

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK *ACINETOBACTER BAUMANNII*
İZOLATLARINDA FLOROKİNOLON DİRENÇ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Bio. Gülşah GÜLER

DANIŞMAN: Doç. Dr. Bayrı ERAÇ

İZMİR

2015

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK *ACINETOBACTER BAUMANNII*
İZOLATLARINDA FLOROKİNOLON DİRENÇ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Bio. Gülşah GÜLER

DANIŞMAN: Doç. Dr. Bayrı ERAÇ

İZMİR

2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Gülşah GÜLER

Başkan : Doç. Dr. Bayrı ERAS Bay

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Mine Haseke-Limoncu Bay

Üye : Prof. Dr. Xher Topor

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 02-09-2015

ÖNSÖZ

Bu çalışmamda bana destek olan tez danışmanım Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Bayrı Eraç'a çok teşekkür ederim. Ayrıca değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Şafak Ermertcan'a, Sayın Prof. Dr. Mine Hoşgör Limoncu'ya, Sayın Doç. Dr. Hüseyin Taşlı'ya, Sayın Yrd. Doç. Dr. F. Ferda Yılmaz'a, kökenlerin temin edilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Şöhret Aydemir'e ve arkadaşlarım Arş. Gör. Yamaç Tekintaş'a, Arş. Gör. İsmail Öztürk'e, Arş. Gör. Kerem Yılmaz'a, Gözde Dıngırdan'a ve bu süre içerisinde her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İzmir

2015

Gülşah GÜLER

ÖZET

Klinik *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Florokinolon Direnç Mekanizmalarının Araştırılması

Acinetobacter baumannii fırsatçı bir patojen olup, nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir. Bir çok antibiyotiğe dirençli oluşu, neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Florokinolonlar hastane ve toplum kaynaklı birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanılan antibiyotikler olup, direnç gelişiminde rol oynayan mekanizmaların belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada hastane kaynaklı *A. baumannii* izolatlarının siprofloksasin (CIP) ve levofloksasin (LEV) minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi, klonal ilişkilerinin incelenmesi, florokinolonlara direnç gelişiminden sorumlu olan DNA giraz ve topoizomerez IV enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile efluks pompalarının aşırı ekspresyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda farklı klinik örneklerden izole edilen CIP dirençli 79, aynı antibiyotiğe duyarlı iki izolat olmak üzere toplam 81 *A. baumannii* kökeni çalışmaya alındı. CIP ve LEV MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Kökenlerin klonal yakınlıkları ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) -PZR yöntemi ile araştırıldı. Her farklı klon ve alttipi temsilen seçilen 16 kökende *gyr-A* ve *par-C* genlerindeki mutasyonlar dizi analizi ile belirlendi. Seçilen kökenlerde efluks pompalarının aşırı ekspresyonu, pompa inhibitörleri varlığında gerçekleştirilen sıvı mikrodilüsyon ve florometrik akümülyasyon deneyleri ile araştırıldı.

İncelenen *A. baumannii* kökenlerinde MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin CIP için 256 ve ≥ 256 aynı değerlerin LEV için 32 ve 128 olduğu belirlendi. Genel olarak CIP MİK değerlerinin LEV MİK değerlerine göre yüksek olduğu saptandı. İzolatların 10 farklı klona ayrıldığı, ancak bunların büyük çoğunluğunun klonal olarak ilişkili oldukları gözlemlendi. Seçilen temsilci kökenlerin *gyr-A* geninde en sık rastlanan önemli mutasyonlar Ser83Leu ve Asp87Glu, *par-C* geninde ise Ser80Leu'di. Temsilci kökenlerden yedisinde sadece mikrodilüsyon yöntemiyle, 11 kökende ise sadece florometrik olarak aşırı pompa ekspresyonu gözlenirken, beş kökende her iki yöntemle de olumlu sonuç elde edildi. Mikrodilüsyon yöntemiyle aşırı ekspresyonu

saptamada CIP'in LEV'den daha iyi olduğu görüldü. İncelenen hastane kaynaklı ve klonal olarak ilişkili *A. baumannii* izolatlarında gözlenen yüksek florokinolon MİK değerlerine, hedef bölge mutasyonlarının yanı sıra, efluks pompalarının aşırı ekspresyonunun yol açtığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*; Florokinolon; QRDR; efluks; ERIC-PZR



ABSTRACT

Investigation of Fluoroquinolone Resistance Mechanisms in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen which is one of the most important agents of nosocomial infections. Being resistant to many antibiotics makes difficult to treat the infections it causes. Fluoroquinolones are used in the treatment of nosocomial and community-acquired infections and it is important to determine the mechanisms of resistance to these antibiotics. It is aimed to investigate ciprofloxacin (CIP) and levofloxacin (LEV) minimum inhibitor concentrations (MIC), clonal relationships, mutations that occur in DNA gyrase and topoisomerase IV genes and overexpression of efflux pumps in nosocomial *A. baumannii* isolates.

79 CIP-resistant and two CIP-susceptible *A. baumannii* strains isolated from different clinical samples (one per patient) in Ege University Department of Clinical Microbiology were included into the study. CIP and LEV MIC values were determined by broth microdilution method. Clonal relationship among the strains was investigated by ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) –PCR. Mutations that occur in *gyr-A* and *par-C* genes were detected by DNA sequence analysis in 16 strains representing each clone and subtype. Overexpression of efflux pumps was evaluated by the broth microdilution and fluorometric accumulation experiments carried out in the presence of pump inhibitors, in the representative strains.

MIC₅₀ and MIC₉₀ values for CIP were 256 and ≥ 256 , same values for LEV were 32 and 128 respectively. Overall, CIP MIC values were found to be higher than that of LEV in the investigated *A. baumannii* strains. Isolates were grouped into 10 different clusters, but the vast majority of them were observed to be clonally related. The most common and important mutations detected in the *gyr-A* and *par-C* genes of the representative isolates were, Ser83Leu, Asp87Glu and Ser80Leu, respectively. While the overexpression of efflux pumps was observed in seven of the representative strains by microdilution method and in 11 strains by fluorometric assay, the results were positive in five strains by both methods. CIP was found to be better than LEV in detecting the overexpression of pumps by microdilution method. It was concluded that, high fluoroquinolone MIC values of the investigated

nosocomial and clonally related *A. baumannii* strains were derived from target mutations and overexpression of efflux pumps.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; Fluoroquinolone; QRDR; efflux; ERIC-PCR



İçindekiler

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
BÖLÜM I.....	1
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. GİRİŞ.....	1
1.2. GENEL BİLGİLER.....	3
1.2.1. <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	3
1.2.1.1. TARİHÇE.....	3
1.2.1.2. MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER.....	3
1.2.1.3. EPİDEMİYOLOJİ.....	4
1.2.1.4. PATOGENEZ VE VIRULANS.....	5
1.2.1.5. <i>ACINETOBACTER</i> KAYNAKLI ENFEKSİYONLAR.....	6
1.2.1.5.1. Solunum Yolu Enfeksiyonu.....	7
1.2.1.5.2. Bakteriyemi.....	7
1.2.1.5.3. Menenjit.....	8
1.2.1.5.4. İdrar Yolu Enfeksiyonu.....	8
1.2.1.5.5. Yumuşak Doku Enfeksiyonu.....	8
1.2.1.5.6. Diğer Enfeksiyonlar.....	8
1.2.1.6. <i>ACINETOBACTER</i> TEDAVİSİNDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER.....	9

1.2.1.7. <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİKLERE KARŞI GELİŞEN DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	9
1.2.1.7.1. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	11
1.2.1.7.2. AMİNOGLİKOZİDLERE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	12
1.2.1.7.3. TETRASİKLİNLERE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	13
1.2.1.7.4. TİGESİKLİNE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMASI.....	14
1.2.1.7.5. POLİMİKSİN GRUBU ANTİBİYOTİKLERE GÖRE DİRENÇ MEKANİZMASI.....	14
1.2.1.7.6. FLOROKİNOLONLARA KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	14
1.2.1.8. EFLUKS POMPA SİSTEMLERİ.....	16
1.2.1.9. EFLUKS POMPA İNHİBİTÖRLERİ.....	18
1.2.1.9.1. Carbonyl Cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone.....	18
1.2.1.9.2. 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine.....	18
1.2.1.9.3. Phenyl-arginine beta-naphthylamide (paβn).....	18
1.2.1.9.4. Tiyoridazin.....	19
1.2.1.10.BAKTERİLERDE EPİDEMİYOLOJİK TİPLENDİRME YÖNTEMLER.....	19
1.2.1.10.1. FENOTİPİK YÖNTEMLER.....	19
1.2.1.10.2. GENOTİPİK YÖNTEMLER.....	20
BÖLÜM II.....	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
2.1. GEREÇ.....	23
2.1.1. Bakteri Kökenleri.....	23
2.1.2. Besiyerleri.....	23
2.1.3. Kimyasal Maddeler.....	23
2.1.4. Efluks Pompa İnhibitörleri.....	24
2.1.5. Antibiyotikler.....	24

2.1.5.1. Antibiyotiklerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	24
2.2. YÖNTEM.....	25
2.2.1. Siprofloksasin ve Levofloksasin MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	25
2.2.2. Siprofloksasin Dirençli İzolatların Klonal Yakınlıklarının Belirlenmesi.....	25
2.2.3. DNA Ekstraksiyonu.....	25
2.2.4. ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) PZR.....	26
2.2.5. Efluks Pompasının Aşırı Ekspresyonunun Araştırılması.....	27
2.2.5.1. Mikrodilüsyon Yöntemi.....	27
2.2.5.2. Florometrik Akümülayon Deneyi.....	28
2.2.6. Gyr-A ve Par-C Genlerindeki Mutasyonların PZR ile Araştırılması.....	28
2.2.6.1. Gyr-A Geninin Araştırılması.....	28
2.2.6.2. Par-C Geninin Araştırılması.....	29
2.2.7. DNA Dizi Analizi.....	30
BÖLÜM III.....	31
3. BULGULAR.....	31
3.1. <i>A.baumannii</i> İzolatlarının Siprofloksasin ve Levofloksasin MİK Değerleri.....	31
3.2. <i>A.baumannii</i> İzolatlarının Klonal Yakınlıkları.....	31
3.3. <i>A.baumannii</i> İzolatlarının Efluks Pompa Aktiviteleri.....	34
3.4. Gyr-A ve Par-C Genlerindeki Mutasyonlar.....	35
BÖLÜM IV.....	38
4. TARTIŞMA.....	38
BÖLÜM V.....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
BÖLÜM VI.....	46
6. KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	55

Tablolar/Şekiller Listesi

Şekil 1: RND efluks pompa sistemi.....	17
Şekil 2: Ade gen kümesinin şematik organizasyonu.....	18
Şekil 3: Bazı <i>A. baumannii</i> suşlarının ERIC PZR sonucu oluşan bant paternleri.....	32
Şekil 4: <i>A.baumannii</i> kökenlerine ait dendogram.....	33
Tablo 1: CLSI kriterlerine göre antibiyotiklerin MİK sınır değerleri.....	25
Tablo 2: Gyr-A ve Par-C genlerinin QRDR bölgelerini hedefleyen Primer Dizileri.....	28
Tablo 3: <i>A.baumannii</i> kökenlerinin siprofloksasin MİK değerleri.....	31
Tablo 4: <i>A.baumannii</i> kökenlerinin levofloksasin MİK değerleri.....	31
Tablo 5: Efluks pompa inhibitörlerinin siprofloksasin MİK değerlerine etkisi.....	34
Tablo 6: Efluks pompa inhibitörlerinin levofloksasin MİK değerlerine etkisi.....	34
Tablo 7: NMP'nin absorbans değerlerine etkisi.....	35
Tablo 8: Seçilen <i>A. baumannii</i> kökenlerinin kinolon duyarlılıkları, efluks pompa aktivitesi ve saptanan mutasyonlar.....	37

Kısaltmalar

Ade:	Acinetobacter drug efflux
AP:	Arbitrary Primed
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	Adenozin tri fosfat
Bp:	Baz çifti
BHI:	Brain Heart Infusion
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
CCCP:	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CFU:	Colony forming unit
CİP:	Siprofloksasin
CLSI:	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
ÇİD:	Çoklu ilaç direnci
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dNTP:	Deoksiribonükleozit Trifosfat
EBI:	European Bioinformatics Institute
EMB:	Eosine-Methylen-Blue Agar
ERIC:	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
EtBr:	Ethidium bromide solution
F-primer:	forward primer
GSBL:	Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz
IS:	İnsersiyon sekansı
Leu:	Lösin
LPS:	Lipopolisakkarit
LVX:	Levofloksasin
MDR:	Multi drug resistance

MFP: Membran füzyon proteini
MHA: Mueller-Hinton Agar
MHB: Mueller-Hinton Broth
MIK: Minimum inhibitör konsantrasyonu
mM: mili molar
NB: Nutrient Broth
NCBI: National Center of Biotechnology Information
NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine
OMP: Dış membran proteini
PAβN: Phenyl-arginine beta-naphthylamide
PBP: Protein bağlayıcı protein
PBS: Phosphate Buffered Saline
PDR: Pan drug resistance
PFGE: Pulsed-Field Gel Elektroforez
pmol: piko mol
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA
REP: Repetitive Extragenic Palindromic
RNA: Ribonükleik asit
RND: Resistance nodulation division
R-primer: reverse primer
Ser: serin
TBE: Tris-Borik asit-EDTA
TSI: Üç şekerli demirli besiyeri
U: Unit
QRDR: Kinolon direncini belirleyen bölge

BÖLÜM I

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. GİRİŞ

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin 1970’li yıllardan itibaren yaygın kullanımı sonucunda, dirençli patojenler ile oluşan hastane enfeksiyonları artan oranlarda karşımıza çıkmaktadır. Gram negatif, kokobasil, nonfermentatif yapıdaki “*Acinetobacter*” de nozokomiyal enfeksiyonlarda rol oynayan fırsatçı patojenlerdendir. Bu cins içerisinde birçok tür klinik olarak izole edilmesine karşın, *Acinetobacter baumannii* türü, insan enfeksiyonları ile ilişkisinden dolayı büyük öneme sahiptir (1,2).

A.baumannii özellikle yoğun bakım ünitelerinde ciddi salgınlara yol açmaktadır. Ayrıca endokardit, menenjit, cilt ve yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, ventilatör ile ilişkili pnömoni ve alkol bağımlısı olanlarda toplum kökenli pnömoni gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (1,3).

