

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINDA OXA-23 VE
OXA-58 TİPİ GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE PFGE YÖNTEMİ İLE
KLONAL YAKINLIĞININ İNCELENMESİ**

ŞERAFETTİN KEYİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Uğur ARSLAN

KONYA

2013

ÖNSÖZ

Bu çalışmada hastane infeksiyonlarına neden olan karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında OXA-51, OXA-23 ve OXA-58 direnç genlerinin varlığı multipleks PCR metodu ile belirlendi. Daha sonra varlığı OXA-23 ile OXA-58 geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının klonal ilişkisi epidemiyolojik tiplendirmenin altın standardı olarak tanımlanan PFGE yöntemi ile araştırıldı. *A. baumannii* izolatlarının *Apal* ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE profillerinin, dendogramı oluşturuldu.

Tez çalışmamın her anında bilgi ve tecrübeleri ile her konuda bana yol gösteren, danışmanlığımı yapan çok saygı değer hocam sayın Doç.Dr. Uğur ARSLAN'a çok minnettarlığımı bildirir ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimin süresince bana gerek derslerimde gerekse laboratuvar çalışmalarında gerekli tecrübe ve bilgilerinden faydalandığım bölüm hocalarımız sayın Prof.Dr. Duygu FINDIK'a ve sayın Prof.Dr. E.İnci TUNCER'e ve tez çalışmamın laboratuvar alanın da bana yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Hatice TÜRK DAĞI'na teşekkür ederim. Tezimin PFGE çalışması aşamasında ve değerlendirme kısmında benden yardımlarını esirgemeyen Tuba BODUR'a ve Meral DEMİRAYAK'a ve tüm aşamalarda yardımcı olan Halit KUŞ'a teşekkür ederim. Ayrıca bana bu süre içinde her konuda destek olan maddi manevi her türlü desteklerini esirgemeyen, sıkıntılarımı paylaşan fedakar eşim Selda KEYİK'e ve çocuklarım Muhammet Kutalp KEYİK ve Hale Begüm KEYİK'e teşekkür ederim.

Ayrıca 11202038 nolu proje ile tezimin yürütülmesinde araç gereç ve maddi olanak sağlayan S.Ü. BAP koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Şerafettin KEYİK
KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÇİZELGE VE RESİM DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1 ACINETOBACTER CİNSİ.....	1
1.1.1 Taksonomi.....	1
1.1.2 Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri.....	2
1.1.3 Mikrobiyolojik Özellikler	4
1.1.4 Epidemiyoloji.....	4
1.1.5 Patogenez ve Virulans.....	6
1.1.6 <i>Acinetobacter</i> enfeksiyonları	7
1.1.7 <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonlarında Tedavi.....	11
1.1.8 Antibiyotiklere Direnç Sorunu.....	13
1.1.9 <i>Acinetobacter</i> Türlerinde Antibiyotiklere Direnç Sorunu.....	14
1.2 Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları:.....	14
1.2.1 Beta-laktamazlar	15
1.2.2 Karbapenemler	24
1.2.3 Metallo-Beta-Laktamazlar	26
1.2.4 PCR (Polimeraz Chain Reaction).....	27
1.2.5 Hastane Enfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Yöntemlerinin Önemi.....	28
1.2.6 Jel Elektroforezi	29
1.2.7 Pulsed-Field Jel Elektroforez	31
2. GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarının tanımlanması	34
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması:.....	34
2.2.1 Disk Difüzyon Yöntemi:.....	34
2.3 DNA izolasyonu.....	35
2.3.1 OXA-23, OXA-58 ve OXA-51 için Multipleks PCR	36
2.4 Agaroz jelin hazırlanması ve elektroforez	37
2.5 OXA-23 ve OXA-58 pozitif suşların PFGE yöntemi ile klonal yakınlığının araştırılması	38
2.5.1 PFGE de kullanılan solüsyon ve çözeltilerin hazırlanması.....	38
2.5.2 PFGE Yöntemi	40
3. BULGULAR.....	43
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
6. ÖZET.....	55
7. SUMMARY	56
8. KAYNAKLAR	57
9. ÖZGEÇMİŞ	66

ÇİZELGE VE RESİM DİZİNİ

Çizelge 1.1 <i>Acinetobacter</i> türlerinin tanımlanması için basitleştirilmiş şema (Tatman-Otkun 1998)	2
Çizelge 1.2 Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri.(Winn ve ark.2006)	17
Çizelge 1.3 Ambler sınıflamasına göre grup A , C v e D beta-laktamazlarda korunmuş üç bölgenin karşılaştırılması	20
Çizelge 1.4 Hastane enfeksiyonu etkenlerinin tiplendirme yöntemleri(Öztürk 2007)	29
Çizelge 1.5 PFGE profillerinin yorumlama kriterleri (Tenover ve ark. 1995, Durmaz 2001)	33
Çizelge 2.1 PCR çalışması için gerekli primer dizileri	36
Çizelge 2.2 OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 için multipleks PCR içeriği	37
Çizelge 2.3 PCR cihazının döngü siklusları	37
Çizelge 3.1 Klinik örneklerle göre OXA tipi suşların dağılımı	44
Resim 1.1 <i>Acinetobacter</i> 'de bulunan OXA beta-laktamazların filogenetiği (Walther-Rasmussen ve Hoiby 2006)	20
Resim 3.1 OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 bantlarının Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü.	43
Resim 3.2 OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli <i>A. baumannii</i> izolatlarının <i>Apal</i> ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE profillerinin, dendogramı (K; kan, İ; idrar, B; BOS, D; drenaj, KT; katater)	45
Resim 3.3 OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli <i>A. baumannii</i> izolatlarının <i>Apal</i> ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE profillerinin, dendogramı (K; kan, İ; idrar, B; BOS, D; drenaj, BL; bronko alveolar lavaj)	46

KISALTMALAR

AME	: Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim
AP-PCR	: Arbitrary Primed PCR
ATCC	: American Type Culture Collection
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CRAB	: Carbapenem Resistant Acinetobacter Baumanni
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EMB	: Eozin Metilen Mavisı
GN	: Gram Negatif
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
IPM	: İmipenem
IRT	: İnhibitör Dirençli TEM
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokoklar
MBL	: Metallo Beta-Laktamaz
mg	:Miligram
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	:Mililitre
OMP	: Dış Membran Proteinleri
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PCR	: Polimerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
TAE	: Tris-Asetat EDTA
TBE	: Tris-Borat EDTA
TSI	: Üç Şekerli Demirli Besiyeri
V	:Volt
VIM	: Veronese İmipenemaz
VİP	: Ventilatör İlişkili Pnömoni

1. GENEL BİLGİLER

1.1 ACINETOBACTER CİNSİ

1.1.1 Taksonomi

İlk kez Beijerinck tarafından 1911 yılında topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoacetius* olarak isimlendirilmiş ve Brisou ve Prevot 1954 yılında *Acinetobacter* ismini önermişlerdir (Parker 1983). *Acinetobacter*'ler *Moraxella* ve *Psychrobacter*'lerle birlikte *Moraxellaceae* ailesi içerisinde bulunan kısa, tombul, daha çok kokkoid formda gram negatif çomakçıklardır (Von Graevenitz 1995). *Acinetobacter baumannii*, yaklaşık 1–1,5µm X1.5-2,5 µm boyutlarında Gram negatif kok, ilk izolasyonda ve bir günlük taze kültürlerinde kokobasil formunda olup, subkültürlerinde veya penisilinli ortamda ürediklerinde basil şeklinde görülür. Oksidaz testi negatiftir. Mac Conkey besiyerinde genellikle ürer. Doğada yaygın olarak görülmekte ve insan deri florasında da bulunabildiğinden klinik örneklerden sıklıkla izole edilmektedir. *Acinetobacter* türleri özellikle vücudun nemli bölgeleri başta olmak üzere normal deri florasında yer alabilmektedirler. Normal sağlıklı bireylerin yaklaşık % 25'inin derilerinde *Acinetobacter* türlerini taşıdıkları gösterilmiştir (Schreckenberger ve Von Graevenitz 1999). Bouvet ve Grimont (1986)'un DNA-DNA hibridizasyon ve beslenme karakterlerine göre 12 farklı grupta sınıflandırmışlardır. 1989 yılında da Tjenberg ve Ursing 3 yeni DNA grubu tanımlamışlar ve 13'den 15'e kadar kodlamışlar ve aynı zamanlarda Bouvet ve Jeanjean 13'den 17'ye kadar 5 DNA grubu tanımlamışlardır. (Tjenberg ve Ursing 1989). Tjenberg ve Ursing tarafından tanımlanan 2 DNA grubu, Bouvet ve Jeanjean'ın tanımladığı DNA gruplarından fenotipik olarak farklıdır (Koneman ve ark. 2006). Bugüne kadar DNA/DNA hibridizasyonuna dayalı çalışmalara göre 32 genomik tür tanımlanmıştır (Giamarellou ve ark. 2008). *Acinetobacter* türleri arasında en sık ve en önemli klinik tablolara yol açan etken *A. baumannii*'dir (Speller ve Humphreys 1998). Rutin laboratuvar koşullarında, biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre *Acinetobacter* tür ayrımı yapılmaktadır (Çizelge 1.1). Glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 44 °C'de üreyebilen kökenler *A. baumannii*'dir (Bonomo ve Szabo 2006).

Çizelge 1.1 *Acinetobacter* türlerinin tanımlanması için basitleştirilmiş şema (Tatman-Otkun 1998)

TEST	<i>1-A. calcoaceticus</i>	<i>2-A. baumannii</i>	<i>3-Acinetobacter spp.</i>	<i>4-A. haemolyticus</i>	<i>5-A. junii</i>	<i>6-Acinetobacter spp.</i>	<i>7-A. johnsonii</i>	<i>8-A. Iwoffii</i>	<i>10- Acinetobacter spp.</i>	<i>11- Acinetobacter spp.</i>	<i>12-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, 10, 11: isimlendirilmemiş türler, +: %90-100 pozitif, -: %0-10 pozitif, D: (değişken):%11-89 pozitif

1.1.2 Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

İkişerli veya küme halinde görülürler. Saf kültürde Gram boyama, hücre boyutları ve düzeninde değişkenlik sıklıkla gözlenebilmektedir. Normalde düzgün bazen mukoid, yeşilimsi beyaz veya soluk sarı koloniler oluştururlar. Bazı çevresel

kaynaklı izolatlar kahverengi pigment oluşturmaktadırlar. Tüm türleri kesin aerop, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve nonfermentatifler. Oksidaz testi diğer nonfermentatiflerden çabuk ve kesin ayrımını sağlayan testtir. Genomik tür 4 olarak da tanımlanan *A. haemolyticus* koyun kanlı agarda hemoliz oluşturabilir. Türler arasında kesin ayrımı sağlayabilecek bir metabolik test yoktur (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Gerner-Smidt ve ark. 1991, Weaver ve Actis 1994).

Laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan besiyerlerinde kolaylıkla ürerler. Klinik örneklerden doğrudan izolasyon için diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe eden Herellea agar, Holton's agar, Leeds *Acinetobacter* Medium gibi seçici besiyerlerinin özellikle *Acinetobacter* salgınlarında antibiyotikler ilave edilerek kullanılmasında yarar vardır. Az sayıda bakterinin bulunabileceği çevre ortamlarından alınan kültürlerde amonyum veya nitrat tuzları içeren, pH'ı 5.5-6.0 olan çoğaltıcı sıvı besiyerleri kullanılabilir. Bazı genomik türlerinin 37°C ve üzerindeki sıcaklıklarda, bazılarının ise 30°C'de üreme özelliği göstermeleri gözönünde bulundurulmalıdır (Weaver ve Actis 1994, Jawad ve ark. 1994).

Epidemik suşların tiplendirilmesi yayılmanın kaynak ve şekli hakkında önemli bilgi verir. *Acinetobacter* türlerinin tiplendirilmesinde hiçbir sistem tek başına kabul görmemektedir ve bu konu halen önemli bir araştırma konusudur. Biotiplendirme, antibiyotik duyarlılık testleri, serotiplendirme, faj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme, protein profili, plazmid profili, multilokus enzim elektroforetik tiplendirme ve pulsed field jel elektroforez (PFGE) analizi, ribotiplendirme ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bu amaçla kullanılan sistemlerdir (Bauvet ve ark. 1990, Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Struelens ve ark.1993).

Glukoz asidifikasyon, koyun kanlı agarda hemoliz oluşturma ve diğer 28 fenotipik test ile yapılan tiplendirmelerin genotipik yöntemlerle uyumluluğu %78'dir. Ülkemizde de yaygın olarak kullanılan ve özellikle karbon asimilasyon testlerine dayanan API 20 NE (BioMerieux) sisteminin veri tabanı sadece *A. baumannii*, *A. haemolyticus* ve *A. lwoffii*, *A. junii*, *A. calcoaceticus* ve *A. johnsonii*'yi içermekte ancak *A. radioresistens* ve diğer genomik tipleri kapsamamaktadır. Genomik tipler arasındaki farklılıkların birbirine çok yakın olması nedeniyle bu sistem hassasiyet açısından problemlidir ve sonuçları gerçekçi değildir. Fenotipik identifikasyon yöntemleri tamamen güvenilir olmadığından klinik mikrobiyoloji

laboratuvarları bu konuda problemler yaşarlar (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Gerner-Smidt ve ark. 1991, Weaver ve Actis 1994).

1.1.3 Mikrobiyolojik Özellikler

Acinetobacter cinsi; non-fermantatif, zorunlu aerob, hareketsiz, pigmentsiz (bazıları sarı pigment yapabilirler), oksidaz negatif, nitratları redükte etmeyen, katalaz pozitif ve bazen ince kapsüllü bakterilerdir. Fimbriaları vardır ve flajellaları olmadığı için hareketsizdirler. Üremenin logaritmik fazında 1-1,5 x 1,5-2,5 µm boyutlarında basil, duraklama fazında ise kokobasiller şeklinde görülürler. Gram boyası ile Gram negatif kokobasil, diplokok, gram labil-kokobasiller şeklinde boyanabilirlerse de, bazen alkol ile dekolorizasyona dirençli olabilmektedirler (Giamarellou ve ark. 2008, Parker 1983, Graevenitz 1995, Bergogne-Berezin ve Towner 1996, Gerçekler 1999).

Solunum aygıtı ilişkili pnömoni ve bakteriyemilerin de içinde bulunduğu genel enfeksiyonların etiyolojik etkenleridir. Salgınlara yol açabilirler ve suşlar genellikle sefalosporin, aminoglikozid, florokinolon ve karbapenemler gibi sık kullanılan antibiyotiklere karşı dirençlidirler. Karbapenemaz aktivitesine sahip olan *A. baumannii* türlerinin enzimleri, plazmid ya da kromozomla dizgelenmiş ve OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 ile simgelenen birbirinden bağımsız klavulanik aside dirençli üç β-laktamazdır. *A. baumannii* karbapenem direncinde rolü olan intrinsik (kromozomda dizgelenen) karbapenemi hidrolize eden oksasilinaza da sahiptir. β-laktamazlara ek olarak, *A. baumannii*'deki karbapenem direnci porin ya da ve penisilin bağlayan proteinlerde oluşan değişiklikler sonucunda da gelişebilir. Bazı toplumlarda en etkili ilaçlar kolistin ve minosiklin olmasına karşın, artık bu ilaçlara karşı da direnç bildirilmeye başlanmıştır (Hawley 2008).

1.1.4 Epidemiyoloji

Diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında *Acinetobacter* türleri kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH derecelerinde yaşayabilme özellikleri ile cansız yüzeylerde günlerce canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler (Bergogne-Berezin ve Towner 1996, Allen ve Hartman 2000(1)). Solunum sistemi ekipmanları gibi nemli yüzeylerde ve insan derisi gibi kuru yüzeylerde yaşayabilmektedirler (Murray ve ark.2005). *Acinetobacter* türlerinin sağlıklı insanların derisinde, ağız florasında,

solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde bulunduğu gösterilmiştir (Koneman ve ark. 2006, Bergogne-Berezin ve Towner 1996). Bir çalışmada sağlıklı gönüllülerinin %40'ının derilerinde çeşitli *Acinetobacter* türleri taşıdığı bulunmuştur (Koneman ve ark. 2006). Hastaneye yatırılmış bireylerde salgın dönemlerinde %7-18 oranında boğaz taşıyıcılığı görülmekte iken trakeostomi sürüntülerinde bu oran %45' dir (Bergogne-Berezin ve Towner 1996). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların dışkılarında çoğul ilaç dirençli *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir (Schreckenberger ve ark. 2007). *Acinetobacter* türleri hastane havası, buhar makinesi, musluklar, yatak kenarları, tansiyon aletleri, anjiyografi kateterleri, mekanik ventilasyon cihazlarından izole edilmiştir (Bergogne-Berezin ve Towner 1996, D'Agata ve ark. 2000). *Acinetobacter* türleri hastane personelin derisinde sürekli taşınan en yaygın gram negatif bakterilerdir. Sağlık personeli, rezervuar insanlar ve cansız materyaller, hastalar arasında geçiş için uygun bir ortam sağlamaktadır (Bergogne-Berezin ve Towner 1996). *A. baumannii*' nin özellikle yoğun bakım ünitesine (YBÜ) yatan hastaların %71' ini yatışı takiben birinci haftanın sonunda kolonize ettiği ve bu hastalarda *A. baumannii* ile ilişkili enfeksiyonların arttığı gösterilmiştir (Nord ve ark. 1999). Özellikle YBÜ' de değişik risk faktörleri bu duruma etkili olmaktadır. Uzun süre hastanede yatmak, cerrahiye takiben endotrakeal tüp takılması, intravasküler, ventriküler veya üriner kateter uygulaması, invaziv alet varlığı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, parenteral beslenme ve mekanik ventilasyon gibi işlemler *Acinetobacter* enfeksiyonları için risk faktörü oluşturmaktadır (Allen ve Hartman 2000–1).

Acinetobacter taşıyıcılık oranı hastanede yatan hastalarda, topluma göre daha yüksektir ve kolonizasyonun boyutu hospitalizasyon boyunca artmaktadır (Seifert ve ark. 1997). Hospitalize hastalarda trakeostomi ve boğaz kültürü örneklerinde *Acinetobacter* türleri pozitif bulunmuştur. Özellikle mekanik ventilasyon gerektiren hastalardaki salgınlar solunum sistemindeki yüksek kolonizasyon oranı ile ilişkilendirilmiş ve aynı zamanda salgın boyunca hastaların derilerinde kolonizasyon saptanmıştır. Bazı çalışmalarda solunum sistemi ve gastrointestinal sistemde kolonizasyon, dirençli suşların major rezervuarı olarak bulunmuştur (Bergogne-Berezin ve Towner 1996). Thamlikitkul ve ark.(2003)'nin Tayland'da yaptıkları bir çalışmada ayaktan ve yatan hastaların deri floralarını incelemişler, yatan hastaların

derilerinde kolonize olan *Acinetobacter* türlerinin prevalansını ayaktan hastaların derilerinden daha fazla bulmuşlar ve bu bakterilerin de %62'sini *A. baumannii* olarak tanımlamışlardır (Thamlikitkul ve ark.2003). Son zamanlardaki çalışmalarda *A. baumannii* yiyeceklerden ve artropodlardan da izole edilmiştir. Bir çalışmada sokakta yaşayan insanlarda vücut bitlerinde de *A. baumannii* varlığı saptanmış, bunların enfeksiyonlar için kaynak olabileceği belirtilmiştir (Koneman ve ark. 2006, La Scola ve Raoult 2004). Bir başka çalışmada da çeşitli yiyeceklerde %17 oranında *Acinetobacter* türleri üretilmiş ve hastanede yatan hastalarda gastrointestinal kolonizasyon için gıdaların kaynak olabileceği vurgulanmıştır (Koneman ve ark. 2006).

