</i> , <i>gyrb</i> ve <i>parC</i> Mutasyonlarının Real Time Pcr Yöntemiyle Araştırılması										
<p style="text-align: center;"><b>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne</b></p> <p>Yukarıda açık adı bulunan tezimin "Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary" bölümlerinden oluşan toplam 62 sayfalık kısmına ilişkin 10/12/2015 Tarihinde tez danışmanım tarafından <i>turnitin</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı % 17 olarak belirlenmiştir.</p> <p><u>Uygulanan filtrelemeler;</u></p> <table><tr><td>1-Kabul ve Onay Sayfası hariç</td><td>6-Kaynaklar hariç</td></tr><tr><td>2-Teşekkür hariç</td><td>7-Şekiller Listesi hariç</td></tr><tr><td>3-İçindekiler hariç</td><td>8-Özgeçmiş hariç</td></tr><tr><td>4-Simge ve Kısaltmalar hariç</td><td>9-Ekler hariç</td></tr><tr><td>5-Gereç ve Yöntemler Hariç</td><td></td></tr></table> <p>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen maksimum benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin ispat edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu beyan ederim 10/12/2015</p> <p style="text-align: right;">Öğrencinin Adı Soyadı, İmza Uğur Koyi's </p> <p>Ek:Orijinallik Raporu (27 Sayfa)</p> <p style="text-align: center;"><b>UYGUNDUR</b> 10/12/2015</p> <p style="text-align: center;">Tammam SİPAHİ Danışman Adı Soyadı, İmza </p>	1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç	2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç	3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç	4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç	5-Gereç ve Yöntemler Hariç	
1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç									
2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç									
3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç									
4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç									
5-Gereç ve Yöntemler Hariç										