Enfeksiyonların tedavisi, bakterinin sahip olduğu doğal direnç ve sonradan kazandığı direnç mekanizmalarından dolayı güçtür. *Acinetobacter* türleri amoksisilin, ampisilin ve birinci kuşak sefalosporinler gibi birçok antibiyotiğe doğal dirençlidirler. Beta-laktamaz enzimleri, aminoglikozit değiştirici enzimler, efluks pompası aktivitesi, hedef bölge mutasyonu gibi mekanizmalar ile antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir (4,5).

Kinolonlar, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aminoglikozitlerle karşılaştırıldığında *Acinetobacter*’lere karşı daha etkili olmaktadır; fakat son yıllarda kinolonlara karşı da direnç gelişimi görülmektedir. Bu direncin mekanizmaları arasında; hedef enzimlerde mutasyon, ilacın efluks pompası ile hücre dışına atımı ve Qnr proteinlerinin sentezi sayılabilir. Etkin antibiyotiklere karşı gelişen direnç bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kombine antibiyotik kullanımını da gündeme getirmiştir (6).

Bu çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde izole edilmiş 81 *A.baumannii* izolatının antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi, moleküler düzeyde tiplendirilmesi, florokinolon grubu antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumlu olan

DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile efluks pompalarının aşırı ekspresyonunun araştırılması amaçlanmıştır.



1.2. GENEL BİLGİLER

1.2.1. ACINETOBACTER BAUMANNII

1.2.1.1. TARİHÇE

Acinetobacter cinsi bakteriler, ilk kez 1911 yılında Hollandalı mikrobiyolog Martinus W. Beijerinck (1851–1931) tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiştir (7). 1939 yılında ise DeBord tarafından üretral örnekten izole edildikten sonra günümüzdeki adını almıştır (8). 1974’de Bergey’in Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı (Bergey’s Manual of Systemic Bacteriology)’nda, Acinetobacter yalnızca bir tür (*Acinetobacter calcoaceticus*) ve iki alt tür altında gruplandırılmıştır (9).

Taksonomik çalışmalar sonucu Acinetobacter cinsi günümüzde *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır. Deoksiribonükleik asit (DNA) benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda 26 genomik tür tanımlanmıştır, 9 genomik türe isim verilirken diğer türler isimlendirilememiştir (7). Genomik türlerden *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU birçok yönden benzerlik gösterip, fenotipik yöntemlerle birbirlerinden ayırt edilmesi zor olduğu için *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi olarak tanımlanmıştır (9,10,11).

A.baumannii, *A. calcoaceticus* ve *A. lwoffii*, klinik literatürlerde en sık rapor edilen Acinetobacter türleridir (11,12). Tüm bu türler arasında önemli klinik tablolara yol açan ve en sık izole edilen tür *A. baumannii*’dir (2).

1.2.1.2. MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER

Moraxellaceae ailesinin üyelerinden Acinetobacter cinsi bakteriler; gram negatif, hareketsiz, zorunlu aerob mikroorganizmalardır. Üreme logaritmik fazında 1-1.5 x 1.5-2.5 µm boyutlarında basil, üreme duraksama fazında ise kokobasil şeklinde görülmektedirler. Flajellaları yoktur, fimbriaları vardır (2,13,14).

Acinetobacter türleri rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan Eosin Metilen Blue (EMB) agar ve kanlı agar gibi besiyerlerinde 35-37 °C’de üreyebilir.

Düzgün, bazen mukoid formda, soluk sarı ya da grimsi beyaz koloniler oluştururlar (2,9).

Bu bakterileri hem çevreden hem de klinik kaynaklardan izole etmek için seçici ve ayırt edici çeşitli besiyerleri geliştirilmiştir. Bunlar diğer mikroorganizmaların büyümesini baskılayan Leeds Acinetobacter Medium (antibiyotik kullanılarak modifiye edilmiş), Herellea Agar (safra tuzları, şeker, bromkrezol moru içerir) ve Holton Agar (safra tuzu, ampisilin, vankomisin, sefsulodin içerir) besiyerleridir (9,15).

Acinetobacter'lerin tüm türleri; katalaz pozitif, oksidaz negatif, indol negatif ve nonfermantatiftir. Ayrıca nitratı redükte edemezler ve DNA'larında G+C içeriği % 39-47 oranındadır. Üç şekerli demirli besiyerinde (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar (2,8,9,12,14).

Acinetobacter türleri diğer nonfermentatif bakterilerden (*Neisseria*, *Moraxella*) oksidaz testinin negatif olmasıyla ayırt edilirler. *Enterobacteriaceae* üyelerinden ise, anaerobik şartlarda üreyememesi ve nitratları redükte edememesi ile kolayca ayrılabilirler (2,8).

Acinetobacter'lerin üreme ve biyokimyasal özelliklerine göre tür ayrımı yapılabilmektedir. *A. baumannii* glikozu oksitleyebilmesi, hemoliz yapmaması ve 44°C'de üreyebilmesi ile diğer Acinetobacter türlerinden ayrılır (13,16). *A. lwoffii* glikozu oksitleyememesi ve hemoliz yapmaması, *A. johnsonii*' de 37°C'de üreyememesi özelliği ile ayırt edilebilir. Genomik tür 4 (*A. haemolyticus*) ise kanlı agarda hemoliz yapar, EMB Agar' da laktoz negatif koloniler oluşturur ve MacConkey Agar' da renksiz ya da hafif pembemsi koloniler oluşturabilir (2,8,16,17).

1.2.1.3. EPİDEMİYOLOJİ

Acinetobacter cinsi bakteriler, yaşamlarını sürdürebilmek için gereksinimlerinin az olması ve çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilme avantajı sayesinde doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbestçe yaşayabilirler (2,18). Acinetobacter'ler kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH ortamlarında canlı kalabilme özellikleri sayesinde, cansız yüzeylerde haftalarca canlı kalabilmektedirler (11,18).

Hastane havasından, musluklardan, ventilatörlerden, kontamine eldivenlerden, pamuktan, kullanılmış enjektörlerden, hasta yastıklarından, kuru filtrelerden izole edilmiş ve buralarda günlerce canlı kaldıkları gözlemlenmiştir (17,18,19,20).

Acinetobacter'ler sağlıklı bireylerin florasında da bulunmaktadır. Özellikle koltuk altı, kasık gibi nemli bölgeler başta olmak üzere deride, ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistem florasında da bulunabilir (2,18). Daha önce hastanede kalmamış bireylerle yapılan çalışmada %43'den fazlasında deri ve mukoza membranında kolonizasyon tespit edilmiştir. En sık izole edilen türler *A.lwoffii* (%58), *A. johnsonii* (%20), *A. junii* (%10) ve *Acinetobacter* genomik tür 3 (%6) olarak raporlanmıştır. Sağlıklı gönüllü bireylerle yapılan çalışmada %44' ünün taşıyıcı olduğu saptanmış olup, izole edilen türler; *A. lwoffii* (%61), *Acinetobacter* genomik tür 15BJ (%12), *A.radioresistens* (%8) ve *Acinetobacter* genomik tür 3 (%5) olarak bulunmuştur (9).

1.2.1.4. PATOGENEZ VE VIRULANS

Acinetobacter cinsi bakterilerin virülans potansiyelleri düşük olduğu için konak savunma mekanizması normal olan bireylerde enfeksiyon oluşturma riski düşüktür ve genellikle fırsatçı hastane enfeksiyonlarına neden olurlar (17). Asidik pH ve düşük ısıda üreyebilme özellikleri dışında bilinen sitotoksin üretimi yoktur (1). *Acinetobacter* cinsi bakteriler genel olarak düşük virülanslı olarak kabul edilmelerine rağmen virülanstan sorumlu faktörler de vardır:

Polisakkarit Kapsül: L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşur. Bakteri yüzeyinin hidrofilik özelliğini sağlar ve fagositozdan korur. Damar içi kateter, trakeal kanül gibi yüzeylere tutunmayı kolaylaştırır (2,12).

Fimbria ve/veya Kapsüler Polisakkarit: İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar (2).

Lipopolisakkarit ve Lipid A: Hücre duvarında bulunan lipid A, endotoksik aktivite göstererek patojeniteyi artırır (2,21).

Sidereför: Demir bağlayıcı dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilmektedir (12).

Biyofilm Oluşturma: Antimikrobiyal ajanlardan ve konağın immün yanıtından kaçmasını sağlar ve enfeksiyonların patogeneze katkıda bulunur. Acinetobacterlerin yaklaşık %14'ü biyofilm oluşturmaktadır (2,22).

Çoğunluğu algılama: “Quorum Sensing ” sistemi, bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu algılamasını sağlar. N-açıl homoserin lakton yapısındaki sinyal moleküllerinin rol oynadığı sistem, uygun olmayan çevresel koşullarda adaptasyonu sağlayabilir (1).

Beta laktamaz enzimleri: Son zamanlarda yapılan çalışmalarda antibiyotik direnci sağlayan PER-1 gibi enzimlerin virülansı arttırdığı ve klinik olarak daha ağır enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmiştir (2,23,17).

Sitotoksik dış membran proteini olan (outer membrane protein) OmpA da önemli virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Bakterinin epiteryal hücrelere yapışmasını ve invazyonunu sağlar. Ökaryotik epiteryal hücrelerde apoptoza neden olur (1,7,12).

1.2.1.5. ACINETOBACTER KAYNAKLI ENFEKSİYONLAR

Acinetobacter türleri genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlara, nadiren de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır (2,14). Hastanede yoğun bakım ünitelerinde pnömoni, ventilatörle ilişkili pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, bakteriyemi, sepsis ve menenjitte yol açabilir (2,11,14). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda ventilatör-ilişkili pnömoni başta olmak üzere nozokomiyal pnömoni ajanı olarak baskın role sahiptir (2).

Sigara kullanımı ve alkol bağımlılığı, ilerlemiş yaş, kronik akciğer hastalığı, immünsupresyon, cerrahi girişimler, uzun süreli antibiyotik kullanımı Acinetobacter enfeksiyonları açısından risk faktörlerindendir (2,24). Askeri personelde de; savaş

alanındaki yaraların kontaminasyonu, hastaneye sevk sırasında çevresel yayılma ve çapraz enfeksiyon gibi kaynaklardan dolayı enfeksiyon görülmektedir (11).

Acinetobacter ile ilgili problemlerden biri enfeksiyon tanısının konulabilmesidir. Acinetobacter suşları sıklıkla enfeksiyondan çok; kolonizasyona neden olmaktadır. Acinetobacter enfeksiyonu; enfeksiyonun klinik ve biyolojik bulgularına sahip olan hastanın kan veya beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi steril bir örneğinden Acinetobacter türlerinin izolasyonu olarak tanımlanır. Acinetobacter kolonizasyonu ise; enfeksiyonun klinik veya biyolojik bulgularına sahip olmayan hastadan alınan ve steril olmayan idrar ve solunum yolu örneklerinden Acinetobacter türlerinin izolasyonu olarak tanımlanabilir (25).

1.2.1.5.1. Solunum Yolu Enfeksiyonu

Acinetobacter enfeksiyonlarının en sık lokalize olduğu yer ve en önemli kolonizasyon yeri solunum yollarıdır. Kolonizasyonun en sık burun delikleri, nazofarenks ve trakeostomi de olduğu tespit edilmiştir (26).

Yoğun bakım ünitesinde yatmak, cerrahi operasyon geçirmiş olmak, endotrakeal tüp gibi invaziv madde varlığı, ileri yaş, kronik akciğer hastalığı, immünsupressif tedavi, antibiyotik kullanımı Acinetobacter pnömonisi ve alt solunum yollarının kolonizasyon riskini arttıran faktörlerdir (2).

Toplum kaynaklı pnömoni olgularına ise nadir olarak rastlanmaktadır. Yaş ortalaması 56 ve 73 arasındaki bireyler için bildirilen risk faktörleri kronik akciğer hastalığı, sigara kullanımı, diyabet ve organ yetmezliğidir (27).

1.2.1.5.2. Bakteriyemi

Bakteriyemi'ye neden olan Acinetobacter türleri arasında en önemlisi *A.baumannii'* dir. Gerçek bakteriyeminin, deri florası ile kontamine kan örneklerinden ayırımı oldukça güçtür. Bakteriyemilerde, Acinetobacter tek patojen veya polimikrobiyal bakteriyeminin bir parçası olarak bulunabilir. Polimikrobiyal bakteriyemilerde mortalite oranı artmaktadır. Acinetobacter bakteriyemisinin mortalite oranı %17-46 arasında bildirilmiştir (28).

Bakteriyeminin kaynağını sıklıkla solunum yolu enfeksiyonları oluşturmaktadır. Daha az görülen diğer kaynaklarını ise idrar yolu enfeksiyonu, yara ve cilt enfeksiyonları oluşturmaktadır (2,29).

1.2.1.5.3. Menenjit

Beyin ameliyatı veya kafa travmasından sonra gelişen nozokomiyal menenjit olgularında pürülan menenjit özelliği görülmektedir. Acinetobacter türlerine bağlı menenjitler ise nadir olarak görülmektedir (2,28). Risk faktörleri olarak; beş günden daha fazla süreli ventriküler kateter varlığı ve yoğun antibiyotik kullanımı belirtilmiştir (30).

1.2.1.5.4. İdrar Yolu Enfeksiyonu

Acinetobacter'e bağlı gelişen idrar yolu enfeksiyonlarına nadir olarak rastlanmaktadır. Genelde immün sistemi baskılanmış, yaşlı, sürekli üriner kateteri olan ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülmektedir (2).

Üriner kateter taşıyan hastalardan izole edilen her Acinetobacter gerçek enfeksiyon etkeni olmayabilir, enfeksiyon veya kolonizasyon ayrımının yapılması gerekmektedir (2).

1.2.1.5.5. Yumuşak Doku Enfeksiyonu

Acinetobacter türleri özellikle travma yaralarında, yanıklarda, cerrahi girişim bölgelerinde, damar içi kateter uygulamasında ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda fırsatçı enfeksiyonlar oluşturmaktadır (2,9). Damar içi kateter giriş yerinde Acinetobacter kaynaklı enfeksiyon gelişebilir ve kateterin uzaklaştırılmasıyla enfeksiyon kendiliğinden iyileşebilmektedir (28).