Afganistan ve Irak-Kuveyt bölgesinde yaralanan ve hastaneye yatan 102 hastanın kan kültürlerinde *A. baumannii* üremiştir. Vietnam savaşı sırasında ekstremiteler yaralanmalarında en sık izole edilen Gram-negatif bakteri *A. baumannii* olmuştur. Afganistan'dan dönen Kanadalı askerlerde çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter*'e bağlı ventilatör ilişkili pnömoni tanımlanmıştır. Tüm bu olgularda kaynak bilinmese de, *Acinetobacter* türleri nemli ve kuru ortamda yaşayabildiği için çevresel kontaminasyon düşünülmüştür (Koneman ve ark. 2006)

Hastanelerde cansız nesnelere *Acinetobacter* ile 5 ay kadar uzun bir süre kolonize olabilmektedir. En sık kaynaklar; ventilatörler, yataklar, yastıklar, karyolalar, distile su kapları, idrar kapları, intravenöz nütrisyon ekipmanları, içme suları, elektrokardiyografi topuzları, infüzyon pompaları, lavabolar, yıkama havuzları, duşlar, çelik servis masaları, taşınabilir radyoloji ekipmanları, çarşaflar, sabunluklar, termometreler, buhar makineleri, nebulizörlerdir. *Acinetobacter* türlerinin hastanelerde yataklar gibi cansız yüzeylerde yaşayabildiğine dair birçok çalışma vardır ve sağlık çalışanlarının ellerine bulaşmaktadırlar (Koneman ve ark. 2006, Bergogne-Berezin ve Towner 1996). Bu bakterilerin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlar, en çok hastane personelinin elleri ile tüm çevrenin kontamine edilmesine bağlı gelişmektedir. Hastane odalarındaki tozlar, etken için potansiyel bir rezervuar oluşturabilmektedir (Kaya ve ark. 2000).

1.1.5 Patogenez ve Virulans

Acinetobacter cinsi bakteriler genel olarak virulansı düşük patojenlerdir. Konak savunma mekanizmaları normal olan bireylerde enfeksiyon oluşturmaları

oldukça güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (Speller ve Humphreys 1998, Taşova ve ark. 1999). Malignite, yanık, konağın savunma sistemini baskılayan durumlar ve konağın yaşı enfeksiyon gelişimini kolaylaştıran bazı faktörlerdir. Ağır cerrahi girişim, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma, uzun süreli antibiyotik kullanımı, damar içikateterizasyon, enteral beslenme, idrar sondası, endotrakeal tüp ve trakeostomi varlığı başlıca risk faktörleridir. Son 30 yıldır hastane ortamında yeni, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanımı, hem *Acinetobacter* türleri ile gelişen Hİ oranını arttırmış hem de bu bakterilerde birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmesine neden olmuştur. Antibiyotik kullanma alışkanlıkları ve çevresel faktörlerin katkısı ile antibiyotik direnci hastaneler, şehirler ve ülkeler arasında farklılık göstermektedir (Speller ve Humphreys 1998, Taşova ve ark. 1999).

Acinetobacter cinsi bakteriler genel olarak düşük virulanslı olarak kabul edilmelerine rağmen virulanstan sorumlu faktörler de vardır;

1- Polisakkarit kapsül: L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşup, bakteri yüzeyinin hidrofilik olmasını sağlar ve fagositozdan korur. Ek olarak intravenöz kateter, trakeal kanül gibi yüzeylere tutunmayı kolaylaştırır.

2- Fimbria ve/veya kapsüler polisakkarit: İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar.

3- Lipopolisakkarit ve lipid A: Hücre duvarında bulunan lipid A potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırır.

4- Dokulardaki lipidleri yıkan enzimler üretirler.

5-Aerobaktin ve siderofor gibi demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilmektedir. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda antibiyotik direnci sağlayan PER-1 enziminin virülansı arttırdığı ve klinik olarak daha ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (Speller ve Humphreys 1998, Goel ve Kapil 2001, Vahaboğlu ve ark. 2001).

1.1.6 *Acinetobacter* enfeksiyonları

Acinetobacter spp.'ler doğada yaygın bulunurlar. İnsanda deri florasında yer aldıklarından klinik örneklerden izole edilebilirler. Zaman zaman fırsatçı patojen bakteriler olarak enfeksiyon yaparlar. Genitoüriner sistem enfeksiyonları (kateter

uygulanmasına bağlı sistit ve piyelonefrit gibi), intrakraniyel enfeksiyonlar (cerrahi girişimlerden sonra görülen menenjit gibi), solunum sistemi enfeksiyonları (intübasyon ve trakeostomi sonrası), yumuşak doku enfeksiyonları oluşturan fırsatçı enfeksiyonlardandır (Baysal 1999). *Acinetobacter* enfeksiyonları sıklıkla hastane kaynaklı olmasına rağmen toplum kökenli alt solunum yolu enfeksiyonlarından da izole edilmiştir (Allen ve Hartman 2000-2). Mahgoub ve ark.(2002)'nin yaptıkları çalışmada, mekanik ventilasyon, trakeostomi ve Foley kateter uygulamasının hastane ortamında *A. baumannii* bulaşması ile kuvvetle ilişkili olduğunu ve önceden antibiyotik kullanımının tüm izolatlar için en sık risk faktörü olduğunu bulmuşlardır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada *A. baumannii*, hastane kökenli pnömoni etkenleri arasında %24 oran ile ilk sırada yer almıştır. Bu olguların önemli bir kısmının ventilatörle ilişkili pnömoni olduğu dikkati çekmektedir (Akalın ve ark.1999).

1.1.6.1 Hastane enfeksiyonları:

Acinetobacter türleri septisemi, pnömoni, endokardit, menenjit, cilt, yara ve üriner sistem enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlardan izole edilebilmektedirler. Diğer gram negatif bakterilerle oluşan nozokomiyal enfeksiyonlarla bölgesel farklılık göstermezler. Uygulanan tanı veya tedavi amaçlı invaziv girişimlere bağlı olarak daha çok yoğun bakım ünitelerinde ortaya çıkabilmektedirler. İzole edilen *Acinetobacter* suşlarının çoğunlukla enfeksiyon yerine kolonizasyon kaynaklı olmasından dolayı oluşan enfeksiyonların gerçek sıklığını tahmin etmek zordur (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Struelens ve ark.1993).

1.1.6.2 Solunum sistemi enfeksiyonları:

Yoğun bakım ünitelerinde nozokomiyal pulmoner enfeksiyon salgınları çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmektedir ve bunların başında ventilatör kaynaklı pnömoniler ilk sırayı almaktadır. Yayınlanmış birçok araştırmaya göre nozokomiyal pnömonilerin %3-12'sini *Acinetobacter*'ler özellikle de *A. baumannii* oluşturmaktadır. Alt solunum yollarında *Acinetobacter* kolonizasyonu veya pnömoni oluşmasında ilerlemiş yaş, kronik akciğer hastalıkları, immünsüpresyon, cerrahi girişimler, gastrik ve endotrakeal tüp kullanımı gibi risk faktörleri rol oynamaktadır. Ventilatör kaynaklı *Acinetobacter* hastane enfeksiyonu pnömonisi olan hastalarda ölüm oranı %30-75'dir. Bu enfeksiyonların prognozu *P. aeruginosa* dışındaki diğer

gram negatiflerle oluşan pnömonilerden çok daha ağırdır (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Lortholary ve ark. 1995, Pennington 1995).

1.1.6.3 Bakteriyemi:

En sık rastlanan tür *A. baumannii*'dir. Bazen tek başına patojen olarak izole edilirken bazen de polimikrobiyal bakteriyemilerde yer almaktadır. Yetişkinlerde immün yetmezlikli hastalar en büyük grubu oluşturmaktadırlar. Bu hastalarda kaynak genellikle solunum sistemi enfeksiyonlarıdır ve hospitalizasyonun ikinci haftasında ortaya çıkar. Maligniteler, travma, yanık diğer sıklıkla görülen predispozan faktörlerdir. Yetişkinlerde bakteriyemi ile sonuçlanan cerrahi yara ve yanık enfeksiyonları sıklıkla görülmektedir. Vasküler kateterizasyon uygulamaları *Acinetobacter* enfeksiyonları için risk faktörleri olarak kabul edilmekte ve asepsi kurallarına uyularak 48 saatte bir kateterlerin değiştirilmesi bu riski azaltmaktadır. Yenidoğanlar ikinci önemli hasta grubunu oluştururlar ve predispozan faktörler; düşük doğum ağırlığı, önceden uygulanan antibiyotik tedavileri, mekanik ventilasyon ve neonatal konvülsiyonlar olarak sayılabilir. *Acinetobacter* enfeksiyonu görülen yanık ve maligniteli hastalarda prognoz kötüdür (Ng ve ark.1989, Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Tilley ve Roberts 1994).

A. baumannii bakteremisinin prognozu hala belirsizdir. Bazı çalışmalar prognozun kötü olduğunu savunurken, bazı çalışmalar ise mortaliteyi bakteremiye bağlamaktadırlar (Cisneros ve Rodriguez-Bano 2002). *A. baumannii*'ye bağlı bakteremiler en sık yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Bilinen risk faktörleri; uzun süre hastanede yatış, invaziv prosedürler (santral venöz kateter, mekanik ventilasyon, cerrahi), daha önce başka bir serviste yatış, enteral beslenme, üriner kateter, immunsupresyon, nötropeni, geniş spektrumlu antibiyotik ile tedavidir (Cisneros ve Rodriguez-Bano 2002, Valero ve ark. 2001).

1.1.6.4 Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları:

Sekonder menenjit sıklıkla görülmekle birlikte, kafa travması ve beyin cerrahisi uygulamalarından sonra oluşan sporadik vakalar da bildirilmektedir. Yetmişli yıllardan evvel bildirilmiş vakaların çoğunluğunu toplumsal kökenli olgular oluşturmaktaydı. Oysa günümüzde vakaların büyük kısmı hastane kaynaklı *A. baumannii* enfeksiyonlarıdır. Bu tip olgularda mortalite oranı %20-27'dir. Ventrikülostomi, beyin-omurilik sıvısı fistülleri, beş günden fazla tutulan ventriküler

kateterler ve beyin cerrahisi yoğun bakım ünitelerinde aşırı antibiyotik kullanımı sıklıkla karşılaşılan risk faktörleridir (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Lortholary ve ark. 1995, Seifert ve ark. 1995).

1.1.6.5 Üriner sistem enfeksiyonları:

Acinetobacter türleri ile oluşan hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonları oldukça nadirdir. Genellikle yaşlı, debil, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve sürekli üriner kateteri olan hastalarda görülmektedir. Prostatik genişleme nedeniyle kateter kullanımına bağlı olarak hastaların %80'i erkektir. Ancak şu da bir gerçektir ki, üriner kateter taşıyan hastalardan izole edilen her *Acinetobacter* gerçek enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilmemelidir (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Lortholary ve ark. 1995, Warren 1995).

1.1.6.6 Diğer *Acinetobacter* enfeksiyonları:

Klinik olarak diğer etkenler ile gelişen endokarditlerden ayrılamayan endokardit, periton diyalizi ile ilişkili peritonit, perkütan transhepatik kolanjiografi ve perkütan safra drenajıyla ilişkili kolanjit, pankreas ve karaciğer abseleri, otolog kemik iliği transplantasyonundan sonra gelişen tiflit, osteomyelit, travma sonrası ekstremitte enfeksiyonu, travma ve keratoplasti sonrası oftalmik enfeksiyonlar bildirilen diğer nadir olgulardır (Bergogne-Berezin ve Towner 1996).

Yanık yoğun bakım ünitesinde 5 yılda görülen nozokomiyal enfeksiyonları incelemişler ve en sık etken olarak *Acinetobacter* türlerini bildirmişlerdir (Chim ve ark.2007). Davis ve ark.(2005)'ı Irak'ta yaralanan 23 askerin yara kültürlerinde *A. calcoaceticus-baumannii complex* saptamışlar ve bu hastaların 15'inde osteomyelit, 3'ünde derin yara enfeksiyonu ve 2'sinde yanık yarası tanımlamışlardır. Bachmayer ve ark.(2005)'ı AIDS'li bir hastada follikülit etkeni olarak *A. baumannii* izole etmişlerdir. Levy ve ark.(2005)'ı ise keratoplastiden sonra gelişen korneal greft ülser ve endoftalmit olgularını bildirmişlerdir.

1.1.6.7 Predispozan Faktörler:

Acinetobacter türleri ile oluşan nozokomiyal enfeksiyonlarda birçok predispozan faktör saptanmıştır. Büyük cerrahi girişimler sonrasında, malignitelilerde, yanıklarda ve immün sistemi baskılanmış özellikle yaşlı hastalarda ve yenidoğanlarda *Acinetobacter* türleri ile oluşmuş hastane enfeksiyonları karşımıza

çıkılmaktadır (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Lortholary ve ark. 1995, Tilley ve Roberts 1994, Dijkshoorn ve ark.1993).

Pnömoni ve alt solunum yolları kolonizasyonunda rol oynayan ilerlemiş yaş, kronik akciğer hastalığı, immün yetmezlik, cerrahi girişim, antibiyotik kullanımı, endotrakeal ve gastrik tüp kullanımı, mekanik ventilasyon ile uzun süreli hospitalizasyon gibi risk faktörleri yoğun bakım ünitelerinde oluşan hastane enfeksiyonlarında rol oynar. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı normal florayı ortadan kaldırmakta ve *Acinetobacter* gibi dirençli mikroorganizmaların seleksiyonuna neden olmaktadır (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Lortholary ve ark. 1995, Dijkshoorn ve ark.1993).

Acinetobacter'ler patojenitesi düşük bakterilerdir. Polisakkarid kapsülün bakterinin yüzeyini daha hidrofilik yapması, fibriolarının epitel hücrelerine adezyon yeteneği, doku lipidlerini parçalayan enzimlerin üretilmesi, hücre duvarındaki lipid A ve lipopolisakkaritlerin toksik etkileri virulansı arttırmaktadır. İn vivo oluşturdukları endotoksinler muhtemelen *Acinetobacter* septisemisi sırasında oluşan semptomlardan sorumludur. Karışık enfeksiyonlarda virulansın artmasından sorumlu en önemli faktör slime oluşturmalarıdır. Ancak yaklaşık %14'ü slime oluşturmaktadır. Slime nötrofillere karşı sitotoksikite ve peritoneal eksüdaya nötrofil migrasyonunun inhibisyonunda rol oynar. Ancak slime miktarı ile virulansın derecesi arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Üremesi için gerekli demiri insan vücudundan sağlaması diğer bir virulans özelliğidir. Aerobaktin gibi sideroforlar ve dış membran reseptör proteinleri ürettiği gösterilmiştir (Bergogne-Berezin ve Joly-Guillou 1991, Lortholary ve ark. 1995, Tilley ve roberts 1994).

1.1.7 *Acinetobacter* Enfeksiyonlarında Tedavi

Acinetobacter cinsi bakteriler *A. lwoffii* dışında birçok antibiyotiğe direnç geliştirmişlerdir. *A. lwoffii* diğerlerinden daha duyarlı iken en dirençli tür *A. baumannii*'dir. Genel olarak penisiline, ampiciline, sefalotine ve çoğunlukla kloramfenikole dirençlidirler. 2. ve 3. kuşak sefalosporinlere ve trimetoprim-sulfametoksazole karşı değişken duyarlılıkları vardır. Son yıllarda *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozidlere, kinolonlara ve karbapenemlere direnci de kapsayan çoğul dirençli suşlar bildirilmiştir (Koneman ve ark.2006, Van Looveren ve Goossens 2004).

A. baumannii enfeksiyonlarının tedavisi, bu mikroorganizmanın birçok antibiyotiğe dirençli olmasından dolayı oldukça güçtür. Karbapenemler, sulbaktam ve kolistin en etkili antibiyotikler olarak görünmektedir (Akalin 2003).

İmipenem ve meropenem orta düzeyde dirençli *A. baumannii*'nin kullanıldığı in vitro çalışmalarda rifampisin + kolistin kombinasyonu sinerjik etkili bulunmuştur (Hogg ve ark. 1998). İmipenem, doksisisiklin ve amikasin duyarlı *A. baumannii*'nin kullanıldığı deneysel fare pnömoni modelinde ise imipenem + amikasin veya doksisisiklin + amikasin kombinasyonu imipenem monoterapisinden daha etkili bulunmamıştır. Bu çalışmada doksisisiklin + amikasin kombinasyonu in vitro olarak sinerjik etki göstermiştir (Rodriguez-Hernandez ve ark. 2000).

Sulbaktama duyarlı *A. baumannii*'nin kullanıldığı deneysel pnömoni modelinde, sulbaktam imipenem kadar etkili bulunmuş, bir başka çalışmada ise levofloksasinin imipenem veya amikasin ile kombinasyonu, levofloksasin monoterapisinden daha etkili bulunmamıştır (Rodriguez-Hernandez ve ark. 2001, Joly-Guillou ve ark.2000). Sulbaktam, *Acinetobacter* türleri üzerine bakterisidal etkilidir. Beta laktam antibiyotikle kombine edilmiş sulbaktam (sefoperazon + sulbaktam, ampisilin + sulbaktam) tedavide iyi bir alternatiftir (Williams1997).

Çoğul dirençli suşlara etkili antibakteriyel ajanlardan birisi de kolistindir (Koneman ve ark. 2006). İmipenem dirençli *A. baumannii* suşlarında sulbaktama da direnç bildirilince tek tedavi seçeneği polimiksinler olmuştur. Polimiksinler 1950 ile 1980 yılları arasında kullanılmış olsa da, nefrotoksisite, nörotoksisite ve nöromusküler blokaj yaptığı, yeni ve daha güvenli antimikrobiyaller bulunduğu için kullanımdan kalkmıştır. Son çalışmalarda ise bu yan etkiler daha az sıklıkta bulunmuştur. Kolistinin etki mekanizması; bakteri dış membranındaki lipopolisakkaritler ile elektrostatik ilişkiye girerek bakteri hücre membranında düzensizlik yapmasıdır. Kolistin, lipopolisakkarit moleküllerini stabil halde tutan magnezyum ve kalsiyumun yerini değiştirerek dış membranda bozulmaya ve permeabilitenin bozulması ile bakterinin ölümüne neden olmaktadır (Akalin 2007). Son yıllarda çoklu dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *A. baumannii* enfeksiyonlarında tedavide tekrar kullanılmaya başlanmış ve rifampin, meropenem, azitromisin gibi başka antibiyotikler ile kombine kullanılmıştır (Akalin 2007, Perez ve ark. 2007). Polimiksin B ile rifampin veya imipenem ya da üçünün kombinasyonu OXA-23 yapanlar dışında imipenem dirençli suşlara karşı sinerjik etkili olmaktadır.

Bu kombinasyonlarda kolistinin dış membranın hızla permeabilizasyonuna ve diğer ajanların hücre içine girişine izin verdiği düşünülmektedir (Perez ve ark. 2007). Çoğul dirençli suşlara bağlı gelişen nozokomiyal pnömonilerde bu antibiyotiğe klinik yanıt %25–73 arasında değişebilmektedir. Bakteremilerde ise bu oran %66–88 arasındadır ve daha etkilidir. Özellikle VIP’lerde inhalasyon yolu ile de verilebilmekte ve menenjitlerde intraventriküler veya intratekal uygulanabilmektedir (Akalin 2007).

