



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBAPENEM DİRENÇLİ *Acinetobacter baumannii* KLİNİK
İZOLATLARINDA DİRENÇ GENLERİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÜSEYİN BURAK ÖZÇELİK

MAYIS 2019

**KARBAPENEM DİRENÇLİ *Acinetobacter baumannii* KLİNİK
İZOLATLARINDA DİRENÇ GENLERİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Hüseyin Burak ÖZÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2019

Hüseyin Burak ÖZÇELİK tarafından hazırlanan “**Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Direnç Genlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

Temel Eğitim Bölümü, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Başkan: Prof. Dr. Vahit KONAR

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Tez Savunma Tarihi : 02 / 05 / 2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Meryem EVECEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Hüseyin Burak ÖZÇELİK

05.04.2019

KARBAPENEM DİRENÇLİ *Acinetobacter baumannii* KLİNİK İZOLATLARINDA DİRENÇ GENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hüseyin Burak ÖZÇELİK

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2019

ÖZET

En önemli hastane enfeksiyon etkenlerinden *Acinetobacter baumannii*, Gram negatif, aerobik, nonfermentatif, çoğunlukla yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olan, özellikle son yıllarda çoklu antibiyotik direnci özelliğiyle tedavide zorluklar oluşturan fırsatçı bir patojendir. Dünya çapında giderek artan direnç oranlarıyla rapor edilen karbapenemler, *Acinetobacter baumannii* tedavisinde kullanılan β -laktamazlar grubunun önemli temsilcilerindedir. *Acinetobacter baumannii*, karbapenem direncinden sorumlu en yaygın OXA tipi (OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58) gen ailesine sahiptir. Çalışmada, T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yoğun bakım servisinde tedavi gören hastalardan Haziran 2017 – Ocak 2018 tarihleri arasında toplanan solunum yolu örneklerinden elde edilen *Acinetobacter baumannii* izolatları VITEK-2 cihazı ile tanımlandıktan sonra bu örneklerde mikrobiyolojik ve moleküler analizler gerçekleştirildi. Yapılan disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) testleri sonrası karbapenem dirençli suşların, seftazidim, siprofloksasin, levofloksasin, amikasin, gentamisin, tetrasiklin, tigesiklin ve kolistin antibiyotiklerine direnç profilleri belirlendi. Karbapenem direncinden sorumlu OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 genlerinin anlatımları da RT-PZR (ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) ve gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile incelendi. Tanımlanan 50 *Acinetobacter baumannii* izolatı, imipenem, meropenem, sefepim, seftazidim ve siprofloksasine %100, levofloksasine %94, amikasin %68, gentamisine %78, tetrasikline %88 ve tigesikline %6 oranında dirençli bulundu. Tüm örneklerin kolistine duyarlı olduğu ve çoklu antibiyotik direnci gösterdiği tespit edildi. Moleküler analizler sonucunda izolatların tümünde sadece OXA-23 ve OXA-51 genlerinin anlatım yaptığı belirlendi. Bu çalışma, RT-PZR ve gerçek zamanlı PZR yöntemi ile *Acinetobacter baumannii*'de OXA genlerinin araştırıldığı bölgemizdeki ilk raporlardan biridir. Elde edilen bulguların ampirik tedavilere katkı sağlaması beklenmektedir.

Sayfa Adedi : 87

Anahtar Kelimeler : *Acinetobacter baumannii*, Karbapenem direnci, Çoklu antibiyotik direnci, OXA tipi β -laktamaz

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

INVESTIGATION INTO CLINICAL ISOLATES OF RESISTANCE GENES IN
CARBAPENEM RESISTANT *Acinetobacter baumannii* BY USING
MOLECULAR METHODS

(M. Sc. Thesis)

Hüseyin Burak ÖZÇELİK

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

May 2019

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii, one of the most important infectious agents spread in hospitals, is an opportunistic, Gram-negative, aerobic, and nonfermentative pathogen that causes outbreaks often in intensive care units, causing difficulties in treatments due to multiple antibiotic resistance characteristics. Carbapenems reported with increasing resistance rates worldwide are significant representatives of the group β -lactamases that are used in the treatment of *Acinetobacter baumannii*. *Acinetobacter baumannii* has the most common type of OXA gene family (OXA-23, OXA-24, OXA-51 and OXA-58) responsible for carbapenem resistance. In this study, *Acinetobacter baumannii* isolates collected from the respiratory tract samples obtained from the patients receiving treatment between June 2017 and January 2018 at the intensive care unit in T. C. Ministry of Health Amasya University Sabuncuoğlu Şerefeddin Training and Research Hospital were identified by VITEK-2 device and microbiological with molecular analyses were performed in collected samples. Resistance profiles of carbapenem resistant strains against to ceftazidime, ciprofloxacin, levofloxacin, amikacin, gentamicin, tetracycline, tigecycline and colistin antibiotics were determined by disk diffusion and minimum inhibition concentration (MIC) tests. The expressions of OXA-23, OXA-24, OXA-51, and OXA-58 genes responsible for carbapenem resistance, were investigated by RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) and real-time PCR methods. Identified 50 *Acinetobacter baumannii* isolates were found to be 100% resistant to imipenem, meropenem, cefepim, ceftazidime and ciprofloxacin, 94% for levofloxacin, 68% for amikacin, 78% for gentamicin, 88% for tetracycline and 6% for tigecycline. It was detected that all samples are susceptible to colistin and showed multiple antibiotic resistance. As a result of molecular analyses, it was determined that the expressions of only OXA-23 and OXA-51 genes in all isolates. This study is one of the first reports in our region where OXA genes are investigated in *Acinetobacter baumannii* by RT-PCR and real-time PCR method. The obtained findings are expected to contribute to empirical treatments.

Page Number : 87

Key Words : *Acinetobacter baumannii*, Carbapenem resistance, Multidrug resistant, OXA type β -lactamase

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Önder İDİL

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL'e,

Proje konusunun belirlenmesi ve çalışmaların planlanmasında ayrıca tezimin her harfinde büyük emekleri olan, Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nın kapılarını açan hocam Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'a,

Deneylerimde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her an yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Sevgi MARAKLI ve Dr. Öğr. Üyesi Burak YAZGAN hocalarıma,

Klinik deneyimleri ile katkı sağlayan Mikrobiyoloji Uzmanı Dr. Rıdvan GÜÇKAN'a

Proje aşamasından tez yazımına birlikte yorulduğumuz dostlarım Öğretim Görevlisi İbrahim TÜRKEL ve Uzman Biyolog İkbal MACİT'e,

Doğduğum günden beri bana düşünmeyi ve sorgulamayı öğütleyen aileme,

Bu uzun maratonda sabırla bana eşlik eden değerli eşime teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Amasya Üniversitesi BAP birimi tarafından FMB-BAP 17-0268 numaralı proje ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hastane Enfeksiyonu.....	3
2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> Genel Özellikleri.....	5
2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> Enfeksiyonları.....	6
2.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	7
2.5. <i>Acinetobacter baumannii</i> Enfeksiyonlarında Kullanılan Antibiyotikler	8
2.5.1. Karbapenemler	8
2.5.2. Sefalosporinler	9
2.5.3. Kinolonlar	10
2.5.4. Aminoglikozidler	10
2.5.5. Tetrasiklinler	11
2.5.6. Polimiksinler	12

	Sayfa
2.6. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de OXA Tip Karbapenemazlar.....	13
2.6.1. OXA-23.....	13
2.6.2. OXA-24.....	14
2.6.3. OXA-51.....	14
2.6.4. OXA-58.....	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Kullanılan <i>Acinetobacter baumannii</i> klinik izolatları.....	15
3.1.2. İzolatların toplanması.....	15
3.1.3. İzolatların tanımlanması.....	15
3.1.4. İzolatlarının stoklanması	16
3.2. Mikrobiyolojik Yöntemler	17
3.2.1. Disk difüzyon	17
3.2.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmesi.....	17
3.3. Moleküler Yöntemler	18
3.3.1. Total RNA izolasyonu.....	18
3.3.2. Total RNA saflık değeri ölçümü	19
3.3.3. Komplementer DNA sentezi	20
3.3.4. Primerlerin sulandırılması.....	21
3.3.5. Sıcaklık optimizasyonu	21
3.3.6. RT-PZR protokolü	23
3.3.7. Gerçek zamanlı PZR ile gen anlatımlarının belirlenmesi	24
3.3.8. Gen anlatımının kantitatif analizi.....	26

	Sayfa
4. BULGULAR	27
4.1. Toplanacak Numunelerin Belirlenmesi.....	27
4.2. İzolatların Tanımlanması	27
4.3. Disk Difüzyon Sonuçları.....	27
4.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Sonuçları.....	29
4.5. İzolatların Direnç Profili	29
4.6. Total RNA Miktarı ve Saflığı	42
4.7. Sıcaklık Optimizasyonu	44
4.8. RT-PZR Sonuçları.....	44
4.9. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları	48
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	58
6.1. Sonuçlar.....	58
6.2. Öneriler	59
6.2.1. Araştırma sonuçlarına dayalı öneriler	59
6.2.2. İleride yapılabilecek araştırmalara yönelik öneriler.....	59
KAYNAKLAR	60
EKLER	70
Ek-1. Etik Kurul Onayı	71
ÖZGEÇMİŞ	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kinolon grupları.....	10
Çizelge 3.1. cDNA reaksiyon karışımının hazırlanması.....	20
Çizelge 3.2. Thermal cycler cihazı programı.....	20
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primer dizileri	21
Çizelge 3.4. Sıcaklık optimizasyonunda kullanılan PZR bileşenleri.....	22
Çizelge 3.5. Sıcaklık optimizasyonunda kullanılan PZR koşulları.....	22
Çizelge 3.6. RT-PZR bileşenleri.....	23
Çizelge 3.7. RT-PZR koşulları.....	24
Çizelge 3.8. Gerçek zamanlı PZR bileşenleri	25
Çizelge 3.9. Gerçek zamanlı PZR koşulları.....	25
Çizelge 4.1. Disk difüzyon sınır değerleri	28
Çizelge 4.2. Disk difüzyon ölçümleri	30
Çizelge 4.3. MİK değerleri	32
Çizelge 4.4. Direnç profili	34
Çizelge 4.5. Total RNA miktarı ve saflığı	43
Çizelge 4.6. OXA gen bölgelerinin dağılımları.....	47
Çizelge 4.7. Gerçek zamanlı PZR Ct değerleri.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. İzolatlarda imipenem için direnç dağılımı	36
Şekil 4.2. İzolatlarda meropenem için direnç dağılımı	37
Şekil 4.3. İzolatlarda sefepim için direnç dağılımı	37
Şekil 4.4. İzolatlarda seftazidim için direnç dağılımı	38
Şekil 4.5. İzolatlarda siprofloksasin için direnç dağılımı	38
Şekil 4.6. İzolatlarda levofloksasin için direnç dağılımı.....	39
Şekil 4.7. İzolatlarda amikasin için direnç dağılımı	39
Şekil 4.8. İzolatlarda gentamisin için direnç dağılımı	40
Şekil 4.9. İzolatlarda tetrasiklin için direnç dağılımı	40
Şekil 4.10. İzolatlarda tigesiklin için direnç dağılımı	41
Şekil 4.11. İzolatlarda kolistin için direnç dağılımı	41
Şekil 4.12. <i>OXA-23</i> ve <i>OXA-24</i> genine ait erime eğrisi analizi	51
Şekil 4.13. <i>OXA-51</i> ve <i>OXA-58</i> genine ait erime eğrisi analizi	51

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Eozin metilen blue (EMB) agarda <i>Acinetobacter baumannii</i>	5
Resim 3.1. Örneklerin toplanması ve stoklanması.....	16
Resim 4.1. Disk difüzyon zon çapları.....	29
Resim 4.2. MİK belirlenmesi.....	29
Resim 4.3. PZR cihazı sıcaklık optimizasyon protokolü.....	44
Resim 4.4. OXA-23 jel görüntüsü.....	45
Resim 4.5. OXA-51 jel görüntüsü.....	45
Resim 4.6. OXA-24 jel görüntüsü.....	46
Resim 4.7. OXA-58 jel görüntüsü.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
bç	Baz çifti
C	Karbon
Ct	Cycle threshold
dk	Dakika
g	Gram
kb	Kilo baz
lt	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
°C	Celsius
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye
β	Beta
μ g	Mikrogram
μ g/mL	Mikrogram / Mililitre
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CDC	Centers for Disease Control
cDNA	Komplementer DNA
CHIP	Centers for Disease Control
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EMB	Eozin Metilen Blue
HEKK	Hastane Enfeksiyonları Kontrol Komitesi
MHA	Mueller-Hinton Agar
MHB	Mueller-Hinton Broth
mRNA	Mesajcı RNA
NNIS	National Nosocomial Infections Study
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PFGE	Pulsed-Field Jel Elektforez
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
RT-PZR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSS	Santral Sinir Sistemi
TE	Tris EDTA
Tm	Erime Sıcaklığı
tRNA	Taşıyıcı RNA

1. GİRİŞ

Hastane enfeksiyonları, hastane kalış süresinde (20 kat) ve maliyet artmasında (5 kat) rol oynarken, mortaliteyi de ciddi oranda artırır. Yapılan çalışmalara göre enfeksiyonların en az üçte biri önlenbilir hastane enfeksiyonlarıdır. Yüksek morbidite, mortalite ve artan tedavi maliyetlerine sebep olan bu enfeksiyonlardan korunmaya yönelik tedbirlerin alınması ve her kurumun kendi içinde enfeksiyon kontrol programını oluşturması zorunlu olmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda (yenidoğan, prematüre bebekler, kanser ve AIDS hastaları, yaşlı hastalar gibi) ölümlere yol açabilmektedir. Birçok farklı ülkede yapılan çalışmada hastaneye yatışı yapılan hastalarda %3,1 - %14,1 oranında değişen hastane enfeksiyonu geliştiği belirlenmiştir (Hancı, 2010).

Acinetobacter baumannii, cins içinde enfeksiyonlarla en sık ilişkili insan patojenidir. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf hastalarda bu fırsatçı patojen oldukça yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan enfeksiyonlara yol açabilir. Bu bakteriler, fırsatçı patojenlerden olup, özellikle solunum yolu, üriner sistem ve yaralarda enfeksiyonlara sebep olur ve sepsis etkenidir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, cerrahi operasyon geçirmiş veya mekanik solunum altındaki hastalar, bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için yüksek risk altındadır. Karbapenemleri de içerecek şekilde çoklu antibiyotik direnci göstermesi nedeniyle hastanede yatan hastalarda nozokomiyal yara ve akciğer enfeksiyonları önemli bir sorun haline gelmiştir (Murray, Rosenthal ve Pfaller, 2016). *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı gelişen hastane kaynaklı pnömoni ciddi ve hayatı tehdit eden bir enfeksiyondur. Hastanede kalış süresinin uzaması, mekanik ventilasyona uzun süreli maruz kalma ve daha önceden antibiyotik kullanımı, *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı ventilatör ilişkili pnömoni riskini arttıran faktörlerdir (Luna ve Aruj, 2007).

Mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olan *Acinetobacter baumannii*'nin kullanılan birçok antibiyotiğe dirençli olması oldukça büyük bir sorundur (Goić-Barisić ve Tonkić, 2009). Karbapenemler çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında tercih edilen ilk antibiyotiklerdendir. Kazanılmış karbapenem direnci sıklıkla OXA-tipi karbapenemazlar ile ilişkilidir. OXA-23, OXA-24, OXA-58 tip sınıf D karbapenemazların ve doğal oksasilinaz olan OXA-51 gen anlatımlarının artması *Acinetobacter baumannii*'de kazanılmış karbapenem direncinden sorumludur (Wang ve diğerleri, 2007).

Son yıllarda karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının yaygınlaşmaması için uluslararası stratejilerin geliştirilmesi gündeme gelmiştir. Bu amaçla Dünya Sağlık Örgütü sağlık kuruluşlarında sürveyans çalışmalarının yapılmasının önemini vurgulamıştır (Şay Coşkun, 2018).

Bu çalışmada;

- T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin yoğun bakım servisinde tedavi gören hastalardan Haziran 2017 – Ocak 2018 tarihleri arasında toplanan solunum yolu sıvı örneklerinde üremiş *Acinetobacter baumannii* izolatlarının VITEK-2 otomatize sistemle tanımlanması,
- Bu örneklerden antibiyotik direnç profilinin tespiti için karbapenem dirençli izolatların seçilmesi,
- Tespit edilen karbapenem dirençli izolatlarda antibiyotik duyarlılık testleri uygulanarak sefepim, seftazidim, siprofloksasin, levofloksasin, amikasin, gentamisin, tetrasiklin, tigesiklin ve kolistin etken maddelerinin direnç profilinin saptanması,
- Karbapenem direncine sahip klinik izolatlarda *OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-51* ve *OXA-58* gen anlatımlarının, kalitatif ve kantitatif olarak sırasıyla RT-PZR (ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) ve gerçek zamanlı PZR yöntemleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastane Enfeksiyonu

Hastane enfeksiyonu latince nosos (hastalık), komeion (tedavi) ve nosokomeion (hastane) sözcüklerinden türetilen “nozokomiyal enfeksiyon” olarak belirtilmektedir (Pearson, 2009). Aynı zamanda “hastanede edinilen enfeksiyon” olarak belirtilse de 11.08.2005 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren Yataklı Tedavi Kurumları Enfeksiyon Kontrol Yönetmeliği’nde “Yataklı tedavi kurumlarında sağlık hizmetleri ile ilişkili olarak gelişen tüm enfeksiyonlar” şeklinde tanımlanmıştır. Fakat literatürde ve uygulamada, farklı nedenlerle hastaneye yatan bir hastada, hastaneye başvurduğunda inkübasyon döneminde olmayan ve hastaneye yatıştan 48 ila 72 saat geçtikten sonra veya hasta taburcu olduktan sonra 10 gün içinde ortaya çıkabilen enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır (Aydın, 2013).

Bir enfeksiyonun hastane enfeksiyonu olup olmadığına; klinik gözlem, laboratuvar sonuçları, hasta kayıtlarının değerlendirilmesi ve diğer destekleyici bulgular dikkate alınarak karar verilmektedir. Hastaneye yatmadan önce gelişen enfeksiyonlar ve bu enfeksiyonların komplikasyonları, hastaneye yatıldığında kuluçka döneminde olan veya doğumda plasenta yoluyla geçen enfeksiyonlar hastane enfeksiyonu değildir (Doğanay, 2004).

1950’li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde hastanelerde stafilokok enfeksiyonlarının ve bu bakterinin penisiline direnç kazanması sağlık çalışanları için önemli bir sorun olmaya başlamıştır. Bunun üzerine 1958 yılında ABD’de her hastanede Hastane Enfeksiyonları Kontrol Komitesi (HEKK) oluşturulmasının gerekliliği belirtilmiştir. Daha sonra “Centers for Disease Control” (CDC) tarafından pilot çalışmalar başlatılmıştır. Bunu izleyen “Comprehensive Hospital Infections Project” (CHIP) ve “National Nosocomial Infections Study” (NNIS) ile temel kavramlar belirlenmiş, hastane enfeksiyonlarının önemi ortaya konulmuştur (Töreci, 1997; Akhan ve Hayran, 1997).

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar hasta güvenliği ile ilgili işlemlerde büyük sorunlara neden olmaktadır. ABD’de hastane kaynaklı enfeksiyonlar, ölüm nedenleri arasında 6. sırada yer

almaktadır ve yaklaşık 99 000 ölümlle sonuçlanmıştır (Peleg ve Hooper, 2010). Çağımızın en önemli sorunlarından biri olmakla beraber hastaneye yatan her 100 kişiden servislere göre değişmekle birlikte 3 ila 10 arasında değişen kişinin iyileşmesi beklenirken hastalanması, hastanede kalış süresinin uzaması, tedavi maliyetinin katlanarak artması, bir kısmının ölümle yüz yüze gelmesi ve hatta can kayıplarının yaşanması sorunun ciddiyetini göstermektedir (Günaydın, Esen, Saniç, ve Leblebicioğlu, 2002). Hastane kaynaklı enfeksiyonlar özellikle yoğun bakım ünitelerinde hasta güvenliği ile ilgili problemlerinin başında yer alır (Alp ve Damani, 2015).

Hastane enfeksiyonları, yaklaşık hastane kalış süresinde (20 kat) ve maliyet artmasında (5 kat) rol oynarken özellikle de mortaliteyi arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda, en az üçte birinin önlenebilir hastane enfeksiyonları olduğu belirtilmiştir. Yüksek morbidite, mortalite ve artan tedavi maliyetlerine sebep olan bu enfeksiyonlardan korunmaya yönelik tedbirlerin alınması ve her kurumun kendi içinde enfeksiyon kontrol programını oluşturması zorunlu olmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda (yenidoğan, prematüre bebekler, kanser ve AIDS hastaları, yaşlı hastalar gibi) ölümlere yol açabilmektedir. Birçok farklı ülkelerde yapılan çalışmada hastaneye yatışı yapılan hastalarda %3,1 - %14,1 oranında değişen hastane enfeksiyonu geliştiği belirlenmiştir (Hancı, 2010).