1.2.1.5.6. Diğer Enfeksiyonlar

Acinetobacter enfeksiyonu vücudun çeşitli bölgelerinde oluşabilir. Lens kullanımı ve cerrahi sonrası gelişen oftalmik göz enfeksiyonlarına neden olabilir (2,28). Bu bakteri nedeniyle oluşan pankreas ve karaciğer absesi de belirtilmiştir. Kemik iliği transplantasyonundan sonra osteomyelit gelişebilir (2).

1.2.1.6. ACINETOBACTER ENFEKSİYONLARININ TEDAVİSİNDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER

Antibiyotiklere duyarlı *Acinetobacter* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar, genellikle geniş spektrumlu sefalosporinler ve beta-laktamaz inhibitör kombinasyonu ile tedavi edilmektedir. Ayrıca karbapenemler tek başına ya da aminoglikozitle kombine şekilde tedavide kullanılmaktadır (11,16).

Ciddi *Acinetobacter* enfeksiyonlarında ilk tercih edilen kombinasyon; imipenem ile amikasin'dir. Seftazidim ile aminoglikozid veya florokinolon kombinasyonları da kullanılabilir. Beta-laktam antibiyotikle kombine edilmiş sulbaktam (sefoperazon + sulbaktam, ampisilin + sulbaktam) tedavide iyi bir alternatiftir. Sulbaktam, *Acinetobacter* türleri üzerine bakterisidal etkilidir (2,31).

Ventilatör ilişkili pnömoni ve bakteriyemi enfeksiyonlarından tigesiklin tedavisi olumlu sonuç vermiştir (32). En etkin in vitro ajanlar olarak polimiksinler (polimiksin B ve polimiksin E) bulunmaktadır. Polimiksinlerin nefrotoksisite ve nörotoksisiteye sebep olduğu bilindiğinden kullanımı kısıtlanmış fakat çok ilaca dirençli (ÇİD) gram negatif basillerin artması polimiksin kullanımını tekrar gündeme getirmiştir (33).

Metallo beta-laktamaz negatif karbapenem direnci olan *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kolistin+rifampisin veya kolistin+imipenem kombinasyonu değerlendirilmelidir. Metallo beta-laktamaz pozitif karbapenem dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında ise kolistin+rifampisin veya tigesiklin kombinasyonu dikkate alınmalıdır (34). ÇİD *Acinetobacter*lerin etken olduğu enfeksiyonlarda MİK düzeyleri ve antibiyogram sonuçları dikkate alınarak tedavi düzenlenmelidir.

1.2.1.7. ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİKLERE KARŞI GELİŞEN DİRENÇ MEKANİZMALARI

Dirençli *A.baumannii* suşlarının dünyada yaygın olarak hızla ortaya çıkması, çevresel değişikliklere çabuk cevap verme potansiyelini göstermektedir. Bu nedenle

A.baumannii enfeksiyonlarının tedavisinde yeni alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır(9).

A.baumannii'nin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan kinolon, sefalosporin, karbapenem, aminoglikozid, doksisiklin, trimetoprim-sulfametaksazol gibi antibiyotik gruplarından üçüne veya daha fazlasına direnç görülmesi durumunda “Multidrug Resistance ” (MDR, çoklu ilaç direnci, ÇİD) terimi kullanılsa da ÇİD'in standart bir tanımı yoktur. Bu durum bakterilerin yapısından kaynaklanan doğal direncin ve kazanılmış antibakteriyel direnç mekanizmalarının ortak bir sonucudur. “Pan-rezistan” (PDR, bütün antibiyotiklere direnç) tüm standart antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli olan suşları açıklamak için kullanılmaktadır (9,35,36,37,38).

A.baumannii birçok antibiyotik direnç mekanizmasını kullanabilmektedir. Direnci belirleyen faktörlerin genetik çeşitliliğini sağlayan üç tip hareketli genetik eleman tanımlanmıştır. Bunlar: integronlar, transpozonlar ve insersiyon sekans (IS) elemanları'dır. Hareketli genetik elemanlar, aynı veya farklı genetik yapılar üzerinde bir yerden diğeri bir yere hareket edebilen elemanlardır. Bu elemanlar kendi kendilerine replike olamazlar, ancak kromozomla veya plazmitle birlikte replike olabilirler. İntegronlar ise bir veya daha fazla direnç genini, gen kasetleri şeklinde yapısına katabilen hareketli genetik elemanlardır, plazmid veya transpozonun bir parçası olabilir. Transpozonlar ve IS elemanları ise bağımsız bir birim olarak yer değiştirebilirler (39).

Acinetobacter suşlarının antimikrobiyallere karşı başlıca direnç mekanizmaları: İlacı inaktive eden enzimlerin üretimi (sefalosporinaz ve karbapenemazlar gibi beta laktamazlar, aminoglikozit modifiye eden enzimler), antibiyotik hedef bölge değişiklikleri (penisilin bağlayıcı proteinler, Topoizomerazlar), hücre duvar kanallarındaki dış membran porinlerindeki değişiklikler ve efluks pompalarıdır (2,9,32,40).

1.2.1.7.1. BETA LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI

A. baumannii izolatlarında beta-laktam direnci diğer türlere göre daha sıktır. Dört farklı mekanizma ile beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedirler (41).

a- Beta-laktamaz enzimleriyle antibiyotiğin parçalanması: *A.baumannii*'de en sık görülen beta-laktam direncidir. Kromozom, plazmid veya transpozon kontrolünde sentezlenen beta-laktamaz üretimi ile antibiyotik parçalanmaktadır (42).

b- Beta laktam antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi: Dış membrandan madde taşınmasını sağlayan, porin olarak görev yapan dış membran proteinlerinin (OMP) ekspresyonunun azalması sonucu oluşan değişimler direnç gelişimine neden olabilir. Porinler *Acinetobacter*'lerde doğal antimikrobiyal dirençten sorumludur. Diğer gram negatif bakterilere oranla *Acinetobacter*'lerde porin sayısı daha azdır (32).

c- Penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişikliklerin oluşması: Penisilin bağlayan proteinler (PBP) hücre duvarında peptidoglikan sentezinden sorumludur. Beta-laktam antibiyotikler PBP'lere bağlanınca peptidoglikan sentezlenemez, hücre duvar yapısı bozulur ve ozmotik direnci bozulan bakteri hücresi lizise uğrar. Dolayısıyla bakterisidal bir etki ortaya çıkar (28,43).

d- Efluks pompalarının aktive olması: Efluks pompa sistemi ile ilacın uzaklaştırılması çoklu ilaç direnci oluşumunda önemli bir role sahiptir. Beta-laktam, aminoglikozid, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin ve florokinolon direncinde AdeABC pompasının aşırı aktivasyonu rol alır. AdeABC pompasının aktivitesini adeRS geni kontrol eder. Bu gende meydana gelen nokta mutasyonları pompa sisteminin aşırı ekspresyonuna dolayısıyla da direnç gelişimine sebep olur (9,32).

Acinetobacter izolatları ortamda indükleyici antibiyotik yoksa düşük düzeyde, ortamda indükleyici antibiyotik bulunuyorsa da yüksek düzeyde beta-laktamaz (genellikle AmpC tipi) üreterek penisilinleri ve sefolosporinleri hidroliz ederler. Karbapenemler ise sadece indükleyici rol oynar (40,44).

1980 yılında Ambler moleküler yapılarına göre beta laktamazları A,B,C ve D sınıfı olarak 4 gruba ayırmıştır. 1995 yılında Bush ve arkadaşları tarafından yapılan fonksiyonel sınıflandırma şeması da bulunmaktadır ve günümüzde her iki sınıflandırma yöntemi de kullanılmaktadır (45).

Ambler'in sınıflandırmasında yer alan dört sınıf; aktif bölgelerinde serin aminoasiti taşıyan, penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlar (sınıf A), aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallo-beta-laktamazlar (sınıf B), kromozomal AmpC sefalosporinazlar (sınıf C), ve oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlar (sınıf D) olarak belirtilmiştir (45).

Sınıf A içerisinde yer alan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar'ı (GSBL) Acinetobacterlerde saptamak çoğu zaman kolay değildir. Yapılan çalışmalarda PER-1 tipi enzim ilk kez Türkiye'de, VEB-1 tipi enzim Fransa'da, SHV-12 tipi enzim Çin'de ve CTX-M tipi enzim de Japonya'da belirlenmiştir (46).

1.2.1.7.2. AMİNOGLİKOZİDLERE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI

Aminoglikozidler 30S ribozomlara geri dönüşümsüz olarak bağlanıp protein sentezini inhibe ederek bakteri ölümüne neden olmaktadır. Acinetobacter türleri üç mekanizma ile aminoglikozid direnci geliştirirler.

Bu mekanizmalar;

a) Mutasyonlara bağlı olarak ribozomal hedeflerde değişiklik oluşması: Ribozomal proteinleri kodlayan genlerde gerçekleşen mutasyon, aminoglikozitlerin hedef bölgeye bağlanamamasına neden olur (40).

b) Aminoglikozidlerin hücreye girişi ve birikiminde azalma, eflüks pompaları ile ilacın dışarı atılması: Dış membran proteinlerinin (OMP) azalmış ekspresyonu veya kaybı ile birlikte, başta AdeABC olmak üzere eflüks pompalarının aşırı ekspresyonu dirençte rol oynar (40).

c) Aminoglikozidlerin amino grup ve hidroksil gruplarının enzimatik yolla değiştirilmesi:

Bu yolda kullanılan enzimler;

1.Aminoglikozidlerin amino grubunu asetile eden aminoglikozid asetiltransferaz

2.Aminoglikozidlerin hidroksil grubunu fosforile eden aminoglikozid fosfotransferaz

3.Aminoglikozidlerin hidroksil grubunu adenile eden aminoglikozid nükleotidiltransferaz'dır.

Bu enzimler sıklıkla plazmid kontrolünde sentezlenir ve sentezden sorumlu genler transpozonlarla taşınırlar. Bir enzim birçok aminoglikozid molekülünü değiştirebilir ve bir aminoglikozid molekülü birden fazla bölgede değişikliğe uğrayabilir (2,40,47).

1.2.1.7.3. TETRASİKLİNLERE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI

Tetrasiklinin bakteriyostatik etkisi, bakteri hücre ribozomunun 30S alt ünitelerine bağlanarak, protein sentezi inhibisyonu ile meydana gelmektedir. Bu bağlanma sonucu, tRNA-aminoasit kompleksi ribozom-mRna kompleksiyle birleşemez. Böylece protein sentezinde peptid zincirine yeni aminoasitlerin eklenmesi önlenir (48). *A.baumannii*'de yaygın olan tetrasiklin direncinin iki farklı mekanizması tanımlanmıştır;

a) TetA ve tetB spesifik transpozon aracılı efluks pompaları: TetB tetrasiklin ve

minosiklinin her ikisinin de dışa atımını sağlarken; tetA sadece tetrasiklinin dışa atımından sorumludur (49).

b) Ribozomal koruyucu protein: TetM proteini, ribozomları tetrasiklin, minosiklin ve doksisisiklinin etkilerinden koruyan proteindir. *A.baumannii*'de bulunan

bu koruyucu protein *S.aureus*'un tetM proteini ile %100 homoloji gösterir (2,16,49,50,51).

1.2.1.7.4. TİGESİKLİNE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMASI

Tigesiklinin etki mekanizması tetrasiklin ile aynı olduğu için direnç mekanizmaları da aynıdır. AdeABC eflüks pompasının aşırı aktivitesi, tigesiklinde de duyarlılığın azalmasına yada dirence neden olabilir. Ancak tigesiklinin ribozomlardaki bağlanma noktasına tetrasiklinden daha kuvvetli bağlanması, tigesiklini ribozomal koruyucu proteinlerin etkisinden korur. Eflüks pompası da glisilsiklinleri (tetrasikline glisilamid parçasının eklenmesiyle oluşan yapı) hücreden dışarı atamadığı için tigesiklin bu direnç mekanizmasının da üstesinden gelmektedir (52).

Tigesiklinin tedavide yaygın olarak kullanılmaya başlamasıyla bu antibiyotiğe karşı dirençli bakteri gelişimi gözlenebilir. Mutasyonlarla oluşacak yeni eflüks pompaları veya bunların aşırı ekspresyonu ile ribozomal korunma genleri direnç gelişimi sağlayabilir (53).

1.2.1.7.5. POLİMİKSİN GRUBU ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMASI

Polimiksinler, kimyasal olarak beş farklı bileşiği içeren (polimiksin A-E) polipeptid antibiyotiklerdir. Klinikte sadece polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmaktadır (54). Bu antibiyotikler bakteri zarlarına bağlanırlar ve dış zardaki fosfolipid ve lipopolisakkarit'lerle (LPS) etkileşerek hücre geçirgenliğinde artışa ve sonunda hücre ölümüne neden olurlar. Kolistin ve polimiksin arasında çapraz direnç görülmektedir (33). Polimiksinlere direncin veya duyarlılıkta azalmanın, bakteri LPS yapısındaki değişimlere ve iki bileşenli bir regülatör sistemdeki (pmrA/B) mutasyonlara bağlı olduğu düşünülmektedir (55).

1.2.1.7.6. FLOROKİNOLONLARA KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI

Florokinolon grubu antibiyotikler geniş spektrumlu olup hem toplum kökenli

enfeksiyonlarda hem de hastane kökenli enfeksiyonlarda sık kullanılmaktadır. Ancak bu antibiyotiklere karşı da hızla direnç gelişmektedir (56). Direnç, üç farklı temel mekanizma ile ortaya çıkabilmektedir (2,56):

a) Hedef enzimde değişiklik oluşması: En sık kinolon direnci DNA replikasyonunda görevi olan iki topoizomeraz da (DNA giraz (topoizomeraz II ve topoizomeraz IV) oluşan mutasyonlar sonucu görülmektedir. DNA giraz, Gyr A ve Gyr B alt birimlerinden oluşan tetramerik bir enzim olup alt birimler gyrA ve gyrB genleri tarafından kodlanırlar. Topoizomeraz IV ise Par C ve Par E alt birimlerinden oluşmaktadır (46).

DNA giraz enziminin alt birimlerinde oluşan yapısal değişiklikler ilacın enzim-DNA kompleksine afinitesini azaltarak kinolon direncine yol açmaktadır. Bu yapısal değişiklikler çoğunlukla gyrA ve parC genlerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmakta ve sıklıkla enzimin amino ucundaki ‘kinolon direncini belirleyen bölge’ (QRDR) olarak tanımlanan bir bölgede oluşmaktadır (46).