Çoklu dirençli *A. baumannii*’ye karşı önemli ajanlardan biri de tigesiklidir. Tigesiklin’in *A. baumannii*’ye karşı in vitro aktivitesi çok iyidir (Noskin 2005, Perez ve ark. 2007). Tigesiklin minosiklin türevidir glisiklin grubundan bir antibiyotiktir ve tetrasikline karşı bakterilerin geliştirdikleri iki önemli direnç mekanizmasından etkilenmez. Pompa mekanizması için tigesiklin zayıf substrattır ve bakteri ribozomlarına tetrasiklinin bağlanmasını engelleyen Tet (M) proteininin neden olduğu değişiklikten tigesiklin etkilenmez (Stein ve Craig 2006, Akalin 2007). Polimiksin B’den sonra *A. baumannii*’ye en etkili ilaçtır (Noskin 2005). Karbapenemaz üreten *Acinetobacter* suşlarına karşı etkili bulunmuştur (Akalin 2007).

Yeni bir karbapenem olan doripenem de *A. baumannii*’ye karşı umut verici bir antibiyotiktir, fakat OXA–23 ve IPM–4 yapan suşlara karşı etkili değildir (Perez ve ark. 2007).

1.1.8 Antibiyotiklere Direnç Sorunu

Günümüzde antibiyotiklerin düzensiz kullanımının artması, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve immün sistemi bozulmuş hasta sayısının artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Antibiyotiklerin uygunsuz ve gelişmiş kullanımını ile gerek toplum kökenli gerekse de hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde önemli sorunlar yaşanmaktadır. Direnç sorununun daha yoğun olarak yaşandığı yerler antibiyotik kullanımının daha yoğun olması nedeni ile hastanelerdir. Ülkemizde hastanelerde en sık direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalar; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Koagülaz negatif stafilokoklar* (KNS), *Enterobacter spp*, *Enterokoklar*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp* dir (Usluer 2002, Yücesoy ve ark. 2000).

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

A. İntrinsik Direnç (Doğal Direnç): Bir bakterinin genetik özelliği nedeniyle bazı antibiyotiklere olan doğal direncini tanımlar.

B. Kazanılmış Direnç: Bakterinin genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak; ya kromozom, transpozon veya plazmid DNA'sındaki mutasyonlarla ya da direnç geni taşıyan DNA dizilerinin başka bakterilerden transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla alınması sonucu ortaya çıkan dirençtir.

C. Çevre ve Koşullara Bağlı Direnç: Antibiyotiklerin invitro ve invivo etkinliklerinin farklılık göstermesine neden olan dirençtir. Dokudaki pH değişiklikleri, antibiyotiğin enfeksiyon bölgesine ulaşamaması ve oksijen basıncı değişiklikleri gibi nedenlerle invitro testlerde etkili olarak değerlendirilen antibiyotik invivo koşullarda etki göstermeyebilir (Cunha 2000, Mayer ve Opal 1994).

1.1.9 *Acinetobacter* Türlerinde Antibiyotiklere Direnç Sorunu

Bugün *Acinetobacter* cinsi bakterilerin birçok ilaca dirençli olmaları, genetik değişikliklere uygun olduğu kadar antibiyotiklere karşı çabuk direnç geliştirebilme yeteneklerine bağlanmaktadır. Son zamanlarda karbapenem duyarlı ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz yapan *A. baumannii* izolatlarında 40'dan fazla direnç geni saptanmış ve bu suşların genetik değişkenliği gösterilmiştir. Bu özelliği bu bakteriye antibiyotik baskısı devam ettiği sürece çeşitli direnç mekanizmalarından faydalanma yeteneği vermektedir (Giamarellou ve ark. 2008). Bundan 30 yıl kadar önce birçok antibiyotiğe duyarlı bir bakteri iken bugün çoklu dirençli bir bakteri haline gelmişlerdir. Direnç geliştirirken çeşitli mekanizmalardan faydalanmaktadır ve aynı izolatta birkaç direnç mekanizması bulunabilmektedir (Hartzell ve ark. 2007, Slama 2008). Birçok bölgede *Acinetobacter* türleri aminoglikozidlere, sefalosporinlere, florokinolonlara dirençli bulunmuşlardır. Sonuç olarak ampirik tedavi problemleri bir hal almış ve relapslar daha yaygınlaşmıştır (Slama 2008).

1.2 Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları:

Tanımlanan direnç mekanizmaları şunlardır;

A-Beta laktamaz ile hidroliz,

B-Dış membran proteinlerinde (OMP) ve penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklik,

C-Efflux pompa aktivitesinin artması (Giamarellou ve ark. 2008, Perez ve ark. 2007).

1.2.1 Beta-laktamazlar

Penisilinazın 1940 lı yıllarda Abraham ve Chain tarafından bulunmasından sonra günümüze kadar yaklaşık 400 civarında beta-laktamaz enzimi tanımlanmış ve beta-laktamazların sayı ve çeşitlerindeki artış bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu kılmıştır. 1973 yılında Richmand ve Sykes tarafından beta-laktamazlar sınıflandırılmış bu sınıflandırma 1976 yılında ise Sykes ve Matthew tarafından genişletilmiştir (Patricia ve Bradford 2001, Gür 1996, Bush1989).

β -laktam halkası içeren antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının en önemlisidir. Penisilinler, sefalosporinler ve benzer şekilde β -laktam halkası içeren antibiyotikleri hidrolize eden enzimlerdir. Bu enzimler penisilinler, 1. kuşak sefalosporinleri etkin bir biçimde parçaladıkları halde, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanlara kısıtlı etki göstermektedirler. 1980'li yıllardan itibaren genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanların tedavi amaçlı yaygın olarak kullanımları sonucunda, bu ana beta-laktamaz enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak yeni enzimler gelişmiştir. Bunlar genişlemiş spektrumlu β -laktamazlardır. Şimdiye kadar 200'ün üzerinde GSBL tanımlanmıştır (Akova 2004).

GSBL'ler geniş spektrumlu sefalosporinleri (Örneğin: sefotaksim, seftazidim), monobaktamları hidrolize edebilirler ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri ile inhibe edilebilirler (Akova 2004, Dolapçı 2005, Naas ve ark. 2008). Sefamisinlere (sefoksitin, sefotetan) etkili olmamaları ile AmpC tipi beta laktamazlardan ayrılırlar. Bu durumun istisnaları da olabilmektedir. Örneğin TEM-52 moksolaktam ve sefotetani hidrolize edebilmektedir (Akova 2004).

Beta-laktamaz üretiminden sorumlu genler kromozomlar, transpozonlar ve plazmidler de olabilirler. Bunlardan en önemlisi plazmidlerde yerleşik olan direnç genleridir. Çünkü bu genler plazmidler ile konjugasyon yolu ile mikroorganizmalar arasında kolayca aktarılabilmektedirler. Ayrıca GSBL üreten suşlar, aynı zamanda aminoglikozidler, fluorokinolonlar ve kotrimoksazol gibi diğer antibiyotiklere de

dirençli olabilmektedirler. Bunun nedeni GSBL'yi kodlayan genler ile aminoglikozid modifiye edici enzimler (AME) gibi direnç genlerinin aynı birleşik plazmidde kodlanması ve bir suştan diğerine birlikte geçebilmeleridir (Dolapçı 2005).

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırmaları kullanılmaktadır. 1980 yılında Beta-laktamazlar Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır.

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

Sınıf B: Aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallobetalaktamazlardır.

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

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır.

1995 yılında Bush ve arkadaşları substrat özgüllüğü ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığının temel alındığı biyokimyasal özelliklerine göre fenotipik sınıflandırma ile tüm enzimleri 4 gruba ayırmışlardır (Çizelge1.2) (Bush ve ark. 1995). Bu sınıflandırma klinik mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyogram değerlendirmede üstünlük sağlarken, tek bir nokta mutasyonu ile substrat özgüllüğünün değişebilmesi ise dezavantajdır. Beta-laktamazların nükleotid dizilenmesini esas alan Ambler sınıflaması ise mutasyonlardan etkilenmemektedir (Yüce 2001, Gür1996, Bush 1989).

Çizelge 1.2 Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri.(Winn ve ark.2006)

Beta – laktamaz grubu	Alt Grup	Moleküler sınıf (Ambler)	Substrat	Özellik
1		C	Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (ancak plazmitte de kodlanabilir)Klavulanik asitle inhibe olmaz
2		A,D		Birçoğu klavulanik asitle inhibe olur.
	2a	A	Penisilinler	Stafilokok ve enterekoklardaki penisilinazlar
	2b	A	Penisilinler, Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu betalaktamazlar(TEM-1,TEM-SHV-1)
	2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu Sefalosporinler	Oksiimmunosefalosporin ve monobetalaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar(GSBL)
	2br	A	Penisilinler	İnhibitörlere dirençli TEM(IRT) betalaktamazlar
	2c	A	Penisilinler	Karbenisilini hidroliz eden Enzimler
	2d	D	Penisilin, Oksasilin	Oksasilini hidroliz eden Klavulanik asit ile az inhibe olurlar
	2e	A	Sefalosporinler	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar
	2f	A	Penisilin, Sefalosporin, Karbapenemler	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgedeserin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler
3	3a,3b, 3c	B	Karbapenemler dahil bir çok beta-laktam	Metallo-Beta-laktamazlar
4		?	Penisilinler	Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş

1.2.1.1 Grup 1 (Amp C) beta-laktamazlar

Çoğunluğunu kromozomal enzimlerin oluşturmasına rağmen kromozomal Amp C beta-laktamaz genlerinin plazmidlere transferi ile oluşan plazmid

kontrolünde olan beta-laktamazlar da bu grupta yer almaktadır. Moleküler sınıflamada sınıf C'de yer alırlar (Negri ve ark. 2000). Bu gruptaki enzimler 1., 2., 3. kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize edebilirler. Bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmekle birlikte karbapenemler üzerine etkileri azdır. Bu enzimler aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle klavulanik asit ve sulfonların beta-laktam halkalarına bağlanmazlar. Bu nedenle de betalaktamaz inhibitörleri olan klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler (Wiedemann Bi Dietz ve Preifle 1999, Wiedemann Bi Dietz ve Preifle 1998, Mederios 1997).

1.2.1.2 Grup 2 beta-laktamazlar:

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

Grup 2a: Bu grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asitle inhibe olan enzimler bulunmaktadır. Gram pozitif bakterilerde bulunan penisilinazların birçoğu bu grup içerisinde yer almaktadır. Bu gruptaki enzimler penisilini sefalosporinlerden daha hızlı hidrolize etmektedir (Mederios 1997, Bush ve ark. 1995, Livemore 1995).

Grup 2b: Bu grup içinde yer alan enzimler klavulanik asit ile inhibe olan penisilin ve sefalosporinleri içermektedir. Hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta-laktamazlar içerirler. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu grupta yer almaktadır (Livemore 1998, Yuluğ 1997).

Grup 2be: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları (GSBL) içeren gruptur. Oksiimino beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile geniş spektrumlu beta-laktamları da etkileyen, oksiiimino-aminotiazolil sefalosporinleri hidrolize eden yeni beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır. Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır (Yuluğ 1997). GSBL'lar sefoksitin, sefotetan klavulanik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Özellikle *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimi ilk kez Türkiyede saptanmıştır (Danel ve ark.1995, Vahapoğlu ve ark.1995).

Grup 2br: TEM ve SHV enzimlerinin beta-laktam inhibitörlerine dirençli mutantları bulunmaktadır. Klavulanik asitten etkilenmeyen, GSBL'lar bu grupta yer almıştır. İnhibitörlere dirençli enzimlerin çoğu TEM türevidir olduğu için inhibitörlere rezistan TEM (IRT) olarak adlandırılır TEM-30'dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi bu gruptadır (Bush ve ark. 1995).

Grup 2c: Bu grup içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asit gibi betalaktamaz inhibitörlerine duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, BRO-1 ve 2 enzimleri, AER-1, SAR-1 enzimi de bu gruptadır (Bush ve ark. 1995).

Grup 2d: D grubu beta-laktamazlar (OXA-ailesi) oksasilinaz olarak adlandırılmaktadırlar. OXA-tip enzimler oksasilini benzilpenisilinden daha hızlı hidroliz etmektedir (Poirel ve Nordmann 2006). Bu enzimler penisiline, kloksasiline, oksasiline ve metisiline direnç gösterirler. Klavulanik asit ile zayıf inhibe olurlar. NaCl'ün inhibitör etkisi vardır. D grubu beta-laktamazlar C veya A grubu beta-laktamazlara amino asit düzeyinde %16 benzerlik gösterirler. OXA genlerinin plazmid ya da integron üzerinde bulunması yayılımını kolaylaştırmıştır (Helfand ve Bonomo 2003). Şimdiye kadar protein düzeyinde 121 farklı tür D grubu beta-laktamaz belirlenmiştir. Bunlardan 45 tanesi diğer D grubu beta-laktamazların aksine karbapenem hidroliz aktivitesine sahiptir (Walter-Rasmussen ve Hoiby 2006). OXA-1'den OXA-10'a kadar olan beta-laktamazlar dar spektrumlu enzimlerdir ve tercih ettikleri substrat oksasilin ve kloksasilindir. Amino asit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiminosefalosporinleri hidroliz eden geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir. Bunlar OXA-11, OXA-13-19, OXA-28, -31, -32, -35, -45 GSBL'dir (Gür 2005).

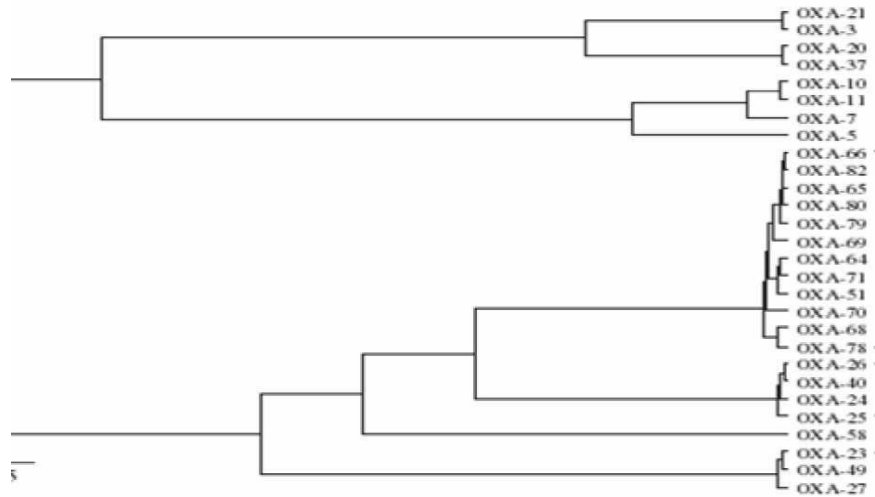
D grubu beta-laktamazların aktif bölgelerinde korunmuş üç motif bulunmaktadır (Çizelge 1.3). Bu motiflerin enzim reaksiyonları sırasında substrat enzim etkileşimlerini kararlı hale getirmede görev alan hidrojen bağlarının ve diğer kovalent olmayan bağların oluşumunda görev aldığı bilinmektedir (Paetzel ve ark.2000).

Çizelge 1.3 Ambler sınıflamasına göre grup A , C v e D beta-laktamazlarda korunmuş üç bölgenin karşılaştırılması

	1. element	2.element	3.element
Grup A	Ser ⁷⁰ -X-X-Lys ⁷³ (S-X-X-K)	Ser ¹³⁰ -Asp ¹³¹ - Asn ¹³² (S-D-N)	Lys/Arg ²³⁴ - Thr/Ser ²³⁵ -Gly ²³⁶ (K-T-G, K-S-G, R-S-G, R-T-G)
Grup C	Ser ⁶⁴ -X-X-Lys (S-X-X-K)	Tyr-Ala/Ser-Asn (Y- A-N)	Lys/Arg/His- Thy/Ser-Gly (K- T-G)
Grup D	Ser ⁷⁰ -X-X-Lys (S-T-F-K)	Ser ¹¹⁸ -X-Val/Ile (S-X- V)	Tyr/Phe ¹⁴⁴ -Gly- Asn (Y-G-N yada F- G- N)

OXA Tip Beta-laktamazların Alt Grupları

Karbapenem hidroliz eden OXA enzimleri sekiz alt gruptan oluşmaktadır. Her alt grubun grup üyelerinin birbirleri ile olan amino asit seviyesindeki dizi benzerlikleri > %92,5 civarında iken farklı alt gruplardaki grup üyeleri ile aralarındaki benzerlik % 40-70 civarındadır (Resim 1.1).



Resim 1.1 *Acinetobacter* 'de bulunan OXA beta-laktamazların filogenetiği (Walther-Rasmussen ve Hoiby 2006)

OXA-23 alt grubu OXA-58, OXA-24 ve OXA-51 alt grupları ile daha sıkı bir filogenetik ilişki göstermektedir. OXA-23 (ARI-1), -27 ve -49 ile birlikte 1. alt grubu oluşturmaktadır. Bu enzimler arasında iki ile beş amino asit farklılık vardır. İkinci alt grup OXA-24, -25, -26, -40 tır. Bu enzimler arasında da bir ile beş amino asit farklılık vardır. İkinci alt gruptaki OXA-24 ve 1. alt gruptaki OXA-23 arasında < % 60 amino asit benzerliği bulunmaktadır. Üçüncü alt grup OXA-51 enzim ailesidir ve *A. baumannii* de 1. ve 2. alt gruplar ile < % 63 amino asit benzerliği göstermektedir. Dördüncü alt grubu OXA-58 oluşturmaktadır ve diğer oksasilinazlar ile < % 50 amino asit benzerliği göstermektedir (Walther-Rasmussen ve Hoiby 2006, Brown ve Amyes 2006, Poirel ve Nordmann 2006).

Klinik örneklerde D sınıfı oksasilinazlar yaygın olarak plazmid üzerinde integron gen kasetleri şeklinde bulunmaktadır. Dünyanın çeşitli yerlerinde plazmid veya kromozomal DNA üzerinde taşınan *bla*_{OXA-23} geni *A. baumannii*'den izole edilmiştir.(Boo ve ark. 2006, Jeon ve ark. 2005, Naas ve ark. 2005, Turton ve ark. 2005, Dalla-Costa ve ark. 2003, Bonnet ve ark. 2002, Donald ve ark. 2000). *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-27} genlerinin taşınımı insersiyon dizileri (IS) ile ilişkilidir. IS*Aba bla*OXA-ss'i de içine alan kompozit bir transpozondur (Walther-Rasmussen ve Hoiby 2006). Sekans çalışmaları *A. baumannii* 6B92'de *bla*_{OXA-23} geninin ön tarafındaki dizinin % 99.3 oranında IS*Aba1* dizisi ile benzerliğini göstermiştir. IS*Aba1* antibiyotik direnç genlerinin ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Segal ve ark. 2005, Donald ve ark. 2000).

OXA Tip Karbapenemazların Orijini

Doğal seleksiyon nedeni ile organizmalar orijinallerinde karbapenemaz aktivitesine sahip enzim içermektedirler ya da bu genleri diğer bakterilerden plazmidler aracılığıyla almaktadırlar. İlk olarak 1985'te İskoçya'da belirlenen OXA tip karbapenemaz *A. baumannii* kaynaklı OXA-23'tür. Bu enzimin keşfediliş zamanı imipenemin genel kullanımından önce olmuştur. Bu bulgu da imipenemin klinik kullanımının D grubu karbapenemazların evrimi ile bağlantılı olmadığı fikrini desteklemektedir (Walther-Rasmussen ve Hoiby 2006). D grubu OXA allelerinin dağılımı Gram negatif bakterilerde limitlidir fakat Gram pozitif bakteri kromozomunda bazı homologlar bulunmuştur.