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre hastanelerde yatan her on hastadan birinde hastane enfeksiyonu gelişmektedir. 1980'li yılların başlarından itibaren ABD'de yatan hastaların %5 - %6'sında ortaya çıkmakla beraber toplam hastane enfeksiyonu vaka sayısı yılda 2,1 milyondur. Hastane enfeksiyonuna bağlı ölüm sayısı ise yılda yaklaşık 90 000 civarındadır. İngiltere'de her yıl ortalama 100 000 hastane enfeksiyonu vakası görülmekle birlikte ölümlerin %1'inin (yaklaşık 5 000) doğrudan, %3'ünün ise dolaylı olarak hastane enfeksiyonları ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde ise hastane enfeksiyonu önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Verilere ulaşım aşamasında sıkıntılar olmakla birlikte Türkiye'de hastane enfeksiyonu oranının %5 ile %15 arasında olduğu kabul edilmektedir (Sayıştay Raporu, 2007).

En önemli hastane enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen *Acinetobacter baumannii*, çoklu ilaç direnci nedeniyle ülkemizde de son yıllarda tekrar önem kazanmıştır (Aşık, 2011). Giderek artan karbapenem direnci ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden

olması sebebiyle tedavi açısından ciddi sorunlara yol açmaktadır (Sieniawski, Kaczka, Rucińska, Gągis ve Pomorski, 2013).

2.2. *Acinetobacter baumannii* Genel Özellikleri

“Acinetobacter” ismi, hareketsiz basil demektir ve Yunanca’da “hareketsiz” anlamına gelen “akinetos” sözcüğünden üretilmiştir (Howard, O’Donoghue, Feeney ve Sleator, 2012). *Acinetobacter baumannii*, fermentasyon yapma yeteneği olmayan, hareket etmeyen, oksidaz negatif ve katalaz pozitif bir mikroorganizmadır. Mikroskopik olarak Gram negatif basil, kokobasil veya diplokok şeklinde görülen bu mikroorganizmalar, bazen yeni ekilmiş kültür plaklarında Gram pozitif olarak da görülebilmektedirler (Resim 2.1). *Acinetobacter* cinsi bakteriler, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında çoğunlukla tercih edilen %5 koyun kanlı agar, triptik soy agar ve McConkey besi yerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. Koyun kanlı agarda 0,5 mm – 2 mm arası çaplarda, şeffaf veya opak, zeminden kabarık koloniler oluştururlar (Winn ve diğerleri, 2006).



Resim 2.1. Eozin metilen blue (EMB) agarda *Acinetobacter baumannii*

Günümüzde *Acinetobacter* cinsinin üyeleri olarak tanımlanan türler, zaman içinde birçok taksonomik değişikliğe uğramıştır. İlk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından, topraktan izole edildiği bilinen ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilen bu bakteri günümüze kadar en az 15 farklı isimle anılmıştır. En iyi bilinenleri *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola* / *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, *B5W*, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii*’dir. Yapılan taksonomik

çalışmalar ışığında *Acinetobacter* cinsi günümüzde *Moraxellacea* ailesi içinde yer almaktadır (Holt, Sneath, Staley, Williams ve Stanley,1994; Bergogne-Berezin ve Towner, 1996).

Acinetobacter nosocomialis ve *Acinetobacter pittii* hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Buna karşın, *Acinetobacter calcoaceticus* çok az klinik önem arz eden çevresel bir patojendir. *Acinetobacter baumannii* ile birlikte bu dört tür, biyokimyasal olarak ayırt edilemez ve klinik uygulamada “*Acinetobacter baumannii* kompleksi”, “*Acinetobacter baumannii calcoaceticus*” veya sadece “*Acinetobacter baumannii*” olarak bir araya toplanır. *Acinetobacter baumannii*, antibiyotiklere daha dirençli olup yüksek mortalite ile ilişkilendirilmektedir (Chuang ve diğerleri, 2011; Sieniawski ve diğerleri, 2013). Çalışmada “*Acinetobacter baumannii* kompleksi” ifadesi yerine “*Acinetobacter baumannii*” terimi kullanıldı.

2.3. *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonları

Acinetobacter baumannii, cins içinde enfeksiyonlarla en sık ilişkili insan patojenidir. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf hastalarda bu fırsatçı patojen oldukça yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan enfeksiyonlara yol açabilir. Bu fırsatçı patojen, özellikle solunum yolu, üriner sistem ve yara bölgelerinde enfeksiyonlara sebep olur ve sepsis etkenidir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, cerrahi operasyon geçirmiş veya mekanik solunum altındaki hastalar, *Acinetobacter* enfeksiyonlar için yüksek risk altındadır. Karbapenemleri de içerecek şekilde çoklu ilaç direnci göstermesi nedeniyle hastanede yatan hastalarda nozokomiyal yara ve akciğer enfeksiyonları önemli bir sorun haline gelmiştir (Murray ve diğerleri, 2016). *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı gelişen hastane kaynaklı pnömoni ciddi ve hayatı tehdit eden bir enfeksiyondur. Hastanede kalış süresinin uzaması, mekanik ventilasyona uzun süreli maruz kalma ve daha önceden antibiyotik kullanımı, *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı ventilatör ilişkili pnömoni riskini arttıran faktörlerdir (Luna ve Aruj, 2007).

Acinetobacter cinsi bakterilerle kolonizasyon ve enfeksiyonu kolaylaştıran risk faktörleri arasında; malignite, yanık, geçirilmiş cerrahi operasyon, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma, idrar sondası, trakeostomi varlığı, uzun süreli antibiyotik kullanımı, damar içi kateterizasyon, enteral beslenme, travmatik yaralar,

bağışıklık sisteminin baskılanması ve konağın yaşı bulunmaktadır (Taşova ve diğerleri, 1999; Garnacho-Montero ve diğerleri, 2005; Lolans, Rice, Munoz-Price ve Quinn, 2006).

Sağlık personelinin yetersiz kişisel hijyenleri ve ellerinde bulunan bakteri kolonizasyonu nozokomiyal salgıların yaşanmasında belirleyici etkenler arasındadır (Peleg, Seifert, ve Paterson, 2008). Kontamine olmuş ventilatörler ile birlikte solunum cihazları da salgının başlamasına neden olabilecek diğer faktörlerdendir (Luna ve Aruj, 2007).

2.4. *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter baumannii antibiyotik direncinin hızla geliştiği bir türdür. Bu direnç tedavide ciddi sorunlara yol açan bir problemdir. Özellikle hasta sirkülasyonu ve antibiyotik kullanımı yüksek olan yoğun bakım ünitelerinde önemli bir sorundur (Saltoğlu, 2007; Sieniawski ve diğerleri, 2013). *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle karbapenemler, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler, β -laktam- β -laktamaz inhibitör kombinasyonları, kombinasyonla veya tek başına aminoglikozitler, kinolonlar, kloramfenikol, rifampisin, trimetoprim-sülfametoksazol, doksisisiklin ve kolistin kullanılan etkili antimikrobiyal ajanlardır (Bergogne-Berezin ve Towner, 1996; Schreckenberger, Daneshvar, Weyant ve Hollis, 2007). Ancak *Acinetobacter* enfeksiyonlarında gelişen direnç nedeniyle tedavi seçenekleri kısıtlanmaktadır. Karbapenemler, sulbaktam, tigesiklin ve kolistin en etkili antibiyotiklerdir. Direnç sorunu nedeniyle kolistine olan ilgi artmıştır. Kolistin kullanımı ile ilgili başarılı sonuçlar bildirilmekle birlikte bu ilaçla klinik deneyim sınırlıdır. Kolistin dahil tüm ilaçlara dirençli suşlar “panrezistan” olarak adlandırılmıştır (Saltoğlu, 2007).

Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç mekanizmaları;

1. Hücredeki antibiyotik miktarının azaltılması (dış membran geçirgenliğinin azaltılması, iç membrandan geçişin engellenmesi, aktif atım pompası),
2. İlacın hedefinde değişiklik oluşturulması (mutasyon ve enzimatik değişiklik),
3. Sentezlenen enzimle ilacın inaktive edilmesi,
4. Antibiyotikten etkilenmeyen farklı bir metabolik yol kullanılması şeklinde dört ana başlık altında toplanabilir (Rice, Sahm ve Bonomo, 2011).

Bir bakteri yukarıda sayılan mekanizmalardan birden fazlasını aynı anda kullanarak antibiyotiklere çoklu dirençli hale gelebilmektedir (Rice ve diğerleri, 2011). Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren *Acinetobacter baumannii* izolatlarının hızlı şekilde ortaya çıkışı, bu bakterinin antibiyotik kullanımına bağlı oluşan baskılayıcı ortam koşullarına hızla uyum sağlama yeteneğinin sonucudur (Peleg ve diğerleri, 2008). Fransa’da yapılan çalışmada dirençli ve duyarlı suşların genom dizilerini karşılaştırarak, dirençli olan suşlarda 45 gen kümesi içeren 86 kb’lık “direnç adası” bulunduğunu belirtilmiştir. Dizi benzerliği ve filogenetik test analizleri sonuçlarına bakıldığında, dirençli suşun genlerinin *Pseudomonas*, *Salmonella* veya *Escherichia* bakterilerinden elde ettiği belirlenmiştir (Fournier ve diğerleri 2006).

2.5. *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonlarında Kullanılan Antibiyotikler

2.5.1. Karbapenemler

İmipenem ve meropenem günümüzde kullanımda olan iki karbapenem türevidir. Karbapenemler kimyasal olarak sentetik ya da yarı sentetik β -laktam türevi antibiyotiklerdir. Penisilinlerden farklı olarak, C1 atomuna bir kükürt atomu buna da bir tiazolidin halkası bağlanmıştır. C2 ve C3 atomlarında doymamış bağlar vardır. 6-transhidroksimetil grubunun varlığı birçok β -laktamaz türüne karşı molekülün direncini sağlar. Karbapenemler, başta penisilin bağlayan protein (PBP) 2 olmak üzere PBP1A, PBP1B, PBP3, PBP4 ve PBP5’e bağlanarak hücre duvar sentezini engeller (Chambers, 2000).

İmipenem, bir β -laktam halkası içerir, penisilin ve sefalosporinlerden farklı olarak α -halkasındaki sülfür atomunda metilen vardır. Bu yapı bakteri hücreesindeki hedef proteinlere bağlanmasını artırır. Bunun sonucunda etki alanı genişler ve antibakteriyel gücü artar. Molekül ağırlığı düşüktür, bu yüzden bakterinin hücre membranından girişi kolay olur. β -laktam halkasında bulunan hidroksimetil yan zinciri β -laktamazlara dayanıklılığı sağlar. Penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise molekülün *Pseudomonas aeruginosa*’ya etkinliğini sağlamaktadır. Meropenem, Gram negatif mikroorganizmalara karşı imipenemden daha etkilidir (Chambers, 2000).

Karbapenemler tüm antibiyotikler içerisinde en geniş spektrumlu gruptur. Gram negatif basiller ve Gram negatif koklar, Gram pozitif koklar ve anaeroblar üzerine etkilidirler. Diğer β -laktam antibiyotiklerde post-antibiyotik etki sadece Gram pozitif bakterilerde görülürken, imipenemin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için post-antibiyotik etkisi saptanmıştır. Bu farkın nedeni, imipenemin PBP2 (Penisilin Bağlayan Protein 2)'ye de bağlanarak bakterilerde sferoblast formasyonu oluşturmamasıdır (Chambers, 2000).

2.5.2. Sefalosporinler

Cephalosporium türü mantarlardan elde edilen üç aktif fermentasyon ürününün biri olan sefalosporin-C türevidir. Birinci kuşak sefalosporinler Gram pozitif koklara çok etkilidirler. İkinci kuşak sefalosporinler Gram negatif bakterilere, özellikle *Proteus* ve *Enterobacter* üzerine biraz daha fazla etkilidirler. Üçüncü kuşak sefalosporinler *Enterobacter*'lere ikinci kuşaktan daha fazla etkilidirler. Organizmaya dağılımları birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlerden iyidir (Dökmeci, 1992). Çalışmada üçüncü kuşağı temsilen seftazidim ve dördüncü kuşağı temsilen sefepim kullanıldı.

Seftazidim, aminotiazolil grubu yarı sentetik üçüncü kuşak bir sefalosporindir. Vücut sıvılarında dağılımı iyidir, antipsödomonal etkinliği ön plandadır ve duyarlı *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kullanılabilir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda yüksek direnç oranları bildirilmiştir (Tünger, Çavuşoğlu, Korkmaz, 2005; Beriş ve diğerleri, 2016).

Sefepim dördüncü kuşak yarı sentetik, sindirim yolu dışı kullanıma uygun çift iyonik karakterde aminotiazolil sefalosporindir. Aminotiazolil grubunun varlığı Gram negatif etkinliği ve β -laktamazlara direnci sağlayan bir özelliktir. Üçüncü karbon atomunda N-metilpirolidin bulunması da Gram negatif hücre duvarından geçebilme ve β -laktamaz direnci özelliği sağlar. *Pseudomonas* kökenleri de dahil tüm Gram negatif basillere, Gram pozitif koklara ve anaeroblara karşı etkilidir. Gram pozitif koklara karşı etkisi üçüncü kuşak sefalosporinlerden fazla, ikinci kuşak sefalosporinlerden azdır. Tip 1 kromozomal β -laktamazlardan daha az etkilenmesi nedeni ile Gram negatif enterik basillere üçüncü kuşak sefalosporinlerden daha etkilidir (Çakır, 2004).

2.5.3. Kinolonlar

Kinolonlar, konsantrasyona bağımlı bakterisidal etkiye sahip antibiyotiklerdir. Bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan iki topoizomeraz (DNA giraz ve topoizomeraz IV) ile etkileşime girerek DNA sentezini durdururlar. DNA giraz, iki *GyrA* ve iki *GyrB* alt birimlerinden oluşan tetramerik bir enzim olup *GyrA* ve *GyrB* 11 genlerinden kodlanır. Topoizomeraz IV’de, ParC ve ParE alt birimlerinden oluşmaktadır. Florokinolonların Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerdeki enzim hedefleri farklıdır. Gram negatif bakterilerde birincil hedef DNA giraz, Gram pozitif bakterilerde ise topoizomeraz IV’tür (Mandell, 2000).

Kinolonlar sentez edildikleri sıraya göre Çizelge 2.1’de gösterildiği gibi dört gruba ayrılır.

Çizelge 2.1. Kinolon grupları (Van Bambeke, Michot, Van Eldere ve Tulkens, 2005)

1. Kuşak Kinolonlar	Nalidiksik Asit, Oksolinik asit, Sinoksasin Piromidik asit
2. Kuşak Kinolonlar	Siprofloksasin, Ofloksasin, Pefloksasin, Norfloksasin, Enoksasin, Fleroksasin.
3. Kuşak Kinolonlar	Levofloksasin, Grepafloksasin, Sparfloksasin, Travofloksasin.
4. Kuşak Kinolonlar	Moksifloksasin, Gatifloksasin, Gemifloksasin.

Ofloksasin ve siprofloksasin, enterik bakterilerin yanı sıra *Acinetobacter spp.* türlerine de etkilidir. Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kombine tedavide siprofloksasin sıklıkla kullanılan bir ajandır. *Acinetobacter* türlerine karşı, 1988’li yıllara kadar oldukça etkili olan florokinolonların günümüzde dirençli kökenleri ön plandadır (Arda ve Ulusoy, 2008).

2.5.4. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler, *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi baktrilerden elde edilen doğal ya da yarı sentetik bakterisidal etkili antibiyotiklerdir (Willke Topçu, Söyletir ve Doğanay, 2002). Etkilerini mRNA’daki kodonların okunuşunu azaltarak ve tRNA antikodonlarındaki bilginin ribozomlarda yanlış okunması ile proteinlerin yanlış kodlanmasına yol açarak

gösterirler. Bu etki sonrası bakteride protein sentezi durur. Protein sentezinin sonlanması için streptomisin ribozomun 30S alt birimine bağlanırken diğer aminoglikozidler hem 30S hem de 50S alt birimlerine bağlanır. Aminoglikozidler bakterilerin dış membranlarındaki porin kanallarından periplazmik aralığa difüzyonla girer. Ancak bakteri sitoplazmik membranını geçebilmeleri enerji ve oksijene bağımlı aktif transport mekanizması ile olmaktadır (Gilbert, Das ve Foley, 1997).

Diğer pek çok patojen grubuna göre, *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozid direnci daha yüksektir. 16S rRNA metil transferazlardan özellikle yüksek düzey aminoglikozid direncini sağlayan *armA*'nın üretimi ile ilgili farklı ülkelerde (Çin, Güney Kore, Vietnam, Japonya, Norveç, İtalya) birçok çalışma yapılmaktadır (Zhou, 2009; Brigante ve diğerleri, 2012). *armA* geninin Tn1548 transpozonu üzerinde bulunduğu gösterilmiş, genin yatay olarak, henüz bilinmeyen bir kaynaktan edinildiği düşünülmüştür (Doi, Adams, Yamane ve Paterson, 2007). Bununla beraber, *armA* kodlayan genin *OXA-23* üreten *Acinetobacter baumannii* suşlarında bulunduğu, ancak her iki direnç geninin tek bir plazmid üzerinde fiziksel olarak bağlantılı olmadığı belirtilmektedir (Brigante ve diğerleri, 2012).

2.5.5. Tetrasiklinler

1950'li yıllardan bu yana kullanılan tetrasiklinler geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Tetrasiklinlerin antibakteriyel etkilerinin yanında önemli antiinflamatuvar aktivite gösterdikleri de bilinmektedir. Tigesiklin tetrasiklinlerin en yeni üyesidir. Yeni semisentetik glisilsiklin olan bu antibiyotik ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Gram negatif, Gram pozitif, atipik ve anaerob mikroorganizmalar ile antibiyotik dirençli bakterilere etkilidir. Diğer tetrasiklinlere benzer antibakteriyel aktivitesine karşın tetrasiklin dirençli organizmalara karşı daha etkilidir. Tigesiklin karmaşık deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, karmaşık intraabdominal enfeksiyonlar ve toplum kökenli pnömonilerde genelde iyi tolere edilir, güvenli ve etkilidir (Taşova, 2010).

Tetrasiklinler, ribozomun 30S alt birime bağlanıp protein sentezininin inhibisyonuna yol açarak bakteriyostatik etki gösteren bileşiklerdir. Tetrasikline direnç; atım pompası, ribozomal koruyucu proteinler veya enzimler ile ilacın inaktive edilmesiyle oluşabilir. Gram negatif bakterilerde tetrasiklin direnci için *tetA*'dan *tetE*'ye kadar farklı genler tanımlanmıştır. Bu genlerden bazıları atım pompasında rol alan proteinleri, bazıları ise

ribozomal koruyucu proteinleri kodlamaktadır. Bu genlerin genellikle plazmid veya transpozonla ilişkili olduğu ifade edilmiş olup *Acinetobacter* türleri için de bu genel kuralın geçerliliği söz konusudur (Huys ve diğerleri, 2005).

Tigesiklin; aerobik Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob patojenlere karşı etkinlik gösterir. Aynı zamanda *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.* ve *Morganella spp.* hariç tetrasiklinlere efluks (dışa atım) veya ribozomal bağlanma ünitesinde değişiklik yoluyla direnç geliştirmiş tüm mikroorganizmalara etkilidir. Ayrıca tigesiklin, karbapenemaz üreten *Acinetobacter* izolatlarına karşı etkili bulunmuştur (Çalık ve Akova, 2007).

Tigesiklin, geniş spektrumlu ve ribozomlar üzerine tetrasiklinlerle aynı bağlanma bölgesine sahip olmasına karşın tetrasiklinler için sözü edilen direnç mekanizmalarından etkilenmemektedir. Tigesiklin bu mekanizmaların çoğunluğuna direnç gösterecek şekilde tasarlanmıştır, ancak *Acinetobacter baumannii*'deki Ade tipi atım pompaları tarafından, özellikle de bu pompaların gen anlatımları arttığında, hücre dışına atılmaya eğilimlidir (Coyne, Courvalin ve Périchon, 2011).

2.5.6. Polimiksinler

Polimiksinler polipeptid katyonik antibiyotiklerdir. Bu sınıfta kolistin (polimiksin E) ve polimiksin B tanımlanmıştır. 1940'lı yıllarda tanımlanan bu ilaç ciddi toksisitesi nedeni ile kullanım dışı kalmıştır. İki kolistin formu ticari olarak kullanımdadır. 1993'te sadece kolistine duyarlı Gram negatif suşların bildirilmesi tekrar bu ilaca ilgiyi arttırmıştır (Saltoğlu, 2007).

Yapılan çalışmalarda intravenöz olarak kolistin ve polimiksin B'nin bakteremi, pnömoni, deri yumuşak doku enfeksiyonları, üriner sistem gibi farklı alanlarda enfeksiyonu olan hastalarda kullanılabileceği önerilmiştir. Polimiksinlerin intratekal ya da intraventrikuler kullanımının yararı çoklu ilaç dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları için bildirilmiştir. Kan beyin bariyerini de geçmesi nedeni ile de SSS enfeksiyonlarında tercih edilmektedir (Saltoğlu, 2007).