Tek başına GyrA mutasyonu sonucunda orta düzeyde bir direnç gelişirken, gyrA ile birlikte parC mutasyonu olması durumunda yüksek düzeyde direnç gelişir (57,58,59). GyrA’nın 83. kodonunda Serin (Ser) yerine Lösin (Leu) gelmesi, en sık gözlenen mutasyonlardan biridir. ParC’deki en sık mutasyon; parC’nin 80. kodonunda Ser yerine Leu gelmesidir. GyrB mutasyonları diğer bakteri türlerinde nadir olarak gözlenirken, *Acinetobacter* kökenlerinde saptanamamıştır (2).

Genel olarak Gram negatif bakterilerde birincil hedef DNA giraz iken, Gram pozitif bakterilerde ise topoizomeraz IV öncelikli hedeftir (60).

b) İlacın hücre içine geçişinin azaltılması: Kinolonlar gram negatif bakterilerde hücre içine dış membrandaki porinlerden veya fosfolipitten difüzyon ile girmektedir. *A.baumannii*’de porin sayısı az ve yapıları küçüktür. Mutasyonlar sonucu daha da azalıp küçülen porinler direnç gelişimine sebep olur. Ancak direnç oluşması için tek başına porin kaybı yeterli değildir. Porinlerdeki azalma ile birlikte enerji gerektiren pompa sistemleri de gereklidir. Efluks pompa sistemi ise kromozomlarca kodlanan ilaç dışı atım pompaları ile ilacın hücre içinde birikimini

engeller (2,56). *Acinetobacter* türlerinde en sık direnç gelişimine neden olanlar RND tipi efluks pompalarıdır.

c) Qnr proteinleri: *qnr*; plazmit aracılı kinolon direnç genidir. Bu gen 219 aminoasit peptopeptit ailesinden “koruma proteininin” üretiminden sorumludur. Saflaştırılmış *qnr* proteini hem DNA giraz hem de Topoizomeraz IV’e bağlanıp bu yapıları koruyarak, siprofloksasinin bu enzimlere bağlanmasını engeller (61).

Kinolonların tümü *Enterobacteriaceae* ailesine çok iyi etkinlik gösterir. Etkileri konsantrasyona bağlıdır. Ofloksasin, levofloksasin ve siprofloksasin *Acinetobacter* türlerine etki gösterir. Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kombine tedavide siprofloksasin sıklıkla kullanılan bir ajandır (56).

1.2.1.8. EFLUKS POMPA SİSTEMLERİ

Efluks pompa sistemleri, hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde bulunabilen, antibiyotikler dahil toksik maddelerin protonlar ile yer değiştirerek hücre dışına atılmasını sağlayan transport proteinleridir. Efluks pompaları tek bir substrata özgül olabildikleri gibi yapısal olarak birbirinden farklı maddeleri de substrat olarak kullanabilirler. Bu durum antibiyotik direncinin yanı sıra substrat profilinin genişliğine bağlı olarak da direnç gelişmesine neden olur. Efluks pompası tarafından en sık dışarı atılan antibiyotikler makrolitler, tetrasiklinler ve florokinolonlardır (62).

Efluks pompa sistemleri altı süper aileye ayrılmaktadır:

- 1- “ATP binding cassette” (ABC) süper ailesi
- 2- “Major facilitator” (MFS) süper ailesi
- 3- “Resistance nodulation division” (RND) süper ailesi
- 4- “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE) süper ailesi
- 5- “Small multidrug resistance” (SMR) süper ailesi
- 6- “Drug/metabolite transporter” (DMT) süper ailesi

ABC tipi efluks pompaları adenosin tri fosfat’a (ATP) bağımlı çoklu ilaç taşıyıcılarıdır ve antibiyotikleri hücre dışına atmak için ATP enerjisini kullanırlar. Bu

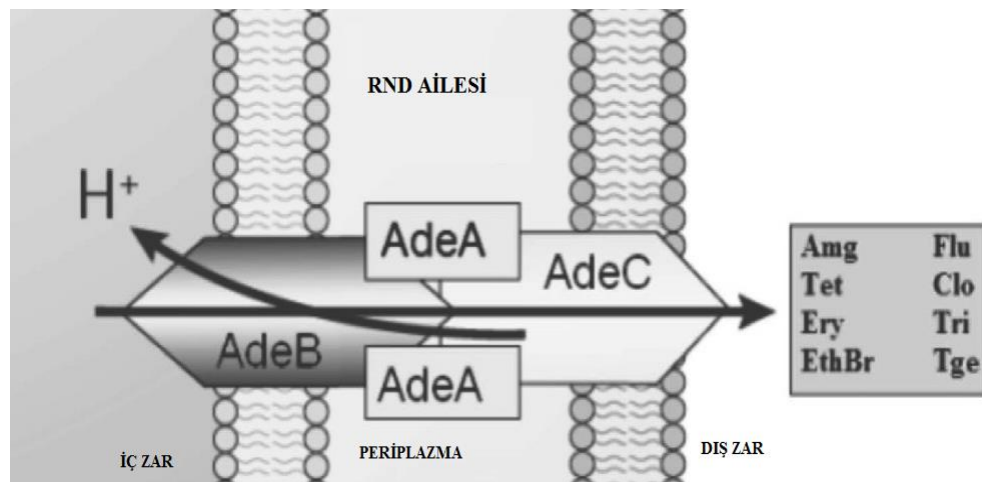
ailenin üyeleri gram negatif bakterilerin antibiyotik direncinde nadiren görev alırlar. Diğer efluks pompaları ise ilaç-proton taşıyıcılarıdır. Antibiyotikleri hücre dışına atmak için proton itici güç (proton motiv güç) kullanmaları gerekmektedir (62).

Gram negatif bakteriler için çoklu ilaç direncine katılan en önemli efluks pompası RND süper ailesidir. Bu ailenin üyeleri üç proteinden meydana gelmektedir ve üç elemanlı pompa sistemi olarak adlandırılmaktadır (62).

Bu üç elemanlı pompa proteinleri:

1. Sitoplazmik zar üzerindeki pompa proteini
2. Dış membranda yer alan bir kanal proteini (OMP)
3. Periplazmik aralıktaki bir membran füzyon proteini (MFP)'dir.

A.baumannii'de RND ailesinin pompa sistemleri: AdeABC, AdeDE, AdeFGH, AdeIJK'dir (Ade: Acinetobacter drug efflux). Aminoglikozid, tetrasiklin, eritromisin, sefotaksim, kloramfenikol, trimetoprim, beta-laktam ve florokinolonları dışarı pompalarlar (63,64). AdeABC pompa sistemi karakterizasyonu yapılmış ilk ve önemli bir pompa sistemidir. AdeA geni MFP'ni, adeB geni stoplazmik zar üzerindeki pompa proteini ve adeC geni OMP'ni kodlamaktadır. Bu pompanın ekspresyonu iki basamaklı regülatör (adeR) ve sensör (adeS) sistemi ile kontrol edilir. AdeR veya adeS genindeki bir nokta mutasyonu, ekspresyonda, dolayısıyla efluksta artma ile sonuçlanır (65,66).



Şekil 1: RND efluks pompa sistemi.

Amg: aminoglikozid, Flu: florokinolon, Tet: tetrasiklin, Clo: kloromfenikol, Ery: eritromisin, Tri: trimetoprim, EthBr: etidyum bromür, Tge: tigesiklin (66).



Şekil 2: Ade gen kümesinin şematik organizasyonu (66)

AdeDE pompa sistemi, *Acinetobacter pittii* (genomik tür 3)'de tanımlanmıştır. Seftazidim ve rifampisine karşı direnç geliştirmiştir. Ayrıca aminoglikozid ve florokinolon dirençlerine de katkıda bulunduğu saptanmıştır. AdeFGH pompa sisteminde; kloromfenikol ve trimetoprim, az oranda da gentamisin ve siprofloksasine direnç gelişimi görülmüştür (67). AdeIJK pompa sisteminin ise daha çok, beta laktam, kloromfenikol, florokinolon ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı doğal (intrinsik) dirençe ilgili olduğu belirtilmiştir (68).

1.2.1.9. EFLUKS POMPASI İNHİBİTÖRLERİ

1.2.1.9.1. Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP): Oksidatif fosforilasyonu durduran bir kimyasal inhibitördür. Kimyasal iyodofor gibi davranarak ATPaz'ın sentezini azaltır. Canlı hücrelerin veya organizmanın yavaş yavaş ölümüne neden olur.

1.2.1.9.2. 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP): Gram negatif ve pozitif bakterilere ayrıca mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite gösteren metal iyonları içeren inhibitördür.

1.2.1.9.3. Phenyl-arginine beta-naphthylamide (PAβN): Dipeptit amid bileşiğidir. Gram negatif bakterilerde sıklıkla çoklu ilaç direncine yol açan RND tipi pompa sistemlerini ihhabe ettiği gösterilmiştir.

1.2.1.9.4. Tiyoridazin: Bir fenotiyazin türevidir. *Staphylococcus aureus*'un çoklu ilaç direncini sağlayan NorA efluks pompasını inhibe ederek florokinolon direncini düşürdüğü belirlenmiştir.

1.2.1.10. BAKTERİLERDE EPİDEMİYOLOJİK TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ

Tiplendirme yöntemleri başlıca; hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların belirlenmesi, dirençli suşların tanımlanması, enfeksiyon etkenlerinin yayılımının belirlenmesi, salgın araştırmalarında epidemik suşların kaynağı ve yayılım yolunun belirlenmesi, hastalardaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konulması gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemi bulunmaktadır (2).

1.2.1.10.1. FENOTİPİK YÖNTEMLER

Bakterilerin identifikasyonunda fenotipik özellikler belirleyicidir. Fenotiplendirme için sıklıkla kullanılan yöntemler arasında; antimikrobiyal maddelere duyarlılık, serotiplendirme, faj ve bakteriyosin tiplendirme, biyokimyasal özelliklerine göre yapılan biyotiplendirme bulunmaktadır (2,69).

Antibiyotipleme

İzolatları benzerliklerine göre gruplandırmak ve direnç gelişimini belirlemek amacıyla kullanılır. Genellikle MİK ve disk difüzyon zon değerleri kullanılmaktadır (2).

Serotipleme

Çalışmalarda suşların serotiplemesi ile salgınlar tanımlanmıştır. Fakat serotiplemenin DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri ile desteklenmesi gerekmektedir (2).

Faj tipleme

Acinetobacter izolatları ile yapılan farklı epidemiyolojik çalışmalarda salgın suşlarının izole edilmesini sağlamıştır. Zaman alıcı olması dışında diğer yöntemlerle birlikte çalışıldığında kullanışlı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (2).

Bakteriyosin tipleme

Protein yapılarının benzerliklerine bakılıp klinik olarak önemli Acinetobacter suşlarının tiplendirilmesinde kullanılan yararlı bir tiplendirme yöntemidir (2).

Biyotipleme

Bakteri tür ayrımını sağlar. Acinetobacterlerin tür ayrımında glukozdan asit oluşumu, değişik ısılarda üreme özelliği (37°C, 41°C, 44°C) gibi biyokimyasal özellikler kullanılmaktadır. Grup 1, 2, 3 ve 13TU genomik türleri benzerliklerinden dolayı *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks olarak tanımlanmakta, alt tiplendirme için 44°C’de üreme varlığı araştırılıp, üreme olduğunda bakteri *A. baumannii* olarak tanımlanabilmektedir (70).

1.2.1.10.2. GENOTİPİK YÖNTEMLER

Bakteri plazmidlerinin veya kromozomal DNA’nın benzerlik yada farklılığına dayanan genotiplendirme, epidemiyolojik araştırmalarda daha güvenilir veriler sağlamıştır. Farklı tiplerin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemlerdir. Genotiplendirme yöntemleri fenotiplendirmeye göre; tiplendirebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırıcı güç yönünden daha üstündür (59,69).

Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE)

Yüksek oranda tekrarlanabilirlik özelliğinden dolayı, moleküler yöntemler içinde altın standart olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem sayesinde çeşitli büyüklükteki DNA fragmanlarını ayrı ayrı görebilmek mümkündür. PFGE yönteminde bakteri agaroz içine gömülerek in situ lizis sonucunda tek, uzun kromozomal DNA hazırlanıp, restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmektedir. Oluşan büyük DNA parçaları PFGE ile agaroz jelde yürütülmektedir. Böylece total genomik DNA farklı elektroforetik hareketlerle değişik sayıda restriksiyon fragmanlarına ayrılmaktadır (59,69)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temelli Yöntemler

DNA (veya RNA)'nın belirli bir bölgesine özgü primerler kullanılarak çoğalmasını sağlayan üç basit reaksiyonun bir döngü halinde tekrarlanmasıdır. Bu reaksiyonlar; uygulanan farklı ısıların da etkisiyle ayrılma (denatürasyon), bağlanma (annealing) ve uzama (elongation)'dır. Reaksiyon sonucunda oluşan PZR ürünleri agaroz jel üzerine yüklenip elektroforezle ayrıştırılır ve farklı maddelerle boyanarak görüntülenir. Duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması ayrıca hızlı bir yöntem olması, mikroorganizmaların ve ürünlerin direkt olarak tiplendirilmesi için yararlı özelliklerindendir (69).

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PZR (ERIC-PZR)

Bakteri genomunda bulunan çok sayıdaki kısa tekrarlayıcı sekans ailelerinden biridir. Genomdaki bu tekrar dizilerinden biri, genler arası tekrarlayıcı parçalar olarak tanımlanan, ERIC sekanslarıdır. ERIC sekansları sadece genler arası ve transkripsiyonun görüldüğü bölgelerde bulunurlar. Bu sekanslardan yararlanılarak yapılan ERIC-PZR yönteminde ERIC sekansları içinden köken alan primerler seçilmektedir. Bu primerlerle yapılan reaksiyon sonrasında elektroforez ile jelde yürütülen ürünler arasında çeşitlilik sonucu farklı bant paternleri oluşmaktadır (71).

Repetitive Extragenic Palindromic PZR (REP-PZR)

Tekrarlayan ekstrasjenomik palindromik diziler fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır. 21-65 baz uzunlukları arasında tekrarlayan, palindromik dizileri ifade eder. REP-PZR yönteminde bu dizilere komplementer primerler seçilerek amplifiye edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek tiplendirme yapılır (72).