Oksasilini hızlı hidrolize eden beta-laktamazlardan OXA grubu enzimler içinde yer alan OXA-11 enzimi, Türkiye’de izole edilen bir suşta saptanmıştır. Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler.

OXA tipi enzimlerden iki grubu önem taşımaktadır.

1) Plazmid veya integron kökenli, seftazidim veya sefotaksim, sefepim, aztreonamı inaktive edebilen OXA tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır.

2) Özellikle *A. baumannii* izolatlarında görülen moleküler sınıflandırmada sınıf D’de bulunan karbapenemleri hidrolize eden karbapenamazlardır. Modifiye Hodge testi ile karbapenemaz aktiviteleri gösterilebilir. Karbapenemaz aktivitesi bulunan metallo enzimlerden klavulanik asit ve tazobaktama kısmen duyarlı, buna karşın EDTA ile inhibe olmamaları ile metallobetalaktamaz enzimlerinden ayrılabilirler. Grup 2’nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A’da yer alırken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D’de yer alır (Donald ve ark. 2000, Anyes 1997).

Esas olarak seftazidime yüksek direnç gösteren *P. aeruginosa* izolatlarında olmak üzere *A. baumannii* suşlarında da tanımlanmıştır (Akova 2004). Karbapenemaz aktivitesi de olan bu enzimlerden *A. baumannii* suşlarında ilk OXA-23 tanımlanmıştır (Dolapçı 2005, Akova 2004). Bu plazmid kaynaklı enzim başlangıçta ARI-1 (*Acinetobacter* resistant to imipenem) olarak adlandırılmıştır ve İngiltere, Brezilya, Kore, Çin, Singapur’da ortaya çıkmıştır. Plazmid kaynaklı diğer bir enzim olan OXA-58 ise Fransa, Arjantin, İspanya, Türkiye, Romanya, Avusturya, Yunanistan, Kuveyt, İskoçya’da bulunmuştur. OXA-40 ve OXA-58 taşıyan *A. baumannii* suşları, Amerika Birleşik Devletlerinde salgınlara neden olmuşlardır. Diğer karbapenemleri hidrolize eden oksasilinazların kromozomal ilişkili enzimler olduğu düşünülmektedir (Akova 2004). OXA-17 ise farklı olarak sefotaksim ve seftriaksona direnç sağlamaktadır (Akova 2004).

Grup 2e: Grup 1’deki enzimlerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olan sefalosporinazları içermektedir. *Stenotrophomonas maltophilia*’nın kromozomal L-2 enzimi, *Bacteroides fragilis* ve *Proteus vulgaris*’in kromozomal enzimleri bu gruptadır (Bush ve ark. 1995).

Grup 2f: Karbapenem antibiyotiklere etkili, ama metallo enzim olmayan serin-beta- laktamazları bu grup içindedir. 1982 yılında *Serratia marcescens*’in Sme-1 enzimi, 1984 yılında *Enterobacter cloacae*’nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, bu grupta yer almaktadır (Bush ve ark. 1995, Quiroga ve ark. 2000).

1.2.1.3 Grup 3 beta laktamazlar

Moleküler sınıf B'de yer alan metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimlerinden oluşur. Aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn^{+2} iyonu bulunan enzimlerdir. Klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri de bu enzimlere etki etmezler, ama EDTA gibi bir metal şelatörü ile inhibe olurlar. Bu gruptaki enzimler hem kromozomal hem de plazmid kökenlidirler. Monobaktamlar dışında karbapenemler dahil tüm beta laktamları hidroliz edebilirler. Aktiviteleri için Zn^{+2} (çinko) iyonlarına gereksinimleri vardır. Bu beta-laktamazlar a, b, c olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar.

Grup 3a: Bu enzimler penisilinleri, karbapenem ve sefalosporinlerden daha etkili olarak hidrolize edebilirler. Maksimum aktivite göstermeleri için ortamda Zn^{+2} (çinko) iyonunun bulunması gereklidir. Bu grup içerisinde CerA, PCM-1, IMP 1-8, VIM 1-3 enzimleri de yer almaktadır.

Grup 3b: Bu grup enzimler penisilin ve sefalosporinlere zayıf hidrolitik etki gösterir. Özellikle karbapenemleri substrat olarak tercih ederler. Büyük ölçüde *Aeromonas* cinsinden türeyip *A. hydrophilia*'da bulunur ve bazen gerçek karbapenemaz olarak adlandırılır.

Grup 3c: Bu grubun özelliği diğer beta laktam antibiyotiklere göre karbapenemler üzerine zayıf etki göstermeleridir. Güçlü sefalosporinaz aktiviteye sahiptir. *Legionella gormanni* metallo-beta-laktamaz enzimi bu gruptadır (Bimbaum ve ark.1985, Harold ve Neu 1985).

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

1.2.2 Karbapenemler

Karbapenemler ilk olarak 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen ve “thienamycin adı verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak elde edilmiştir. İlk bulunan ajan imipenemdir. Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli halka yapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesiyle diğer beta-laktam ajanlardan ayrılır. Beta laktam antibiyotikler gibi peptidoglikan biyosentezi üzerine etki göstermektedir. İmipenem, PBP1, PBP2, PBP4, PBP5 ve PBP6 ya bağlanabilmekte bunlardan PBP2’ye diğerlerinden daha güçlü bağlanmaktadır. İmipenem, böbrekte bulunan dihidropeptidaz enzimi tarafından yıkılmakta; bunu engellemek için klinikte dihidropeptidaz enzim inhibitörü olan silastatinle birlikte kullanılmaktadır. Mikobakteriler, hücre duvarından yoksun organizmalar, nadir nonfermentatifler ve *Aeromonas* dışında Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob mikroorganizmalarla oluşan hastane enfeksiyonları ve toplumdan kazanılmış enfeksiyonlardaki bakteriyel patojenlere etkilidir. 1996 yılından sonra ise karbapenem grubunun ikinci üyesi olan meropenem kullanıma girmiştir. Meropenem, karbapenem halkasına 1-β-metil grubu eklenerek elde edilmiştir. Meropenem, dihidropeptidaz enziminden etkilenmez. Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakterilere karşı etkindir. (Bonfiglio ve ark. 1985). 2001 yılında geliştirilmiş olan diğer bir karbapenem de Ertapenemdir. İmipenem ve meropeneme kıyasla daha dar spektrumludur. *Enterobacteriaceae*’ye ve anaeroblara etkilidir, ancak özellikle *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, enterokoklar ve penisilin dirençli pnömokoklara etkili değildir (Shah 2008). Bir başka karbapenem ise Doripenemdir. Meropeneme benzer aktivitede olmakla birlikte *P. aeruginosa*’ya invitro olarak daha etkili görünmektedir. Valproik asid kullanan hastalarda valproik asid serum düzeyini düşürmektedir. Komplike üriner sistem ve intra-abdominal enfeksiyonlarda ve hastane kaynaklı pnömönide kullanılmaktadır (Mandel 2009, Paterson ve Depestel 2009).

1.2.2.1 Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları

Karbapenemlere karşı bilinen 3 etki mekanizması ile direnç gelişebilmektedir:

1. İlacın hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşamaması:

A. Porin değişimleri: Bu, özellikle *P. aeruginosa* suşlarındaki temel direnç mekanizmasıdır. *P. aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı bu grup antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır. OprD kaybı özellikle imipenem tedavisi sırasında gelişmektedir (Rasmussen ve Bush 1997).

B. Aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi

2. Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı (karbapenemazlar)

En geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip beta laktam sınıfı olan karbapenemlerden birini, en azından imipenem veya meropenemden birini, belirgin olarak hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Bu enzimlerin çoğu yalnız karbapenemlere değil, diğer beta-laktam ajanlara da etkilidirler (Rasmussen ve Bush 1997, Bonfiglio ve ark. 1985).

Karbapenemazlar

a. Ekstrinsik (kazanılmış) karbapenemazlar:

Ambler moleküler sınıflamasına göre A, B veya D moleküler sınıflarına ait olabilirler. Bunlar, imipenem, meropenem, penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama direnç gelişmesine neden olan ve tazobaktam başta olmak üzere beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan enzimlerdir. *Acinetobacter spp.*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae*'da bulunur. Sınıf D tipleri sadece *Acinetobacter spp.*'de, sınıf A tipleri ise birkaç *Enterobacteriaceae* izolatında bulunurlar.

b. İntrinsik (kromozomal) karbapenemazlar:

Moleküler sınıf B'de yer alan bu enzimler aktif bölgelerinde çinko iyonları bulduklarından beta-laktamazlar içinde kendine ait özgün özelliğe sahiptir. Katalitik aktivite çinko iyonuna bağlıdır ve EDTA ile birleştğinde kaybolur. Diğer moleküler sınıflara (A, C ve D) ait beta-laktamazlar çinko içermezler, serin bazlı mekanizmaları vardır ve birkaç istisna dışında önemli kromozomal karbapenemaz etkinlikleri yoktur. Bu grupta, *B. cereus II*, *B. fragilis*'in CcrA, *B. cepacia*'nın PCM-1, *S. maltophilia*'nın L1, *C. indologenes*'in IND-1-4, *C. meningosepticum*'un BlaB enzimleri sayılabilir. Bunların tümü Bush sınıflandırmasında grup 3'te yer alan metallo beta laktamazlardır.

3. Hedef PBP değişimleri:

Tek başına nadir görülür, ancak diğer mekanizmalar ile birlikte.

1.2.3 Metallo-Beta-Laktamazlar

Metallo-beta-laktamazlar, 1980 yılında Ambler tarafından sınıf B, serin beta laktamazlar içinde sınıflandırılmış, daha sonra 1989 yılında Bush fonksiyonel özelliklerine göre bu enzimleri ayrı bir grup olan fonksiyonel grup 3 içerisinde sınıflandırmıştır. Bu sınıflama 1995 yılında güncellenmiş ve 1997 yılında modifiye edilmiştir (Rasmussen ve Bush 1997, Bush ve ark.1995).Metallo-beta-laktamazlar, diğer beta-laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunan enzimlerdir. Serin beta laktamaz inhibitörlerinden (klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam gibi) etkilenmezler ama EDTA gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar dışında tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilmeleridir.(Rasmussen ve Bush 1997, Massidda ve ark. 1991).

1.2.3.1 Kromozomal Olarak Kodlanmış MBL'lar

Kromozomal olarak kodlanmış MBL enzimlerinin önemli özellikleri indüklenebilir özellikte olmalarıdır. Genelde doğada bulunan bazı bakteriler, aynı zamanda MBL enzimi de taşımaktadırlar. Bu enzimleri taşıyan çoğu bakteriler genellikle beta laktamlar antibiyotiklere dirençlidir ya da direnç kazanabilir. Bu bakterilerin çoğu fırsatçı patojenler olup *S. maltophilia* ve *B. anthracis* dışında nadiren ciddi enfeksiyonlara neden olurlar.(Tetik 2008).

1.2.3.2 Aktarılabılır MBL'lar

IMP tipi Metallo Beta Laktamazlar 1988 yılında ilk olarak Japonya'da *P. aeruginosa* suşunda GN 17203'ün bulunmasıyla konjugatif bir plazmidle taşınan metallo beta laktamaz geni tanımlanmıştır (Watanabe ve ark.1991). Bu izolatın imipenem MIC değeri 50 µg/ml olarak tesbit edilmiş ve genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere de (örneğin seftazidim MIC >400 µg/ml) dirençli olduğu bildirilmiştir. Beta laktam ajanlarla birlikte imipenemi hidrolize etme özelliğinden dolayı bu enzime IMP-1 adı verilmiştir.(Arakawa ve ark.1995).

1.2.3.3 VIM-tip Metallo Beta Laktamazlar

Kazanılan MBL'ların ikinci dominant grubu VIM-tipi enzimlerdir. VIM-1 ilk olarak 1997 yılında Verona İtalya'da bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. Bu izolatın İmipenem için MIC değeri >128µg/ml iken piperasilin, seftazidim, imipenem

ve aztreonam gibi beta laktam ilaçlara da dirençliydi. VIM-1 (Veronese imipenemaz) diğer metallo enzimlerle yapısal benzerlikler gösteriyordu. (Lauretti ve ark. 1998).

Yakın zamanda, Tayvan'da *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-2 ve VIM serisinin yeni ortaya çıkan varyantı VIM-3 identifiye edildi. Yunanistan'dan transfer edilen İsveç'teki bir hastada karbapenem dirençli VIM-4 *P. aeruginosa* izolatu identifiye edildi. VIM-1'den 5 amino asit değişikliği ile ayrılan VIM-5 ise, ilk olarak Türkiye- Ankara'da *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* izolatlarında izole edilmiştir (Bahar ve ark.2004). Singapur'dan iki *P. putida* izolatında β -laktamaz VIM-6 identifiye edildi. Yeni blaVIM genlerinin ilki Kolombiya'da *P. aeruginosa*'dan izole edilen blaVIM-8 Güney Amerika'da sayıları hızla artan blaVIM genlerine bir yenisini eklemiş oldu. Son olarak, İngiltere'den blaVIM-9 ve blaVIM-10 Arjantin ve İtalya'dan blaVIM-11 bildirilmiştir (Pagniez ve ark.2004).

1.2.3.4 SPM-1 Metallo Beta Laktamaz

1997 yılında Brezilya Sao Paulo'da bir *P. aeruginosa* klinik izolatu, SENTRY araştırma programı parçası olarak tanımlanmış ve blaSPM-1 (Sao Paulo MBL) olarak adlandırılan yeni bir gen taşıdığı gösterilmiştir (Simm ve ark.2002). İzolatu, kolistin dışında standart bütün Gram negatif bakterilere etkili antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir. (Poirel ve ark. 2004,Simm ve ark.2002)

1.2.3.5 GIM-1 Metallo Beta Laktamaz

2002 yılında Almanya Dusseldorf'da farklı tıp merkezlerinden farklı hastalardan beş *P. aeruginosa* izolatu elde edildi ve GIM-1 diye adlandırılan yeni bir klas B beta laktamaz içerdiği gösterildi.(German imipenemase).

1.2.4 PCR (Polimeraz Chain Reaction)

PCR, moleküler biyolojide uygulanan bir tekniktir ve basitçe nükleik asitlerin tüpte çoğaltılması olarak tanımlanabilir. PCR, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), daha sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon-çift iplikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanmaktadır. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer

kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanmaktadır. Bu yöntem ile hedef bölge birkaç saat içinde milyonlarca sayıda çoğaltılabilmektedir (Köksal 2001, Murray ve ark 2005).

1.2.5 Hastane Enfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Yöntemlerinin Önemi

Hastaneye yatan kişiler altta yatan nedenlerden dolayı enfeksiyonlara yatkınlık göstermekte ve hastane ortamı dirençli mikroorganizmaların enfeksiyonları için zemin hazırlamakta ve yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan hastane enfeksiyonları hastane masraflarını önemli ölçüde artırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı hastane kaynaklı enfeksiyonlarda korunma ve kontrol çok önemlidir.

Hastane enfeksiyonları sporadik, endemik, epidemik olarak görülebilirken en sık endemik enfeksiyonlara rastlanmaktadır ve kontrol önlemleri bu gruba uygulanmaktadır. Endemik enfeksiyonların 1/3 kadarı çapraz bulaşma ile meydana gelmektedir. Hastane enfeksiyonları için epidemiyolojik araştırmalar, belirli bir patojen ile enfeksiyon sıklığı arttığı zaman, bir hasta grubunda aynı tür bakteri izole edildiği zaman veya belirli antibiyotik duyarlılık paterni gösteren suşlar belirlendiği hallerde başlatılmaktadır. Moleküler mikrobiyolojik yöntemler hastane enfeksiyonlarının etkenlerinin bulaşma yollarını, bulaşma mekanizmalarını ortaya koymada önemli katkılarda bulunmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının tanısında mikrobiyolojide çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır (Çizelge 1.4). Klonalitenin (aynı biyotip, benzer genotip, ortak virülans faktörlerine sahip aynı tür üyeleri) varlığını veya yokluğunu belirleyen moleküler teknikler enfeksiyonların yayılımını izlemede oldukça etkilidir. Moleküler yöntemler enfeksiyonların hızlı tanısında, kökenlerin identifikasyonu ve klonal benzerliklerinin saptanmasında, antibiyotik direnci saptanmasında, enfeksiyonların izleminde, hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi konusunda yeni açılımlar sağlamıştır (Öztürk 2007).

Çizelge 1.4 Hastane enfeksiyonu etkenlerinin tiplendirme yöntemleri(Öztürk 2007)

1.Fenotipik Yöntemler	2.Genotipik Yöntemler
a. Biyotipleme b. Serotipleme c. Antibiyotik duyarlılık paterni d. Bakteriyofaj tipleme e. Bakteriyosin tipleme f. Protein analizi	a. Plazmid analizi b. Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizi: RFLP,PFGE c. Ribotipleme d. Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemler: REP-PCR, AP-PCR e. Sekans analizi (Tek Lokus sekans analizi, multilokus sekans analizi) f. "Mikroarray"-DNA "chip" teknolojisi

1.2.6 Jel Elektroforezi

Günümüzde laboratuvarlarda amplifiye DNA ve RNA'nın saptanması ve karakterizasyonu için agaroz jel elektroforezi, Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Southern blotting gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu prosedürlerin yapımı kolay, oldukça ucuz ve kısa sürede uygulanabilmektedirler.

1.2.6.1 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, çapraz bağlı galaktopiranozdan oluşan uzun zincirli polisakkaritlerdir. İçindeki pirüvat ve sülfat agaroz ile ilişkili DNA'nın ayrılma özelliğinin çoğundan sorumludurlar. Elektroforez sırasında agaroz hareketsiz ve negatif yüklüdür ve içindeki pozitif iyonlar hareket ederek katoda doğru göç etmektedirler. DNA fosfat içeriğinden dolayı negatif yüklü olduğu için anoda doğru hareket eder. Bu arada su, pozitif iyonlar ile beraber hareket ederek, DNA moleküllerinin anoda doğru göçüne engel olmaktadır. DNA moleküllerinin göçü büyüklüklerine bağlıdır. Küçük moleküller daha hızlı hareket ederler. Jel içinde agarozun yüksek konsantrasyonu DNA moleküllerinin hareketini güçleştirir. Agaroz oranı arttıkça daha küçük moleküller ayrılır. DNA molekülleri büyüdükçe Pulsed

Field Gel Electrophoresis (PFGE) gibi özel elektroforez teknikleri gerekmektedir (Podzorski 2004).

Jelde kullanılan agaroz tipi ve konsantrasyonu DNA fragmanlarının büyüklüğüne bağlıdır. Ayrıca jele yüklenebilecek DNA volümü, kuyucuğun kapasitesine, DNA miktarına ve DNA moleküllerinin büyüklüğüne, DNA moleküllerinin büyüklük dağılımına, elektroforez için kullanılan voltaj gradientine bağlıdır. DNA molekül büyüklüğü arttıkça jelin DNA kapasitesi azalmaktadır. 1000 bp altındaki DNA molekülleri için yüksek voltajlar daha uygun iken, 1000 bp üstündeki moleküller için daha düşük voltajlar uygundur (Podzorski 2004). Agaroz jel elektroforezi yapmak için bir jel havuzu, jel tarağı (jelde kuyucuklar açmak için), agarozu eritmek için mikrodalga fırın ve elektroforezi yapmak için güç kaynağı gerekmektedir (Podzorski 2004).