Son yıllarda izlenen çoklu ilaç direnci bulunan Gram negatif bakteriler (özellikle *Pseudomonas spp.* ve *Acinetobacter spp.*) ile oluşan enfeksiyonların sıklığında artış ve

tedavilerinde yaşanan sorunlar polimiksinleri tekrar gündeme getirmiştir. Klinikte, çoklu ilaç direnci bulunan bakteriler (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) ile oluşan enfeksiyonlarda ve özellikle de kolistin dışındaki diğer antibiyotiklere direnç varlığında kullanılması önerilmektedir (Li, 2005; Turgut, 2017; Bayraktar, Duman ve Duman, 2018).

Çoklu ilaç direnci olan *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarında son zamanlarda yeniden gündeme gelmiş ve tedavide kullanıma tekrar başlanmıştır. Çoklu ilaç direnci olan *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinin neden olduğu nozokomiyal pnömonilerde kolistine klinik yanıt oranları %25 - %73,3 arasında değişmektedir (Akalin, 2007). Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalarda kolistine karşı direnç de rapor edilmiştir (Gales, Jones ve Sader, 2006; Beriş ve diğerleri, 2016).

2.6. *Acinetobacter baumannii*'de OXA Tip Karbapenemazlar

OXA enzimlerini kodlayan genler temel olarak dört ana gruba ayrılmaktadır ve kodladıkları enzimler de genler ile aynı ismi taşımaktadır. Bu genler; *OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-51* ve *OXA-58*'dir.

2.6.1. OXA-23

İlk olarak 1985 yılında İskoçya'dan imipeneme dirençli bir *Acinetobacter baumannii* izolatında tanımlanmıştır ve *ARI-1* (*Acinetobacter resistant to imipenem*) olarak isimlendirilmiştir (Paton, Miles, Hood ve Amyes, 1993). Daha sonra bu enzim *OXA-23* olarak isimlendirilmiştir (Poirel ve Nordmann, 2006a). Tayland'da ilk defa 2009 yılında yapılan bir çalışmada; 13 klinik izolatta *OXA-23* geninin varlığı rapor edilmiştir (Niumsup, Boonkerd, Tansawai ve Tiloklurs, 2009). *OXA-23* geni *Acinetobacter baumannii*'de dünya çapında karbapenem direnci sağlamaktadır. *OXA-23* geninin, *OXA-27* ve *OXA-49* olarak alt grupları bulunmaktadır. Çin'de *Acinetobacter baumannii*'de *OXA-49* geni identifiye edilmiştir (Poirel ve Nordmann, 2006a).

2.6.2. OXA-24

OXA-24; *OXA-25*, *OXA-26* ve *OXA-40* alt gruplarını içermektedir. İspanya’da karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii*’de *OXA-24* ve *OXA-25* varyantları bildirilmiştir (Poirel ve Nordmann, 2006a). *OXA-40/24* genleri G+C içeriği %33,9 - %34,3 arasında değişirken, *Acinetobacter baumannii* genomuna ait orandan farklıdır ve bu enzim ailesinin başka bir türden evrimleştiği düşünülmektedir (Bergogne-Berezin ve Towner, 1996).

2.6.3. OXA-51

Acinetobacter baumannii’de kromozomda lokalize olabilen *OXA-51* β -laktamazı, çok düşük seviyede oksasilinaz üretmektedir (Poirel ve Nordmann, 2006a). Kaynağı ne olursa olsun *OXA-51* enzim kümesi üyeleri *Acinetobacter baumannii*’nin hemen hemen tüm izolatlarında doğal yapı olmasına karşın diğer *Acinetobacter* türlerinde bulunmaz (Mussi, Limansky ve Viale, 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 diğerleri, 2006).

2.6.4. OXA-58

OXA-58; ilk olarak Fransa’da salgın sırasında tanımlanmıştır (Poirel ve Nordmann, 2006a). *OXA-58* enzimi, diğer *Acinetobacter* türlerinde de bulunabilmektedir. Bu türlerde de genellikle plazmit kökenlidir fakat kromozomal lokasyon da bildirilmiştir (Bogaerts ve diğerleri, 2006; Poirel ve diğerleri, 2006b). *blaOXA-58* geninin G+C içeriği %37,4- %37,5 arasındadır ki bu oran *Acinetobacter baumannii* genom içeriğinin altında kalmaktadır (Bergogne-Berezin ve Towner, 1996). *OXA-58* enziminin etkisi ile görülen direnç; Türkiye, İspanya, Romanya, Kuveyt, İtalya, Arjantin, Avusturya, İngiltere gibi çeşitli coğrafik bölgelerde yayılım göstermektedir. *Acinetobacter junii*’de bulunan *OXA-58* ve *IMP-4* β -laktamazları birlikte karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. *OXA-23* ve *OXA-58* genleri genellikle plazmidten izole edilmektedir (Poirel ve Nordmann, 2006a).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan *Acinetobacter baumannii* klinik izolatları

T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli servislerden gelen numunelerden çalışma için uygun olan *Acinetobacter baumannii* örnekleri kullanıldı.

3.1.2. İzolatların toplanması

T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Haziran 2017 – Ocak 2018 tarihleri arasında yoğun bakım servislerinden gelen aspirasyon ile steril şartlarda alınan solunum yolu numuneleri çalışmaya dahil edildi. Bu numuneler hazır olarak tedarik edilen %5 koyun kanlı agar (RTA) ve EMB agar (RTA) besi yerlerine, biyogüvenlik kabin (Nüve) içerisinde seyreltme yöntemi ile ekildi. Ayrıca aynı hastaya ait tekrarlayan numunelerden sadece bir tanesi çalışmaya alındı.

3.1.3. İzolatların tanımlanması

Ekimi yapılan numuneler, 37°C'de 24 saat etüvde (Nüve) bekletildikten sonra her iki besi yerinde de üreyen ve Gram negatif olduğu tahmin edilen bakteriler değerlendirildi. İzolatların tanımlanmasında gerekli görüldüğünde gram boyama tekniği, oksidaz ve katalaz testleri gerçekleştirildi. Bu klinik izolatlar, VITEK-2 (Biomerieux) cihazına uygun kartlar kullanılarak yüklendi. Cihazın *Acinetobacter baumannii* olarak tanımladığı numuneler etiketlenip çalışmada kullanılmak üzere saklandı.

3.1.4. İzolatlarının stoklanması

Her bir izolat için iki kopya olacak şekilde tarih, servis, yaş, cinsiyet gibi numune bilgileri kaydedilerek stok tüplerine inoküle edildi. Bir kopya -80°C 'de (Panasonic), diğer kopya ise çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C 'de (Arçelik) stoklandı (Resim 3.1).



Resim 3.1. Örneklerin toplanması ve stoklanması

Stok tüpleri hazırlanışı

Steril 2 ml'lik stok saklama cryo tüplerinin her birine 1 ml %20 gliserol (Merck) içeren Brain Heart Infusion Besi yeri (Merck) hazırlandı. 37 gr toz besi yeri 1 lt distile su içerisinde çözülerek tüplere dağıtıldı ve otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildi.

Stok canlandırma

-80°C 'lik (Panasonic) dondurucuda bulunan stok bakteriler, -20°C 'de (Arçelik) 2 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı. Sonra hızlı şekilde Mueller-Hinton agar (MHA) (RTA) besiyerine seyreltme ekimi yapıp 24 saat 37°C 'de inkübasyon için etüve (Nüve) konuldu.

3.2. Mikrobiyolojik Yöntemler

3.2.1. Disk difüzyon

Steril salin su (Biomerieux) içinde 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanan suşların, MHA dökülmüş petrilere yayma yöntemi uygulanarak ekimi yapıldı. Oxoid marka, imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), sefepim (30 µg), seftazidim (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), amikasin (30 µg), gentamisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), tigesiklin (15 µg) ve kolistin (10 µg) antibiyotik diskleri Kirby Bauer disk difüzyon yöntemine göre çalışmaya dahil edildi. Sonuçlar CLSI (2016) kriterlerine göre değerlendirildi. CLSI kriterlerinde bulunmayan tigesiklin için inhibisyon zon çapı ≤ 12 mm ise dirençli, ≥ 16 mm ise duyarlı (Galani ve diğerleri, 2008), kolistin için inhibisyon zon çapları ≤ 12 mm ise dirençli, ≥ 14 mm ise duyarlı (Jones ve diğerleri, 2007) olarak kabul edildi. *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kontrol suşu kullanıldı.

Mueller-Hinton agar hazırlanışı

Besi yeri hazırlamak üzere hassas terazide (Precisa) 34 gr tartılan besi yeri erlen içerisine konuldu ve üzerine 1 lt su eklendi. Pamuk ya da alüminyum folya ile kapatılan erlenler, 121°C'de 15 dk otoklavda (Nüve) steril edildi. Su banyosunda bir miktar (47°C - 50°C'ye) soğutulan agarlı besi yeri 90 mm çapındaki petrilere (Isolab) 18 ml - 20 ml yani yaklaşık kalınlığı en az 3 mm olacak şekilde döküldü. Bu işlem aseptik koşullarda bek alevi kullanılarak yapıldı ve petrilere oda sıcaklığında donmaları için bekletildi.

3.2.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmesi

Bir gün öncesinde Mueller-Hinton agarda seyreltme ekimi ile canlandırılmış stok numunelerden bir kaç koloni alınıp, 5 ml Mueller-Hinton broth içeren steril cam tüplere inoküle edildi. Bu tüpler 37°C'de çalkalamalı su banyosu içinde 18 saat inkübasyona bırakıldı. Mueller-Hinton broth içinde 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanan numunelerden 400 µl, daha önceden hazırlanmış 60 ml'lik Mueller-Hinton broth besi yerine inoküle edildi. Hafif bir çalkalama hareketinden sonra hazırlanan steril tüplerin her birine 1000 µl olacak şekilde eklendi. Ardından ilk tüpe 900 µl daha ilave edildi. 0.04 gram tartılan antibiyotiklerin toz formları 1 ml steril saf su içinde homojen olana kadar karıştırıldı. Her

bir numune için ilk tüpe 100 µl eklendi ve ilk tüpün hacmi 2000 µl'ye tamamlandıktan sonra 1000 µl'lik seri dilüsyonları yapıldı. Tüpler etiketlendi ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün tüplerde üremenin olup olmadığı kontrol edilerek, üremenin olmadığı son tüp belirlendi ve MİK değeri olarak kabul edildi.

Mueller-Hinton broth hazırlanışı

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için Mueller-Hinton broth (MHB) (Merck) besi yeri kullanıldı. 1 lt'ye 21 gr olacak şekilde toz besi yerinden hassas terazi (Precisa) ile tartım yapıp, üzerine saf su eklenmiş erlenler, manyetik karıştırıcı ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve ağzı pamuk ya da alüminyum folya ile kapatılıp 12°C'de 15 dk otoklavda (Nüve) steril edildi.

Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının antibiyotik direnç profili belirlendikten sonra moleküler analizler gerçekleştirildi. Bu amaçla örneklerin total RNA izolasyonları yapıldı ve *OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-51* ve *OXA-58* genleri RT-PZR yöntemi ile belirlendi.

3.3. Moleküler Yöntemler

3.3.1. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için -80°C'de stok halde bulunan bakterilerin Tryptic Soy Agar (Merck) besi yerine ekimi yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 5 ml'lik Tryptic Soy Broth (Merck) besi yerine birkaç koloni inoküle edilip 37°C'de logaritmik faza ulaşmaları sağlandı. Total RNA izolasyonu, "Thermo Scientific GeneJET RNA Purification" kiti ile protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Ön hazırlık olarak "wash buffer 1" 'e 10 ml %100'lük etanol eklenerek son hacim 50 ml'ye tamamlandı. "Wash buffer 2" 'ye'de 39 ml etanol eklenerek son hacminin 62 ml olması sağlandı. 0,4 mg/ml lizozim içeren TE (Tris-EDTA) tamponu hazırlandı. Protokole göre her 1 ml "lysis buffer" için 20 µl β-merkaptotanol eklenmesi gerektiği için, 7,5 ml "lysis buffer" içine 150 µl β- merkaptotanol eklendi ve çalışmada kullanıldı.

Protokole göre;

- 1,5 ml bakteri kültürü, 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atılıp, oluşan pellet kullanıldı.
- 100 µl taze hazırlanmış 0,4 mg/ml lizozim içeren TE tamponu eklendi. Tüp hafifçe ters düz edilerek karıştırıldı.
- Süspanse edilen hücreler 25°C'de 5 dakika inkübe edildi.
- Tüpün içine β- merkaptotanol eklenmiş "lysis buffer" 'dan 300 µl eklendi ve tüp homojen bir karışım elde edilene kadar dikkatli şekilde vorteks kullanılarak karıştırıldı.
- %100'lük 180 µl etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Tüp içindeki karışımdan 700 µl alınarak "Genejet RNA Purification Column" 'a aktarıldı.
- Bu kolon 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve kolon yeni steril 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
- "Wash buffer 1" 'den 700 µl kolon içine aktarıldı ve kolonla birlikte tüp 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan toplama tüpüne akan sıvı atıldı ve aynı tüp tekrar kolon altına yerleştirildi.
- "Wash buffer 2" 'den kolona 600 µl eklendi ve 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve kolon tüpe tekrar yerleştirildi.
- Tekrar "wash buffer 2" 'den 250 µl kolona eklendi ve 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon steril yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
- Son olarak 50 µl "nuclease free water" eklendi ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolon atılarak toplama tüpünde kalan sıvı -20°C'de saklandı.

3.3.2. Total RNA saflık değeri ölçümü

Total RNA izolasyonundan sonra RNA'nın saflık değeri ve kantitatif analiz ölçümü için µDrop cihazı (Thermo) kullanıldı. İzole edilen total RNA örneklerinden 2 µl alınarak µDrop plakası (Thermo) üzerine damlatıldı ve cihaza yerleştirildi. RNA örneklerinin 260/280 nm absorpsiyon oranları okunarak saflık düzeyleri ve miktarları µg/mL olarak belirlendi.

3.3.3. Komplementer DNA sentezi

Çalışmada total RNA ölçüm sonuçlarına göre hesaplama yapıлып, ortalama 1 µg - 2 µg total RNA kullanıldı. cDNA (komplementer DNA) sentezi için Thermo marka cDNA sentez kitinin önerdiği yönteme göre 20 µl'lik tüplerde Çizelge 3.1'de verilen sarf malzemeler kullanılarak karışım hazırlandı.

Çizelge 3.1. cDNA reaksiyon karışımının hazırlanması

Kullanılan Malzeme	Miktar
10X dsDNase Buffer	1 µl
dsDNase	1 µl
Kalıp RNA	7 µl
Su	1 µl
Toplam	10 µl
<i>37°C'de 2 dk inkübasyon ardından;</i>	
5X Reaction Mix	4 µl
Maxima Enzyme Mix	2 µl
Su	4 µl
Toplam	20 µl

Tüm uygulamalar buz üzerinde çalışıldı. Thermal Cycler cihazı (Thermo) Çizelge 3.2'ye göre programlandı. Elde edilen cDNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Çizelge 3.2. Thermal cycler cihazı programı

Sıcaklık	Süre
25°C'de	10 dk
50°C'de	15 dk
85°C'de	5 dk

3.3.4. Primerlerin sulandırılması

Aşağıda Çizelge 3.3’de gösterilen primerler (Thermo) 100 µM olacak şekilde steril “nuclease free water” ile sulandırılarak hazırlandı ve -20°C’de stoklar depolandı.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primer dizileri (Huang, Cash, Chahine, Nikolich ve Craft, 2012)

Genler	Primer Dizisi	Baz Uzunluğu	Gen Bankası No
<i>OXA 23 – F</i>	<i>GACACTAGGAGAAGCCATGAAG</i>	116 bç	HM772981.1
<i>OXA 23 – R</i>	<i>CAGCATTACCGAAACCAATACG</i>		
<i>OXA 24 – F</i>	<i>GATGACCTTGACATAACCG</i>	151 bç	AJ239129.2
<i>OXA 24 – R</i>	<i>CAGTCAACCAACCTACCTGTG</i>		
<i>OXA 51 – F</i>	<i>TGTCTAAGGAAGTGAAGCGTG</i>	112 bç	CP001182.1
<i>OXA 51 – R</i>	<i>AACTGTGCCTCTTGCTGAG</i>		
<i>OXA 58 – F</i>	<i>AAGATTTTACTTTGGGCGAAGC</i>	141 bç	CP000864.1
<i>OXA 58 – R</i>	<i>CAACTCCGTGCCTATTTGC</i>		

3.3.5. Sıcaklık optimizasyonu

OXA genlerine (*OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-51* ve *OXA-58*) özgü primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda optimizasyon denemeleri yapılarak en uygun değer tespit edildi. Her gen için 40°C ile 51°C aralığında gradient PZR (Thermo) yapılarak genlerin bağlanma sıcaklıkları belirlendi.

Optimizasyonda kontrol suşu olarak *Acinetobacter baumannii* klinik izolatu kullanıldı. Çizelge 3.4 optimizasyonda kullanılan PZR bileşenlerini, Çizelge 3.5 ise sıcaklık optimizasyonunda kullanılan PZR koşullarını göstermektedir.

Çizelge 3.4. Sıcaklık optimizasyonunda kullanılan PZR bileşenleri

Kullanılan Malzeme	Miktar
Dream Taq PCR Master Mix (2X)	10 µl
“Forward” Primer (10 µM)	2 µl
“Reverse” Primer (10 µM)	2 µl
Kalıp DNA (cDNA)	3 µl
Su	3 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 3.5. Sıcaklık optimizasyonunda kullanılan PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	3 dk	1
95°C	30 sn	30
40°C - 51°C	30 sn	
72°C	2 dk	
72°C	7 dk	1

Sıcaklık optimizasyonu için agaroz jel elektroforezi

Hazırlanan PZR ürünlerinin bant büyüklüğü agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak görüntüleme cihazında belirlendi. 100 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde %1'lik agaroz jel hazırlandı. PZR ürünleri 5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jel kuyularına 20 µl olacak şekilde yüklendi. Oluşan bantların moleküler büyüklükleri görüntüleme cihazında 50 bp DNA markırı “DNA Ladder Plus” kullanılarak belirlendi. 120 voltta 1 saat 45 dakika akım

uygulandı. Jel 1 µg/ml etidyum bromür (Sigma) içeren çözelti kullanılarak 10 dakika boyandıktan sonra görüntülenme cihazında (Vilber Lourmat) fotoğrafları çekildi.

3.3.6. RT-PZR protokolü

RT-PZR; izole edilen RNA moleküllerinin revers transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen anlatımının analizlerinin yapılabildiği kısa sürede sonuç veren hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle çok az miktarda RNA ile oluşan mesajlar saptanabilir (Okutucu ve Pehlivan, 2003). Bu amaçla elde edilen cDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde 0,2 ml'lik tüplerde Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi PZR bileşenleri hazırlandı. Tüpler Çizelge 3.7'de belirtildiği şekilde programlanan PZR Cihazına (Thermo) yerleştirildi.

Çizelge 3.6. RT-PZR bileşenleri

Kullanılan Malzeme	Miktar
Dream Taq PCR Master Mix (2X)	10 µl
“Forward” Primer (10 µM)	2 µl
“Reverse” Primer (10 µM)	2 µl
Kalıp DNA (cDNA)	3 µl
Su	3 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 3.7. RT-PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	3 dk	1
95°C	30 sn	30
43°C	30 sn	
72°C	2 dk	
72°C	7 dk	1

RT-PZR agaroz jel elektroforezi

Hazırlanan RT-PZR ürünlerinin bant büyüklüğü agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak görüntüleme cihazında belirlendi. 100 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde %1'lik agaroz jel hazırlandı. PZR ürünleri 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jel kuyularına 10 µl olacak şekilde yüklendi. 120 voltta 1 saat 45 dakika akım uygulandı. Jel 1 µg/ml etidyum bromür (Sigma) içeren çözelti kullanılarak 10 dakika boyandıktan sonra görüntülenme cihazında fotoğrafları çekildi. Oluşan bantların moleküler büyüklükleri görüntüleme cihazında 50 bp DNA markırı "DNA Ladder Plus" kullanılarak belirlendi. Bu çalışmada, nicel olarak *OXA*-tipi genlerin anlatımına bakıldıktan sonra daha hassas olan gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak da gen anlatımları analiz edildi.

3.3.7. Gerçek zamanlı PZR ile gen anlatımlarının belirlenmesi

Gerçek zamanlı PZR, etken mikroorganizmaların moleküler tiplendirilmesi ve gen anlatım miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Nadkarni, Martin, Jacques ve Hunter, 2002). Uygulama alanları her geçen gün genişleyen bu yöntem, antibiyotik direncinin erken belirlenmesine de imkan vermektedir. Son yıllarda hastane enfeksiyonlarına neden olan direnç etkenlerinin erken tanısı için çok sayıda ticari kit üretilmiş ve kullanıma sunulmuştur (Cantarelli ve diğerleri, 2011; Renwick, Holmes ve Templeton, 2013). *OXA*-tipi gen anlatım miktarlarının belirlenmesi için "Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix" ticari kiti kullanılmış ve firmanın önerdiği protokol uygulanmıştır. Çizelge 3.8'de verilen miktarlar kullanılarak toplam hacim 10 µl olacak şekilde bileşenler hazırlandı ve Çizelge 3.9'da verilen protokol koşulları uygulandı.