Arbitrary Primed PZR (AP-PZR)

AP-PZR yöntemi DNA yapısındaki değişiklikleri belirlemek adına rastgele primerler kullanılarak yapılan yöntemdir. Uygulamada kısa (9-10 bazlık) rastgele dizayn edilmiş, herhangi bir özel diziyi hedef almayan primerler seçilmektedir. Primerlerin rastgele bağlanması amplifikasyon esnasında düşük bağlanma sıcaklığı ile sağlanmaktadır. Böylece primerler kendilerine özgü ve özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Aynı türün farklı suşlarında primerlerin bağlanma yerleri ve sayıları

farklı olacağı için ürünler elektroforez aracılığıyla jelde yürütülerek, görüntülendiğinde farklı bantlar görülecektir (73).

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Rastgele bir DNA segmentinin rastlantısal olarak seçilmiş bir nükleotid dizisi ile PZR kullanılarak amplifiye edilmesine dayanmaktadır. RAPD-PZR ile bilinen hedef bir sekans gerekmeden yaklaşık 10 nükleotidlik tek bir rastgele primer kullanılır ve amplifikasyonun ilk döngüsü palindromik terminalleri olan tekli dizilerle sonuçlanır (74).



BÖLÜM II

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Bakteri Kökenleri

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda, Aralık 2011 - Mart 2012 tarihleri arasında farklı klinik örneklerden izole edilen ve her hastadan bir izolat olmak üzere siprofloksasine dirençli 79, aynı antibiyotiğe duyarlı iki izolat olmak üzere toplam 81 *A.baumannii* kökeni çalışmaya alındı. Kontrol kökeni olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı. Bakteriler çalışma zamanına kadar % 10'luk gliserinli buyyon besiyerinde -80 °C'de saklandı.

2.1.2. Besiyerleri

1. Eosine-Methylen-Blue Agar (EMB) (MERCK, ABD)
2. Mueller-Hinton Agar (MHA) (OXOID, İngiltere)
3. Mueller-Hinton Broth (MHB) (MERCK, ABD)
4. Gliserinli Brain-Heart Infusion (BHI) Broth (MERCK, ABD) (BHI besiyerine %10 oranında gliserin ilave edildi.)
5. Nutrient Broth (NB) (OXOID, İngiltere) (NB besiyeri Nutrient agar olarak kullanılacağına besiyerine % 20 oranında agar ilave edildi.)

2.1.3. Kimyasal Maddeler

1. Tris-Borik asit-EDTA (TBE) (5X)

Tris base 54 g

Borik asit 27.5 g

EDTA 0.5M (pH: 8.0)

Karışım distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi ve +4°C'de saklandı. Çalışmalarda, 1X TBE elde etmek için gerekli oranda distile su ile dilüe edildi.

2. dNTP Karışımı (Thermo Scientific, ABD)
3. Hot Start Taq Polimeraz (Thermo Scientific, ABD)

4. 'Marker'

Gene Ruler 50 bp DNA Leader (Biolabs, İngiltere)

Gene Ruler 100 bp DNA Leader (Thermo Scientific, ABD)

5. Ethidium bromide solution (EtBr) (Sigma, ABD)

6. Phosphate Buffered Saline (PBS) (OXOID, İngiltere) (% 0.4 glikoz ilave edildi.)

7. Safe View (ABM G108, Kanada)

8. Agaroz (Sigma, ABD)

9. 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, İngiltere)

2.1.4. Efluks Pompa İnhibitörleri

1. Carbonyl cyanide 3-chloro-phenylhydrazone (CCCP) (Sigma, ABD)

2. 1-(1-Napthylmethyl)-piperazine (NMP) (Sigma, ABD)

2.1.5. Antibiyotikler

1. Siprofloksasin (CIP) (Koçak Farma, Türkiye)

2. Levofloksasin (LEV) (Sigma, ABD)

2.1.5.1. Antibiyotiklerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Toz halindeki CIP ve LEV stok çözeltilerinin hazırlanması CLSI kriterlerine uygun olarak yapıldı.

Stok solüsyon hazırlama formülü;
$$W = \frac{C \times V \times 1000}{P}$$

P= Potens (µg/mg)

V= Hacim (ml)

C= Final konsantrasyon (µg/ml)

W= Antibiyotik ağırlığı (mg)

Antibiyotik stok solüsyonları 0.2µm por çapındaki membran filtrelerden geçirilerek steril edildi ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Siprofloksasin ve Levofloksasin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışma kökenlerinin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK), sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI kriterlerine uyularak belirlendi. Çalışmada U tabanlı 96 kuyucuklu mikropalak kullanıldı. MHA'a ekilip 1 gece bekletilerek elde edilen taze kökenler, steril serum fizyolojik içerisine alınarak 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. Mikrodilüsyon plağındaki son inokulum konsantrasyonunun 5×10^5 CFU/ml olması için bakteri süspansiyonları MHB besiyeri ile 1/100 oranında dilüe edildi. Steril mikropalalara 50 µl MHB dağıtıldı. İlk kuyucuklara 50 µl antibiyotik stok çözeltileri eklendi. Yan kuyucuklara aynı hacimde aktararak çift katlı seri dilüsyonlar uygulandı, 11. kuyucuktan alınan 50 µl dışarı atıldı. Son olarak tüm kuyucuklara 50 µl bakteri süspansiyonu konuldu. Bu şekilde antibiyotiklerin kuyucuklardaki final konsantrasyonunun 256-0.0625 µg/ml arasında olması sağlandı. Her plakta, besiyeri ve bakteri üreme kontrollerine yer verildi. Plaklar 37°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı Bu süre sonunda üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi. Kullanılan antibiyotiklerin Acinetobacter kökenleri için duyarlılık sınır değerleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1: CLSI kriterlerine göre antibiyotiklerin MİK sınır değerleri

	DUYARLI (S)	ORTA (I)	DUYARLI DİRENÇLİ (R)
SİPROFLOKSASİN	≤ 1	2	≥ 4
LEVOFLOKSASİN	≤ 2	4	≥ 8

2.2.2. *A. baumannii* İzolatlarının Klonal Yakınlıklarının Belirlenmesi

2.2.3. DNA Ekstraksiyonu

1. Kökenler MHA besiyerine ekilerek 37°C' de 24 saat inkübe edildi.
2. Steril ependorflar içerisine 400 µl ultra distile su konuldu.

3. Taze kültürden alınan bakteri kolonileri ependorf içerisine konularak süspansiyon elde edildi, 3 dakika vortekslendi.

4. Örnekler 95°C’de 10 dakika bekletilerek hücre duvarı bütünlüğü bozuldu, 13000 rpm’de 6 dakika santrifüj edildi.

5. DNA içeren süpernatantlar steril ependorflara alındı.

2.2.4. ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) PZR

ERIC-PZR ile 81 *A.baumannii* kökeninin klonal yakınlıkları incelendi. Bu yöntem için ERIC-2 primeri (5’-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3’) kullanıldı.

PZR Karışımı her bir örnek için 25 µl olacak şekilde hazırlandı.

10X Taq Buffer	1X	
25mM MgCl ₂	3	mM
dNTP	200	µM
ERIC-2	100	pmol
Taq Polimeraz	1.5	U
Steril Distile Su	11,7	µl
Ekstraksiyon ürünü	2	µl

PZR ürünü içeren ependorflar ısı döngü cihazına (Techne) yerleştirildikten sonra aşağıda belirtilen sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirildi.

95 °C’de 5 dakika ön denatüresyon

94 °C’de 1 dakika denatürasyon

40 °C’de 1 dakika birleşme

72 °C’de 1 dakika uzama

72 °C’de 10 dakika son uzatma

% 1,5 agaroz jel 1X TBE ile hazırlandı ve mikrodalga fırında homojen olana kadar eritildi. 100 ml eriyik içerisine 12 µl safe view ilave edildi. Jel kasetine taraklar yerleştirildi ve karışım kasete dökülerek donmaya bırakıldı. PZR ürünleri jel yükleme tamponu ile 1/6 oranında (2,5 µl jel yükleme tampon çözeltisi + 12,5 µl PZR ürünü) karıştırılarak her bir kuyucuğa 15 µl ve bir kuyucuğa da GeneRuler 50

veya 100 bp DNA Leader marker olacak şekilde jele aktarıldı. Jel 1X TBE içinde 100 V uygulanarak 75 dakika yürütüldü.

Jeller “Vilber Lourmat fusion FX-7” cihazı ile görüntülendi. ERIC PZR yöntemine göre bant profilleri, bantların sayı ve büyüklükleri karşılaştırılarak belirlendi.

Tüm bantları bire-bir aynı olan izolatlar aynı suş (klon), bir veya iki bant farklılık gösteren izolatlar benzer (klonal ilişkili), iki banttan fazla farklılık gösteren izolatlar ise farklı suşlar olarak kabul edildi. $SJ = nAB / (nAB + a + b)$ formülüne göre hesaplanan “Jaccard” katsayısı esas alınarak, *A. baumannii* izolatları için filogenetik analizler “MEGA version 4” programı ile yapıp, dendogramlar oluşturuldu (75). [nAB = A ve B izolatlarında ortak olan bant sayısı, a = A izolatında olup B’de olmayan bant sayısı, b = B izolatında olup A’da olmayan bant sayısı].

2.2.5. Efluks Pompasının Aşırı Ekspresyonunun Araştırılması

2.2.5.1. Mikrodilüsyon Yöntemi

Kökenlerin Efluks pompalarının ekspresyonu, öncelikle sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI kriterlerine uyularak belirlendi. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış ve son inokulum konsantrasyonunun 5×10^5 CFU/ml olması için MHB besiyeri ile 1/100 oranında dilüe edilmiş bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril mikropiplara 50 µl MHB dağıtıldı. Birinci plağın, ilk kuyucuklarına final konsantrasyonu 1024 µg/ml olacak şekilde CIP stok çözeltisi eklendi. Yan kuyucuklara aynı hacimde aktarılacak çift katlı seri dilüsyonlar uygulandı, 11. kuyucuktan alınan 50 µl dışarı atıldı. İkinci plağın ilk kuyucuklarına son konsantrasyonu 1024 µg/ml olacak şekilde CIP ve 100 µg/ml olacak şekilde NMP eklendi. Üçüncü plağın ilk kuyucuklarına da son konsantrasyonları 1024 µg/ml ve 100 µg/ml olacak şekilde CIP ve CCCP eklendi. Son olarak tüm kuyucuklara 50 µl bakteri süspansiyonu konuldu. Aynı işlemler LEV antibiyotiği için de uygulandı. Plaklar 37°C’de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı.

Efluks pompa inhibitörü varlığında (NMP veya CCCP) antibiyotik MIK değerlerinde en az 4 katlık azalmanın olması, efluks pompasının aşırı eksprese olduğu şeklinde değerlendirildi.

2.2.5.2. Florometrik Akümülayon Deneyi

Kökenlerin efluks pompa ekspresyonu spektrofotometrik olarak da değerdendirildi. Çalışmada 96 kuyucuklu U tabanlı siyah mikropalaklar kullanıldı. Kökenler NA'a ekilip 1 gece 37 °C'de inkübe edildi. Kökenler, içerisinde % 0.4'lük glikoz bulunan PBS çözeltisi içeren tüplere alınarak 0.5 Mcfarland bulanıklığına ayarlandı. Ayrıca spektrofotometrede 600 nm'deki absorbands değerdeleri ölçüldü. Birinci mikropalağa kökenlerden 180 µl konuldu. Üzerine final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde 10 µl NMP ve 10 µl EtBr ilave edildi. İkinci plağa kökenlerden 190 µl konuldu ve üzerine 10 µl EtBr ilave edildi. Plaklar 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Spektroflorometrede eksitasyon dalga boyu 544 nm, emisyon dalga boyu 612 nm olacak şekilde ölçümler yapıldı. Tüm kökenler için 3 ölçüm yapılarak bu ölçümlerin ortalamaları değerdendirmeye alındı. Elde edilen absorbands değerdelerindeki 4 katlık azalma aşırı ekspresyon göstergesi olarak değerdendirildi.

2.2.6. Gyr-A ve Par-C Genlerindeki Mutasyonların PZR ile Araştırılması

Her klondan ve alt tiplerinden birer temsilci seçilerek, toplam 16 kökenin ilgili genlerinin QRDR bölgeleri PZR ile çoğaltıldı. Çalışmaya yardımcı olması amacıyla bir duyarlı köken de incelendi. Kullanılan primerler tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2: Gyr-A ve Par-C genlerinin QRDR bölgelerini hedefleyen Primer Dizileri

Primer	Dizi (5'-3')	Tm	Baz sayı
gyrA F	5'-AAA TCT GCT CGT GTC GTT GG-3'	68 °C	20
gyrA R	5'-GCC ATA CCT ACA GCA ATA CC-3'	68 °C	20
parC F	5'-AAG CCC GTA CAG CGC CGT ATT-3'	72 °C	21
parC R	5'-AAA GTT ATC TTG CCA TTC GCT-3'	64 °C	21

2.2.6.1. Gyr-A Geninin Araştırılması

Seçilen 16 köken ve bir duyarlı kökenin gyr-A gen bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı.

Her bir örnek için reaksiyon karışımı 50 µl olacak şekilde hazırlandı.

10X Taq Buffer	1X	
dNTP	200	µM
gyr A forward	100	µM
gyr A reverse	100	µM
Taq Polimeraz	1.5	U
Ekstraksiyon ürünü	3	µl
Steril Distile Su	39,75	µl

PZR ürünü içeren ependorflar ısı döngü cihazına (Techne) yerleştirildikten sonra aşağıda belirtilen sıcaklıklarda 36 döngü gerçekleştirildi.

95 °C'de 1 dakika ön denatüresyon
95 °C'de 30 saniye denatürasyon
55 °C'de 30 saniye birleşme
72 °C'de 2 dakika uzama
72 °C'de 10 dakika son uzatma

2.2.6.2. Par-C Geninin Araştırılması

Seçilen 16 köken ve bir duyarlı kökenin par-C gen bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı.

Her bir örnek için reaksiyon karışımı 50 µl olacak şekilde hazırlandı.

10X Taq Buffer	1X	
dNTP	200	µM
par C forward	100	µM
par C reverse	100	µM
Taq Polimeraz	1.5	U
Steril Distile Su	39,75	µl
Ekstraksiyon ürünü	3	µl

PZR ürünü içeren ependorflar ısı döngü cihazına (Techne) yerleştirildikten sonra aşağıda belirtilen sıcaklıklarda 36 döngü gerçekleştirildi.