Bu yöntemde jel ve elektroforez için 2 tampon seçeneği vardır. Bunlar, TAE (Tris-Asetat, EDTA; 40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA), TBE (Tris-Borat, EDTA; 89 mM Tris-borat, 2mM EDTA) olup, genellikle konsantre çözeltiler olarak hazırlanır ve oda sıcaklığında saklanırlar. Her iki tamponun pH'sı 7'den daha büyüktür. TAE, 12 kb'dan büyük DNA moleküllerinin elektroforezi için kullanılırken, TBE, daha küçük (1kbdan küçük) DNA moleküllerinin elektroforezi için tercih edilmelidir. TBE'nin agaroz ile etkileşimi ile daha küçük porlar oluşmaktadır (Podzorski 2004). Örnek yükleme tamponları olarak bromfenol mavisi ve Ksilen syanol FF boyaları kullanılabilir. Amaç örneğin dansitesini artırmaktır ve jele yüklemeye önce DNA örneklerine eklenmektedir (Podzorski 2004). Agaroz jelde DNA'yı görüntülemek için en çok kullanılan etidyum bromiddir. Etidyum bromid çift zincirli DNA içine girmekte ve kırmızı renkte floresan yaymaktadır. DNA'ya bağlandığı zaman floresanı 20-30 kat artmaktadır. DNA etidyum bromid ile boyandığında, 300 nm transilluminasyon ile 1 ile 5 ng arası çift zincirli DNA içeren bant saptanabilmektedir. Etidyum bromid elektroforez öncesi jele eklenebilir veya elektroforez sonrası jel boyanabilir. Eğer elektroforez öncesi eklenirse DNA hareketini etkilemekte ve %15 yavaşlatmaktadır. Önce boyamanın bir diğer sakıncası zeminin fazla boyanabilmesidir.(Podzorski 2004). Kullanılabilecek diğer boyalar ise SYBR Green I, GelStar, Metilen mavisi, Gümüş boyadır. SYBR Green I ve GelStar, etidyum bromid'den daha duyarlı olmalarının yanında daha pahalı boyalardır. Metilen mavisi ile DNA UV aydınlatmasız görülebilir. Nontoksiktir, ama etidyum

bromid'den 40 kez daha az duyarlıdır ve ancak büyük DNA miktarları varsa kullanılabilir. Gümüş boya, genelde poliakrilamid jelde proteinleri boyamak için kullanılırken, agaroz jelde de kullanılabilir (Podzorski 2004).

1.2.7 Pulsed-Field Jel Elektroforez

Bir kısım fenotipik yöntemler enfeksiyonların epidemiyolojilerini tanımlama da kullanışlı olsalar da bunların çoğunun deneysel araştırmalarda kullanılması sorun oluşturmaktadır. Bunların yerini yeni geliştirilen DNA temelli tiplendirme yöntemleri almıştır. Bu yöntemler içerisinde PFGE çok önem taşır ve özellikle salgın araştırmalarında yaygın bir kullanıma sahiptir. (Arbeit 1995).

PFGE, moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıyla agarozda süspansiyon edilip küçük kalıplar içine dökülmektedir. Bakteri hücreleri deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE' de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Lizis işlemini takiben agaroz kalıpları birkaç kez yıkanarak veya diyaliz edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA, nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Daha sonra DNA parçaları içeren kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belirli aralıklarla yön değiştiren elektrik akımı verilmektedir. DNA, elektroforez sırasında farklı yönlerde doğru hareket edecek olursa bantlar birbirinden ayrılırlar. Jele uygulanan elektrik alanının yön değiştirmesi ile daha küçük olan DNA parçaları daha hızlı olarak hareket ederler ve böylece büyük DNA parçaları geride kalarak dizilirler. Bu tip bir elektrik akımı 10-800 kilobazlık DNA segmentlerinin net olarak ayırt edilmesine imkan sağlamaktadır. Elektroforez sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak, her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımı ile değerlendirilerek suşların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulmaktadır (Swaminathan ve Matar 1993). Bilgisayara dayalı analizlerde, incelenen mikroorganizmalara ait PFGE profillerinin saklanması amacıyla "veri bankası" oluşturulabilir. Böylece çalışılan suşların profillerinin, daha önce var olan verilerle karşılaştırılma olasılığı bulunmaktadır (Olive ve Bean 1999).

1.2.7.1 PFGE Profillerinin Yorumlanması

PFGE profillerinin yorumlanması kriterleri için yapılan öneriler, tiplendirme çalışmalarında sınırlı zamanı ve kaynağı olan, tek bir restriksiyon endonükleaz kullanarak suşları analiz edecek laboratuvarlar için düzenlenmiştir ve Çizelge 1.5’de özetlenmiştir (Tenover ve ark. 1995, Durmaz 2001).

a. Aynı izolatlar: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik açıdan farksız olarak kabul edilirler. Salgın suşu ile aynı profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkilidir. Epidemiyolojik verilerle desteklenen tek bant farklılığının da klonal ilişkiyi gösterdiği kabul edilmektedir.

b. Yakın ilişkili izolatlar: Salgın suşu ile aralarında iki-üç bant farkı olan izolatlar için kullanılır. İzolat salgın suşuyla yakından ilişkili olarak değerlendirilir ve epidemiyolojik açıdan salgının bir parçası olma olasılığı yüksektir.

c. Muhtemel ilişkili izolatlar: Salgın suşu ile aralarında dört-altı bant farkı olan izolatlar için kullanılır. Bu değişim, iki bağımsız genetik değişikliğin (insersiyon/delesyon ya da restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı) sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Epidemiyolojik yönden bu izolat, salgın suşuyla olası ilişkili olarak değerlendirilir. Bu izolatlar salgın suşuyla aynı genetik soydan gelebilirler, ancak genetik olarak ilişkili değildirler, epidemiyolojik olarak ilişkili olma ihtimalleri ise daha azdır.

d. İlişkisiz izolatlar: Bu izolatlarda, salgın suşundan yedi ya da daha fazla bant farkı gözlenmektedir. Epidemiyolojik olarak salgın suşuyla ilişkisiz oldukları kabul edilir.

Bu kriterler kullanılırken dikkate alınması gereken belirli hususlar vardır:

1. PFGE ile en az 10 ayrı bant oluşmuşsa bu kriterler güvenle kullanılabilir. Daha az sayıda bant tespit edildiğinde kriterlerin güvenilirliği ve ayırt etmedeki yeterliliği belirsizdir.

2. Kriterler, genetik değişimin sınırlı olduğu düşünülen küçük ve lokal çalışmalar için belirlenmiştir. Hastanelerde ya da toplumda görülen salgınlara ilgili

yapılan epidemiyolojik çalışmalar sırasında kısa bir zaman sürecinde (1-3 ay) alınmış izolatlar için kullanılabilir.

Bu oneriler, tiplendirme çalışmalarında sınırlı zamanı ve kaynağı olan, tek bir restriksiyon endonükleaz kullanılarak suşları analiz edecek laboratuvarlar için düzenlenmiştir (Tenover ve ark. 1995).

Çizelge 1.5 PFGE profillerinin yorumlama kriterleri (Tenover ve ark. 1995, Durmaz 2001)

Kategori	Salgın suşuna kıyasla genetik farklılık sayısı	Salgın suşundan farklılık gösteren bant sayısı	Epidemiyolojik yorum
Aynı	0	0	İzolat, salgının bir parçası
Yakın ilişkili	1	2-3/ 1-3	İzolat, salgınla yakın ilişkili
Olası ilişkili	2	4-6	İzolat, salgınla olası ilişkili
Farklı	>3	>7	İzolat, salgınla ilişkisiz

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2007-2012 yılları arasında kliniklerden gönderilen materyellerden üreyen 204 adet *A. baumannii* izolatu çalışmaya alındı. Aynı hastadan birkaç kez *A. baumannii* izole edilmiş olsa bile bu suşlardan sadece biri çalışmaya alındı. Hastalardan uygun koşullarda alınan (kan, bronko alveolar lavaj, trakea, katater, idrar, yara, drenaj mayi gibi) örnekler çalışmamıza dahil edildi.

2.1 *Acinetobacter baumannii* izolatlarının tanımlanması

Üreyen bakteriler konvansiyonel yöntemlerle identifiye edildi. EMB besiyerinde laktoz ve oksidaz negatif bakterilere Gram boyaması yapıldı. Gram negatif kok/kokobasil şeklinde boyanan bakteriler, TSI, Simons sitrat besiyeri, hareket besiyeri ve İndol testi için buyyona ekildi. TSI besiyerinde dipte ve yatıkta alkali reaksiyon veren, Simons sitrat besiyerinde üreyerek besiyerinin rengini maviye dönüştüren, hareket besiyerinde hareketsiz olarak tespit edilen, İndol testi negatif bakterilerin *Acinetobacter spp.* olabileceği düşünüldü. Daha sonra Vitek 2 Compact (BioMérieux, Fransa) ve Phoenix 100 BD (Becton Dickinson, Sparks) ile bu suşların otomatize tip tayini yapıldı. Daha sonra çalışma sürecine kadar %20 gliserollü Brain Heart İnfüzyon besiyerine alınarak -20 °C’de saklandı.

2.2 *Acinetobacter baumannii* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması:

2.2.1 Disk Difüzyon Yöntemi:

Çalışmaya başlamadan önce saklama besiyerinden EMB besiyerine bakterilerin canlandırma pasajı yapıldı ve daha sonra tek koloniden pasaj tekrarlandı. Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılığı Kirby–Bauer disk difüzyon tekniği ile CLSI önerileri dikkate alınarak Mueller Hinton agarda yapıldı. Buyyon içinde 0.5 McFarland standartına göre bakteri süspansiyonları hazırlandı ve steril eküvyonlar ile Mueller Hinton besiyerine tüm besiyeri yüzeyini kaplayacak şekilde yayıldı. Ticari olarak temin edilen meropenem 30µg ve imipenem 10µg (Oxoid, UK) antibiyogram diskleri, besiyerine 2.5 cm aralıklarla yerleştirildi. 24 saatlik inkübasyon sonrasında

zon çapları lildi. Mueller Hinton besiyeri ve antibiyogram diskleri ATCC 27853 numaralı Standart *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile test edildi.

2.3 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için bakteriler EMB (Eosin Metilen Blue) besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. DNA izolasyonu için ticari bir kit olan Qiagen Minikit (QIAGEN, United Kingdom) kullanıldı. İzolasyon retici firmanın talimatlarına göre yapıldı.

- Bakteriler, besiyerinden bir öze dolusu kadar, 180µl Buffer ATL içeren 1,5 ml'lik bir tüpe alındı ve süspansiyon haline getirildi.
- zerine 20µl Proteinase K eklendi ve vortekslendi.
- 56°C'de ara ara vorteksleyerek üzülmesi beklendi.
- Tüpün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için kısa bir santrifüj uygulandı.
- Örneğin, zerine 200µl Buffer AL eklendi ve 15 saniye vortekslenip 70°C'de 10 dk. beklendi.
- Tüpün kenarındaki damlacıkları indirmek için kısa bir süre santrifüjlendi.
- Örneğin, zerine 200µl %96 etanol eklendi ve 15 saniye vortekslendikten sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- 5 dk. bekledikten sonra QIAamp Spin kolonu 2 ml'lik temiz bir tüpe yerleştirildi ve elde edilen karışım spin kolona aktarıldı.
- Kolonun kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi ve sıvının biriktiği toplama tüpü atıldı. QIAamp Spin kolonu ise 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolonun kapağı açılıp tüpün çeperine değmeden 500µl Buffer AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Sıvı biriken toplama tüpü atıldı ve QIAamp Spin kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolonun kapağı açılıp tüpün çeperine değmeden 500µl Buffer AW2 eklendi ve 13000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Sıvı biriken toplama tüpü atıldıktan

sonra kolon yeni bir toplama tüpüne tekrar yerleştirildi ve 13000 rpm’de 1 dk. tekrar santrifüjlendi.

- Sıvı biriken toplama tüpü atıldı ve QIAamp Spin kolon 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 200µl Buffer AE eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk. bekletildikten sonra 8000 rpm’de 1 dk. santrifüj edildi.
- Son aşamada Spin kolon atılarak tüpte biriken sıvı PCR çalışması için -20°C’de saklandı.

2.3.1 OXA-23, OXA-58 ve OXA-51 için Multipleks PCR

PCR çalışması için gerekli bütün primerler İntron (İntron sağlık, İzmir) tarafından sentezlenmiştir. Primer dizileri ve çoğaltılan baz çifti uzunlukları çizelge 2.1.’de yer almaktadır (Amudhan ve ark. 2011).

Çizelge 2.1 PCR çalışması için gerekli primer dizileri

Primer	Primer dizisi (5’-3’)	Çoğaltılan baz çifti (bç)
<i>bla</i> _{OXA-23} like -F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501
<i>bla</i> _{OXA-23} like -R	ATTTCTGACCGCATTTCAT	
<i>bla</i> _{OXA-51} like -F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353
<i>bla</i> _{OXA-51} like -R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
<i>bla</i> _{OXA-58} like -F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599
<i>bla</i> _{OXA-58} like -R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	

OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 için multipleks PCR içeriği her örnek için 50 µl olacak şekilde çizelgedeki 2.2.’deki gibi hazırlandı. Bu elde edilen PCR içerikleri ile hedeflenen DNA parçalarını çoğaltmak için Sensoquest (Labcyler, Germany) PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıda belirtilen döngü siklusları uygulandı (Çizelge 2.3)

Çizelge 2.2 OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 için multipleks PCR içeriği

Reaksiyon İçeriği	Volüm
10X PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP miks	2 µl
TaqDNA polimeraz	1 µl
Primer F	3 µl
Primer R	3 µl
DNA	4 µl
ddH ₂ O	29 µl
TOPLAM Volüm	50 µl

Çizelge 2.3 PCR cihazının döngü siklusları

Çoğaltılan Bölge	Reaksiyon Koşulları		Siklus Sayısı
OXA-23	Başlangıç denatürasyonu	94°C'de 5 dak	1
OXA-51	Denatürasyon	94°C'de 25 sn	33
OXA-58	Bağlanma (Annealing)	53°C'de 40 sn	
	Uzama	72°C'de 50 sn	
	Son Uzama	72°C'de 6 dak	1

2.4 Agaroz jelin hazırlanması ve elektroforez

Amplifiye edilmiş multipleks PCR ürünlerinin gözlenmesi için jel elektroforez yapıldı. Bunun için aşağıda işlemler sıra ile yapıldı.

- 1,5 gr. agaroz 150 ml 0,5X TBE (pH 8.3) tamponu içeren erlen içerisinde çözüldü ve mikrodalga fırında ısıtılarak (4-6 dakika) agarozun tamamen erimesi sağlandı.
- Agaroz eridikten sonra eli yakmayacak sıcaklığa gelinceye dek soğumaya bırakıldı.
- Çözelti içerisine jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmek için 12µl syber green eklendi (stok solüsyon: 10 mg/ml) ve tamamen karışması sağlandı.
- Jel tankına taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan agaroz çözeltisi döküldü ve oda sıcaklığında 30-45 dakika katılaşmaya bırakıldı.
- Daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel havuzuna jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE tamponu eklendi.
- Kuyucuklara, 6µl amplifikasyon ürünü, 2µl bromfenol mavisi (6XLoading Dye Solution, Fermentas) karıştırılarak mikropipet yardımıyla yüklendi. Ayrıca DNA örnekleri ile beraber bir adet marker (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder) ve OXA pozitif kontrol jel kuyucuklarına aynı şekilde yüklendi.
- 100 V'da 1 saat elektroforez yapıldı.
- Süre sonunda syber green içeren jel, tanktan alınarak jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak) bantların varlığı gözlemlendi.
- Pozitif DNA örneğinin karşısına denk gelen ve moleküler standart ile uyumlu baz çiftine sahip olan örneklerin genomu taşıdığı kabul edildi.

2.5 OXA-23 ve OXA-58 pozitif suşların PFGE yöntemi ile klonal yakınlığının araştırılması

2.5.1 PFGE de kullanılan solüsyon ve çözeltilerin hazırlanması

Hücre Süspansiyon Tamponu (HST):

100mM Tris HCl	15,6 gr
100mM EDTA 1X 1LT pH=8	37,22 gr 1000 ml'ye tamamlamr.

Lysis Buffer I Solüsyonu:

50mM Tris HCl

50mM EDTA 1X 1LT pH=8

1000ml-1X LYSIS BUFFER I

7,88 grTris HCl

18,61 gr EDTA

1000 ml'ye tamamlanır.

Lysis Buffer II Solüsyonu:

0,5 M EDTA

%1 SARKOZYL 1X 1 litre pH=8

100ml-1X LYSIS BUFFER II

18,61 gr EDTA çözdürülür.

1gr SARKOZYL 100 ml'ye tamamlanır.

TE Tamponu:

10mM Tris HCl

0.1mM EDTA 1X 1 litre Ph=7,6

500ml -10XTE TAMPONU

7,88 grTris HCl

0,186 grEDTA 500

TBE 10X

108 gr Trisbase (Sigma)

55 gr Borik asit

7,44 gr EDTA

1000 ml'ye tamamlanır.

%20'lik SDS Hazırlanışı:

20 gr SDS + 80 ml steril distile su içinde gece boyu karıştırarak çözülür(ağzı kapalı kap) yada 68 °C su banyosunda çözülür.

Lizozim Solüsyonunun Hazırlanışı

0,1 gr stok lizozim enziminin üzerine 1000 µl enjeksiyonluk su eklenir, vortex yardımı ile çözülür. Hazırlanan lizozim 100 gr / ml olacak şekilde sulandırılır. Hazırlanan lizozim stok olur. (Stok lizozimden 1 µl alınır üzerine 999 µl enjeksiyonluk su ilave edilir. 100 gr / ml olur.) -20°C de saklanır.

Proteinaz K Solüsyonunun Hazırlanışı

100 mg proteinaz K solüsyonu 1000 µl enjeksiyonluk suda çözülür. -20°C de saklanır.

Tango Buffer Hazırlanışı

16 örnek için: 16 µl 10X Tango Buffer (BSA) + 1584 µl enjeksiyonluk su.

Restriksiyon Enziminin Hazırlanışı

Herbir örnek için:

10X 'lik 10 µl *ApaI* Tango Buffer

3 µl *ApaI* enzim

1 µl Buffer B

86 µl steril distile su

Yürütme İçin %1'lik Jelin Hazırlanışı

100 ml 0,5 X TBE içinde 1 gr agaroz çözülür. Uygun ısıda kaynatılmadan eritilerek homojen hale getirilir.

2.5.2 PFGE Yöntemi

PCR yöntemi ile OXA-23 ve OXA-58 varlığı belirlenen *A. baumannii* suşlarının klonal yakınlığını belirlemek amacıyla, bazı modifikasyonlar uygulanarak Durmaz ve ark.(2007)'ı tarafından bildirilen PFGE metodu kullanıldı.

İzolatların hazırlanması

Mueller Hinton agar besiyerine tek koloni ekimi yapılan örneklerin, bir gecelik inkübasyondan sonra saflığı kontrol edildi. Buradaki tek koloniden tekrar Mueller Hinton agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakıldı. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, 13,000 x g 4°C'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılıp, pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlandı ve kırık buz içinde bekletildi.