Çizelge 3.8. Gerçek zamanlı PZR bileşenleri

Kullanılan Malzeme	Miktar
SYBR Green qPZR Master Mix (2X)	5 µl
“Forward” Primer (10 µM)	0,5 µl
“Reverse” Primer (10 µM)	0,5 µl
Kalıp DNA (cDNA)	1 µl
Su	3 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 3.9. Gerçek zamanlı PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
50°C	2 dk	1
95°C	10 dk	
95°C	15 sn	40
43°C	30 sn	
72°C	30 sn	
72°C	7 dk	

Erime eğrisi analizi ve agaroz jel elektroforezi

Reaksiyon sonrası ürünlerin özgüllüğünü doğrulamak için gerçek zamanlı PZR cihazında erime eğrisi analizi yapıldı. Her 1 saniyede 0,2°C’lik sıcaklık artışı 60°C - 95°C’ye kadar yavaş yavaş yükselir, artan sıcaklığa bağlı olarak çift sarmal zincirler ayrılmaya başlar ve floresans ışımada azalma olur. Bu aşamada belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı ölçülür. Erime eğrisi analizi ile her ampikonun T_m (melting temperature - erime sıcaklığı) derecesi saptanır ve primer dimer oluşup oluşmadığı izlenir.

Erime eğrisi analizlerini doğrulamak için gerçek zamanlı PZR cihazına yüklenen ürünlerinin bant büyüklüğü agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak görüntülendi. 100 ml 1X TBE çözeltisi içerisinde %1'lik agaroz jel hazırlandı. PZR ürünleri 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jel kuyularına 10 µl olacak şekilde yüklendi. 120 voltta 1 saat 45 dakika akım uygulandı. Jel 1 µg/ml etidyum bromür içeren çözelti kullanılarak 10 dakika boyandıktan sonra görüntülenme cihazında fotoğrafları çekildi. Oluşan bantların moleküler büyüklüklerini görüntülemeye 50 bp DNA markırı "DNA Ladder Plus" kullanıldı.

3.3.8. Gen anlatımının kantitatif analizi

İzolatlara ait *OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-51* ve *OXA-58* genlerinin kantitatif anlatım analizleri gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak analiz edildi. Her gen ve her örnek için Ct (Cycle threshold) değerleri, ışımaya değerinin artmaya başladığı döngüyü belirtmektedir. Gen anlatımlarının belirlenmesi için her bir gen için her bir örnekte belirlenen o gene ait Ct değeri referans gen Ct değerinden çıkarıldı ve ΔCt hedef hesaplandı. Sonraki aşamada $\Delta\Delta Ct$ değerinin elde etmek için ΔCt hedef - ΔCt kontrol formülü kullanıldı (Livak ve Schmittgen, 2001).

4. BULGULAR

4.1. Toplanacak Numunelerin Belirlenmesi

T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2010 – 2017 yılları arasında gönderilen numuneler ile ilgili retrospektif çalışmada (Özçelik ve İdil, 2018) elde edilen veriler ışığında *Acinetobacter baumannii*'nin en çok yoğun bakım ünitelerinden (%82) gönderilen solunum yolu numunelerinde (%60) tanımlandığı tespit edilmiştir. Çalışmaya bu doğrultuda devam edildi.

4.2. İzolatların Tanımlanması

T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Haziran 2017 – Ocak 2018 tarihleri arasında yoğun bakım servislerinden gelen aspirasyon ile steril şartlarda alınan solunum yolu numuneleri, %5 koyun kanlı agar ve EMB besi yerlerine, biyogüvenlik kabin (Nüve) içerisinde seyreltme yöntemi ile ekildi. Bu numuneler 37°C'de 24 saat etüvde (Nüve) bekletildikten sonra her iki besi yerinde de üreyen ve Gram negatif olduğu tahmin edilen bakteriler değerlendirildi. Şüpheli durumlarda gram boyama (Gram negatif), oksidaz (negatif) ve katalaz (pozitif) testleri de uygulandı. Yapılan gözlemler ve test sonuçlarından sonra *Acinetobacter baumannii* olduğu düşünülen koloniler VITEK-2 (Biomérieux) cihazına uygun kartlar kullanılarak yüklendi. 24 saat sonunda cihazın *Acinetobacter baumannii* olarak tanımladığı numuneler etiketlenip çalışmada kullanılmak üzere -20°C ve -80°C'de stoklandı.

4.3. Disk Difüzyon Sonuçları

Çalışmadaki suşlar, MHA'lı petrilere yayma yöntemi ile ekildikten sonra, imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), sefepim (30 µg), seftazidim (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), amikasin (30 µg), gentamisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), tigesiklin (15 µg) ve kolistin (10 µg) antibiyotik diskleri Kirby Bauer disk difüzyon yöntemine göre petrilere yerleştirildi ve petrilere 37°C'de 20-24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar CLSI

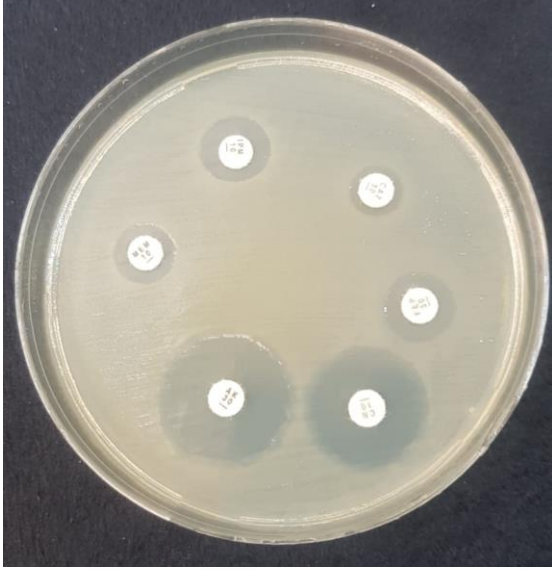
kriterlerine göre değerlendirildi. CLSI kriterlerinde bulunmayan tigesiklin için inhibisyon zon çapı ≤ 12 mm ise dirençli, ≥ 16 mm ise duyarlı (Galani ve diğerleri, 2008), kolistin için inhibisyon zon çapları ≤ 12 mm ise dirençli, ≥ 14 mm ise duyarlı (Jones ve diğerleri, 2007) olarak kabul edildi. Kullanılan sınır değerleri Çizelge 4.1’de verilmektedir. Petrielerde oluşan zon çapları mm cinsinden ölçüm yapılarak sonuçları Çizelge 4.2’de gösterilmektedir. Resim 4.1’de MHA besi yerine yayma ekimi yapılmış *Acinetobacter buamannii*’nin disk difüzyon testi sonrası oluşan zon çaplarına örnek petri gösterilmektedir. Çalışmada *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kontrol suşu kullanıldı.

Çizelge 4.1. Disk Difüzyon Sınır Değerleri (CLSI, 2016)

Antibiyotikler	mm	
	R	S
Imipenem	≤ 18	≥ 22
Meropenem	≤ 14	≥ 18
Sefepim	≤ 14	≥ 18
Seftazidim	≤ 14	≥ 18
Siprofloksasin	≤ 15	≥ 21
Levofloksasin	≤ 13	≥ 17
Amikasin	≤ 14	≥ 17
Gentamisin	≤ 12	≥ 15
Tetrasiklin	≤ 11	≥ 15
Tigesiklin*	≤ 12	≥ 16
Kolistin**	≤ 12	≥ 14

* (Galani ve diğerleri, 2008)

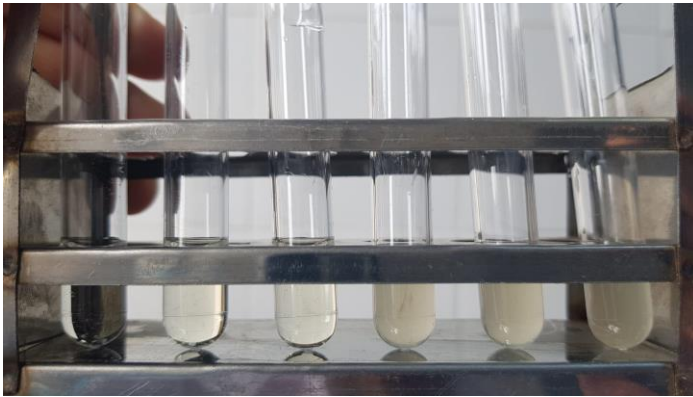
** (Jones ve diğerleri, 2007)



Resim 4.1. Disk difüzyon zon çapları

4.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Sonuçları

Yapılan disk difüzyon testleri sonrası tüm klinik izolatların aynı antibiyotikler kullanılarak, minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlendi. Seri dilüsyon sonrası 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılan tüpler, ertesi gün kontrol edildi ve üremenin olmadığı son tüp MİK değeri olarak kabul edildi (Resim 4.2). MİK değerleri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.



Resim 4.2. MİK belirlenmesi

4.5. İzolatların Direnç Profili

Yapılan disk difüzyon sonuçları ile MİK değerlerinin karşılaştırılmasında uyumsuzluğa rastlanmamış olup elde edilen direnç profili Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Disk difüzyon ölçümleri (mm)

Örnekler	IMP	MEM	FEP	CAZ	CIP	LEV	AK	GN	TE	TGC	CT
1	4	0	0	0	0	9	0	0	0	20	15
2	10	9	9	0	0	9	0	0	0	14	19
3	16	11	14	0	0	11	0	20	13	16	17
4	11	10	10	0	0	10	0	0	0	15	22
5	16	14	15	12	0	0	10	0	10	13	18
6	10	10	0	0	0	11	0	0	0	14	21
7	14	11	18	0	0	11	0	0	0	19	15
8	4	9	9	0	0	10	0	0	0	16	15
9	4	0	0	0	9	12	0	0	0	20	15
10	15	11	12	0	0	9	17	10	0	15	21
11	12	12	0	0	0	0	18	0	0	13	20
12	10	10	0	0	0	10	0	0	11	14	20
13	14	13	14	0	0	12	18	0	0	13	19
14	13	10	11	0	0	12	0	0	0	15	18
15	15	14	14	0	0	11	0	0	0	15	16
16	13	12	12	0	0	10	18	0	0	14	20
17	14	10	15	13	0	15	18	20	16	17	15
18	14	12	12	0	0	11	0	0	0	15	16
19	12	10	0	0	0	12	0	0	9	14	17
20	13	14	11	8	0	0	0	17	0	16	16
21	11	10	14	0	0	11	0	0	0	15	20
22	10	10	0	0	0	11	0	0	0	15	20
23	10	10	0	0	0	11	0	0	0	15	20
24	10	10	0	0	0	11	0	0	0	15	20
25	10	10	0	0	0	11	18	0	0	17	15

IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, AK: Amikasin, GN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, TGC: Tigesiklin, CT: Kolistin

Çizelge 4.2. (devam) Disk difüzyon ölçümleri (mm)

Örnekler	IMP	MEM	FEP	CAZ	CIP	LEV	AK	GN	TE	TGC	CT
26	10	10	0	0	0	15	18	16	16	17	20
27	10	10	0	0	0	11	0	0	0	15	20
28	10	10	0	0	0	11	0	0	0	17	20
29	10	10	0	0	0	12	0	0	10	15	19
30	10	10	0	0	0	10	0	19	13	20	18
31	10	10	0	0	0	10	0	0	0	15	20
32	10	10	0	0	0	10	0	0	0	13	18
33	11	11	0	0	0	10	17	0	0	13	17
34	10	10	10	10	0	12	20	22	0	22	16
35	12	12	0	0	6	10	22	11	10	13	16
36	10	0	10	10	0	11	20	22	0	25	16
37	10	10	0	0	0	9	18	13	0	25	16
38	10	9	9	0	0	0	0	10	0	13	15
39	11	11	16	0	0	9	0	0	0	10	15
40	11	10	9	0	0	9	9	0	0	17	15
41	4	9	9	13	0	12	18	20	13	21	14
42	10	9	0	0	0	10	0	0	0	13	17
43	10	9	10	0	0	10	0	0	0	14	20
44	10	10	0	0	0	10	0	0	0	16	16
45	11	10	11	14	0	15	18	20	16	20	16
46	11	10	10	0	0	0	0	0	0	11	18
47	11	10	12	0	0	10	0	0	0	15	22
48	11	10	0	0	0	0	9	0	0	10	15
49	13	12	13	10	0	9	22	20	0	16	15
50	10	10	0	0	0	10	18	0	0	18	20

IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, AK: Amikasin, GN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, TGC: Tigesiklin, CT: Kolistin

Çizelge 4.3. MİK değerleri (µg/mL)

Örnekler	IMP	MEM	FEP	CAZ	CIP	LEV	AK	GN	TE	TGC	CT
1	125	125	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	62,5	1,953125	0,244141
2	31,25	125	62,5	125	15,625	15,625	250	31,25	125	3,90625	0,244141
3	62,5	62,5	31,25	62,5	15,625	15,625	250	3,90625	7,825	1,953125	0,244141
4	31,25	62,5	62,5	125	15,625	15,625	250	31,25	125	3,90625	0,244141
5	62,5	31,25	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
6	31,25	62,5	62,5	125	31,25	15,625	125	31,25	125	3,90625	0,244141
7	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	125	1,953125	0,244141
8	125	125	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	125	1,953125	0,244141
9	125	125	31,25	62,5	7,8125	15,625	125	31,25	125	1,953125	0,244141
10	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	7,8125	15,625	125	3,90625	0,244141
11	62,5	31,25	62,5	125	15,625	15,625	3,90625	31,25	62,5	3,90625	0,244141
12	62,5	62,5	62,5	125	31,25	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
13	62,5	31,25	62,5	125	31,25	15,625	3,90625	31,25	62,5	3,90625	0,244141
14	62,5	62,5	62,5	125	31,25	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
15	62,5	31,25	62,5	125	31,25	15,625	250	31,25	62,5	3,90625	0,244141
16	62,5	31,25	62,5	125	15,625	15,625	3,90625	31,25	62,5	3,90625	0,244141
17	62,5	62,5	31,25	62,5	15,625	3,90625	15,625	3,90625	3,90625	1,953125	0,244141
18	62,5	31,25	31,25	62,5	15,625	15,625	250	31,25	62,5	3,90625	0,244141
19	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	250	31,25	62,5	3,90625	0,244141
20	62,5	31,25	31,25	62,5	15,625	15,625	125	3,90625	62,5	1,953125	0,244141
21	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
22	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
23	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
24	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
25	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	7,8125	31,25	62,5	1,953125	0,244141

IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, AK: Amikasin, GN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, TGC: Tigesiklin, CT: Kolistin

Çizelge 4.3. (devam) MİK değerleri (µg/mL)

Örnekler	IMP	MEM	FEP	CAZ	CIP	LEV	AK	GN	TE	TGC	CT
26	62,5	62,5	31,25	62,5	15,625	3,90625	15,625	3,90625	3,90625	1,953125	0,244141
27	62,5	62,5	62,5	125	31,25	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
28	62,5	62,5	62,5	125	31,25	15,625	250	31,25	62,5	1,953125	0,244141
29	62,5	62,5	62,5	125	15,625	15,625	250	31,25	62,5	3,90625	0,244141
30	31,25	62,5	31,25	62,5	15,625	15,625	250	3,90625	7,825	1,953125	0,244141
31	31,25	62,5	62,5	125	15,625	15,625	250	31,25	125	3,90625	0,244141
32	31,25	62,5	62,5	125	15,625	15,625	125	31,25	125	3,90625	0,244141
33	31,25	62,5	31,25	62,5	15,625	15,625	7,8125	31,25	125	3,90625	0,244141
34	31,25	62,5	125	250	15,625	15,625	3,90625	3,90625	125	1,953125	0,244141
35	31,25	31,25	125	250	7,8125	15,625	7,8125	15,625	62,5	3,90625	0,244141
36	31,25	125	125	250	15,625	15,625	3,90625	3,90625	125	1,953125	0,244141
37	31,25	62,5	125	250	15,625	15,625	3,90625	7,8125	125	1,953125	0,244141
38	31,25	125	125	250	15,625	15,625	125	15,625	125	3,90625	0,244141
39	31,25	62,5	31,25	62,5	15,625	15,625	125	31,25	125	15,625	0,244141
40	31,25	62,5	125	250	15,625	15,625	125	31,25	62,5	1,953125	0,244141
41	125	125	125	250	15,625	15,625	15,625	3,90625	7,825	1,953125	0,244141
42	31,25	125	125	250	31,25	15,625	125	31,25	62,5	3,90625	0,244141
43	31,25	125	62,5	125	31,25	15,625	250	31,25	62,5	3,90625	0,244141
44	31,25	62,5	125	250	31,25	15,625	250	31,25	62,5	1,953125	0,244141
45	31,25	62,5	31,25	62,5	15,625	3,90625	15,625	3,90625	3,90625	1,953125	0,244141
46	31,25	62,5	125	250	15,625	15,625	250	31,25	62,5	15,625	0,244141
47	31,25	62,5	125	250	15,625	15,625	250	31,25	62,5	3,90625	0,244141
48	31,25	62,5	31,25	62,5	15,625	15,625	125	31,25	62,5	15,625	0,244141
49	31,25	31,25	62,5	125	15,625	15,625	3,90625	3,90625	62,5	1,953125	0,244141
50	31,25	62,5	62,5	125	15,625	15,625	7,8125	31,25	62,5	1,953125	0,244141

IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, AK: Amikasin, GN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, TGC: Tigesiklin, CT: Kolistin

Çizelge 4.4. Direnç profili

Örnekler	IMP	MEM	FEP	CAZ	CIP	LEV	AK	GN	TE	TGC	CT
1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
3	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
10	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S
11	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S
12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
13	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S
14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
16	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S
17	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S
18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
20	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
25	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S

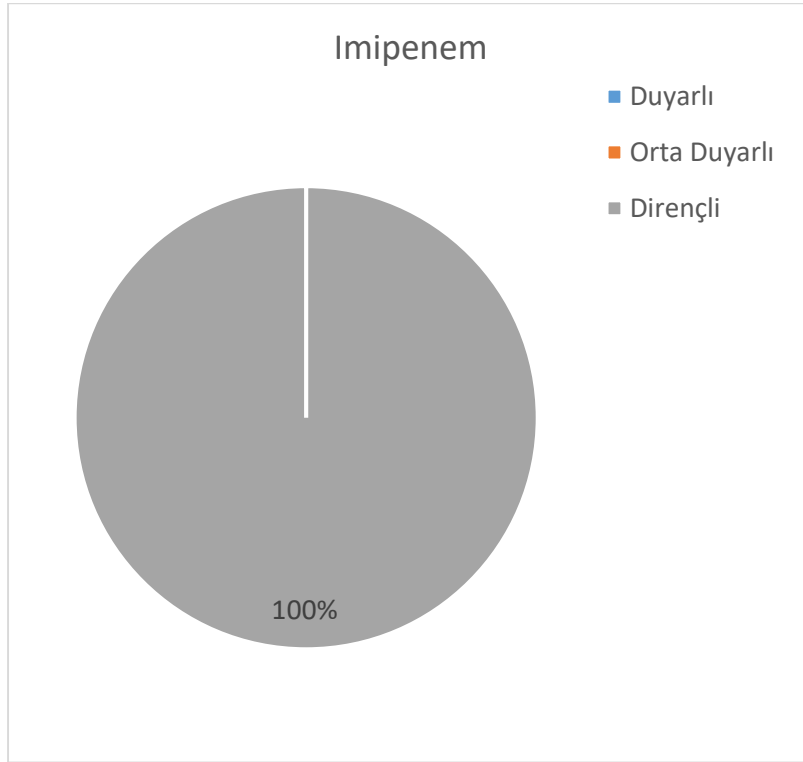
IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, AK: Amikasin, GN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, TGC: Tigesiklin, CT: Kolistin

Çizelge 4.4. (devam) Direnç profili

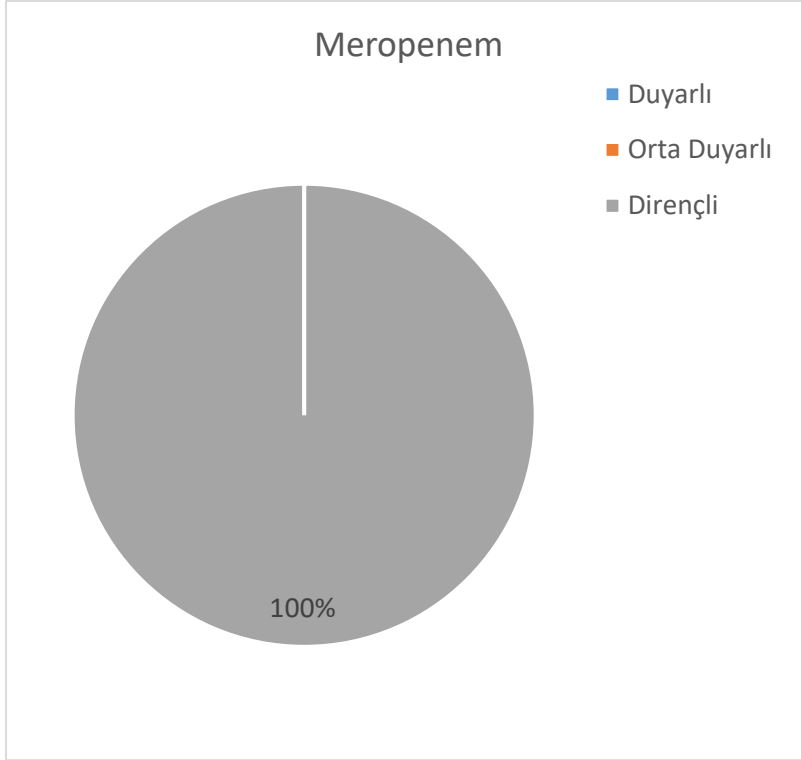
Örnekler	IMP	MEM	FEP	CAZ	CIP	LEV	AK	GN	TE	TGC	CT
26	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S
27	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
28	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
30	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S
31	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
33	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S
34	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S
35	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S
36	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S
37	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S
38	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
39	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
40	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
41	R	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S
42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
43	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
44	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
45	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S
46	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
47	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
49	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S
50	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S

IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, AK: Amikasin, GN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, TGC: Tigesiklin, CT: Kolistin

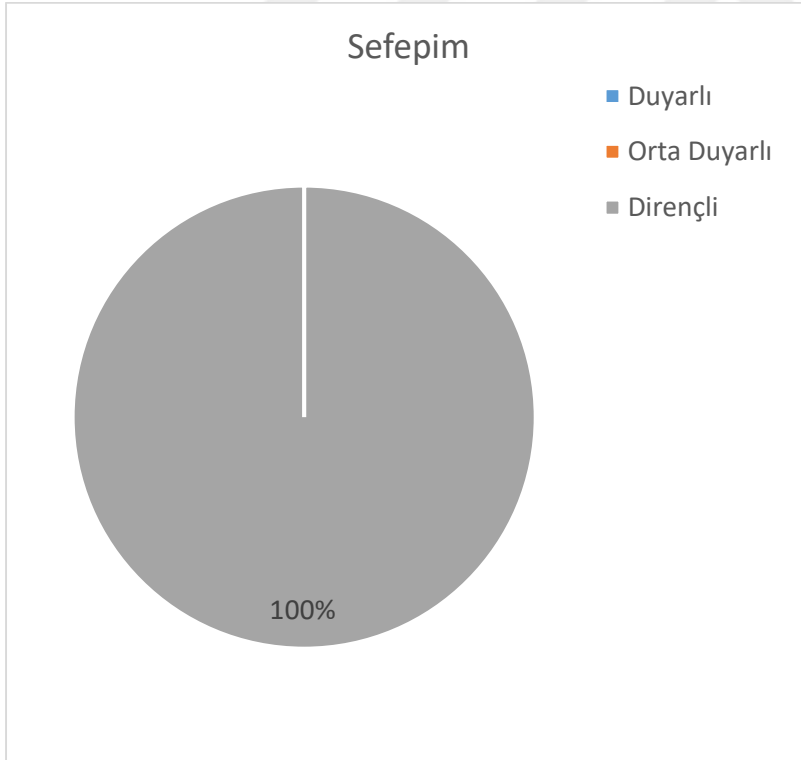
Bu değerlendirmelere göre *Acinetobacter baumannii* izolatları; imipenem, meropenem, sefepim, seftazidim ve siprofloksasine %100 dirençli bulunurken, levofloksasine %94, amikasine %68, gentamisine %78, tetrasikline %88 ve tigesikline %6 oranında dirençli bulundu. Kolistin ise tüm örneklerde duyarlı tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen 50 izolatın tamamında çoklu antibiyotik direnci belirlendi. Çalışılan tüm antibiyotilerin direnç profilleri Şekil 4.1 – 4.11’de verildi.



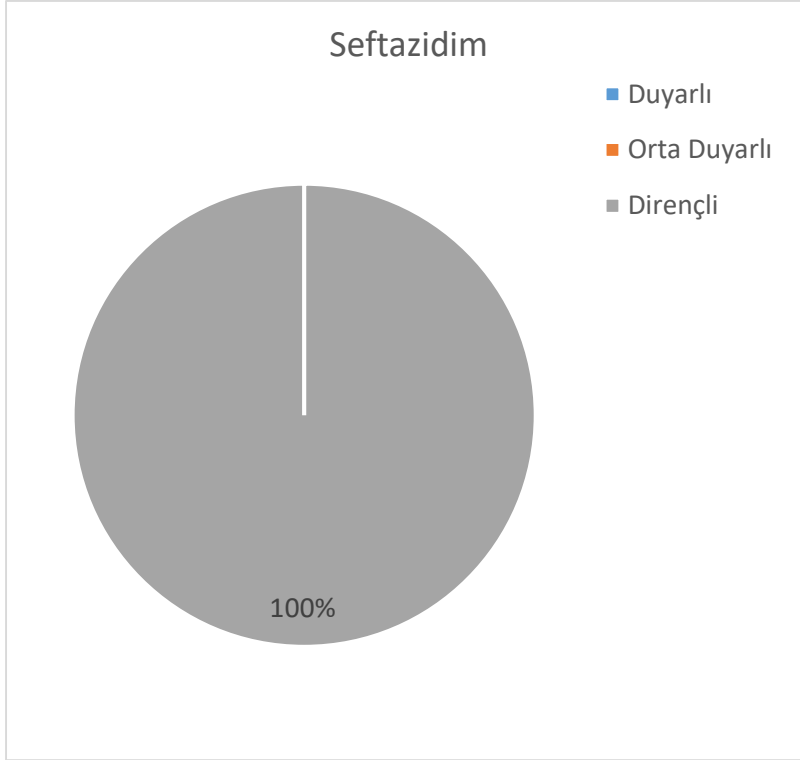
Şekil 4.1. İzolatlarda imipenem için direnç dağılımı



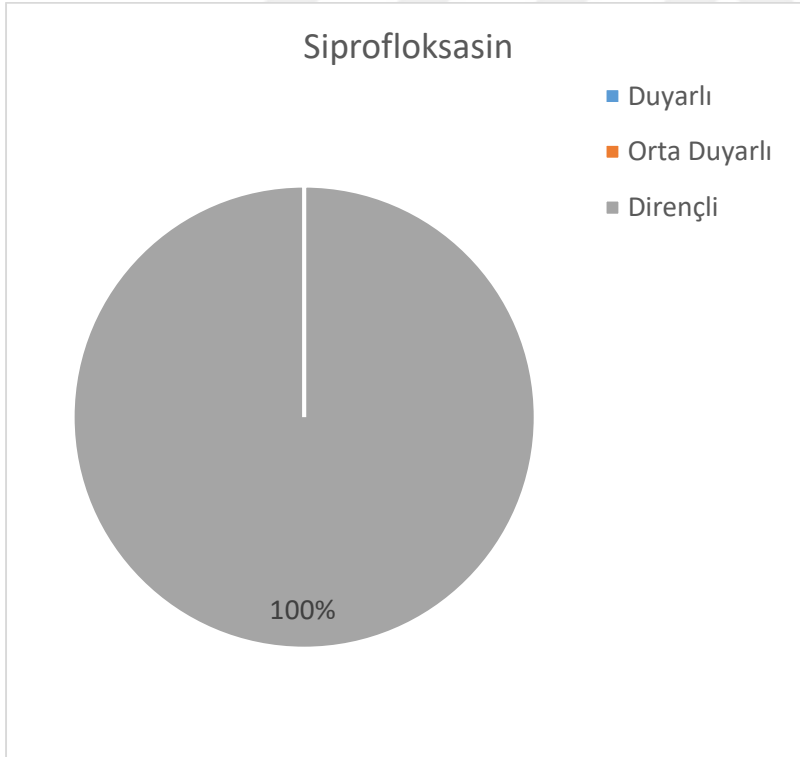
Şekil 4.2. İzolatlarda meropenem için direnç dağılımı



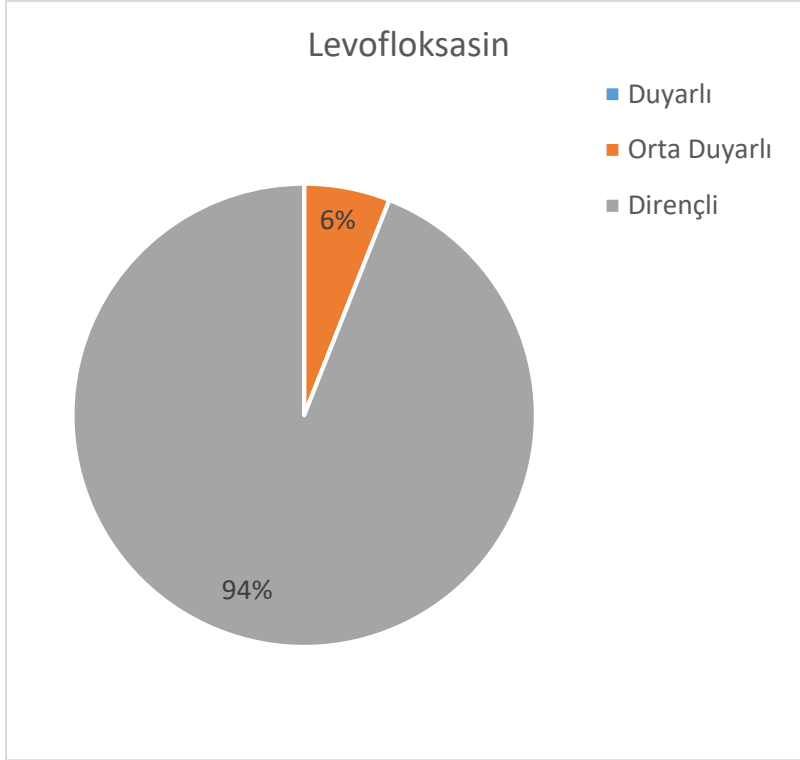
Şekil 4.3. İzolatlarda sefepim için direnç dağılımı



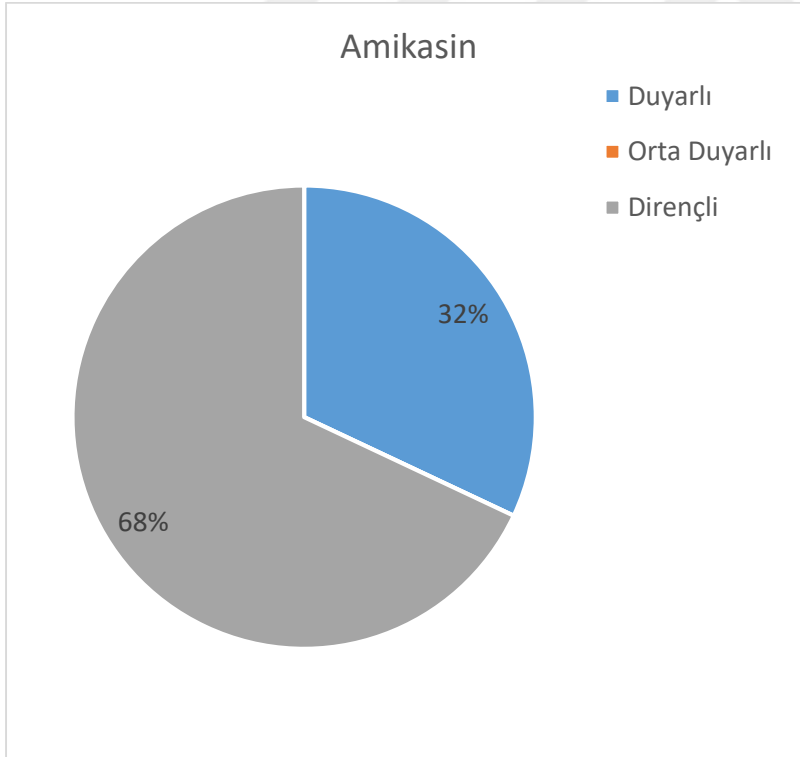
Şekil 4.4. İzolatlarda seftazidim için direnç dağılımı



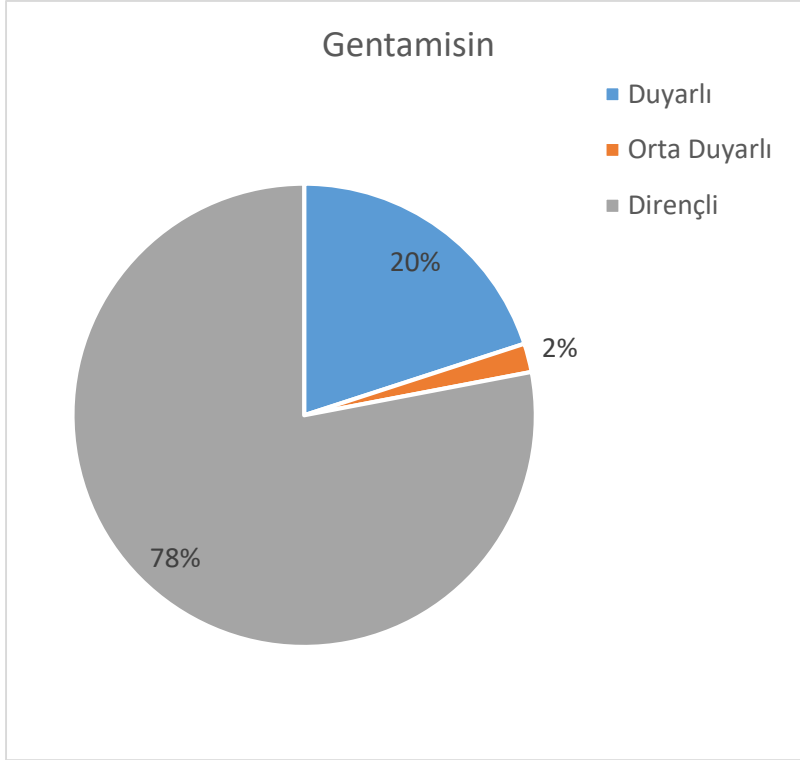
Şekil 4.5. İzolatlarda siprofloksasin için direnç dağılımı



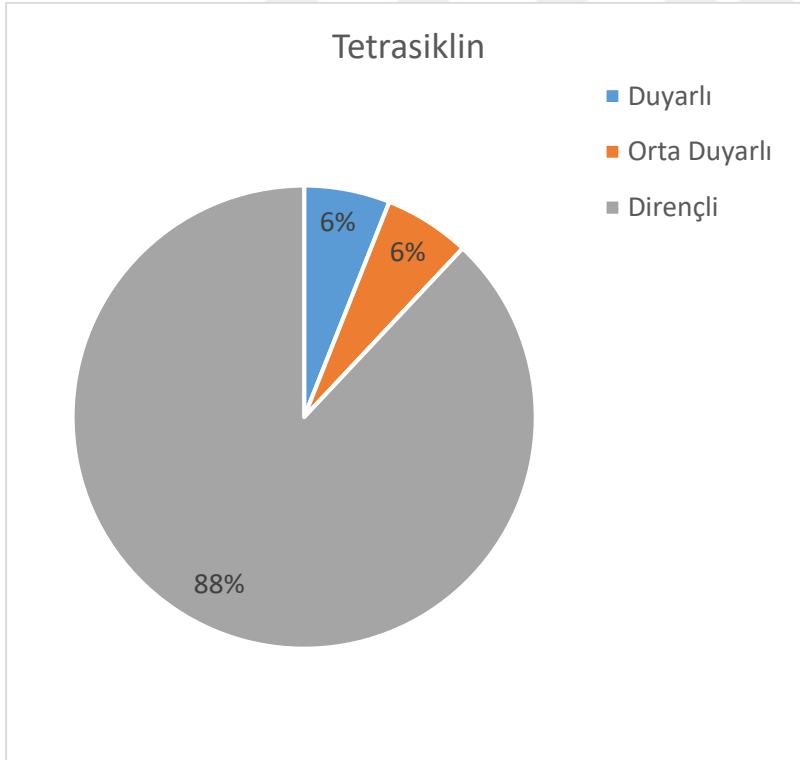
Şekil 4.6. İzolatlarda levofloksasin için direnç dağılımı



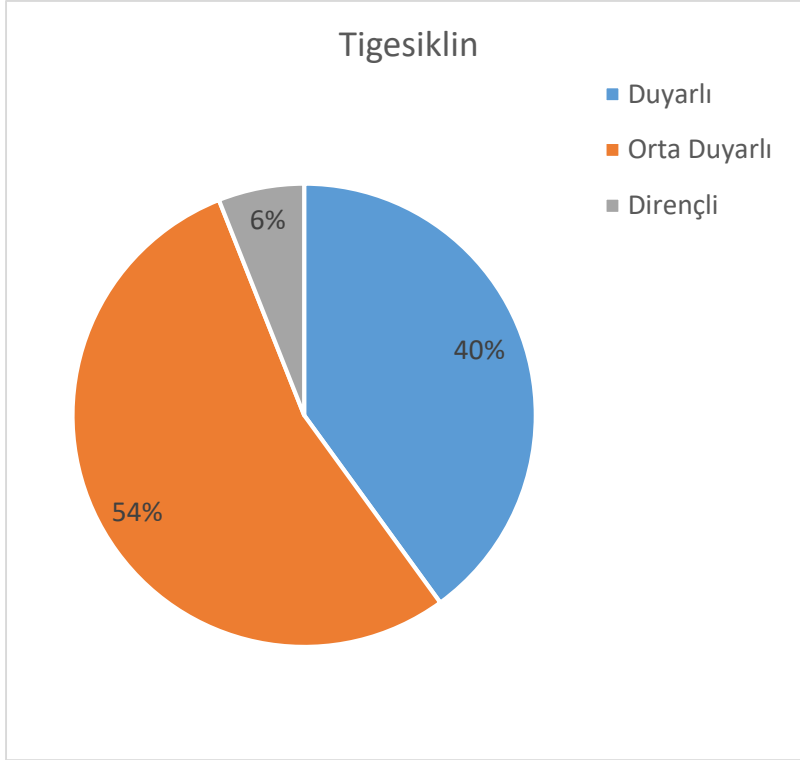
Şekil 4.7. İzolatlarda amikasin için direnç dağılımı



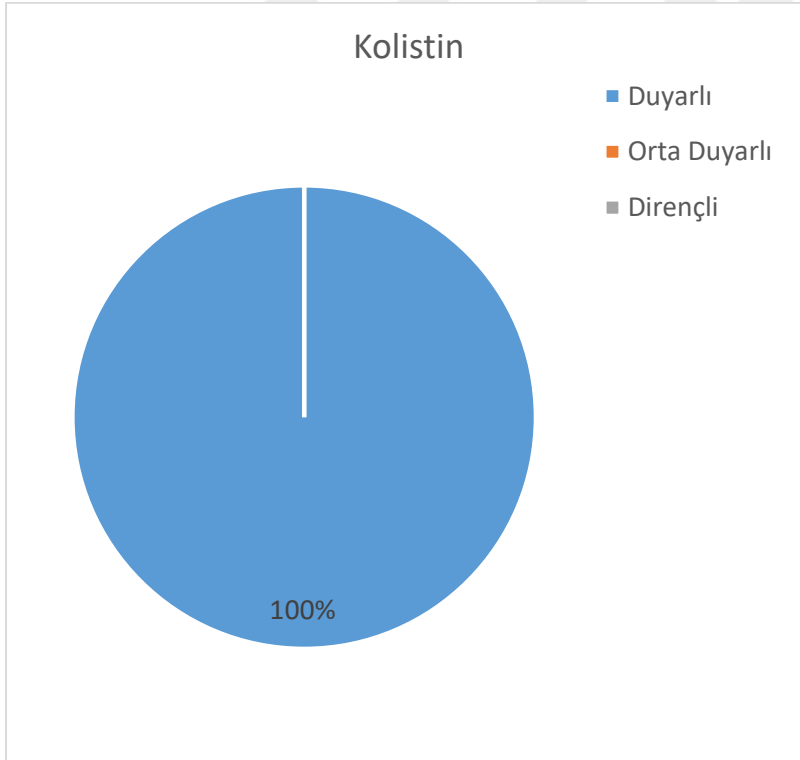
Şekil 4.8. İzolatlarda gentamisin için direnç dağılımı



Şekil 4.9. İzolatlarda tetrasiklin için direnç dağılımı



Şekil 4.10. İzolatlarda tigesiklin için direnç dağılımı



Şekil 4.11. İzolatlarda kolistin için direnç dağılımı

4.6. Total RNA Miktarı ve Saflığı

Suřlardan “Thermo Scientific GeneJET RNA Purification” kiti ile protokolüne uygun olarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. *Acinetobacter baumannii* izolatlarından elde edilen total RNA’ların saflığı ve konsantrasyonu μ Drop cihazında 260 nm’de ölçüldü ve tüm değerler izelge 4.5’de gösterildi. Genel olarak yüksek saflıkta total RNA’lara ait nükleik asit/protein oranı 1,8 - 2,1 arasındadır. Elde edilen total RNA örnekleri bu aralıkta tespit edildi.