95 °C’de 1 dakika ön denatüresyon

95 °C’de 30 saniye denatürasyon

58 °C’de 30 saniye birleşme

72 °C’de 2 dakika uzama

72 °C’de 10 dakika son uzatma

Tüm PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

2.2.7. DNA DİZİ ANALİZİ

PZR ürünlerinin çift yönlü olarak DNA dizi analizi yaptırıldı. Analiz sonuçları hem nükleotid hem de aminoasit dizisi olarak National Center for Biotechnology Information (NCBI) ve European Bioinformatics Institute (EBI)’nin web tabanlı uygulamaları kullanılarak referans dizilerle (gyr A ve par C için *E.coli* K12 MG1655) karşılaştırıldı.

BÖLÜM III

3. BULGULAR

3.1. *A.baumannii* İzolatlarının Siprofloksasin ve Levofloksasin MİK Değerleri

Çalışmamız kapsamında incelenen toplam 81 *A.baumannii* kökeninde, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI kriterlerine göre CIP'e 2 köken duyarlı, 79 köken dirençli bulundu. LEV'e 3 köken duyarlı, 10 köken orta duyarlı, 68 köken dirençli bulundu. CIP MİK50 ve MİK90 değerlerinin 256 ve ≥ 256 , LEV MİK50 ve MİK90 değerlerinin ise 32 ve 128 olduğu belirlendi. İncelenen kökenlerin CIP ve LEV MİK değerleri tablo 3 ve tablo 4'te belirtilmiştir.

Tablo 3: *A.baumannii* kökenlerinin siprofloksasin MİK değerleri

MİK ($\mu\text{g/ml}$)	≥ 256	128	64	32	16	8	0,25	0,0625
İzolat Sayısı (toplam:81)	42	16	11	6	3	1	1	1

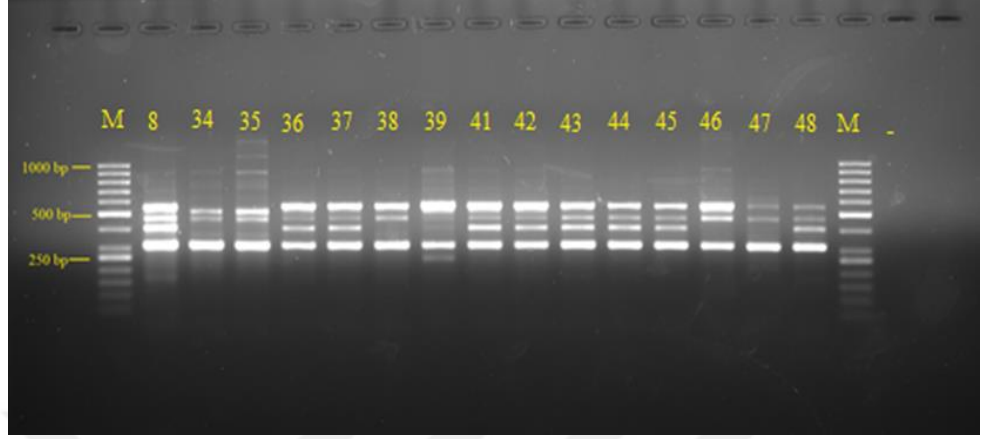
Tablo 4: *A.baumannii* kökenlerinin levofloksasin MİK değerleri

MİK ($\mu\text{g/ml}$)	≥ 256	128	64	32	16	8	4	2	0,25
İzolat sayısı (toplam:81)	6	8	15	17	7	15	10	1	2

3.2. *A.baumannii* İzolatlarının Klonal Yakınlıkları

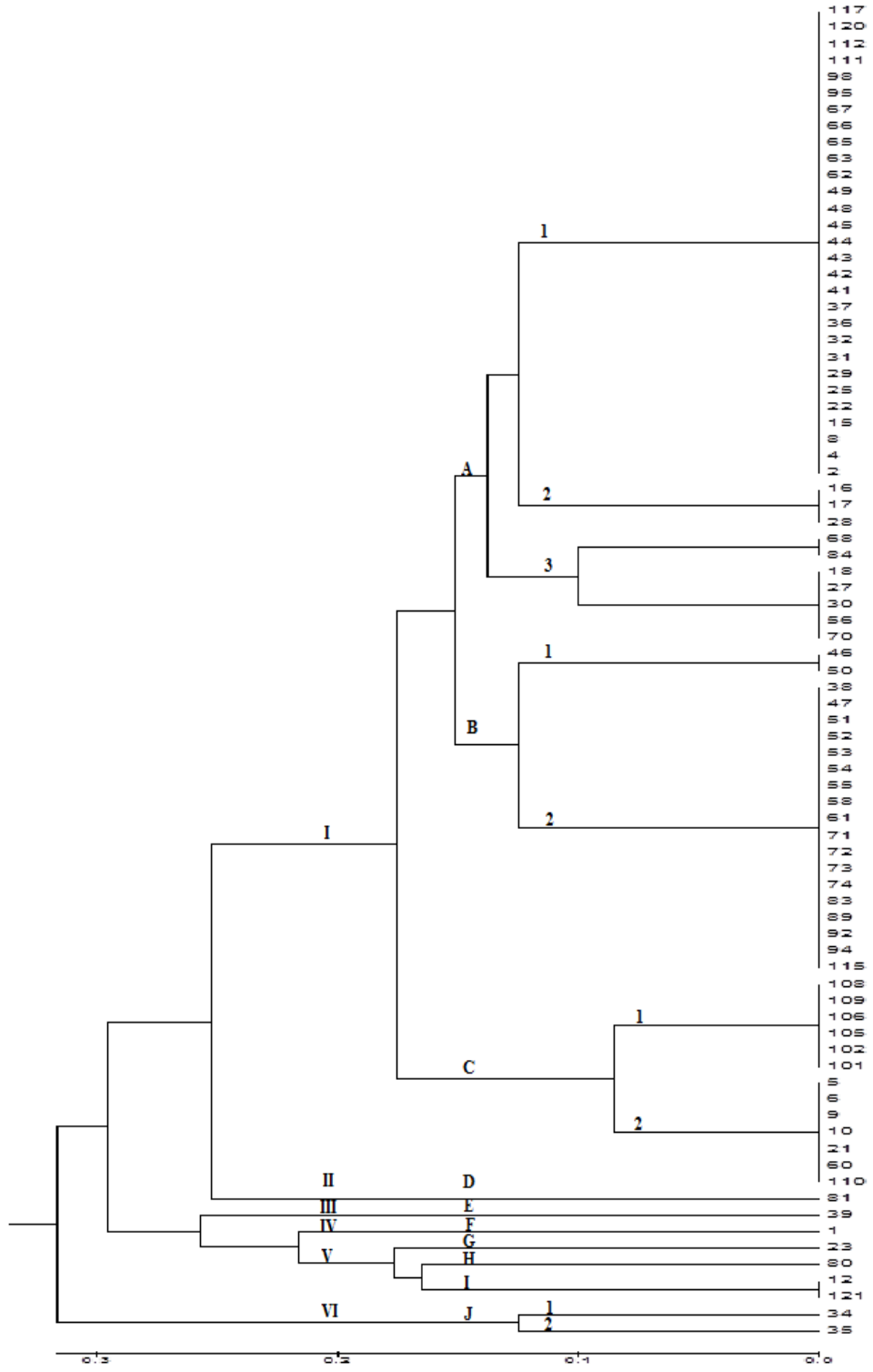
81 *A.baumannii* izolatının klonal yakınlığı ERIC dizilerine özgü ERIC 2 primeri kullanılarak PZR ile araştırıldı. Buna göre kökenlerde çoğunlukla 3 ila 6 sayıda bant oluştuğu gözlemlendi. Kökenlerin tamamında 300 bp'lık bant saptandı.

Ayrıca 76 kökünde (%93,82) 550 bp, 74 kökünde (%91,35) 475 bp, 52 kökünde (%64,19) 400 bp'lık bant belirlendi (Şekil 3).



Şekil 3: Bazı *A. baumannii* suşlarının ERIC PZR sonucu oluşan bant paternleri (M: Marker, - : Negatif kontrol)

Kökenlerin 6 ana grup (I-VI) ve 10 farklı klon (A-J) altında toplandığı belirlendi (Şekil 4). ‘A’ klonunun 39 üyesi ile en büyük klon olduğu ve 3 alt tipe (1-3) ayrıldığı gözlemlendi. A1 subtipinin en fazla üyeye sahip olduğu ve subtiplerin hepsinin kendi içerisinde % 100 bant profil benzerliği gösterdiği belirlendi. ‘B’ klonu 20 üye ve 2 subtipte, ‘C’ klonu 13 üye ve 2 subtipte ayrıldı. ‘I’ ve ‘J’ klonlarında ikişer üye bulunurken, 5 klonda (D,E,F,G,H) ise tek üye bulunduğu gözlemlendi.



Şekil 4: *A.baumannii* kökenlerine ait dendrogram

(Ana Gruplar: I-VI, Klonlar: A-J)

3.3. *A.baumannii* İzolatlarının Efluks Pompa Aktiviteleri

10 farklı klona ve alt tiplere ayrılmış izolatlardan, her klon ve subtipi temsil edecek şekilde seçilen 16 köken ve değerlendirmeye yardımcı olması amacıyla kullanılan florokinolon duyarlı bir kökende, efluks pompa inhibitörlerinin CIP ve LEV MİK değerlerine etkisi belirlendi. NMP ile 5, CCCP ile 7 kökenin MİK değerlerinde en az 4 katlık azalma görüldü. MİK değerlerinde herhangi bir azalma görülmeyenler ile çeşitli derecelerde (2-4 kat ve üzeri) azalma görülen kökenler tablo 5 ve tablo 6’da belirtilmektedir.

Tablo 5: Efluks pompa inhibitörlerinin siprofloksasin MİK değerlerine etkisi

MİK değişimi	Köken sayısı		
	Azalma yok	2 kat azalma	4 kat ve üzeri azalma
Siprofloksasin +NMP	9	5	3
Siprofloksasin +CCCP	9	3	5

Tablo 6: Efluks pompa inhibitörlerinin levofloksasin MİK değerlerine etkisi

MİK değişimi	Köken sayısı		
	Azalma yok	2 kat azalma	4 kat ve üzeri azalma
Levofloksasin+NMP	9	6	2
Levofloksasin+CCCP	11	4	2

Seçilen 16 köken ve duyarlı bir köken ile yapılan florometrik akümülayon deneyinde, efluks pompa inhibitörü NMP’nin EtBr absorbans değerleri üzerine etkisi incelendi. On bir kökenin absorbans değerlerinde 4 kat ve üzeri azalma görüldü. 5 kökende ve duyarlı kökende absorbans değerlerinde bir değişim saptanmadı. NMP’li ve NMP’siz ortamlarda, absorbans değerlerindeki değişime ait veriler tablo 7’de görülmektedir.

Tablo 7: NMP'nin absorbans değerlerine etkisi

Köken numarası	NMP'li	NMP'siz	4 Kat ve üzeri azalma
1	21,2115	8,7082	-
6	28,8177	3,8107	+
12	30,0233	5,4203	+
16	25,3154	4,2344	+
21*	10,3792	10,705	-
23	23,6553	4,8151	+
30	36,4397	5,3131	+
34	16,7053	4,6920	+
35	20,2033	6,1708	-
39	29,4273	6,7377	+
45	31,5570	4,6159	+
50	24,4571	6,9271	+
58	26,2514	9,6419	-
68	31,4902	4,9649	+
80	33,414	9,2025	-
81	14,7581	5,7792	-
105	32,1113	4,0294	+

*: Duyarlı köken

3.4. Gyr-A ve Par-C Genlerindeki Mutasyonlar

Her klon ve subtipleri temsilen seçilen 16 köken ve florokinolon duyarlı bir kökenin gyr-A ve par-C genlerinin QRDR bölgeleri PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünlerinin çift yönlü DNA analizi yaptırılarak dizilimleri belirlendi. DNA dizileri hem nükleotit hem de aminoasit düzeyinde referans dizilerle (*E.coli* K12 MG1655) karşılaştırılarak, bu genlerdeki mutasyonlar belirlendi.

Gyr-A geninde Ser 83 Leu mutasyonu 14 kökende görüldü. Duyarlı kökende bu mutasyona rastlanmadı. Ayrıca QRDR bölgesine dahil olan Aspartat (Asp) 87 Glutamat (Glu), Prolin (Pro) 95 Asp, Metiyonin (Met) 101 Leu mutasyonları tüm kökenlerde saptandı.

Par-C geninde Ser 80 Leu mutasyonu 13 kökende görüldü. Duyarlı kökende bu mutasyona rastlanmadı Ayrıca QRDR bölgesinde yer alan Valin (Val) 100 İzölösün (Ile) ve Asp 101 Glu mutasyonları tüm kökenlerde görüldü. Kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları ve saptanan mutasyonları tablo 8’de belirtilmektedir.



Tablo 8: Seçilen *A. baumannii* kinolon duyarlılıkları, efluks pompa aktivitesi ve saptanan mutasyonlar

Köken Numarası	Duyarlılık (CIP/LEV)	Efluks Pompa Aktivitesi**	Gyr-A	Par-C
1	R/R	-	D87E,P95D,M101L	V100I,D101E
6	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
12	R/R	+	D87E,P95D,M101L	V100I,D101E
16	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
21*	S/S	-	D87E,P95D,M101L	V100I,D101E
23	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	V100I,D101E
30	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
34	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
35	R/R	-	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
39	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
45	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
50	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
58	R/R	-	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
68	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
80	R/R	-	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
81	R/R	-	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E
105	R/R	+	S83L,D87E,P95D,M101L	S80L,V100I,D101E

*: Duyarlı köken CIP:Siprofloksasin LEV:Levofloksasin R:Direnç S:Duyarlı

S:Serin L:Lösin D:Aspartat E:Glutamat P:Prolin M:Metionin V:Valin I:İzolösin

** : Hem mikrodilüsyon hemde spektrofotometrik akümülayon yöntemi ile pozitif sonuç veren kökenler alınmıştır.

BÖLÜM IV

4. TARTIŞMA

Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin yoğun olarak kullanılması sonucu ÇİD bakteri oranlarında önemli bir artış gözlenmiş ve bu dünyada en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Gram negatif bakteriler içinde özellikle *Enterobacteriaceae* üyeleri, *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerindeki antibiyotik direnci, neden oldukları enfeksiyonların tedavisini çok zor, kimi zaman da imkansız hale getirmektedir. Bu bakteriler hastane enfeksiyonlarında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır.