İzolatların agaroz gömülmesi

HST içerisinde %2'lik düşük erime ısıli agaroz (Low melting agaroz) hazırlandı. Bir balon içerisinde 0.1 g agaroz, 5 ml HST ile karıştırıldı ve mikro dalga fırında eritildi. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50 °C'lik su banyosuna konulup, % 20'lik sodyum dodesil sülfattan (50 °C de ısıtılmış) 250 µl ml eklenerek

iyice karıştırıldı. Agaroz-SDS karışımından 100 µl Ependorf tüplere dağıtıldı ve 50 °C'deki kuru ısı bloğunda bekletildi. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına yerleştirildi. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak, 50 °C'de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime ısılı agaroz-SDS karışımı bulunan tüpe eklendi. Bu karışımdan agaroz kalıplara 100 µl aktarıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4 °C'de 10 dakika bekletildi.

Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1.5 ml'lik steril ependorf tüplere, 500 µl hücre liziz solüsyon I dağıtıldı. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak liziz solüsyonuna yerleştirildi. 37 °C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Liziz solüsyon I aspire edildi ve yerine 500 µl hücre liziz solüsyon II kondu. 55 °C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

Hücre lizizinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

Liziz aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler +4 °C'de 15 dakika bekletildi. Dikkatlice hücre liziz solüsyonu II aspire edildi. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 1 ml TE tamponu aktarıldı ve 50 °C'de çalkalamalı su banyosunda 15 dakika yıkandı. TE tamponu ile yapılan bu yıkama işlemi aynı şekilde beş kez daha tekrar edildi. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirildi.

A. *baumanni* DNA'sını içeren kalıpların *ApaI* RE ile kesimi:

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 0.1X *ApaI* tamponu içine aktarıldı ve çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 10 dakika bekletildi. Sonra sıvı aspire edildi. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

10 µl 10X *ApaI* tamponu,

3 µl *ApaI* enzimi (10 U /µl) (Fermentas, Litvanya)

1 µl Buffer B

86 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)

Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı kondu ve çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi. Kalıplar elektroforez için hazırlandı.

Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

0.5x TBE içinde 100 ml olacak şekilde % 1'lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.

RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna (*A. baumannii* RSKK 02026) ait kalıplar yüklendi. Örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Sıcaklığı yaklaşık 45-50 °C'de olan agaroz dikkatli bir şekilde kaset içine döküldü. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 2000 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

Elektroforez

CHEF-DRII sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium), *A. baumannii* için elektroforez şartları: Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 200 V (6 V/cm²), sıcaklık 14 °C, elektroforez süresi 20 saat (TBE tamponu pH=8.0) şeklinde uygulandı.

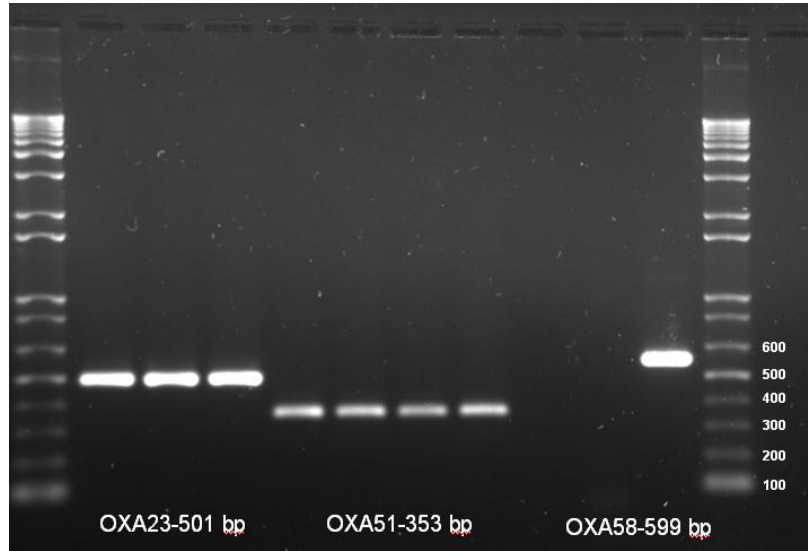
Sonuçların gözlenmesi ve analizi

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml Syber Green içeren 400 ml ultra saf su içine alındı ve 20 dakika boyandı. Jel, UV ışığa altında görüntülendi. Gel logic imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. GelCompar II yazılım sistemi kullanılarak bant profilleri analiz edildi. UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) metodu ve Dice benzerlik (Dice similarity coefficient) katsayısı kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümelenme analizi yapıldı. Değerlendirmede tolerans %1 olarak alınmıştır. Bu istatistiksel analizde %95-100 benzerlik ilişkili ayırt edilemez, %90-95 muhtemel ilişkili ve <%90 ilişkisiz kabul edildi.

3. BULGULAR

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına kliniklerden gönderilen materyellerden 204 adet üreyen *A. baumannii* izolatları çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan tüm suşların imipenem ve meropenem duyarlılıkları Kirby–Bauer disk difüzyon tekniği ile belirlendi.

105 adet *A. baumannii* izolatında imipenem ve meropenem direnci belirlendi. Bu suşlarda OXA-51like, OXA-23 like ve OXA-58like geni varlığı araştırıldı. İmipenem ve meropenem dirençli 105 suşun tümünde OXA-51like geni saptanırken, 49’ünde OXA-23like, 56’sında OXA-58 like suşu belirlendi (Resim 3.1). OXA-23 ve OXA-58 sentezleyen suşların klinik örneklerle göre dağılımı çizelge 3.1’de gösterildi. OXA-23like geni taşıyan suşların hem Meram Tıp Fakültesi Hastanesi hem de Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı olduğu gözlemlenirken, OXA-58like geni taşıyan suşların sadece Meram Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı olduğu, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde OXA-58like geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının bulunmadığı tespit edildi.

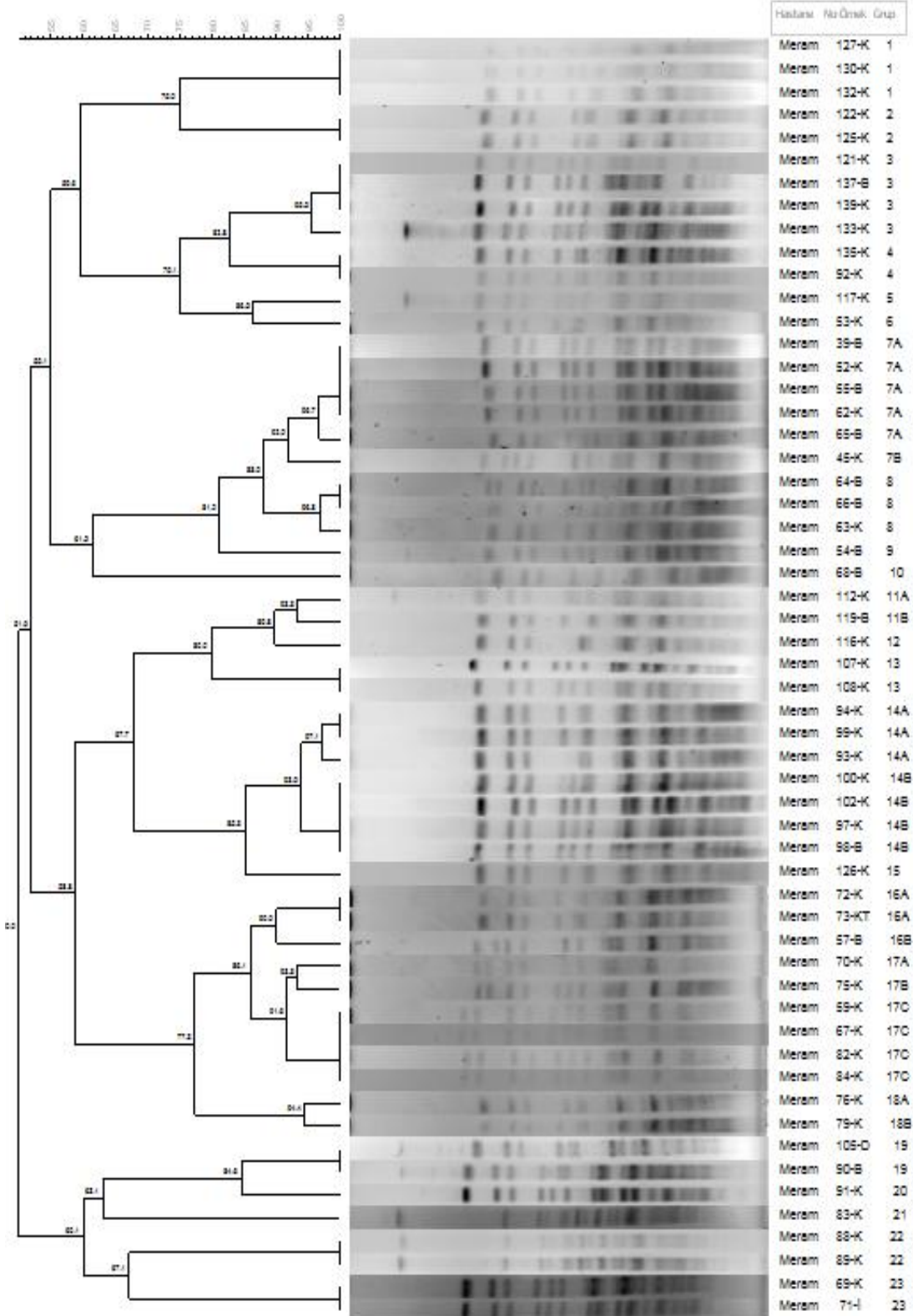


Resim 3.1 OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 bantlarının Gel Logic 200 Imaging System görüntüsü.

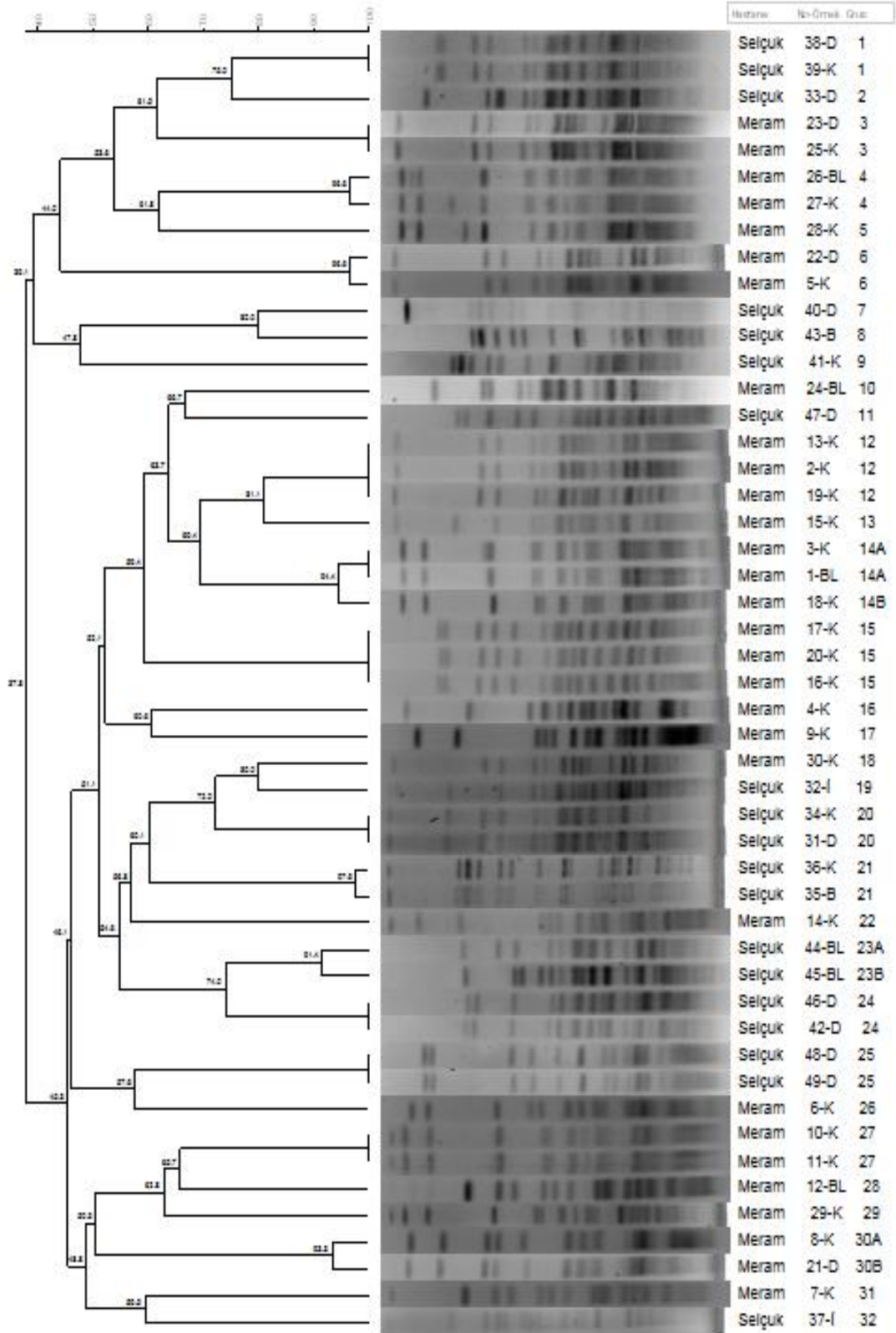
Çizelge 3.1 Klinik örneklere göre OXA tipi suşların dağılımı

Klinik Örnek	OXA-23 like Pozitif izolat sayısı	OXA-58 like Pozitif izolat sayısı	Toplam
Kan	27	41	68
BAL	6	12	18
İdrar	2	1	3
Drenaj	12	1	13
BOS	2	---	2
Katater	---	1	1
GENEL TOPLAM	49	56	105

PFGE yöntemi ile OXA-23like ve OXA-58like geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının klonal ilişkisi bakıldı. Elektroforezde oluşan bantların dendogramı yapılmış ve bantlar arasındaki benzerlikler Resim 3.2’de OXA-58’e ait, Resim 3.3’de OXA-23’e ait dendogramları yer aldı. OXA-23 genlerinin dendogram analizleri incelendiğinde iki hastanenin klonlarının geniş dağılım göstermiş olup 32 grup belirlendi. Meram Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı OXA-23 geni taşıyan suşlar ile Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı OXA-23 taşıyan suşlar arasındaki benzerlik oranı <math><90\%</math>’nin altında olup ilişkisiz kabul edildi. Ortak bir salgın izolatı saptanmadı. OXA-58 suşlarının klonal ilişkisine bakıldığında 23 grup belirlendi. Bazı grupların özellikle 3, 7, 14 ve 17’nin Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde küçük salgınlar oluşturduğu söylenebilir.



Resim 3.2 OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının *ApAI* ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE profillerinin, dendrogramı (K; kan, İ; idrar, B; BOS, D; drenaj, KT; katater)



Resim 3.3 OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının *Apal* ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE profillerinin, dendrogramı (K; kan, İ; idrar, B; BOS, D; drenaj, BL; bronko alveolar lavaj)

4. TARTIŞMA

Acinetobacter ailesinin üyeleri ilk olarak 1911'de tanımlanmış, 1970'lerin başlarında da nozokomiyal patojenler arasındaki yerini almıştır. İlk in-vitro çalışmalarda pek çok klinik izolat ampicilin, gentamisin, kloramfenikol ve nalidiksik asit gibi sık kullanılan antimikrobial ajanlara duyarlı bulunmuş, ancak zaman içerisinde *A. baumannii* kompleksine ait klinik izolatların direnç oranlarında artış gözlenmiştir. Günümüzde izolatların büyük bir kısmı aminopenisilinler, üreidopenisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler, çoğu aminoglikozidler, kinolonlar, kloramfenikol ve tetrasiklinler gibi sık kullanılan antibakteriyel ajanlara dirençlidir. Son yıllarda *Acinetobacter* türlerinde ortaya çıkan çoklu ilaç direnci (ÇİD) *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenemlerin (imipenem, meropenem..) yoğun kullanımına neden olmuştur. Ancak, günümüzde *Acinetobacter* klinik izolatlarında yüksek oranda karbapenem direnci tüm dünyadan bildirilmekte, bazı izolatlar da tüm geleneksel antibiyotik ajanlara dirençli bulunmaktadır (Goic-Barisic ve Tonkic 2009)

A. baumannii türleri tarafından üretilen ve doğal beta-laktamaz olan OXA-51 benzeri beta-laktamaz kümesi sınıf D oksasilinazlardan biridir. Bu doğal grup, bilinen diğer oksasilinazlardan farklı olarak %63'e varan amino asit homolojisi gösteren bir enzim kümesinden oluşur. OXA-51 geni dizi analizleri diğer major OXA enzim kümeleri ile karşılaştırıldığında sınıf D motiflerden bariz farklılıklar gösterir. Çeşitli coğrafik bölgelerde şu ana kadar en az 18 değişik OXA-51 varyantı gösterilmiştir. Ancak bu enzimlerin tümü zayıf karbapenemaz aktivitesi gösterir. Ampicilinden daha zayıf substrat olan sefaloridin hariç sefalosporinlerin hiçbirisi bu enzimlerle hidrolize olmaz. Bu genler ve ilişkili enzimlerin ekspresyon seviyesinin düşük olduğu görülmektedir. *A. baumannii* OXA-51 benzeri enzim analizleri, tüm izolatlarda *bla*OXA-51 benzeri gen bulunmasına rağmen sadece ISAbal1 ile komşu olan *bla*OXA-51 benzeri genleri taşıyan suşların karbapenem dirençli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle ISAbal1 *bla*OXA-51 için düzenleyici gibi görünmektedir (Çiftçi ve Aşık 2011). OXA-51 benzeri enzim kümesinin genomik kaynağı halen bilinmemekte olup muhtemelen antibiyotik üreten toprak mikroorganizmalarına karşı direnç mekanizması olarak veya bilinmeyen organizmalardan kaynaklanıp kromozoma integre olmuştur. Senegal'de yapılan bir çalışmada 354 insan saç

bitinden, 717 insan dışkısından ve 118 hayvan dışkısından izole edilen *A. baumannii* suşlarının tümünde real time PCR metodu ile OXA-51 geni varlığı gösterilmiştir (Kempf ve ark.2012). Kaynağı ne olursa olsun OXA-51 enzim kümesi üyeleri *A. baumannii*'nin hemen hemen tüm izolatlarında doğal yapı olmasına rağmen diğer *Acinetobacter* türlerinde bulunmaz (Mussi ve ark.2005). Bu enzimlerin sıklıkla diğer kümelere ait kazanılmış OXA-tipi enzimlerle kombine olarak bulunduğu belirtilmiş ve belirli şartlar altında karbapenem direncinde en azından sinerjik rolü olabileceği ifade edilmiştir (Woodford ve ark. 2006). Çalışmamızda karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının hepsinde OXA-51 geni varlığı gösterilmiştir.

Acinetobacter'de kazanılmış karbapenem hidrolize eden oksasilinazlar ilk olarak 1985'te Edinburg Üniversitesinde izole edilen suшта gösterilmiş ve enzimi ilk olarak ARI-1 olarak bildirilmiştir. Enzimin genetik ve biyokimyasal incelenmesini takiben OXA-23 olarak adlandırılmıştır (Paton ve ark.1993). OXA-23 *A. baumannii*'de doğal olarak bulunan OXA-51 benzeri enzimlerle % 56 amino asit benzerliğine sahip olup, karbapenem hidrolize eden oksasilinazların ilk temsilcisidir. OXA-23 daha sonra bir çok ülkeden çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Pennsylvania'da yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitesinden izole edilen *A. baumannii* izolatlarının %16,3'ünde OXA-23 varlığı gösterilmiştir (Adams-Haduch ve ark.2008). Tayland'ta ilk defa 2009 yılında yapılan bir çalışmada 13 klinik izolatta rapor edilmiştir (Niumsup ve ark.2009).