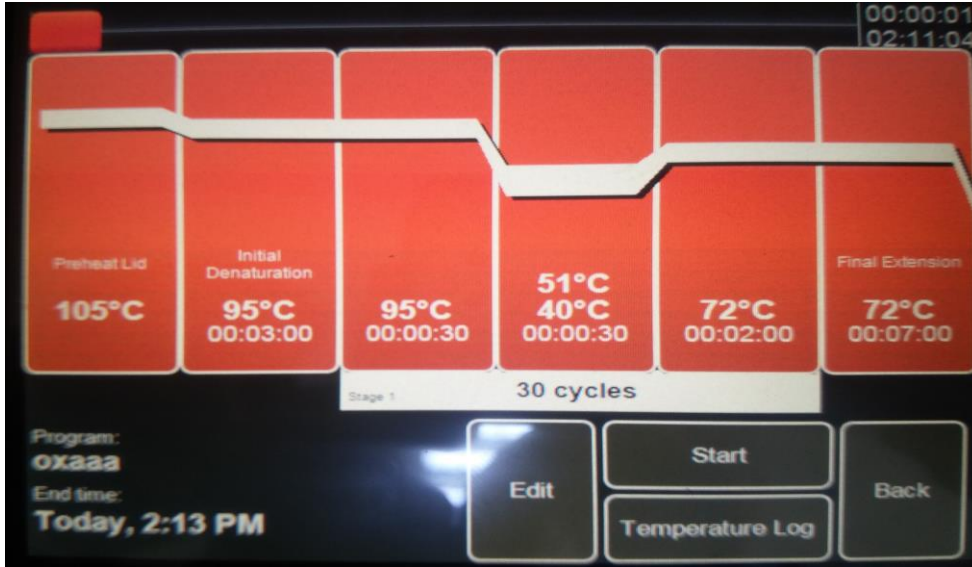


Çizelge 4.5. Total RNA miktarı ve saflığı

Örnekler	Konsantrasyon (µg/mL)	Saflık (260 / 280)	Örnekler	Konsantrasyon (µg/mL)	Saflık (260 / 280)
1	555,8	2,123	26	1295	2,121
2	501,4	2,126	27	406,4	2,101
3	401,5	2,12	28	967	2,128
4	352,5	2,128	29	345,9	2,099
5	321	2,139	30	131,2	2,155
6	620,2	2,115	31	2418	1,192
7	262,7	2,143	32	229,3	2,171
8	117,6	2,142	33	360	2,064
9	922,9	2,102	34	93,8	2,074
10	352,4	2,127	35	134,5	2,102
11	444,8	2,091	36	105,7	2,077
12	1240	2,124	37	273,4	2,114
13	370	2,107	38	575,8	2,12
14	521,2	2,098	39	225	2,103
15	197,9	2,094	40	341,8	2,08
16	271,6	2,104	41	599,2	2,115
17	278,6	2,117	42	349,6	2,082
18	144,7	2,084	43	340,8	2,106
19	2419	1,191	44	229,6	2,09
20	1115	2,116	45	607,4	2,106
21	256,8	2,065	46	567,5	2,114
22	1035	2,118	47	457,3	2,2
23	1021	2,135	48	414,2	2,112
24	595,4	2,115	49	129,6	2,057
25	477,2	2,115	50	388,2	2,12

4.7. Sıcaklık Optimizasyonu

OXA genlerine (*OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-51* ve *OXA-58*) özgü primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda optimizasyon denemeleri yapıldı. Gradient sistemli PZR cihazı 40°C - 51°C derece aralığında programlandı (Resim 4.3).

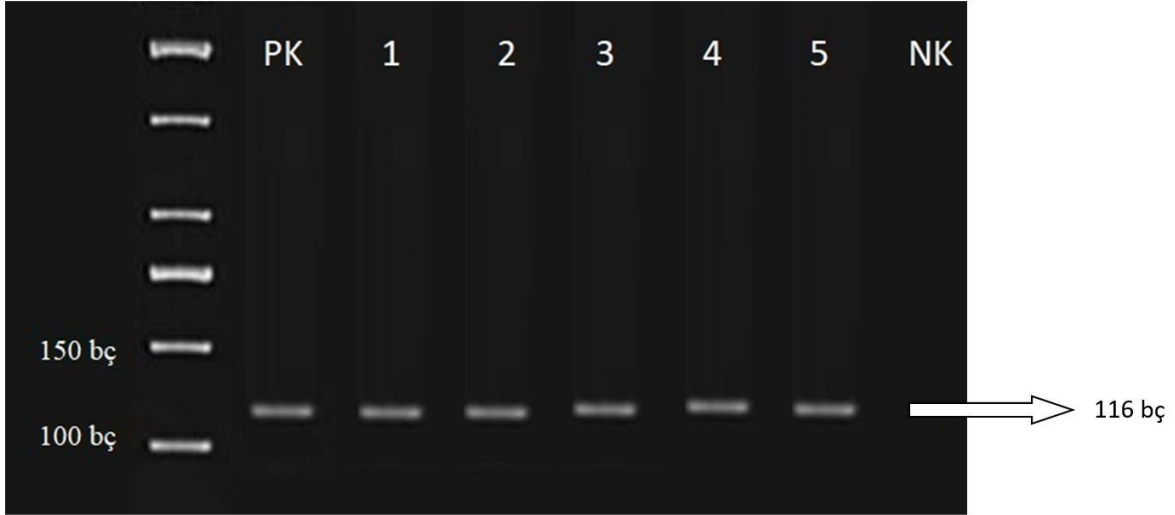


Resim 4.3. PZR cihazı sıcaklık optimizasyon protokolü

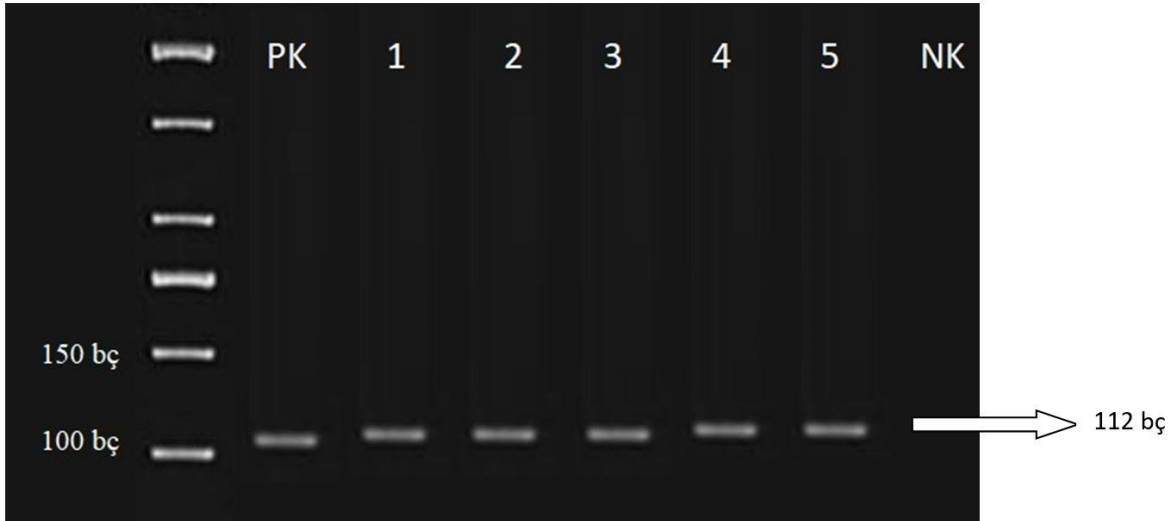
Agaroz jel elektroforez çalışması sonrasında, görüntüleme cihazı kullanılarak yapılan değerlendirmelerde kullandığımız *OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-51* ve *OXA-58* genleri için en uygun sıcaklığın 43°C olduğu saptandı.

4.8. RT-PZR Sonuçları

Optimizasyon çalışmaları ile her gen bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra RT-PZR aşamasına geçildi. RT-PZR sonucu elde edilen PZR ürünleri, %1 agaroz jele yüklendi. Elektroforez işlemi sonrası görüntüleme cihazından elde edilen resimlerde de görüldüğü gibi örneklerin tamamında *OXA-23* (116 bç) ve *OXA-51* (112 bç) geni bulunurken, *OXA-24* (151 bç) ve *OXA-58* (141 bç) genlerinin bulunmadığı belirlendi. Tüm örnekler jele yüklenmiştir. Örneklerden temsilen beşer tanesinin görüntüsü Resim 4.4 – 4.7’de verilmiştir.



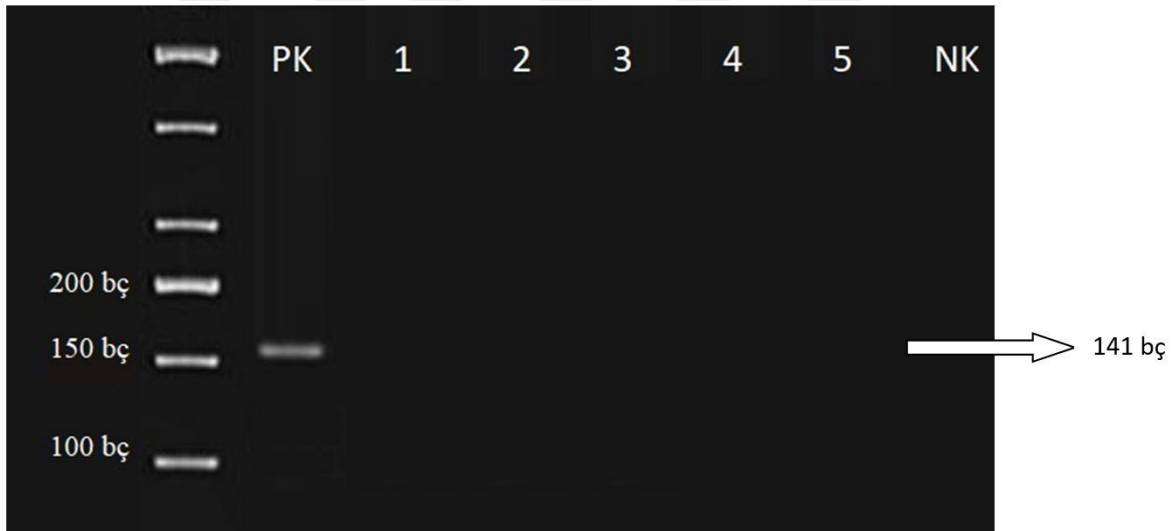
Resim 4.4. *OXA-23* jel görüntüsü
(PK: *OXA-23* pozitif kontrol, NK: negatif kontrol, 1-5: örnekler, bç: baz çifti)



Resim 4.5. *OXA-51* jel görüntüsü
(PK: *OXA-51* pozitif kontrol, NK: negatif kontrol, 1-5: örnekler, bç: baz çifti)



Resim 4.6. *OXA-24* jel görüntüsü
(PK: *OXA-24* pozitif kontrol, NK: negatif kontrol, 1-5: örnekler, bç: baz çifti)



Resim 4.7. *OXA-58* jel görüntüsü
(PK: *OXA-58* pozitif kontrol, NK: negatif kontrol, 1-5: örnekler, bç: baz çifti)

Şekillerde temsilen beş örnek ile ilgili bilgiler bulunmaktadır. Çizelge 4.6'da ise klinik izolatlardaki *OXA* gen bölgelerinin anlatımı ile ilgili bilgiler yer almaktadır.

Çizelge 4.6. OXA gen bölgelerinin dağılımları

Örnek	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	Örnek	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58
1	+	-	+	-	26	+	-	+	-
2	+	-	+	-	27	+	-	+	-
3	+	-	+	-	28	+	-	+	-
4	+	-	+	-	29	+	-	+	-
5	+	-	+	-	30	+	-	+	-
6	+	-	+	-	31	+	-	+	-
7	+	-	+	-	32	+	-	+	-
8	+	-	+	-	33	+	-	+	-
9	+	-	+	-	34	+	-	+	-
10	+	-	+	-	35	+	-	+	-
11	+	-	+	-	36	+	-	+	-
12	+	-	+	-	37	+	-	+	-
13	+	-	+	-	38	+	-	+	-
14	+	-	+	-	39	+	-	+	-
15	+	-	+	-	40	+	-	+	-
16	+	-	+	-	41	+	-	+	-
17	+	-	+	-	42	+	-	+	-
18	+	-	+	-	43	+	-	+	-
19	+	-	+	-	44	+	-	+	-
20	+	-	+	-	45	+	-	+	-
21	+	-	+	-	46	+	-	+	-
22	+	-	+	-	47	+	-	+	-
23	+	-	+	-	48	+	-	+	-
24	+	-	+	-	49	+	-	+	-
25	+	-	+	-	50	+	-	+	-

4.9. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

RT-PZR ile genlerin anlatımına bakıldı ve Çizelge 4.6'da sonuçlar var/yok (+/-) şeklinde verildi. Daha sonra gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR analizlerinde ise çalışmanın üç tekrarlı gerçekleştirilmesine karşın bu genlere ait Ct değerlerinde anlamlı bir fark bulunamadı (Çizelge 4.7). Gerçek zamanlı PZR sonuçlarının anlamlı bir fark vermemesinin sebebi, Huang ve diğerleri (2012)'nin yaptıkları çalışmada da belirttiği gibi Gram negatif bakterilerde karbapenem dirençliliğini hızlı bir şekilde tanımlayan mevcut bir gerçek zamanlı PZR yönteminin bulunamayışı olarak açıklanabilir. Acinetobacter'ler için geleneksel PZR ya da gerçek zamanlı PZR kullanarak sınıf D β -laktamaz tespiti için de birçok yöntem geliştirilmektedir (Woodford ve diğerleri, 2006). Buna karşın her bir yöntemin kendine özgü farklılıkları bulunduğu için (kullanılan genlerin farklılığı, her bir genin bağlanma sıcaklıklarının farklı olması veya cins içindeki türlerin farklılığı gibi) standardize edilmiş bir yöntem yok denebilir.

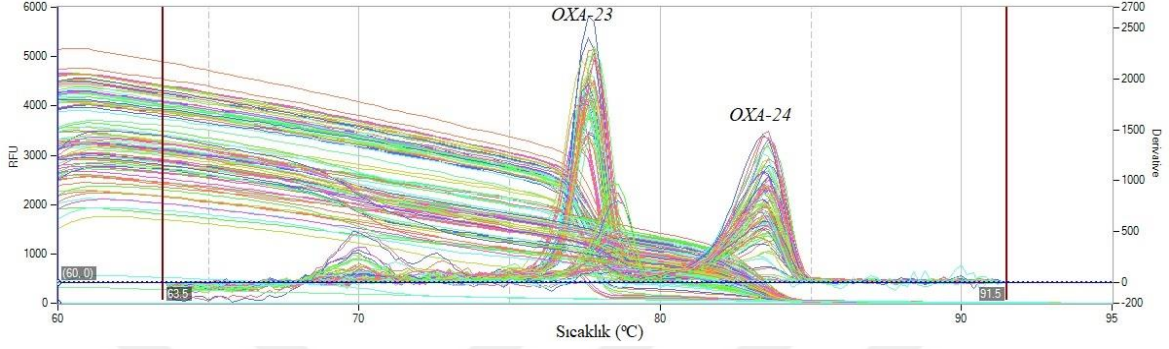
Çizelge 4.7. Gerçek zamanlı PZR Ct değerleri

Genler	OXA-23			OXA-24			OXA-51			OXA-58		
Örnekler	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
Referans	35,67	35,70	35,69	38,09	38,78	38,44	36,65	32,49	34,57	35,64	36,67	36,16
1	37,19	17,44	27,32	5,33	4,06	4,70	26,52	26,69	26,61	3,15	4,91	4,03
2	30,50	18,82	24,66	2,96	3,25	3,11	30,37	28,83	29,60	2,54	4,76	3,65
3	21,21	18,75	19,98	5,73	39,30	22,52	28,91	25,33	27,12	4,38	NaN	4,18
4	18,51	18,30	18,41	NaN	NaN	NaN	25,54	26,92	26,23	4,98	16,23	10,61
5	27,37	18,56	22,97	4,04	6,49	5,27	31,01	30,67	30,84	3,36	6,26	4,81
6	26,43	16,99	21,71	6,00	10,63	8,63	27,74	26,59	27,17	NaN	6,67	6,01
7	23,76	19,05	21,41	38,54	NaN	38,99	23,92	24,59	24,26	36,15	37,21	36,68
8	39,47	17,61	28,54	4,22	5,02	4,62	29,50	29,94	29,72	3,80	5,31	4,56
9	31,59	19,23	25,41	7,41	6,62	7,02	23,98	27,45	25,72	6,09	7,89	6,99
10	24,50	18,85	21,68	5,80	5,02	5,41	27,01	28,37	27,37	3,38	4,82	4,10
11	3,09	18,21	10,65	3,13	3,63	3,38	28,72	28,69	28,71	2,69	3,37	3,03
12	20,02	19,38	19,70	7,21	4,90	6,06	26,22	28,48	27,35	3,54	5,30	4,42
13	25,58	18,37	21,98	6,07	4,60	5,34	26,97	25,85	26,41	3,16	5,14	4,15
14	19,81	17,83	18,82	4,16	3,12	3,64	28,59	28,14	28,37	2,46	3,04	2,75
15	22,95	18,70	20,83	7,83	23,24	15,54	22,63	24,26	23,45	6,60	NaN	6,23
16	18,54	18,33	18,44	11,12	6,82	8,97	25,57	26,12	25,85	6,44	7,19	6,82
17	20,76	17,36	19,06	4,91	6,24	5,58	29,11	28,39	28,75	16,62	4,84	10,73
18	19,36	19,41	19,39	NaN	38,74	38,78	21,69	22,47	22,08	NaN	35,53	35,03
19	3,39	3,29	3,34	4,87	3,20	4,04	28,14	29,94	28,69	3,28	4,09	3,69
20	16,60	18,03	17,32	3,92	5,84	4,88	28,31	30,90	29,61	3,98	5,47	4,73
21	19,01	19,20	19,11	NaN	39,87	39,71	28,01	28,75	28,38	38,97	NaN	38,11
22	34,60	18,77	26,69	3,25	4,03	3,64	30,95	31,21	31,01	2,87	7,46	5,17
23	17,57	17,99	17,78	3,86	4,52	4,19	39,18	37,64	38,99	4,61	4,28	4,45
24	20,09	18,57	19,33	3,29	3,88	3,59	28,88	33,11	31,00	2,98	4,20	3,59
25	22,21	17,79	20,00	5,33	4,53	4,93	28,73	28,32	28,53	3,26	5,10	4,18

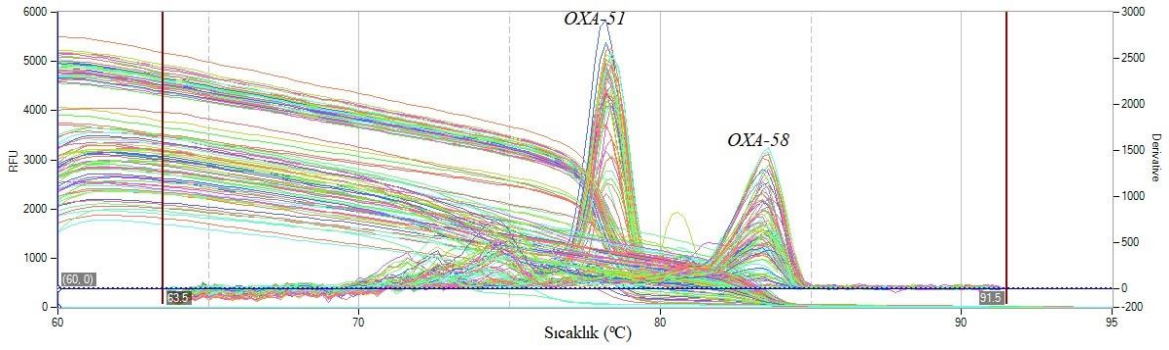
Çizelge 4.7. (devam) Gerçek zamanlı PZR Ct değerleri

Genler	OXA-23			OXA-24			OXA-51			OXA-58		
Örnekler	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
Referans	35,67	35,70	35,69	38,09	38,78	38,44	36,65	32,49	34,57	35,64	36,67	36,16
26	17,03	17,21	17,12	3,04	3,66	3,35	28,50	26,47	27,49	2,81	3,79	3,30
27	16,75	19,03	17,89	4,28	4,22	4,25	24,34	27,33	25,84	37,47	NaN	37,78
28	16,71	16,20	16,46	6,33	5,92	6,13	25,02	29,44	27,23	3,34	4,15	3,75
29	17,45	17,91	17,68	4,40	5,86	5,13	23,13	24,55	23,84	4,87	13,48	9,18
30	17,34	17,90	17,62	39,82	NaN	39,72	24,56	25,65	25,11	36,24	36,61	36,43
31	17,58	17,83	17,71	5,48	12,61	9,05	23,35	24,70	24,03	5,29	NaN	5,66
32	19,22	19,23	19,23	4,49	5,74	5,12	24,83	26,60	25,72	NaN	7,10	7,90
33	18,23	17,95	18,09	11,64	NaN	11,55	25,09	26,34	25,72	39,60	NaN	39,52
34	18,45	18,15	18,30	NaN	NaN	NaN	21,84	22,91	22,38	35,75	37,80	36,78
35	17,89	18,21	18,05	30,54	37,83	34,19	23,97	24,75	24,36	33,64	34,82	34,23
36	19,13	19,35	19,24	NaN	11,51	11,01	24,34	26,58	25,46	38,25	NaN	39,29
37	22,24	18,96	20,60	3,04	9,39	6,22	39,72	32,02	35,87	3,06	13,71	8,39
38	18,55	17,84	18,20	4,22	37,30	20,76	26,28	30,01	28,15	4,31	6,91	5,61
39	20,24	18,15	19,20	3,87	5,40	4,64	27,88	28	27,88	3,20	28,80	16,00
40	25,60	18,47	22,04	6,17	3,75	4,96	27,54	29,46	28,50	6,77	6,49	6,63
41	20,17	17,16	18,67	3,09	3,68	3,39	26,56	28,72	27,64	2,91	13,86	8,39
42	22,37	22,95	22,66	NaN	NaN	NaN	36,81	35,13	36,10	NaN	NaN	NaN
43	20,54	21,08	20,81	NaN	NaN	NaN	37,86	31,12	34,49	NaN	NaN	NaN
44	21,65	23,19	22,42	16,68	NaN	16,32	26,69	24,26	25,33	NaN	36,20	36,58
45	25,29	29,07	27,18	19,32	NaN	19,17	27,45	28,37	26,98	31,03	NaN	30,84
46	22,78	24,26	23,52	NaN	NaN	NaN	26,92	26,12	28,83	23,09	NaN	23,48
47	23,35	23,27	23,31	32,17	37,27	34,72	30,67	28,39	25,85	NaN	NaN	NaN
48	20,75	22,28	21,52	NaN	NaN	NaN	33,68	34,20	34,98	NaN	NaN	NaN
49	16,60	18,03	17,32	3,92	5,84	4,88	28,31	30,90	29,61	3,98	5,47	4,73
50	25,60	18,47	22,04	6,17	3,75	4,96	27,54	29,46	28,50	6,77	6,49	6,63

Gerçek zamanlı PZR çalışmasından elde edilen erime eğrilerinde Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de verildiği gibi birden fazla pik değeri görüntülendi. Erime eğrisi analizi sonrası ürünlerin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi ile elde edilen bant profillerinde özgül olmayan bağlanma ve primer-dimer oluşumu gözlemlendi.