Acinetobacter cinsi içerisinde hastane enfeksiyonu etkeni olarak en sık izole edilen ve antibiyotik direnci açısından problem oluşturan tür *A. baumannii*'dir. *A. baumannii*; toprak, su, yiyecek gibi farklı ortamlarda yaşayabilme, dış ortamda uzun süre canlı kalabilme özelliğine sahip fırsatçı bir patojendir. Çeşitli genetik elemanlarla aktarılabilen direnç mekanizmaları *A. baumannii* izolatları arasında hızla yayılabilmekte ve tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır.

Acinetobacter 'lerde kinolon direncini araştıran çalışmalar, 1980'li yıllardan sonra yoğunluk kazanmıştır. Bu da, son 20-25 yıl içerisinde *A. baumannii*'nin florokinolon ve diğer antibiyotiklere direnç profilindeki değişimi izleme olanağı sunmaktadır. Florokinolonların bir üyesi olan CIP ile *Acinetobacter* 'lerde yapılan çalışmalarda direnç oranları; 1990'da Almanya'da %5, 1994-1995 yılları arasında Belçika'da %18, 1996-1999 yılları arasında Türkiye'de %67, 2001-2004 yılları arasında Asya ve Orta Doğu'da %45, 2002-2004 yılları arasında Avrupa'da çok merkezli bir çalışmada %52.4 ve 2009 yılında Kore'de %67 olarak saptanmıştır (9,47,76).

Yurt içinde yapılan çalışmalarda da Gazi ve ark. (77) 2000 yılında %55.2 olan CIP direncini 2004'te %68.5, Avcı ve ark. (78) 2000-2003 yılında %63 olan direnci 2003-2005 yıllarında %95, Gülhan ve ark.(79) 2004'te %54 olan direnci 2006'da %82 olarak bulmuştur (7,9,35). Bu veriler Türkiye'de zaman içerisinde *Acinetobacter* izolatlarında kinolonlara karşı direncin arttığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda incelenen *Acinetobacter* kökenlerinde de CIP ve LEV MİK

değerlerinin yüksek olması artan florokinolon direncinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda, 81 kökende CIP ve LEV MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Duyarlı olanlar da dahil olmak üzere kökenlerin CIP MİK değerlerinin 0,062 ile ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$, LEV MİK değerlerinin ise 0,25 ile ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ aralığında olduğu belirlenmiştir. İncelenen kökenlerde MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin CIP için 256 ve ≥ 256 aynı değerlerin LEV için 32 ve 128 olduğu saptanmıştır. CIP MİK değeri ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ olan köken sayısı 75 iken, LEV MİK değeri ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ olan köken sayısı 46'dır. Bu dağılım, incelenen *Acinetobacter* kökenlerinde genel olarak CIP MİK değerlerinin LEV MİK değerlerine göre yüksek olduğunu göstermektedir.

Yurt dışında yapılan bazı çalışmalara da bakıldığında Valentine ve ark.(80) 2008'de yaptığı çalışmada CIP MİK değer aralığı 16 ile 256 $\mu\text{g/ml}$, LEV MİK değer aralığı 0.25 ile 64 $\mu\text{g/ml}$, 2012 yılında Liu ve ark.(6) yaptığı başka bir çalışmada CIP MİK değer aralığı 0,25 ile 64 $\mu\text{g/ml}$, LEV MİK değer aralığı 0,25 ile 16 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bu çalışmalarda CIP MİK değerlerinin LEV MİK değerlerine göre yüksek olduğu görülmekte ve bulgularımızla uyum göstermektedir.

Hastane enfeksiyonu etkeni olan bakteriler arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması, salgın kaynaklarının belirlenmesi, dirençli kökenlerin yayılımı ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması açısından önem taşımaktadır. Bakterilerin tiplendirilmesi için fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemlerin güvenilirlik ve ayırım gücü düşüktür. Genotipik yöntemlerde güvenilirliğin ve ayırım gücünün yanı sıra tekrarlanabilirliğin de yüksek olması, bu yöntemin daha sık tercih edilmesini sağlamıştır.

Günümüzde bakterilerin genotiplendirilmesinde PFGE ve PZR temelli yöntemler sıklıkla tercih edilmektedir. Restriksiyon enzimi kullanılarak uygulanan PFGE yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Maliyetin yüksek olması, uygulanma süresinin uzun olması, emek yoğun bir çalışma gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir. PZR temelli yöntemler ise kolay uygulanabilen, uygun ayırt etme gücüne sahip, hızlı sonuç veren düşük maliyetli yöntemlerdir. Literatürlerde

ERIC PZR'ın PFGE'den sonra *A.baumannii* tür ayrımında verimli, güvenilir, kabul gören ve kullanılan bir yöntem olduğu belirtilmektedir (2,71,81,82).

Bu çalışmada kökenlerin klonal ilişkisinin saptanmasında ERIC PZR yöntemi çift tekrarlı olarak uygulanmış, 81 *A. baumannii* kökeninin 6 farklı ana gruba ve 10 farklı klona ayrıldığı belirlenmiştir. 39 üyeli "A" klonu ile 20 üyeli "B" klonunun aynı ana gruba (I) dahil olması, incelenen kökenlerin çoğunlukla klonal bir yakınlık içinde olduğunu göstermektedir. Kökenlerin 4 ay gibi kısa sürede toplanması ve hastane enfeksiyonu etkeni olmaları nedeniyle böyle bir dağılımın olduğu düşünülmektedir.

Acinetobacter'lerde ERIC PZR ile tiplendirme yapılan çalışmalarda; Ece ve arkadaşlarının (81) 33 izolatta 7 klon, Eraç ve ark.(83) 65 izolatta 7 klon, Eser ve ark. (82) 51 izolatta 9 klon saptadıkları ve bakterilerin klonal yayılım gösterdiği rapor edilmiştir.

A. baumannii kökenlerinde florokinolonlara karşı birçok mekanizmayla direnç gelişebilmektedir. Bu mekanizmalardan biri gyr-A ve par-C genlerinde görülen mutasyonlardır. Öncelikle gyr-A geninde görülen mutasyonlar direnç gelişimine neden olurken, tek başına par-C'de olan mutasyonlar direnç gelişiminde rol oynamamaktadır.

Çalışmamızda her bir klon ve subtipi temsil eden 16 köken ile florokinolon duyarlı bir kökenin gyr-A ve par-C genlerindeki mutasyonlar dizi analizi ile belirlenmiştir. İncelenen kökenlerin tümünün gyr-A geninde, 13 kökenin ise par-C geninde direnç gelişimine neden olabilecek önemli mutasyonlar saptanmıştır. S83L mutasyonu, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere kinolon dirençli tüm Gram-negatif bakterilerin gyr-A geninde en sık karşılaşılan mutasyondur (56). Çalışmamızda, S83L mutasyonu olan tüm kökenlerde aynı zamanda D87E mutasyonu da gözlenmiştir. Bu mutasyon da yine kinolon dirençli izolatlarda sıklıkla karşılaşılan bir mutasyondur (56). Gyr-A bölgesinde S83L mutasyonu görülen 14 kökenin 13'ünde aynı zamanda par-C bölgesinde de mutasyon (S80L) saptanmıştır.

Klinik Acinetobacter izolatları ile yapılan bir çalışmada 49 kökende gyr-A, 25 kökende ise hem gyr-A hem de par-C genlerinde mutasyon görülmüştür (58). Valentine ve ark. (80)'ın çalışmasında, 20 kökende gyr-A, 19 kökende hem gyr-A hem de par-C mutasyonu bulunmuştur. Aralarında klonal yakınlık olduğu bilinen

örneklerle yapılan bir diğer çalışmada 5 kökende gyr-A, 3 kökende hem gyr-A hem de par-C mutasyonları görülmüştür (5). Bu çalışmalar incelendiğinde gyr-A'da görülen mutasyon oranlarının par-C'ye göre daha fazla olduğu, yalnız gyr-A'da mutasyon olabilmesine rağmen yalnız par-C'de nadiren mutasyon görüldüğü dikkat çekmektedir. Çalışmamızda elde edilen veriler de bu genel prensiplerle paralellik göstermektedir.

Kinolon direncinden en sık sorumlu olabileceği düşünülen mutasyonlar gyr-A'da Ser83Leu, par-C'de Ser80Leu mutasyonlarıdır. Ayrıca bazı çalışmalarda gyr-A'da Glisin(Gly)81Val, Alanin(Ala)84Pro ve Asp87Val/Gly ile, par-C'de Ser56Asparajin(Asn), Glu84Lizin(Lys) mutasyonları gözlenmiştir (6,5,67,56,57,84,58,80,85).

Çalışmamızdaki kökenlerde en sık rastlanan mutasyonlar olan; gyr-A'da Ser83Leu ve Asp87Glu ile par-C'de Ser80Leu mutasyonları görülmüştür. Gyr-A geninde çoğunlukla Asp87Val/Gly şeklinde ortaya çıkan mutasyon, tüm kökenlerimizde Asp87Glu olarak bulunmuştur. Bu mutasyonun duyarlı kökenimizde de bulunması, florokinolon direnci gelişiminde tek başına yeterli olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Aynı mutasyonu gösteren kökenlerde farklı MİK değerlerinin saptanmış olması ve dirençli olan kökenlerden 2 tanesinde (no:1,12) literatürde belirtilen gyr-A ser83Leu ve par-C Ser80Leu mutasyonlarının görülmemesi bu izolatlarda kinolon direncinde farklı mekanizmaların görev aldığına işaret etmektedir. Ayrıca QRDR bölgeleri içinde bulunmasına rağmen direnç gelişimine katkıda bulunmadığı belirtilen gyr-A'da Pro95Asp ve Met101Leu mutasyonları ile Par-C'de Val100Ile ve Asp101Glu mutasyonları bulunmuştur.

Florokinolonlara karşı bir diğer önemli direnç mekanizması, genellikle RND ailesine ait eflüks pompalarının aşırı ekspresyonudur. Eflüks pompa inhibitörleri 3 farklı yolla etkilerini gösterebilir. Bu etkiler; pompa proteinleri ile etkileşime girme, CCCP'nin etkisinde olduğu gibi pompanın aktivitesi için gerekli olan proton motive gücün engellenmesi ve pompa genlerinin ekspresyonunu inhibe edebilme olarak sıralanabilir (86). Gram negatif bakterilerde pompa inhibitörü etkisi gösteren birçok madde bulunmaktadır. Geniş spektrumlu RND inhibitörü olan PAßN CIP'e karşı düşük seviyede etki gösterdiği için bu çalışmada kullanılmamıştır (39). Onun yerine klinik izolatlarda daha aktif olarak RND tipi eflüks pompasını inhibe ettiği bilinen

NMP ve CCCP'nin kullanımı tercih edilmiştir. Bu inhibitörlerle yapılan çalışmalarda birbiri ile yakın sonuçlar elde edildiği görülmüştür (65,67,87).

EtBr; AdeABC tipi efluks pompası için substrat olarak kabul edilmekle beraber bakterinin DNA'sına bağlanarak floresans oluşmasını sağlar. Benzer çalışmalarda EtBr yerine bisbenzimid'in kullanıldığı belirtilmiştir. Bisbenzimid adenin ve timin yoğunluklu bölgelere bağlanma eğilimi gösterdiğinden kullanılması tercih edilmemiştir (88).

Çalışmamızda, efluks pompa aktivitesini saptamak için hem mikrodilüsyon yöntemi hem de florometrik akümülyasyon yöntemi kullanılmıştır. Sadece MİK değerindeki anlamlı azalmaya bağlı olarak efluks pompa aktivitesi bulunan 7 köken ve sadece florometrik olarak aktivite belirlenen 11 kökene karşılık, her iki yöntem ile 5 kökende aşırı pompa ekspresyonu saptanmıştır.

CIP'in NMP ve CCCP ile kombinasyonlarının MİK değerleri dikkate alındığında, NMP ile 3 köken, CCCP ile 5 kökende (sadece birer köken aynı olmak üzere); LEV ile NMP ve CCCP kombinasyonlarına bakıldığında ise, NMP ve CCCP ile aynı 2 kökende efluks pompa aşırı ekspresyonu görülmüştür. Her iki yöntemle de efluks pompa aktivitesi saptanan 5 köken dikkate alındığında, aşırı ekspresyonu saptamada en iyi sonuç veren antibiyotiğin CIP olduğu saptanmıştır. Bazı kökenlerde NMP, bazı kökenlerde CCCP ve bazı kökenlerde de her iki inhibitör ile azalma görülmesi; bu iki inhibitörün farklı mekanizmalar ya da RND dışında farklı efluks pompaları üzerine de etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca bu inhibitörlerin değişik tip pompalar üzerine farklı oranda etkinlik gösterdiği de ileri sürülmüştür (32,118).

Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında; Schumacher ve ark. (87) efluks inhibitörü olarak CCCP ve NMP karşılaştırılmış, CCCP'nin aktivitesinin NMP'den fazla olduğu belirtilmiştir. Valentine ve ark.(80) çalışmalarında NMP aktivitesinin istenilen kriterlerde hatta daha da üzerinde olduğunu belirtmiştir. Çoban ve ark. (89) NMP aktivitesinin tüm izolatlarda etkili olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızdaki veriler ışığında, NMP ve CCCP'nin efluks pompa aşırı ekspresyonunu göstermek açısından aralarında bir fark olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızda hastane kaynaklı ve hemen hemen hepsi CIP dirençli 81 *A. baumannii* izolatı incelenmiş, genel olarak CIP MİK değerlerinin LEV

MİK değerlerine göre yüksek olduğu saptanmıştır. İncelenen *A. baumannii* kökenlerinin 10 farklı klona ayrıldığı belirlense de, bunların büyük çoğunluğunun birbiriyle ilişkili klonlar altında toplandığı, yani klonal olarak ilişkili oldukları gösterilmiştir. Her klonu ve alt tipi temsil edecek şekilde seçilen 16 kökende gyr-A ve par-C genlerindeki mutasyonlar araştırılmış, bu kökenlerin tümünün gyr-A geninde, 13 kökenin ise par-C geninde direnç gelişimine neden olabilecek önemli mutasyonlar saptanmıştır. Literatürde de sıklıkla rapor edilen bu mutasyonlar; gyr-A'da Ser83Leu ve Asp87Glu ile par-C'de Ser80Leu mutasyonlarıdır. Temsilci kökenlerde efluks pompalarının aşırı ekspresyonu hem mikrodilüsyon hem de florometrik akümülayon yöntemleriyle araştırılmış, sadece mikrodilüsyon yöntemiyle 7 köken ve sadece florometrik olarak 11 kökende, her iki yöntemle ise 5 kökende aşırı pompa ekspresyonu saptanmıştır. Mikrodilüsyon yönteminde aşırı ekspresyonu saptamada en iyi sonuç veren antibiyotiğin CIP olduğu belirlenmiştir. İncelenen hastane kaynaklı ve klonal olarak ilişkili *A. baumannii* izolatlarında gözlenen yüksek florokinolon MİK değerlerine, gyr-A ve par-C genlerindeki mutasyonların yanı sıra, efluks pompalarının aşırı ekspresyonunun yol açtığı sonucuna varılmıştır.