OXA-23 varlığının tespitinden sonra bu genin epidemiyolojik araştırmasına yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Çin'de 2012 yılında eğitim araştırma hastanesinde yapılan bir çalışmada 33 adet karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının 18'inde OXA-23 geninin varlığını göstermişler ve MLST analizi sonucunda ise bu suşların 14'ünün ST92 olduğunu bildirmişlerdir (Qiao Zhong ve ark.2012). İtalya'da yapılan çok merkezli 5 yıllık çalışma sonucunda 202 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatın 21'inde hem OXA-23 hem de OXA-58 genini bir arada 27'sinde ise OXA-23 genini tek başına belirlemişler ve bu suşlara MLST ve PFGE yöntemi ile yaptıkları klonalite çalışması sonucunda European clone I ve II ile benzerlik gösterdiklerini ifade etmişlerdir (Mezzatesta ve ark.2011). Amerika'da yapılan benzer bir çalışmada New York, Pennsylvania, Florida, Missouri, Nevada ve Kaliforniya'dan izole edilen OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarına MLST ve PFGE yöntemi ile yaptıkları klonalite çalışması sonucunda European clone II ile benzerlik gösterdiğini ve bu klonun global epidemik bir klon olduğunu vurgulamışlardır

(Adams-Haduch ve ark.2011). Mugnier ve ark.(2010)'nın aynı yöntemleri uyguladıkları 15 ülkeyi kapsayan çalışmada 4'ü yeni olmak üzere 8 sekans tipi belirlemişler ve bu sekans tiplerinin European clone I ve II üzerine yoğunlaştığını tespiti etmişlerdir.

Kolombiya'da 10 hastaneyi kapsayan çok merkezli bir çalışmada toplam 66 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatın 65'inde OXA-23 geninin varlığını tespit etmişler ve hastaneler arası klonal ilişki belirlemişlerdir (Villegas ve ark.2007) Nowak ve ark (2012)'nin hastane enfeksiyonu etkeni olarak belirledikleri karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının yoğun bakım ünitelerinden çok özellikle yanık tedavi ünitelerinde önemli bir risk grubu olup burada yoğunlaştığını ifade etmişlerdir.

Taiwan'da üç yıllık bir periyodu (2005-2007 yılı) kapsayan bir çalışmada özellikle 2006-2007 yılları boyunca OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının hastanede yaygın bir suş olduğunu PFGE yöntemi ile göstermişlerdir (Lin ve ark.2011). Yunanistan'da yapılan iki yıllık (2010-2011 yılı) bir çalışmada ise 2010 yılında hastanede hakim olan OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının yerine 2011 yılında %72.4 oranla OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatların aldığını ve bu suşlar ile enfekte olan hastaların tedavi opsiyonlarını kısıtlı olduğunu ifade etmişlerdir (Liakopoulos ve ark.2012)

On ülkeyi kapsayan (Çin, Hindistan, Endonezya, Tayland, Kore, Taiwan, Singapur, Austuralya, Hong Kong ve Filipinler) 2009 yılı SENRTY surveyans çalışmasında özellikle OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının PFGE çalışması sonucunda bu ülkeler için epidemik bir potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır (Mendes ve ark.2009). Amerika'da yapılan başka bir çalışmada ise benzer şekilde OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının hastane enfeksiyonları için önemli bir tehdit olduğu ifade edilmiştir (Srinivasan ve ark.2009).

OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları değişik dönemlerde salgınlarla karşımıza çıkmıştır. Örneğin Dalla-Costa ve ark(2003)'ı tarafından, Brezilya'da, Naas ve ark(2005)'ı tarafından Fransa'da ve Yang ve ark(2009)'ı tarafından Kore'de tek bir klondan kaynaklanan salgınlar oluturdıkları bildirilmiştir. Enfeksiyon kaynağı olarakta hastane ortamı ve cross kontaminasyon sorumlu tutulmuştur. OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii*

izolatları sadece hastanelerden izole edilmemiştir. Senegal'de yapılan bir çalışmada dışkı örneklerinde ve insan baş bitinde varlığı gösterilmiştir. Yazarlar tarafından karbapenem dirençli *A. baumannii* bağlı enfeksiyonlar için bu ortamların bir rezarvuvar olabileceği ifade edilmiştir (Kempf ve ark.2012).

Kazanılmış karbapenem hidrolize eden oksasilineazlar içinde önemli bir potansiyele sahip küme ise ilk olarak Fransa'da saptanan OXA-58'dir (Poirel ve ark.2005). OXA-58, OXA-51 doğal enzim kümesi ile %59 benzerliğine sahiptir. OXA-58'in *A. baumannii*'de eksprese olduğunda karbapenemlere duyarlılığı azaltıp, aşırı ekspresyon durumunda da yüksek karbapenem direncine yol açtığı bildirilmiştir. OXA-58 tipi enzimler tüm dünyada farklı coğrafi bölgelerde saptanmıştır. (Çiftçi ve Aşık 2011). Örneğin başka bir çalışmada üç kıtada üç ayrı ülkeden (Arjantin, Kuveyt ve İngiltere) toplanan 10 yıllık çalışmada OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının yaygın bir suş olduğunu vurgulanmıştır. (Coelho ve ark 2006). Altı ülkeden (Fransa, Yunanistan, İtalya, Romanya, İspanya ve Türkiye) 12 merkezin katıldığı benzer bir çalışmada karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında OXA-58 geninin varlığı gösterilmiş ve PFGE yöntemi ile klonal ilişki incelenmiştir. Çalışmada plasmid kaynaklı bu suşların karbenem direncinin gelişmesinde önemli bir katkısı olabileceği ifade edilmiştir (Marque ve ark.2005). Bir Güney Amerika ülkesi olan Brezilya'da ise OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının varlığı Figueiredo ve arkadaşları tarafından 2011 yılında rapor edilmiştir (Figueiredo ve ark.2011)

İtalya'da yapılan bir çalışmada OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında PFGE ve plasmid analizi sonucunda European clone I ve II'den farklı iki klon tespit edilmiş ve bu klonların hastanenin bazı servislerinde salgınlar oluşturabileceği belirtilmiştir (Mendes ve ark.2009). Çalışmalarda değişik tarihlerde çeşitli ülkelerde OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarına bağlı salgınlar bildirilmiştir, örneğin Yunanistan'da 2003-2005 tarihleri arasında bir pediatri hastanesinde OXA-58 kaynaklı karbapenem dirençli *A. baumannii* salgını rapor edilmiş ve elde edilen tüm izolatlar arasında klonal ilişki belirlenmiştir (Poirel ve ark.2006). Benzer şekilde ülkemizden bir çalışma ile multidrug dirençli *A. baumannii* bağlı bir salgının kaynağının OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* olduğunu bildirilmiş ve PFGE ile yapılan klonalite çalışması sonucunda tek bir klondan kaynaklanan bir salgın suşunun olduğunu belirtilmiştir (Özen ve ark.2009). Külah ve ark (2010)'nın yaptıkları diğer

bir çalışmada merkezlerinde değişik dönemlerde meydana gelen karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarına bağlı enfeksiyonların OXA-58 üreten suşlar olduğunu ve bunların European clone I, II ve III'den farklı klonlardan kaynaklandığını göstermişlerdir. Benzer salgınlar Fransa, Yunanistan, Belçika ve İtalya'da rapor edilmiştir (Hereiter ve ark.2005, Pournaras ve ark.2006, Bogaerts ve ark.2006, Zarrilli ve ark.2007).

OXA-23 ve OXA-58 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının prevalansına ülkemizde yapılan çalışmalarda; Ergin ve arkadaşları kan kültüründen izole ettikleri çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* izolatlarında %31 oranında OXA-23like ve %23'ünde OXA-58like geni varlığı belirlemişlerdir. Yedi yıllık verilerin değerlendirildiği çalışmada OXA-23 oranının yıllar içinde artış gösterirken, OXA-58 geninde ise baskılanmanın olduğu gözlemlenmiştir. Klonalite çalışmasının REP-PCR ile yapıldığı bu çalışmada uzun dönem varlığını sürdüren çok varyantlı patern tespit etmişlerdir (Ergin ve ark.2013).

Vahapoğlu ve ark (2006)'nın altı merkezden elde ettikleri 72 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatu ile yaptıkları çalışmada beş merkezin 10 izolatında OXA-58 geni varlığı belirlemişlerdir. Bu suşlar ile yapılan PFGE ve plasmid analiz çalışması sonucunda, genlerin plasmid kaynaklı olup, çoklu klonalite gösterdiği ifade edilmiştir. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program'ı bünyesinde ülkemizden iki merkezin (İstanbul ve Ankara) katıldığı çalışmada 44 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatu 26'sında (%59.1) OXA-23 geni, 18'inde (%40.9) OXA-58 geni tespit etmişlerdir. İstanbul'dan izole edilen 26 suşun 25'inde OXA-23 geni belirlenirken, Ankara'dan izole edilen 18 suşun 17'sinde OXA-58 geni bulunmuştur. PFGE çalışması sonucunda suşlar arasında yaygın bir klonalite görülmüştür (Gür ve ark.2008). İki merkezden izole edilen 105 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatu ile yaptığımız çalışmada izolatların tümünde OXA-51 geni saptanırken, 49'ünde OXA-23, 56'sında OXA-58 suşu belirlenmiştir. OXA-23 geni taşıyan suşların hem Meram Tıp Fakültesi Hastanesi hem de Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı olduğu gözlemlenirken, OXA-58 geni taşıyan suşların sadece Meram Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı olduğu, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde OXA-58 geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının bulunmadığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda da görüleceği gibi OXA tipleri ülkeler arasında hatta hastaneler arasında farklılıklar göstermektedir.

Gür ve arkadaşlarının yaptığı SENTRY çalışması gibi bizim çalışmamızda da hastaneler arası OXA tipinde farklılık görülmekte olup Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde OXA-58 geni taşıyan *A. baumannii* izolatu belirlenmemiş sadece OXA-23 geni taşıyan suşların varlığı gösterilmiştir. OXA-23 genlerinin dendogram analizleri incelendiğinde iki hastanenin klonlarının geniş dağılım göstermiş olup 32 grup belirlenmiştir. Meram Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı OXA-23 geni taşıyan suşlar ile Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı OXA-23 taşıyan suşlar arasındaki benzerlik oranı <90'nın altında olup ilişkisiz kabul edilmiştir. OXA-58 suşlarının klonal ilişkisine bakıldığında 23 grup belirlenmiştir. Bazı grupların özellikle 3, 7, 14 ve 17'nin Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde küçük salgınlar oluşturduğu söylenebilir..

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile Meram Tıp Fakültesi Hastanesi'nden ve Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında karbapenem direncinin yüksek oranda (%51.5) olduğunu gösterdi.

Karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarında OXA-51 ile birlikte bulunan OXA-23 ve OXA-58 genlerinin varlığı multipleks PCR yöntemi ile araştırıldı. OXA genlerinin değişik oranlarda (OXA-51 %100; OXA-58 %53.3; OXA-23 %46.6) pozitif olduğu görüldü. OXA-23 geni taşıyan suşların hem Meram Tıp Fakültesi Hastanesi hem de Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı olduğu gözlemlenirken, OXA-58 geni taşıyan suşların sadece Meram Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı olduğu, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde OXA-58 geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının bulunmadığı tespit edildi.

Çalışmada *A. baumannii* karbapenem direncinde OXA-51 ile birlikte bulunan OXA genlerinin önemli bir rol oynadığı gösterildi. OXA geni taşıyan *Acinetobacter* izolatlarının klonal ilişkisi epidemiyolojik tiplendirmenin altın standardı olarak tanımlanan PFGE yöntemi ile araştırıldı. *A. baumannii* izolatlarının *ApaI* ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE profillerinin, dendogramı oluşturuldu.

OXA-23 genlerinin dendogram analizleri incelendiğinde iki hastanenin suşları geniş bir klonal dağılım göstermiş olup 32 grup belirlendi. Meram Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı OXA-23 geni taşıyan suşlar ile Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kaynaklı OXA-23 taşıyan suşlar arasındaki benzerlik oranı <%90'nın altında olup ilişkisiz kabul edildi. Ortak bir salgın izolatı saptanmadı. OXA-58 suşlarının klonal ilişkisine bakıldığında 23 grup belirlendi. Bazı grupların özellikle 3, 7, 14 ve 17'nin Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde küçük salgınlar oluşturduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının her iki hastanede de oldukça yaygın olduğu görüldü, bu bakterinin neden olduğu direnç mekanizmalarına yönelik saptayabildiğimiz epidemiyolojik verilerin hastanemizde ileriye yönelik araştırmalar ve tedavi yöntemleri açısından yararlı olabileceği düşünüldü.

Çalışmamız, hastanemizde *A. baumannii* izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin ortaya konması açısından bir başlangıç olma niteliğindedir. Bundan sonra bu bakteri ile yapılacak ileri çalışmalarla dirence neden olan mekanizmalar, bu

genlerin transferinde rol alan integronlar, integronlara ilişkin epidemiyolojik veriler ve risk faktörleri daha iyi ortaya koyulabilecek. Böylece özellikle yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon kontrolü ve tedavi protokolleri daha da etkin ve verimli olarak gerçekleştirilebilecektir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA-23 ve OXA-58 Tipi Genişlemiş
Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması ve PFGE Yöntemi ile
Klonal Yakınlığının İncelenmesi**

Şerafettin KEYİK

Danışman: Doç.Dr. Uğur ARSLAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2013

Acinetobacter baumannii sağlık kuruluşlarında hastane enfeksiyonlarına yol açan fırsatçı ve çoklu ilaç direncine sahip önemli bir patojendir. Son on yıldır, D sınıfı beta-laktamazların yayılması nedeniyle *A. baumannii*'de karbapenemlere dirençte önemli ve tehdit eden bir artış tüm dünyada bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı karbapenemlere dirençli *A. baumannii* suşlarında OXA tipi β -laktamazların (OXA-23 ve OXA-58) varlığının ve klonal ilişkilerinin araştırılmasıdır.

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında 2007-2012 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 204 *A. baumannii* suşu çalışmaya alındı. Bakteri identifikasyonu konvansiyonel yöntemler ve Phoenix 100 BD (Becton Dickinson, Sparks) ve VITEK 2 (bioMerieux, France) otomatize sistemleri ile yapıldı. Karbapenem duyarlılık testi Clinical and Laboratory Standards Institute önerilerine göre Kirby-Bauer disk-difüzyon yöntemi ile saptandı. OXA 23-like, OXA-58-like ve OXA-51-like genleri multipleks PCR yöntemi ile araştırıldı ve klonal ilişki pulsed field gel electrophoresis (PFGE) yöntemi ile belirlendi.

A. baumannii izolatlarının 105'i imipenem ve meropenem dirençli idi. Karbapenemlere dirençli *A. baumannii* izolatlarının hepsi intrensek OXA-51-like geni taşıyordu. blaOXA-23 ve blaOXA-58 genleri sırasıyla izolatların %46.6 ve %53.3'ünde saptandı. blaOXA-23 geni hem Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi hem de Meram Tıp Fakültesi'nde izole edilen suşlarda saptanırken blaOXA-58 geni sadece Meram Tıp Fakültesi suşlarında tespit edildi. *A. baumannii* izolatlarının *Apal* ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE yöntemi ile OXA-23 üreten *A. baumannii* suşlarında 32 farklı grup ve OXA-58 üreten *A. baumannii* suşlarında 23 farklı grup belirlendi. İki hastane arasında ortak bir salgın izolatı saptanmadı.

Bu çalışmada *A. baumannii* izolatlarında görülen karbapenem direncinde OXA-51 ile birlikte OXA-23 ve blaOXA-58 genlerinin önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Karbapenemlere dirençli OXA-23 ve OXA-58 üreten *A. baumannii* hastane suşlarının epidemik bir potansiyele sahip olduğu ve izolatların epidemiyolojik ilişkisini tanımlamak için moleküler yöntemlerin gerekliliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, OXA tipi Beta laktamazlar, Pulsed Field Gel Elektroforezi

7. SUMMARY

T.C.

SELÇUK UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Detection of Extended Spectrum Beta Lactamase Type OXA-23 and OXA-58

From The *Acinetobacter baumannii* Species and Investigation of Clonal

Relationship by PFGE

Şerafettin KEYİK

Advisor: Associate Prof.Dr. Uğur ARSLAN

Department of Clinical Microbiology

MS THESIS / KONYA-2013

Acinetobacter baumannii is an important opportunistic and multidrug-resistant pathogen causing nosocomial infections in health facilities. Over the last 10 years, a significant and threatening increase in resistance to carbapenems in *A. baumannii*, mainly due to dissemination of class D beta-lactamases, has been reported worldwide. The aim of this study was to investigate the presence of OXA type β -lactamases (OXA-23 and OXA-58) in *A. baumannii* strains resistant to carbapenems and their clonal relatedness.

A total of 204 non-duplicate *A. baumannii* isolated from various clinical samples in the Microbiology Laboratories of Selçuk University Faculty of Medicine and Faculty of Meram between 2007-2012 were included in this study. The isolates were identified by conventional methods and Phoenix 100 BD (Becton Dickinson, Sparks) and VITEK 2 (bioMerieux, France) automated systems. Carbapenem susceptibility test was performed by Kirby-Bauer disk-diffusion method according to the standards of Clinical and Laboratory Standards Institute. OXA 23-like, OXA-58-like and OXA-51-like genes were amplified by multiplex PCR assay and clonal relatedness was investigated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

One hundred five isolates were resistant to imipenem and meropenem. All carbapenem resistant strains, *A. baumannii* isolates carried the intrinsic OXA-51-like gene. The *bla*OXA-23 and *bla*OXA-58 genes were detected in 46.6% and 53.3% of isolates, respectively. *bla*OXA-23 gene determined in both Faculty of Medicine and Faculty of Meram but *bla*OXA-58 gene only determined in Faculty of Meram. In the PFGE analysis of *A. baumannii* isolates for genomic DNA that was restricted with *Apa*I, 32 different groups have been found in OXA-23 producing *A. baumannii* strains and 23 different groups have been found in OXA-58 producing *A. baumannii* strains. Any common epidemic isolates have not been found between two hospitals.