Şekil 4.12. *OXA-23* ve *OXA-24* genine ait erime eğrisi analizi (RFU: Rölatif Floresan Birimi)



Şekil 4.13. *OXA-51* ve *OXA-58* genine ait erime eğrisi analizi (RFU: Rölatif Floresan Birimi)

5. TARTIŞMA

Acinetobacter baumannii, ilk kez 1911 yılında Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck tarafından izole edilmiştir. Önceleri *Micrococcus calcoaceticus* olarak tanımlansa da 43 yıl sonra Yunanca'da "akinetos", hareketsiz anlamına gelen *Acinetobacter*, *Achromobacter* cinsindeki hareketli organizmalardan ayırt edilerek Brisou ve Prevot tarafından tanımlanmıştır (Brisou ve Prevot, 1954).

Acinetobacter baumannii, zorunlu aerobik, pleomorfik, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketsiz, non-fermentatif Gram negatif basildir. Saprofit olarak her yerde bulunabileceği gibi doğada ve hastane ortamında da bulunur. Mekanik solunum cihazları gibi kuru olmayan yüzeylerde ve deri gibi kuru yüzeylerde de yaşayabilir (Gordon ve Wareham, 2010).

Dünya genelinde hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biri *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarıdır. Çok düşük nem oranlarında dahi yaşayabilmesi ve yüzey temizleyicilere gösterdiği direnç gibi sebeplerle hastane içi birçok alanda uzun süre canlılığını koruyabilirler (Forbes, Sahm ve Weissfeld, 2013).

Bir fırsatçı patojen olan *Acinetobacter baumannii*, özellikle bağışıklık sistemi zayıf hastalarda oldukça yüksek morbidite ve mortaliteye neden olur. *Acinetobacter baumannii*, solunum yolu, üriner sistem ve yaralarda enfeksiyonlara yol açar ve sepsise de neden olur. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, cerrahi operasyon geçirmiş veya mekanik solunum altındaki hastalar, *Acinetobacter* enfeksiyonları için yüksek risk altındadır. Karbapenemleri de içerecek şekilde çoklu antibiyotik direnci göstermesi nedeniyle önemli bir sorun haline gelmiştir (Murray ve diğerleri, 2016).

Acinetobacter baumannii suşlarının klinik örneklerde dağılım oranları ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle ilk sırayı solunum kültürü örnekleri almakta olup, kan, yara ve idrar örnekleri bu suşların en sık izole edildikleri diğer örneklerdir (Erol, Yazgı, Aktafi ve Özkurt, 2002; Gül ve diğerleri, 2008; Gülhan, Nergiz, Meşe, Özekinci ve Atmaca, 2009; Iraz, Ceylan ve Akkoyunlu, 2012; Özçelik ve İdil, 2018). Villers ve diğerleri (2009), *Acinetobacter* suşlarının sıklıkla solunum sistemi, üriner sistem, yara ve kan dolaşım yolu

enfeksiyonuna neden olduklarını ortaya koymuştur. Yaptıkları çalışmada Çetin, Kaya, Tetik ve Arıdoğan (2006), 129 *Acinetobacter baumannii* suşunu çoğunlukla yoğun bakımlardan gönderilmiş olan kan kültürlerinden ve solunum örneklerinden izole etmiştir. Ayrıca Balcı, Bitirgen, Kandemir, Arıbaş ve Erayman (2010), yaptıkları çalışmada, *Acinetobacter* suşlarını en sık solunum sistemi ve yara materyalinden elde etmişlerdir.

Erben, Kiremitçi ve Özgüneş (2006), en sık suş izole edilen servisin %38 ile Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi olduğunu bildirmişlerdir. Özdemir, Erayman, Gündem, Baykan ve Baysal (2009), 217 *Acinetobacter* suşunu en fazla yoğun bakım ünitesinden izole etmişlerdir. Balcı ve diğerleri (2010), *Acinetobacter* suşlarının en sık izole edildiği servisin %63 ile yoğun bakım ünitesi olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmanın yapıldığı, T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2010 – 2017 yılları arası gönderilen ve *Acinetobacter baumannii* üremesi olan numunelerin, %82'sinin yoğun bakım ünitelerinden geldiği, %60'ının da solunum yolu numuneleri olduğu belirlenmiştir (Özçelik ve İdil, 2018).

Elde edilen veriler ışığında; T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Haziran 2017 – Ocak 2018 tarihleri arasında yoğun bakım servislerinden gelen, aspirasyon ile steril şartlarda alınan solunum yolu numunelerinden üretilen bakteriler VITEK-2 cihazına uygun kartlar kullanılarak yüklendi, *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanan izolatlar çalışmaya dahil edildi.

Çoklu antibiyotik direnci, mikroorganizmaların en az üç farklı antibiyotik grubuna dirençli olmaları ile tanımlanmaktadır (Magiorakos ve diğerleri, 2012). *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli problem ise çoklu antibiyotik direncine sahip bakteri izolatlarının artması, bunun yanısıra tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerinin de giderek azalmasıdır (Bergogne-Berezin ve Towner, 1996; Kwon ve diğerleri, 2007).

Çalışmada kullanılan tüm *Acinetobacter baumannii* örneklerinin çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu gözlemlendi. Bu çoklu dirence sahip *Acinetobacter baumannii*

suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar sağlık kuruluşlarının ciddi bir sorunu haline gelmiştir. Yoğun ve uygunsuz antibiyotik kullanımının da bu sorunun hızlı büyümesinin başlıca nedeni olduğu düşünülmektedir.

Karbapenemler, *Acinetobacter baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlarda tercih edilebilen ilaçlardan olmasına karşın son yıllarda dünyada karbapenem dirençli izolatların sayısında artış gözlenmektedir. Özdemir ve diğerleri (2009)'nin ülkemizde yaptığı çalışmada; *Acinetobacter baumannii* izolatının imipenem direncini %70 olarak bildirmişlerdir. Aral, Doğan ve Paköz (2010)'ün çalışmalarında ise imipenem %72 dirençli bulunmuştur. Iraz ve diğerleri (2012)'nin çalışmalarında; imipenem için direnç oranı ise %92'dir. Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan bir çalışmada ise imipeneme %79 oranında direnç saptamışlardır (Sezgin, 2012). Bu çalışmaya dahil edilen tüm numuneler imipeneme dirençlidir.

Acinetobacter baumannii için 2005 yılında Gazi ve diğerleri (2005) meropeneme %36,3 oranında direnç tespit etmişlerdir. 2009 yılında Bacakoğlu ve diğerleri (2009)'nin çalışmasında meropenem direnci %55 olarak saptamıştır. Yakın zamanda ülkemizde karbapenem direncinin %100 olduğu çalışmalar mevcuttur (Kızıllarslanoğlu, Ergönül, Çetinkaya-Şardan ve Akova, 2018). Bu çalışmada ise imipenemde olduğu gibi tüm izolatlar meropeneme de dirençlidir.

2006 yılında, Özer, Tatman-Otkun, Memiş ve Otkun (2006) sefalosporin grubuna %94 direnç tespit etmişlerdir. 2006 yılında da Bayram ve Balcı (2006) %100 seftazidim direncini bildirmiştir. Mansur, Kuzucu, Ersoy ve Yetkin (2009) seftazidim ve sefepim için %94 direnç saptamışlardır. 2012 yılında ise Iraz ve diğerleri (2012) seftazidim için %94 sefepim için %93 direnç bildirmişlerdir. Çalışmada sefalosporin grubu 3. kuşağı temsilen seftazidim, 4. kuşağı temsilen sefepim kullanıldı ve karbapenem grubunda olduğu gibi sefalosporin grubunda da daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak yüksek oranda direnç tespit edildi.

Özdemir ve diğerleri (2009) siprofloksasin için %86, Aral ve diğerleri (2010) levofloksasin için %91 direnç bildirmişlerdir. 2012 yılında Iraz ve diğerleri (2012) ise %92 siprofloksasin direnci bildirmişlerdir. Samsun'da yapılan çalışmada siprofloksasin ve levofloksasin dirençleri benzer oranlarda (%83) tespit edilmiştir (Sezgin, 2012). Yapılan

çalışmada, levofloksasine, diğer çalışmalara benzer olarak %94 direnç tespit edilirken, siprofloksasine önceki çalışmalardan farklı olarak %100 direnç bulundu. Bu dirence, hastanede yoğun siprofloksasin kullanımının sebep olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada aminoglikozid grubu antibiyotiklerini temsilen gentamisin ve amikasin direnci incelendi. Özer ve diğerleri (2006) yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Acinetobacter spp.* suşlarında hem amikasin hem de gentamisin direncini %94 olarak saptamışlardır. Kuşcu ve diğerleri (2009) ise, *Acinetobacter spp.* suşlarında direnç oranını amikasin için %87, gentamisin için %97 olarak bulmuşlardır. Özünel, Boyacıoğlu, Güreser ve Taylan-Özkan (2014) Çorum'da yaptığı araştırmada ise gentamisin ve amikasin için %77 ve %71 oranında direnç gözlemiştir. Yapılan bu çalışmada ise literatüre benzer olarak gentamisin için %78, amikasin için %68 direnç tespit edildi.

Tetrasiklin için yapılan çalışmalarda 2009 yılında Mansur ve diğerleri (2009) %86 direnç tespit ederken, Atasoy, Karakeçe, Terzi ve Çiftci (2014) %65 direnç belirlemiştir. Gür Vural ve Durupınar (2016)'ın çalışmalarında ise %72 direnç gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada da %88 gibi yüksek oranda tetrasikline direnç bulundu.

Tigesiklin, Türkiye'de 2008 yılında klinik kullanıma giren, tetrasikline yapısal benzerlik gösteren glisilsiklin grubu geniş spektrumlu bir antibiyotik olup, karbapenemlere dirençli *Acinetobacter* suşlarında tercih edilebilecek bir antibiyotiktir (Ünlü, Vardar-Ünlü, Yağmuroğlu ve Yıldırım, 2009).

Zer, Akın ve Namıduru (2007) yayınladıkları çalışmalarında yoğun bakım ünitelerinden izole edilen çoklu antibiyotik dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında tigesiklin direncini %19 olarak bildirirken, Kuşcu ve diğerleri (2009) 2007 - 2009 yılları arasında yine yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Acinetobacter* suşlarında tigesiklin direncini %5, Kurtoğlu ve diğerleri (2011) ise 2009 - 2010 yıllarında yatan hastalarda %12 ve %21 olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada tespit edilen %6 oranında tigesiklin direnci diğer çalışmalar ile uyumludur.

Çoklu antibiyotik dirençli *Acinetobacter* suşlarının artmasıyla yeniden gündeme gelen kolistin, *Acinetobacter baumannii* enfeksiyon etmeni olan hastalıkların tedavisinde önemli bir yere sahiptir. 2009 yılında *Acinetobacter* suşlarındaki direnç durumunu araştıran

Özdemir ve diğerleri (2009), 2013 yılında Gözütok ve diğerleri (2013), 2014 yılında ise Altunok ve Koç (2014) kolistin direnci bildirmemişlerdir. Her ne kadar bu çalışmada da kolistin direnci gözlenmemiş olsa da, 2009 yılında Mansur ve diğerleri (2009) %9, 2010 yılında da Kurtoğlu ve diğerleri (2011)'nin %5'lik kolistin direnci bulmaları dikkat çekicidir.

Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde; çalışmaya dahil edilen 50 izolatın tamamında imipenem, meropenem, sefebim, seftazidim ve siprofloksasin etken maddeleri %100 dirençli bulundu ve tüm izolatlarda çoklu antibiyotik direnci belirlendi.

Acinetobacter baumannii'de karbapenemlere direnç bir kaç farklı yol ile olabilir. Bunlardan bazıları, karbapenemaz üretimi, dış membran porinlerinin kaybı, atım pompaları ile ilgili genlerin anlatımlarının fazla olması, PBP modifikasyonu olarak sıralanabilir. Ancak doğal veya kazanılmış yolla karbapenemaz üretimi sunucunda gelişen direnç, *Acinetobacter baumannii*'de en önemli direnç mekanizmasıdır. *Acinetobacter baumannii* düşük düzeyde doğal olarak kromozomal kodlanmış *OXA-51* karbapenemaz üretir (Turton ve diğerleri, 2006; Figueiredo, Poirel, Papa, Koulourida ve Nordmann, 2009; Zarrilli, Giannouli, Tomasone, Triassi ve Tsakris, 2009; Huang, Cash, Chahine, Nikolich ve Craft, 2012).

Acinetobacter baumannii'de karbapenemaz aktivitesi olan en yaygın β -laktamaz grubu, sıklıkla bu türler için özel olan karbapenem hidroliz eden sınıf D β -laktamazlardır. Bu grupta *OXA-23*, *OXA-24* ve *OXA-58* ile temsil edilen, kromozomal ya da plazmid aktarımlı üç ana kazanılmış karbapenem hidrolize eden sınıf D oksasilinaz gen kümesi tanımlanmıştır. Ayrıca *OXA-51* tip doğal oksasilinazın fazla üretimi de kazanılmış karbapenem direncine sebep olmaktadır (Poirel ve Nordmann, 2006a).

Acinetobacter baumannii'de doğal oksasilinazlar olan *OXA-51* benzeri β -laktamazları kodlayan genler tüm *Acinetobacter baumannii* izolatlarında bulunmaktadır. Bu enzimlerin karbapenemleri hidroliz etmek için fazlaca üretilmesi karbapenemlere direnci artırmakla sonuçlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda *OXA-51* geninin tüm *Acinetobacter baumannii* izolatlarında bulunabileceği, sadece aşırı gen anlatımının karbapenem direncinden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Huang, Cash, Chahine, Nikolich ve Craft, 2012). Çalışmadaki örneklerin tamamında *OXA-51* gen bölgesi tespit edildi. Ülkemizde yapılan çalışmalarda

da *Acinetobacter baumannii* izolatlarında *OXA-51* gen bölgesi saptanmıştır (Güçlü Üsküdar, 2011; Uluçam, Bayramoğlu, Tosun, Kaklıkkaya ve Aydın, 2012; Çiftci ve diğerleri, 2013; Keyik, Arslan, Türk, Seyhan ve Fındık, 2014).

Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda *OXA-23* geni de değişen oranlarda saptanmıştır. Bir çoğunun ortak özelliği *OXA-23* genini baskın olarak saptanmış olmasıdır. Bu çalışmalarda farklı merkezlerin farklı oranlar bildirdiği ve özellikle son yıllarda *OXA-23* gen bölgesinin görülme sıklığının arttığı belirtilmektedir (Gür, Korten, Ünal, Deshpande ve Castanheira, 2008; Ergin, Haşçelik ve Eser, 2013; Çiftci ve diğerleri, 2013). Yapılan çalışmada tüm örneklerde *OXA-23* geni tespit edilerek bu veriler ile uyumlu bulundu.

Tayvan (Yang ve diğerleri, 2010), Çin (Wang ve diğerleri, 2007), Kore (Park, Son, Bae ve Jeong, 2005) dışında pek çok ülkede bildiri yapılan karbapenem direncinden sorumlu *OXA-58* geni ülkemizde yapılan çalışmalarda yaklaşık %13 oranında tespit edilirken, bölgesel farklılıklar göze çarpmakla birlikte, yıllar içinde *OXA-58* geninin saptanmasında azalma söz konusu olmuştur. Özellikle 2011 yılı izolatları arasında *OXA-58* gen pozitifliğinin %6.1'e gerilemiştir (Çiftci ve diğerleri, 2013). Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada 2009 - 2011 yılları arasında *OXA-23* gen yoğunluğu *OXA-58*'den yüksek bulunmuştur (Sarı ve Gülay, 2012). 2012'de sunulan çalışmalarda 2004 - 2009 yılları arasında *OXA-58* gen bölgesinde artma olmuştur. Ama 2008- 2010 arasında *OXA-58* gen bölgesinde azalma gözlenmiştir (Ergin ve diğerleri, 2012). Bu çalışmada olduğu gibi bölgemize yakın olan ve yine Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2013 yılında yapılan çalışmada da *OXA-58* gen bölgesine rastlanmamıştır (Gür Vural ve Durupınar, 2016).

Ülkemizde *OXA-24* gen bölgesinin çalışıldığı, 2006 yılında Vahaboğlu ve diğerleri (2006)'nin, 2013 yılında Çiftci ve diğerleri (2013)'nin, 2014 yılında Keyik ve diğerleri (2014)'nin ve son olarak Gür Vural ve Durupınar (2016)'ın çalışmalarında *OXA-24* gen bölgesi tespit edilememiştir. Hacettepe Üniversitesi iç hastalıkları yoğun bakım servisinde yapılan PZR çalışmasında da *OXA-24* geni bulunamamıştır (Kızılarıslanoğlu ve diğerleri, 2018). Aynı sonuç bu çalışmada da gözlenmiş ve örneklerde *OXA-24* gen bölgesi tespit edilmemiştir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda artan yoğun antibiyotik kullanımı ile tedavide karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi de bakterilerin antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu dirençtir. *Acinetobacter baumannii*'nin hastane ortamında hemen her yüzeyde canlılığını koruması ve hızla artan direnç profili tedavi seçeneklerini giderek kısıtlamaktadır.

Bu amaçla Haziran 2017 – Ocak 2018 tarihleri arasında T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen numunelerden uygun 50 örnek çalışmaya dahil edildi.

Bu çalışma bölgemizde RT-PZR ve gerçek zamanlı PZR yöntemi ile *Acinetobacter baumannii*'de OXA genlerinin araştırıldığı ilk çalışmalardandır.

- Yapılan çalışmada, *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarının en çok yoğun bakım servislerinden gelen solunum numunelerinde bulunduğu tespit edildi.
- Çalışmaya dahil edilen imipenem, meropenem, sefepim, seftazidim ve siprofloksasin antibiyotiklerine %100 dirençli bulundu.
- Levofloksasine %94, amikasine %68, gentamisine %78, tetrasikline %88 ve tigesikline %6 direnç tespit edildi.
- Tüm örneklerde kolistin duyarlılığı gözlemlendi.
- Çalışmadaki tüm *Acinetobacter baumannii* örneklerinin çoklu antibiyotik direnci gösterdiği belirlendi.
- Literatür çalışmaları ile uyumlu olarak OXA-23 ve OXA-51 genleri tüm örneklerde belirlenirken, OXA-24 ve OXA-58 genlerine rastlanmadı.

6.2. Öneriler

6.2.1. Araştırma sonuçlarına dayalı öneriler

Çoklu dirence sahip *Acinetobacter baumannii* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar sağlık kuruluşlarının ciddi bir sorunu haline gelmiştir. Yoğun ve uygunsuz antibiyotik kullanımı yerine akılcı antibiyotik kullanımı desteklenmelidir.

Yapılan çalışmanın, yoğun antibiyotik kullanımının bakterilerde direnç gelişimine neden olduğunu göstermesi yönüyle, tedavi seçeneklerine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Hastane içi enfeksiyon geçiş yolları tespit edilmeli ve ilgili personellerin eğitimlerine hassasiyet gösterilmelidir.

6.2.2. İleride yapılabilecek araştırmalara yönelik öneriler

Çalışmada kullanılan klinik izolatların klonal yakınlıklarının incelenip, benzerliklerine göre geçiş yolları PFGE (Pulsed-Field jel elektroforez) gibi moleküler tiplendirme yöntemleri ile araştırılabilir.

Kolistinin uygulanan tedavilerde az seçenekten biri olması direnç gelişimine neden olabileceğinden, ciddi enfeksiyonlara sebep olan bu izolatların oluşumunun genetik temelleri belirlenebilir.