In this study it is shown that OXA-23 and *bla*OXA-58 genes found with OXA-51 has a significant role in *A. baumannii* carbapenem resistance. Carbapenem-resistant OXA-23 and OXA-58 producing *A. baumannii* strains showed the epidemic potential of this nosocomial pathogen and the requirement of molecular typing methods to identify the epidemiologic relationship of the isolates.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, OXA type Beta lactamases, Pulsed Field Gel Electrophoresis

8. KAYNAKLAR

1. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, Urban CM, Spellberg BJ, Rhee D, Halstead DC, Pasculle AW, Doi Y. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *Journal Clinical Microbiology* Nov. 2011, p. 3849–3854
2. Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, Harrison LH, Doi Y. Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates at a Tertiary Medical Center in Pennsylvania: . *Antimicrob Agents Chemother*, Nov. 2008, p. 3837–3843 Vol. 52, No. 110066-4804/08/\$08.00_0 doi:10.1128/AAC.00570-08, American Society for Microbiology.
3. Akalın H, Özakin C, Kahveci F, Sütçü Ş, Helvacı S, Gedikoğlu S ve ark. Hastane kökenli pnömoniler. *Flora* 1999;4(4): 253–257.
4. Akalın H. Çoğul dirençli gram negatif bakteriler. Doğanay M, Ünal S (Editörler). Hastane infeksiyonları'nda. 1. baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003.s.269–89.
5. Akalın H. Kolistin. *ANKEM Derg* 2007; 21(Ek 2): 26-28.
6. Akova M. Dikkat: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) var! *ANKEM Derg* 2004; 18(Ek 2): 98-103.
7. Allen DM, Hartman BJ.(1). *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, ed(s). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2000; 5th ed. 2339- 2344.
8. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (Eds.). *Principles and Practice Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Inc. 2000:2339–2344.
9. Amudhan SM, Sekar U, Arunagiri K, Sekar B. OXA beta-lactamase-mediated carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol*. 2011 Jul-Sep;29(3):269–274
10. Anyes, Carbepenamase. *ANKEM Derg*, 1997; 11:221–224.
11. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N and Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995; 39: 1612-1615.
12. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth Edition, Eds: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. ASM pres Washington 1995 D.C.190-208.
13. Bachmeyer C, Landgraf N, Cordier F, Lemaitre P, Blum L. *Acinetobacter baumannii* folliculitis in a patient with AIDS. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 256-258.
14. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R G, Rossolini M and Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J. Antimicrob. Chemother*. 2004; 54: 282-283.
15. Baysal B. Bakteriyel infeksiyonların patogenezi. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (Editörler) *Temel ve klinik mikrobiyoloji'de*. 1. baskı. Ankara. Güneş Kitabevi; 1999. s.109–112.
16. Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J Hosp Infect* 1991;18(suppl A):250-255.
17. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148-165.
18. Bimbaum J, Kahan F M, Kroop H. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. *Am J Med*, 1985; 78(6A): 3–21.

19. Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Piérard D, et al. Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J Clin Microbiol* 2006;44:4189–4192.
20. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11(4): 529–544.
21. Bonnet R, Marchandin H., Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Jumas-Bilak E. & Sirot J. (2002) Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2004-6.
22. Bonomo R.A, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006;43:49–56.
23. Boo, T. W., Walsh, F. & Crowley, B. (2006) First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 58, 1101-2.
24. Bouvet PJM, Jeanjean S, Vieu JF, Dijkshoorn L. Species biotype, and bacteriophage type determination compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J Clin Microbiol* 1990;28:170–176.
25. Bouvet PJM, Grimont PAD. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:228-240
26. Brown, S. & Amyes S, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006, 57, 1-3.
27. Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1211–1233.
28. Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989; 259–263.
29. Chim H, Tan HB, Song C. Five-year review of infections in a burn intensive care unit: High incidence of *Acinetobacter baumannii* in a tropical climate. *Burns* 2007; 33: 1008-1014.
30. Cisneros JM; Rodriguez-Bano, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment : *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 687-693.
31. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. . *Antimicrob Agents Chemother*, Feb. 2006, p. 756–758
32. Cunha B A. Antibiotic resistance. *Antibiotic therapy, Part I. Medical Clinics of North America*, 2000;84: 1407- 29.
33. Çiftçi İ.H. Aşık G. *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları ANKEM Derg 2011;25(3):196-207
34. D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 588- 591.
35. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Pentead-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2003, p. 3403–3406
36. Danel F, Hall L M C, Gür D, Akalın H E, Livermore D M. Transferable production of PER–1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J -Antimicrob Chemother*, 1995; 35: 281–294.
37. Davis AK, Moran AK, McAllister KC, Gray JP. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1218-1224.
38. Dijkshoorn L, van Dalen R, van Ooyen A, Bijl D, Tjernberg I, Michel MF, Horrevorts M. Endemic *Acinetobacter* in intensive care unit: epidemiology and clinical impact. *J Clin Pathol* 1993;46:533-536.
39. Dolapçı İ. Genişlemiş spektrumlu beta lakltamazlar: Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, tedavi ve enfeksiyon kontrolündeki rolleri. *Mikrobiyol Bült* 2005; 39: 229-240.

40. Donald H M, Scaite W, Anyes S G B, Young H K. Sequence analysis of ARI 1, a novel OXA beta-lactamase responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6b92. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44:196–199.
41. Durmaz R, Otlu B, Çalışkan A, Gürsoy N. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *klebsiella* türlerinin moleküler tiplendirmesinde kullanılacak kısa süreli “Pulsed-Field gel” elektroforez (PFGE) protokolü. *ANKEM Derg* 2007;21(2):113–117
42. Durmaz R. : Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. İkinci Baskı, Editör, Durmaz R, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2001: 139-147
43. Ergin A, Haşçelik G, Eser Ö K. Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2013; 45: 26–31
44. Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonça-Souza CR, Teixeira LM, Mondino SS. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(3): 368-370, May 2011
45. Gerçekler D. Miscellaneous (çeşitli) Gram negatif bakteriler. In: Ustaçelebi Ş editor, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999; 15: 541-550.
46. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for Identification of *Acinetobacter* Species. *J Clin Microbiol* 1991;29:277-282.
47. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 106-119.
48. Goel KV, Kapil A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiology* 2001;1:16–23.
49. Goic-Barisic I, Tonkic M. The review of carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Acta Med Croatica* 2009;63(4):285-296.
50. Güllü N, Gürol Y, Bülüş M, Bal Ç. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında görülen betalaktam direnç fenotipleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2003; 7: 141–147.
51. Gür D, Korten V, Ünal S, Deshpande LM, Castanheira M. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. *Journal of Medical Microbiology* (2008), 57, 1529–1532
52. Gür D. Beta-laktamazların sınıflandırılması. *Flora Dergisi* 1996;1:80–86.
53. Harold C, Neu M D. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am J Med*, 1985; (2A): 2–13.
54. Hartzell JD, Kim AS, Kortepeter MG, Moran KA. *Acinetobacter pneumonia*: a review. *MedGenMed*. 2007; 9: 4. Published online 2007 July 5.
55. Hawley J.S., Murray C.K., and Jorgensen J.H. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008; 52:1; 351-352.
56. Helfand, M. S. & Bonomo, R. A. ;Beta-lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2003 3, 9-23.
57. Héritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:115–118.
58. Hogg GM, Barr JG, Webb CH. In vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:494-495.

59. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp. and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol* 1994;32:2353-2358.
60. Jeon B C, Jeong S H, Bae I K, Kwon S B, Lee K, Young D, Lee J H, Song J S. & Lee S H. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *J Clin Microbiol*, 2005;43, 2241-2245.
61. Joly-Guillou ML, Wolff M, Farinotti R, Bryskier A, Carbon C. In vivo activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or amikacin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:827-830.
62. Kaya O, Kırkan Ş, Ünal B. *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu hastane infeksiyonları. *İnfeksiyon Derg* 2000;14: 565-567.
63. Kempf M, Rolain J-M, Diatta G, Azza S, Samb B, Mediannikov O, Sow A G, Diene S M, Fenollar F, Raoult D. Carbapenem Resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: The Paradigm of a Common Phenomenon in Natural Reservoirs; /www.plosone.org /June 2012 | Volume 7 | Issue 6 | e39495
64. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:627-632
65. Koneman W.E, Procop W.G, Schreckenberger C.P, Woods L.G. Nonfermentative Gram negative bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006;8th ed Chapter 7: 303-391.
66. Köksal F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. In: Durmaz R editor, Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kursu 2. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 2001; 15-34.
67. Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N, Rijnsburger MC, Savelkoul PH. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Pages 114-118, August 2010
68. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1671-1673.
69. Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998;43:1584-1590.
70. Levy J, Oshry T, Rabinowitz R, Lifshitz T. *Acinetobacter* corneal graft ulcer and endophthalmitis: report of two cases. *Can J Ophthalmol* 2005; 40: 79-82.
71. Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas E A, Karagouni A D, Daikos G L, Tzouveleki L S, Petinaki E Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011: www.eurosurveillance.org Article published on 15 March 2012 *Euro Surveill*.2012;17(11):pii=20117. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20117>
72. Lin MF, Kuo HY, Yeh HW, Yang CM, Sung CH, Tu CC, Huang ML, Liou ML. Emergence and dissemination of bla(OXA-23)-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* sp in a regional hospital in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2011) 44, 39-44
73. Livermore D M. Beta-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother*, 1998;41(D): 24-41.
74. Livermore D M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8: 557-584.
75. Lortholary O, Fagon JY, Buu Hoi A, et al. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 1995;20:790-6.
76. Mahgoub S, Ahmed J, Glatt EA,. Underlying characteristics of patients harboring highly resistant *Acinetobacter baumannii*. *Am J Infect Control* 2002; 30: 386-390.

77. Mandell L: Doripenem: a new carbapenem in the treatment of nosocomial infection, *Clin Infect Dis* 2009;49(Suppl 1):S 1-3.
78. Marque S, Poirel L, Heritier C, Brisse S, Blasco M D, Filip R, Coman G, Naas T and Nordmann P. Regional Occurrence of Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Sept. 2005, p. 4885–4888
79. Massidda O, Rossolini G M, and Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. *J. Bacteriol*, 1991; 173:4611–4617.
80. Mayer K H, Opal J M, Medeiros A A: Mechanisms of antibiotic resistance. Mandell, Bennet T, Dolin (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 1994; 13:1015–18.
81. Medeiros AA. β -lactamases: Quality and resistance. *Clin Microbiol Infect*. 1997; 3(14): 2–9.
82. Mendes RE, Bell J M, Turnidge J D, Castanheira M and Jones R N. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009) 63, 55–59
83. Mendes RE, Spanu T, Deshpande L, Castanheira M, Jones RN, Fadda G. Clonal dissemination of two clusters of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 or OXA-58 in Rome, Italy. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 588–592
84. Mezzatesta M. L, D'Andrea M. M, Migliavacca R, Giani T, Gona F, Nucleo E, Fugazza G, Pagani L, Rossolini G. M. and Stefani S. Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy: *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 160–166
85. *Molecular Diagnosis In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA editors: Medical Microbiology*, 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby 2005; 17: 177-181.
86. Mugnier P D, Poirel L, Naas T, and Nordmann P. Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*: *Emerging Infectious Diseases* Vol. 16, No. 1, January 2010
87. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins, *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(4):1432-1440
88. Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Sept. 2005, p. 4826–4829
89. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. Review in *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 42-52.
90. Negri M C, Morrossini M I, Blazquero J, Bacquero F. Antibiotic resistance in hospital infections: the role of newer cephalosporins. *Clin Microb Infect*. 2000; 6(13): 95–97.
91. Ng PC, Herrington RA, Beane CA, Ghoneim AT, Dear PR. An outbreak of *Acinetobacter* septicaemia in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 1989;14:363-368.
92. Niumsup PR, Boonkerd N, Tansawai U, Tiloklurs M. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. *Jpn J Infect Dis*. 2009 Mar;62(2):152-154.
93. Nord JA, Dy ME, LaBombardi VJ, Kislak JW. The emergence of resistant strains of *Acinetobacter baumannii*: clinical and infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 565–567.
94. Noskin GA. Tigecycline: A new glycylycine for treatment of serious infections. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 303-314.
95. Nowak P, Paluchowska P, Budak A. Distribution of blaOXA genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *NEW MICROBIOLOGICA*, 35, 317-325, 2012

96. Olive DM and Bean P. : Principles and applications of methods for DNA-based typing microorganims. *J Clin Microbiol* 1999. 37, 1661-1669.
97. Özen N, Ergani A, Naas T, Ögünç D, Gültekin M, Çolak D, Nordmann P. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the Carbapenemase OXA-58 in Turkey. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 2009, 1, 1-8
98. Öztürk R. Hastane enfeksiyonları kontrolünde moleküler mikrobiyoloji metotlarının önemi. Ed: Durmaz R. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007: 64-75.
99. Paetzel M., Danel F., De castro L., Mosimann, S. C, Page, M. G. & Strynadka N. C. Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol* 2000. 7, 918-925.
100. Pagniez G, Radice M, Amoroso A, Famiglietti A and Gutkind G. Abstr. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, abstr. Washington, D. C. 2004; C1-293
101. Parker M.T. *Chromobacterium, Flavobacterium, Acinetobacter* and *Alkaligenes*. In: Parker MT editor, Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity, London: Edward Arnold Ltd, 1983;7 chapter 32: 263-271.
102. Paterson DL, Depestel DD: Doripenem, Clin Infect Dis 2009;49(2):291-298.
103. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI-1: Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, *Int J Antimicrob Agents* 1993;2(2):81-87.
104. Patricia A. Bradford, Phd. What's new in β -lactamases? Current Infectious Disease Reports 2001; 3:13–19.
105. Pennington JE. Nosocomial Respiratory Infections. Principles and Practice of Infectious diseases. Forth Edition, New-York, Churchill Livingstone. 1995.
106. Perez F, Hujer MA, Hujer MK, Decker KB, Rather PN, Bonomo AR. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3471–3784.
107. Podzorski PR. Gel electrophoresis, Southern hybridization and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. In: Persing HD editor. Molecular Microbiology, Washington: ASM Press, 2004; Chapter 22; 273-280.
108. Poirel L, Lebessi E, Héritier C, Patsoura A, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clinical Microbiology and Infection* 2006 Nov;12(11):1138-1141.
109. Poirel L, Magalhaes M, Lopes and Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene blaSPM-1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 1406-1409.
110. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordman P. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan. 2005, p. 202–208
111. Poirel, L. & Nordmann, P. :Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, (2006) 12, 826-836
112. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, et al. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:557–561.
113. Qiao Zhong, M.D., Weidong Xu, M.D., Yuanjian Wu, M.D., and Hongxing Xu, M.D. Clonal Spread of Carbapenem Non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit in a Teaching Hospital in China: *Ann Lab Med* 2012;32:413-419
114. Quiroga A M, Franceshini N, Rossolini G M, Gutking G, Bonfiglio G, Franchino L, Amicosante G. Interaction of cefotetan and the metallo betalactamases produced in *Aeromonas* spp and invitro activity. *Chemother.* 2000; 46: 177–183.
115. Rasmussen B A, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997; 41: 223–232.

133. Tatman-Otkun M. Hastane İnfeksiyonlarından İzole edilen *Acinetobacter* Türlerinde β Laktamazların İzoelektrik Odaklama Yönteniyle Tiplendirilmesi (doktora tezi). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 1998.
134. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electroforesis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 33, 2233-2239.
135. Tetik T. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen gram negatif nonfermenter bakterilerde metallo beta-laktamaz enzim aktivitesinin araştırılması (Uzmanlık tezi).Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 2008
136. Thamlikitkul V, Santiprasitkul S, Suntanondra L, Pakaworawuth S, Tiangrim S, Udompuntharak S et al. Skin flora of patients in Thailand. *Am J Infect Control* 2003; 31: 80-84.
137. Tilley PA, Roberts FJ. Bacteremia with *Acinetobacter* species: risk factors and prognosis in different clinical settings. *Clin Infect Dis* 1994;18:896-900.
138. Turton J F, Kaufmann M E, Glover J, Coelho J M, Warner M, Pike R. & Pitt T L. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*, 2005;43, 3074-3082.
139. Usluer G. Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyolojive kontrol. *Flora*, 2002; 7: 135–41.
140. Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol* 2001;50:642–645.
141. Vahaboğlu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, Kolaylı F, Eroğlu C. High prevalence of OXA-51-type class D β -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2006) 58, 537–542
142. Valero C, Garcia Palomo JD, Matorras P, Fernandez-Mazarrasa C, Gonzalez Fernandez C, Farinas MC. *Acinetobacter* bacteraemia in a teaching hospital, 1989–1998. *Eur J Intern Med* 2001; 12: 425-9.
143. Van Looveren M, Goossens H, the ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 684-704.
144. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, Livermore D, Quinn JP. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* Clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian Hospitals: Antimicrobial Agents and chemotherapy June 2007, p. 2001–2004
145. Von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. In: Murray RP editor. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM press 1995; 6th ed, Chapter 41: 520-532.
146. Walter-Rasmussen, J. & Hoiby, N. ;OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006, 57, 373-383.
147. Warren JW. Nosocomial Urinary Tract Infections. Principles and Practice of Infectious Diseases. Forth Edition, New-York, Churchill Livingstone. 1995.
148. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35: 147-151.
149. Weaver R, Actis LA. Identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1994;32:1833-1838.
150. Wiedemann Bi Dietz H, Preifle D. Induction of β lactamase in *Enterobacter aerogenes*. *Clin Infect Dis* 1998; 27(11): 42–47.
151. Wiedemann Bi Dietz H, Preifle D. Induction of β lactamase in *Enterobacter aerogenes* *Clin Infect Dis.* 1999; 28(9): 4–7.
152. Willams JD. Beta laktamaz inhibitörleri ve in vitro aktiviteyi sulbaktam ve sulbaktam/cefaperazon. *Clin Infect Dis* 1997; 24:494–497.

153. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. Lippincott Williams and Wilkins Sixth Edition, 2006; 309-375.
154. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27(4):351-3.
155. Yang H Y, Lee J H, Suh T J, Lee M K. Outbreaks of Imipenem Resistant *Acinetobacter Baumannii* Producing OXA-23 β -Lactamase in a Tertiary Care Hospital in Korea. *Yonsei Med J* 50(6): 764-770, 2009
156. Yucesoy M, Yulug N, Kocagöz S, Unal S, Çetin S, Çalangu S. Antimicrobial resistance of gramnegative isolates from intensive care units in Turkey: comparison to previous three years. *J Chemother*, 2000; 12:294–298.
157. Yuluğ N. Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. *ANKEM Derg*, 1997; 11. 205–7.
158. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klimik dergisi* 2001;14 (2): 42–46.
159. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:481–489.

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı SOYADI :Şerafettin KEYİK
Uyruğu :Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Yeri ve Tarihi :Konya - 1979
Telefon :0 530 1406444
e-mail :skeyik@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:Cemil Keleşoğlu Lisesi, Karatay, Konya	1996
Önlisans	:Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2001
Üniversite	:Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2005
Yüksek Lisans	:Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2013

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2000–2005	S.Ü. Meram Tıp Fak. Hast. Kan Merkezi	Laboratuar Tekn.
2005-	Türkkızılayı Konya Kan Bağışı Merkezi	KanBağ. Kznm.Uzm.

UZMANLIK ALANI

Yüksek Lisans eğitimi devam etmekte olup ders aşamasını 93,79 / 100 ortalama ile tamamladı. Öğrendiği ve uygulayabildiği mikrobiyolojik ve moleküler teknikler; DNA izolasyonu, Real-Time PCR uygulaması, Elektroforez uygulamaları, MIC konsatrasyon uygulamaları,E-test uygulamaları, PFGE uygulamaları,.

YAYINLAR

1-H Türk Dağı, H Kuş, Ş Keyik, U Arslan, İ Tuncer, D Fındık. Karbapenemlere Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. ANKEM Derg 2012;26(4):111-5.

POSTERLER

1-S Keyik, U Arslan, H Turk Dagi, T Bodur, D Findik. Investigation of clonal relatedness OXA-23 carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* strains in Konya, Turkey. 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, Tirana-Albania. 15-18 May 2013;P328

2-S Keyik, H Türk Dağı, U Arslan, D Fındık. Investigation of OXA type β -lactamases in Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains in Konya, Turkey. 13th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection, China 25-28 October 2012: PS-016.

3- H Türk Dağı, H Kuş, **Ş Keyik**, U Arslan, İ Tuncer, D Fındık. Karbapenemlere Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2012. Aydın: P103.

4- H Türk Dağı, SÖ Anlıaçık, **Ş Keyik**, U Arslan. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Bölge Kan Merkezi'ne Başvuran Hasta ve Donörlerin Kan Grubu Dağılımı. V. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi, 18-22 Kasım 2012. Antalya: P30