T.C. Sağlık Bakanlığı Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan elde edilen izolatlar ile dirençlilik/duyarlılık frekansının belirlenmesi, kullanılan ampirik tedavilere yön vermesi ve özellikle ülke ekonomisine katkı sağlaması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Akalın, H. (2007). Çoklu ilaç direncinde tedavi yaklaşımı ve ilaç politikaları. *Ankem Dergisi*, (21), 186-191.
- Akhan, S. ve Hayran, M. (1997). Hastane İnfeksiyonlarına Epidemiyolojik Bakış. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, (1), 13-37.
- Alp, E. ve Damani, N. (2015). Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *Journal of infection in developing countries*, (9), 1040-1045.
- Altunok, E. S. ve Koç, M. M. (2014). Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen *Acinetobacter* Suşlarının Yıllara Göre Antibiyotik Direnç Oranlarının Karşılaştırılması. *Ankem Dergisi*, 28(1), 1-7.
- Aral, M., Doğan, S., ve Paköz, N. İ. E. (2010). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. *Ankem Dergisi* 24(4), 215-9.
- Arda, B. ve Ulusoy, S. (2008). Kinolonlar. Ed: Leblebicioğlu, H., Usluer, G. ve Ulusoy, S. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;497-512.
- Aşık, G. (2011). Current approaches to explain the virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45(2), 371-380.
- Atasoy, A. R., Karakeçe, E., Terzi, H. A. ve Çiftci, İ. H. (2014). Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antimikrobiyal direnç. *Cerrahi Sanatlar Dergisi*, 7(1), 8-10.
- Aydın, R. (2013). Hastane Enfeksiyonlarının Oluşumu, Önlenmesi ve El Hijyeni, Yüksek Lisans Tezi, Beykent Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul
- Bacakoğlu, F., Korkmaz, P. E., Taşbakan, M. S., Başarık, B., Pullukçu, H., Aydemir, S., Gürgün, A. and Başoğlu, O. K. (2009). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in respiratory intensive care unit. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 43(4), 575-585.
- Balcı, M., Bitirgen, M., Kandemir, B., Türk Arıbaş, E. ve Erayman, İ. (2010). Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılığı. *Ankem Dergisi*, 24(1), 28-33.
- Bayraktar, Y. Ş., Duman, İ. ve Duman, A. (2018). Geriatrik ve non-geriatrik yoğun bakım hastalarında kolistin ilişkili nefrotoksisite: Retrospektif kohort çalışması. *Genel Tıp Dergisi*, 28(4). 141-145.
- Bayram, A. and Balcı, I. (2006). Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. *BMC infectious diseases*, 6(1), 155-161.

- Bergogne-Berezin, E. and Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews*, 9(2), 148-165.
- Beriş, F. Ş., Budak, E. E., Gülek, D., Uzun, A., Çizmecici, Z., Mengeloğlu, F. Z. ve Dal, T. (2016). Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Toplanan Klinik *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Beta-Laktamaz Gen Sıklığı Ve Dağılımının Araştırılması: Çok Merkezli Bir Çalışma. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 50(4), 511-521.
- Bogaerts, P., Naas, T., Wybo, I., Bauraing, C., Soetens, O., Piérard, D. and Glupczynski, Y. (2006). Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *Journal of clinical microbiology*, 44(11), 4189-4192.
- Brigante, G., Migliavacca, R., Bramati, S., Motta, E., Nucleo, E., Manenti, M. and Viganò, F. E. (2012). Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase *armA*. *Journal of medical microbiology*, 61(5), 653-661.
- Brisou, J. and Prevot, A. R. (1954). Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. In *Annales de l'Institut Pasteur* (Vol. 86, No. 6, pp. 722-728).
- Cantarelli, V., Cavalcante, B., Pilger, D. A., Souza, F., Dias, C. G., Brodt, T. and d'Azevedo, P. A. (2011). Rapid detection of Van genes in rectal swabs by real time PCR in Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(5), 631-632.
- Chambers HF. (2000). Other beta-lactam antibiotics. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone
- Chuang, Y. C., Sheng, W. H., Li, S. Y., Lin, Y. C., Wang, J. T., Chen, Y. C. and Chang, S. C. (2011). Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 52(3), 352-360.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. (M100S, 26th ed)
- Coyne, S., Courvalin, P. and Périchon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(3), 947-953.
- Çakır N. (2004). Gram negatif etkili antibakteriyel ajanlar ve klinik kullanımları (sefalosporinler). Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Usluer G, eds. *Önemli ve sorunlu Gram negatif bakteri infeksiyonları*. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi
- Çalık N. ve Murat Akova M. (2007). Tigesiklin. *Ankem Dergisi*, 21(2), 29-33.

- Çetin, E. S., Kaya, S., Tetik, T. ve Arıdoğan, B. C. (2006). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Örneklerle Göre Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*, 20(4), 202-205.
- Çiftci, I. H., Aşık, G., Karakece, E., Oksüz, L., Yağcı, S., Sesli, E. Ç. ve Kurtoğlu, M. G. (2013). Distribution of *blaOXA* genes in *Acinetobacter baumannii* strains: a multicenter study. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47(4), 592-602.
- Doğanay, M. (2004). Hastane Enfeksiyonları El Kitabı, Ankara, s:13-14
- Doi, Y., Adams, J. M., Yamane, K. and Paterson, D. L. (2007). Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(11), 4209-4210.
- Dökmeci, İ. (1992). Kemoterapötik ilaçlar. *Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri
- Erben, N., Kiremitçi, A. ve Özgüneş, İ. (2006). Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz ve indüklebilir beta-laktamaz sıklığının ve antimikrobiyal duyarlılığın değerlendirilmesi. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 28(3), 135-46.
- Ergin, A., Hascelik, G. ve Eser, O. K. (2013). Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 45(1), 26-31.
- Erol, S., Yazgı, H., Aktafı, O. ve Özkurt, Z. (2002). Nozokomiyal *Acinetobacter* İzolatlarında Antibiyotik Direnci
- Figueiredo, S., Poirel, L., Papa, A., Koulourida, V. and Nordmann, P. (2009). Overexpression of the naturally occurring *blaOXA-51* gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 4045-4047.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A.S. (2013). *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* and other organisms. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Mosby Elsevier, 334-39.
- Fournier, P. E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L. and Nordmann, P. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS genetics*, 2(1), e7
- Galani, I., Kontopidou, F., Souli, M., Rekatsina, P. D., Koratzanis, E., Deliolanis J. and Giamarellou, H. (2008). Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *International journal of antimicrobial agents*. 31(5), 434-439.

- Gales, A. C., Jones, R. N. and Sader, H. S. (2006). Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). *Clinical microbiology and infection*, 12(4), 315-321.
- Garnacho-Montero, J., Ortiz-Leyba, C., Fernández-Hinojosa, E., Aldabó-Pallás, T., Cayuela, A., Marquez-Vácaro, J. A. and Jiménez-Jiménez, F. J. (2005). *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive care medicine*, 31(5), 649-655.
- Gazi, H., Sürücüoğlu, S., Kurutepe, S., İnmez, E., Dinç, G. ve Özbakkaloğlu, B. (2005). Yoğun Bakım Ünitesi Ve Diğer Ünitelerde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında İn-Vitro Antibiyotik Direnci. *Ankem Dergisi*, 19(3), 115-118.
- Gilbert, P., Das, J. and Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in dental research*, 11(1), 160-167.
- Goić-Barisić, I. and Tonkić, M. (2009). The review of carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Acta medica Croatica: casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, 63(4), 285-296.
- Gordon, N. C. and Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 35(3), 219-226.
- Gözütok, F., Sarıgüzel, F. M., Çelik, İ., Berk, E., Aydın, B. ve Güzel, D. (2013). Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antimikrobiyal Direnç Oranlarının Araştırılması. *Ankem Dergisi*, 27(1), 7-12.
- Güçlü Üsküdar, A. (2011). Molecular Analysis of Beta-Lactamases in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates From Intensive Care Units; Doktora Tezi; Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara
- Gül Yurtsever, S., Altın, N. N., El, S., Çetin, F. L., Pişmişoğlu, E. ve Uzun, S. (2008). Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olarak Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*, 22(3), 148-52.
- Gülhan, B., Nergiz, Ş., Meşe, S., Özekinci, T. ve Atmaca, S. (2009). *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Tigesiklin İçin Disk Difüzyon Yöntemiyle Elde Edilen Zon Çaplarının İki Farklı Kriterlere Göre Değerlendirilmesi. *Ankem Dergisi*, 23(2), 78-81.
- Günaydın, M., Esen, Ş., Saniç, A. ve Leblebicioğlu, H. (2002). Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları, Simad Yayınları, Samsun, 193-198.
- Gür D. (2008). Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. İn. Leblebicioğlu H., Usluer G., Ulusoy S. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi

- Gür Vural, D. ve Durupınar, B., (2016). Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 46(4):181-187.
- Gür, D., Korten, V., Ünal, S., Deshpande, L. M. and Castanheira, M. (2008). Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. *Journal of medical microbiology*, 57(12), 1529-1532.
- Hancı, H. (2010). Hasta Ziyaretleri için Hastaneye Gelen Kişilerin Ziyaret Öncesi ve Sonrası El Floralarının Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Holt, J. G. K., Sneath, N. R., Staley, P. H., Williams, J. T. and Stanley, T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., and Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 243-250.
- Huang, X. Z., Cash, D. M., Chahine, M. A., Nikolich, M. P., and Craft, D. W. (2012). Development and validation of a multiplex TaqMan real-time PCR for rapid detection of genes encoding four types of class D carbapenemase in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of medical microbiology*, 61(11), 1532-1537.
- Huys, G., Cnockaert, M., Vaneechoutte, M., Woodford, N., Nemec, A., Dijkshoorn, L. and Swings, J. (2005). Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Research in microbiology*, 156(3), 348-355.
- Iraz, M., Ceylan, A. ve Akkoyunlu, Y. (2012). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter* Türlerinde Antibiyotik Direnç Oranlarının İncelenmesi. *Ankem Dergisi*, 26(2), 80-85.
- Jones, R. N., Ferraro, M. J., Reller, L. B., Schreckenberger, P. C., Swenson J. M. and Sader, H. S. (2007). Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter spp.* *Journal of clinical microbiology*. 45(1):227-230.
- Keyik, S., Arslan, U., Türk, H. D., Seyhan, T. ve Fındık, D. (2014). Investigation of OXA type beta-lactamases and PFGE patterns in *Acinetobacter baumannii* strains resistant to carbapenems. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 48(4), 556-565.
- Kızıllıslanoğlu, M.C., Ergönül, Ö., Çetinkaya-Şardan, Y. ve Akova, M. (2018). Yoğun Bakım Ünitesinde *Acinetobacter baumannii* Kolonizasyonu ve İnfeksiyonu: Risk Faktörleri, Bulaşma Yolları ve Bulaşma Dinamikleri. *Klinik Dergisi*, 31(1), 20-9.
- Kurtoğlu, M. G., Opuş, A., Kaya, M., Keşli, R., Güzelant, A. ve Yüksekaya, Ş. (2011). Bir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Antibakteriyel Direnç (2008-2010). *Ankem Dergisi*, 25(1), 35-41.

- Kuşcu, F., Öztürk, D. B., Tütüncü, E. E., Uslu, M., Gürbüz, Y., Gülen, G. ve Şencan, İ. (2009). Çoğul Antibiyotik Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Tigesiklin Duyarlılık Oranlarının E-Test Yöntemiyle Araştırılması. *Klinik Dergisi*, 22(2), 48-51.
- Kwon, K. T., Oh, W. S., Song, J. H., Chang, H. H., Jung, S. I., Kim, S. W. and Shin, S. Y. (2007). Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(3), 525-530.
- Li, J., Nation, R. L., Milne, R. W., Turnidge, J. D. and Coulthard, K. (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents*, 25(1), 11-25.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method; *Methods*, 25(4): 402-408.
- Lolans, K., Rice, T. W., Munoz-Price, L. S. and Quinn, J. P. (2006). Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(9), 2941-2945.
- Luna, C. M. and Aruj, P. K. (2007). Nosocomial acinetobacter pneumonia. *Respirology*, 12(6), 787-791.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. and Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Mandell, G., Douglass, R. G. and Bennett, J. E. (2000). Principles and Practice of Infectious Diseases. New York. *Churchill Livingstone*, 404-423.
- Mansur, A., Kuzucu, Ç., Ersoy, Y. ve Yetkin, F. (2009). İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde 2008 Yılında Yatan Hastalardan İzole Edilen *Acinetobacter* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*, 23(4), 177-181.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A. (2016). Tıbbi Mikrobiyoloji, Çeviri: Us, D. A., Başustaoğlu, A. Pelikan Yayınevi
- Mussi, M. A., Limansky, A. S. and Viale, A. M. (2005). 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 β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(4), 1432-1440.
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A. and Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257-266.

- Niumsup, P. R., Boonkerd, N., Tansawai, U. ve Tiloklurs, M. (2009). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. *Jpn J Infect Dis*, 62(2), 152-156
- Okutucu, B. ve Pehlivan, S. (2003). Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(2)
- Özçelik, H. B. ve İdil, Ö. (2018). Development of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 2 (1), 23-27.
- Özdemir, M., Erayman, İ., Gündem, N. S., Baykan, M. ve Baysal, B. (2009). Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Acinetobacter* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. *Ankem Dergisi*, 23(3), 127-132.
- Özer, B., Tatman-Otkun, M., Memiş, D. ve Otkun, M. (2006). Yoğun Bakım Ünitesinde Hastane İnfeksiyonu Etkenleri, Antibiyotik Duyarlılıkları Ve Antibiyotik Kullanımı. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal Of Infection)*, 20(3), 165-170.
- Özünel, L., Boyacıoğlu, Z. İ., Güreşer, A. S. ve Taylan-Özkan, A. (2014). Çorum Eğitim Ve Araştırma Hastanesinde Derin Trekeal Aspirat Örneklerinden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Paternlerinin Değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 71(2), 81-88.
- Park, K. O., Son, H. C., Bae, I. K. and Jeong, S. H. (2005). Molecular epidemiology of infection caused by OXA-23 or IMP-1 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Korean Journal of Clinical Microbiology*, 8(2), 121-129.
- Paton, R., Miles, R. S., Hood, J. and Amyes, S. G. B. (1993). ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*, 2(2), 81-87.
- Pearson, A. (2009). Historical and epidemiology of healthcare associated infection. *Journal of Hospital Infection*, 73 (4): 296-304.
- Peleg, A. Y., Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *New England Journal of Medicine*, 362 (19), 1804-1813.
- Peleg, A. Y., Seifert, H. and Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 538-582.
- Poirel, L. and Nordmann, P. (2006a). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 826-836.
- Poirel, L., Lebessi, E., Heritier, C., Patsoura, A., Foustoukou, M. and Nordmann, P. (2006b). Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clinical microbiology and infection*, 12(11), 1138-1141.

- Renwick, L., Holmes, A. and Templeton, K. (2013). Multiplex real-time PCR assay for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine leukocidin from clinical samples. *Methods Mol Biol*; 943(2), 105-13.
- Rice, L. B., Sahm, D. and Bonomo, R. A. (2011). Mechanisms of resistance to antibacterial agents in Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW.(eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 1082-1114.
- Saltoğlu, N. (2007). *Acinetobacter baumannii* infeksiyonları ve tedavisi. *Klinik Dergisi*, 20(Suppl 1), 204-211.
- Sarı, A. ve Gülay, Z. (2012). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Kan Kültürlerinde Üremiş *Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA-58 Tipi Karbapenemaz Üretiminin Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Yöntemi ile Araştırılması. XXXV. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi*. Kuşadası
- Sayıştay Raporu (2007). Hastane Enfeksiyonları ile Mücadele. Performans Denetim Raporu, T.C. Sayıştay Başkanlığı, Ankara
- Schreckenberger, P.C., Daneshvar, M.I., Weyant, R.S. and Hollis D.G. (2007). *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, DC: ASM Press,770-802.
- Sezgin Milleti F. (2012). *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Biyofilm Üretimi ve Kolistin Duyarlılıklarının Biyofilm Formasyonunda Araştırılması. Uzmanlık Tezi, 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Samsun
- Sieniawski, K., Kaczka, K., Rucińska, M., Gągis, L., and Pomorski, L. (2013). *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections. *Polish Journal of Surgery*, 85(9), 483-490.
- Şay Coşkun, U. S. (2018). Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Antibiyotik Direncinin Araştırılması. *Ankem Dergisi*, 2018;32(2), 37-44.
- Taşova, Y. (2010). Tetrasiklinden Tigesikline. *Ankem Dergisi*, 24(Ek 2), 36-44.
- Taşova, Y., Akgün, Y., Saltoğlu, N., Yılmaz, G., Kara, O. ve Dündar, İ. H. (1999). Nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonları. *Flora*, 4(3), 170-176.
- Willke Topçu, A., Söyletir, G. ve Doğanay, M. (2002). Aminoglikozitler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 214-23.
- Töreci, K. (1997). Hastane infeksiyonlarının tanımlanması, epidemiyolojisi ve ekonomik yönü, *Ankem Dergisi*, 11 (2), 181-184.
- Turgut, H. (2017). Polimiksinler (Kolistin ve Polimiksin B). *Türkiye Klinikleri Journal of Infectious Diseases Special Topics*, 10(1), 106-109.

- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M. and Pitt, T. L. (2006). The role of IS Abal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*, 258(1), 72-77.
- Tünger, A., Çavuşoğlu, C. ve Korkmaz, M. (2005). Antimibiyotikler ve Kemoterapotikler. Asya Mikrobiyoloji (5.basım). İzmir, Asya Tıp Kitabevi
- Uluçam, G., Bayramoğlu, G., Tosun, İ., Kaklıkkaya, N. ve Aydın, F. (2012). Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Karbapenem Dirençli Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması XXXV. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi*. Kuşadası
- Ünlü, M., Vardar-Ünlü, G., Yağmuroğlu, A. ve Yıldırım, D. (2009). Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* Suşlarına Tigesiklin Etkinliği. *Ankem Dergisi*, 23(1), 13-16.
- Vahaboğlu, H., Budak, F., Kasap, M., Gacar, G., Torol, S., Karadenizli, A. and Eroglu, C., (2006). 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*, 58(3), 537-542.
- Van Bambeke, F., Michot, J. M., Van Eldere, J., and Tulkens, P. M. (2005). Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and infection*, 11(4), 256-280.
- Villers, D., Espaze, E., Coste-Burel, M., Giauffret, F., Ninin, E., Nicolas, F. and Richet, H., (1998). Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Annals of internal medicine*, 129(3), 182-189.
- Wang, H., Guo, P., Sun, H., Wang, H., Yang, Q., Chen, M. ve Zhu, Y., (2007). Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* from Chinese hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(11), 4022-4028.
- Winn, J., Stephen, A., William, J., Elmer, K., Gary, P., Schreckenberger, P. and Gail, W. (2006). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. *Lippincott williams and wilkins*
- Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S. and Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *International journal of antimicrobial agents*, 27(4), 351-353.
- Yang, S. C., Chang, W. J., Chang, Y. H., Tsai, Y. S., Yang, T. P., Juan, C. W. and Shiau, M. Y. (2010). Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in central Taiwan. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 29(5), 601-604.
- Zarrilli, R., Giannouli, M., Tomasone, F., Triassi, M. and Tsakris, A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(05), 335-341.

- Zer, Y., Akın, F. E. Ö. ve Namıduru, M., (2007). *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Tigesiklin Etkinliğinin Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal Of Infection)*, 21(4), 193-196.
- Zhou, H., Du, X. X., Yang, Q., Zhou, J. Y., Yu, Y. S. and Li, L. J. (2009). Study on carbapenemase and 16S rRNA methylase of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi*, 30(3), 269-272.





EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 83116987 - 105 17.02.2016
Konu : Etik Kurul Kararı
Toplantı Tarihi : 16.02.2016
Toplantı No : 2016/04
Proje No : 16-KAEK-054

Sayın. Yrd.Doç.Dr. Önder İDİL

Etik Kurulumuzun 16.02.2016 tarihli toplantısında görüşülen 16-KAEK-054 numaralı "**Karbapenem Dirençli Acinetobacter Baumannii Klinik İzolatlarındaki Direnç Genlerinin Karakterizasyonu**" başlıklı çalışmanız gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç. Dr. Resul YILMAZ
Başkan



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı - Soyadı : Hüseyin Burak ÖZÇELİK
 Uyuğu : Türkiye Cumhuriyeti
 Doğum Tarihi ve Yeri : 13.07.1985 - Ankara
 Medeni Hali : Evli
 e-posta : h.burakozcelik@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2008
Yüksek Lisans	Amasya Üniversitesi	2019

İş Deneyimi/Yıl	Çalıştığı Yer	Görevi
2009 – 2010	Ventura Yazılım	Yazılım Destek ve Kurulum
2010 – 2012	Aymed Medikal	Satış Sorumlusu
2012 – 2013	İğdır Halk Sağlığı Laboratuvarı	Biyolog
2013 –	Amasya Üniversitesi SŞEAH	Biyolog

Yabancı Dili

İngilizce

Bilimsel Faaliyetler

Özçelik, H. B. ve İdil, Ö. (2018). Development of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 2 (1), 23-27.

Hüseyin Burak ÖZÇELİK, Önder İDİL. Flash Presentations: Development of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* strains. 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Necmettin Erbakan University Konya, Turkey, 25-27 April 2018

Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarındaki Direnç Genlerinin Karakterizasyonu, Araştırmacı, Amasya Üniversitesi, 2017 (Ulusal)