BÖLÜM V

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Acinetobacter türleri genellikle nozokomiyal enfeksiyonlarda rol oynayan fırsatçı patojenlerdendir. Birçok tür klinik olarak izole edilmesine karşın, *A. baumannii* insan enfeksiyonları açısından büyük öneme sahiptir. Enfeksiyonların tedavisi, bakterinin sahip olduğu doğal ve sonradan kazandığı direnç mekanizmalarından dolayı güçtür. Kazanılmış dirençte, dış membran proteinlerindeki değişim, efluks pompalarının aşırı ekspresyonu, hedef bölge mutasyonu ve antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin üretimi gibi farklı mekanizmalar rol almaktadır. *A. baumannii*'nin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde genellikle, karbapenemler başta olmak üzere beta-laktam ajanlar ve sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri, aminoglikozitler ve polimiksinler kullanılmakta, ayrıca kombine antibiyotik kullanımı da gündeme gelmektedir. Ancak dünya genelinde artan direnç oranları, akılcı antibiyotik kullanımını zorunlu kılmakta, florokinolonlar gibi alternatif ajanları değerlendirmeyi gerektirmektedir. Bu açıdan, *A. baumannii* izolatlarında florokinolon direnç mekanizmalarının araştırılması önem taşımaktadır.

Çalışmamızda incelenen hastane kaynaklı *A. baumannii* izolatlarının çoğunlukla klonal olarak ilişkili olduğu ve yüksek florokinolon MİK değerlerine sahip oldukları ortaya konmuştur. Ayrıca, genel olarak CIP MİK değerlerinin LEV MİK değerlerine göre yüksek olduğu da saptanmıştır. Seçilen 16 temsilci kökenin *gyr-A* ve *par-C* genlerindeki mutasyonlar araştırılmış, bu kökenlerin tümünün *gyr-A* geninde, 13 kökenin ise *par-C* geninde direnç gelişimine neden olabilecek önemli mutasyonlar saptanmıştır. Temsilci kökenlerden çoğunda mikrodilüsyon ve/veya florometrik akümülayon yöntemiyle aşırı pompa ekspresyonu tespit edilmiştir. Çalışmamız kapsamında incelenen *A. baumannii* kökenlerindeki florokinolon direncinde, *gyr-A* ve *par-C* genlerindeki mutasyonlarla birlikte efluks pompalarının aşırı ekspresyonunun da rol aldığı sonucuna varılmıştır. Efluks pompalarının aşırı ekspresyonu, florokinolonlar dışındaki antibiyotiklere de direnç gelişimine yol

açacaktır. Dolayısı ile florokinolon direnci ÇİD *A. baumannii* kökenlerinin bir habercisi niteliğindedir.

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de *A. baumannii* kökenlerinde bildirilen yüksek antibiyotik direnç oranları, akılcı antibiyotik kullanımı ve enfeksiyon kontrol önlemlerine uymayı zorunlu kılmaktadır. Tedavide antibiyotik kombinasyonlarının kullanılması, yeni antibiyotiklerin veya efluks pompa inhibitörü gibi ajanların geliştirilmesi hem florokinolon hem de genel olarak antibiyotik direncini kontrol altına almak için gereklidir.



BÖLÜM VI

6. KAYNAKLAR

1. Aşık G. *Acinetobacter baumannii* Virülansının Açıklanmasında Güncel Yaklaşımlar. *Mikrobiyol Bul* 2011;45:371-380.
2. Bergogne-Bérézin E, Towner K J. *Acinetobacter* spp. As nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148.
3. Copur Cicek A, Karagoz A, Koksall E, Erturk A, Ozgumus O. B, Senturk Koksall Z ve ark. *Jpn J Infect Dis* 2013;66:245-248.
4. Cortez-Cordova J, Kumar A. Activity of the efflux pump inhibitör phenylalanine-arginine β -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*. *Int J of Antimicrob Ag* 2011;37:420–424.
5. Pannek S, Higgins P. G, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert J. A et. al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide. *J Antimicrob Chemoth* 2006;57:970–974.
6. Liu Y, Kuo S, Lee Y, Chang I. C. Y, Yang S, Chen T et. al. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *J Microbiol Immunol* 2012;45:108-112.
7. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator R. D. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 2012;3:243–250.
8. Özinel M. A. Enterobacteriaceae. İçinde: Topçu A. W, Söyletir G, Doğanay M, Editörler. *Enfeksiyon Hastalıkları Ve Mikrobiyolojisi Cilt 1 Nobel Tıp Kitabevleri 3. Baskı İstanbul, 2008;2195-2200.*
9. Peleg A. Y, Seifert H, Paterson D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538.
10. Bartual S. G, Seifert H, Hippler C, Angeles Domínguez Luzon M, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence

Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2005;43:4382.

11. Munoz-Price L. S, Weinstein R. A. *Acinetobacter* Infection. N Engl J Med 2008;358:1271-81.
12. Doughari H. J, Ndakidemı P. A, Human I.S, Benade S. The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. Microbes Environ 2011;26:101–112.
13. Ustaelebi, ř. Enterobacteriaceae, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneř Kitabevi, 1999;542-543.
14. Towner K. The Genus *Acinetobacter*. In: Prokaryotes, 2006;6:746–758.
15. Jawad A, Hawkey P. M, Heritage J, Snelling A. M. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a New Selective and Differential Medium for Isolation of Clinically Important *Acinetobacter* spp., and Comparison with Herellea Agar and Holton's Agar. J Clin Microbiol 1994;2353-2358.
16. Ersavař H. Çeşitli Antibiyotik Kombinasyonlarının oęul İlaç Dirençli *Acinetobacter Baumannii* Suşlarına İn-vitro Etkileri, Uzmanlık Tezi. 2009.
17. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2008;2195-2201.
18. Jawad A, Seifert H, Snelling A. M, Heritage J, Hawkey P. M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. J Clin Microbiol 1998;36:1938.
19. Paterson D. L. The Epidemiological Profile of Infections with Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. Clin Infect Dis 2006;43:8.
20. D'Agata E. M.C, Thayer V, Schaffner W. An Outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The Importance of Cross-Transmission. Infect Cont Hosp Ep 2000;21:9:588-591.
21. Joly-Guillou M.-L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2005;11:868–873.

22. Gaddy J. A, Actis L. A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 2009;4:273–278.
23. Vahaboğlu H, Sarıbaş S, Akbal H, Öztürk R, Yücel A. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:269-270.
24. Anstey N.M, Currie B.J, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. Community-Acquired Bacteremic *Acinetobacter* Pneumonia in Tropical Australia Is Caused by Diverse Strains of *Acinetobacter baumannii*, with Carriage in the Throat in At-Risk Groups. *J Clin Microbiol* 2002;685–686.
25. Kempf M, Rolain J. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J of Antimicrob Ag* 2012;39:105–114.
26. Hartzell J. D, Kim A. S, Kortepeter M. G, Moran K. A. *Acinetobacter* Pneumonia: A Review. *Medscape* 2015;6. Available from: http://www.medscape.com/viewarticle/557767_print.
27. Ho P, Cheng V. C, Chu C. Antibiotic Resistance in Community-Acquired Pneumonia Caused by *Streptococcus pneumoniae*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*. *Chest* 2009;136:1119–1127.
28. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editor. *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier, 2010;2881-2885.
29. Yoon Y. K , Lee J, Ryu S. Y, Chang H, Choi W. S, Yoon J. H et. al. Clinical significance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from central venous catheter tip cultures in patients without concomitant bacteremia. *Scand J Infect Dis* 2013;45:900–906.
30. Tuon F. F, Penteado-Filho S. R, Amarante D, Andrade M. A, Borba L. S. Mortality rate in patients with nosocomial *Acinetobacter* meningitis from a Brazilian hospital. *Braz J Infect Dis* 2010;14:437-440.

31. Towner K. J. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* 1997;46:721-746.
32. Gordon N. C, Warehama D. W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J of Antimicrob Ag* 2010;35:219–226.
33. Falagas M. E, Kasiakou S. K. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis* 2005;40:1333–1341.
34. Arda B. Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* Olgusu. *Ankem Derg* 2010;24:78-81.
35. Lee K, Yong D, Jeong S. H, Chong Y. Multidrug-Resistant *Acinetobacter* spp.: Increasingly Problematic Nosocomial Pathogens. *Yonsei Med J* 2011;52:879-891.
36. Arman D. Yoğun Bakımda Gram Negatif Bakteri Sorunu. *Ankem Derg* 2009;23:148-156.
37. Şahin E, Yürüken Z, Göçmen J. S. Toplumda kazanılmış çoklu ilaç dirençli nonfermentatif gram negatif bakterilerde duyarlılık sonuçları. *Pam Tıp Derg* 2012;5:15-19.
38. Falagas M. E, Karageorgopoulos D. E. Pandrug Resistance (PDR), Extensive Drug Resistance (XDR), and Multidrug Resistance (MDR) among Gram-Negative Bacilli: Need for International Harmonization in Terminology. *Clin Infect Dis* 2008;46:1121–1122.
39. Georgopapadakou N. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, editors. *Principles and Practice of Pediatrics Infectious Diseases*. 2nd ed. Churchill Livingstone: Philadelphia p. 1432-1442.
40. Bonomo R. A, Szabo D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006;43:49–56.
41. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?. *Int J of Antimicrob Ag* 2008;32:106–119.

42. Livermore D. M. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean J Intern Med* 2012;27:128-142.
43. Cohen F. L, Tartasky D. Microbial resistance to drug therapy: A review. *Am J Infect Control* 1997;25:51-64.
44. Thomson J. M, Bonomo R. A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: b-lactams in peril!. *Curr Opin Microbiol* 2005;8:518–524.
45. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010;300:371–379.
46. Çiftci İ.H, Aşık G. *Acinetobacter baumannii*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. *Ankem Derg* 2011;25:196-207.
47. Looveren m. V, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:684–704.
48. Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar. İçinde: Dökmeci İ, editör. *Kemoterapötik ilaçlar Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul*; 1992;705–786.
49. Perez F, Hujer A. M, Hujer K. M, Decker B. K, Rather P. N, Bonomo R. A. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3471.
50. Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemoth* 2003;52:477–480.
51. Çalık N, Akova M. Tigesiklin. *Ankem Derg* 2007;21:29-33.
52. Ulusoy S. Tigesiklin. *Ankem Derg* 2006;20:117-119.
53. Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemoth* 2007;59:772–774.
54. Akalın H. Kolistin. *Ankem Derg* 2007;21:26-28.
55. Neonakis I. K, Spandidos D. A, Petinakia E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *International Int J of Antimicrob Ag* 2011;37:102–109.

56. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemoth* 2003;51:1109–1117.
57. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:377.
58. Wisplinghoff H, Decker M, Haefs C, Krut O, Plum G, Seifert H. Mutations in *gyrA* and *parC* associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemoth* 2003;51:177–180.
59. Ferrara A. M. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int J of Antimicrob Ag* 2006;27:183–195.
60. Özgür Akın F. E, Bayram A, Balcı İ. Çoğul Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Kolistin, Polimiksin b ve Tigesiklin Direncinin Saptanmasında Disk difüzyon, E-test ve Buyyon Mikrodilüsyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:203-210.
61. Jacoby G. A. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis* 2005;41:120–6.
62. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemoth* 2007;59:1210–1215.
63. Nikaido H, Page S J. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *Fems Microbiol Rev* 2012;36:340–363.
64. Lina L, Ling B, Li X. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*–*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J of Antimicrob Ag* 2009;33:27–32.
65. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:947.
66. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* –the role of *AdeABC* (RND

family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cyto* 2008;46:257-267.

67. Lopes B.S, Amyes S. G. B. Insertion sequence disruption of *adeR* and ciprofloxacin resistance caused by efflux pumps and *gyrA* and *parC* mutations in *Acinetobacter baumannii*. *Int J of Antimicrob Ag* 2013;41:117–121.
68. Yoon E, Chabane Y. N, Goussard S, Snestrud E, Courvalin P, Dé E. Et. al. Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*. 2015;3 [accessed 24 March 2015]. Available from: <http://mbio.asm.org/lookup/suppl/doi:10.1128/mBio.00309-15//DCSupplemental>.
69. Durmaz R. Direnç Gelişimini Önlemede Moleküler Mikrobiyolojinin Katkısı. *Ankem Derg* 2009;23:111-115.
70. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 1997.
71. Wilson L. A, Sharp P.M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol* 2006;23:1156–1168.
72. Tobes R, Pareja E. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. *BMC Genomics* 2006;7:62.
73. Durmaz R. DNA Amplifikasyonuna Dayalı Tiplendirme Yöntemleri: AP-PZR, RAPD, ERIC-PZR, BOX-PZR, MLVA(VNTR), XXXIII. *Türk Mikrobiyoloji Kongre Kitabı İstanbul*; 2008;52-55.
74. Levin RE. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis to *Listeria monocytogenes*: Review of Methodology and Results. *Food Biotechnol* 2003;17:217-36.
75. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 *Mol Biol Evol* 2007;24:1596–1599.

76. Iraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter* Türlerinde Antibiyotik Direnç Oranlarının İncelenmesi. *Ankem Derg* 2012;26:80-85.
77. Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, İnmez E, Dinç G, Özakkaloğlu B. Yoğun Bakım Ünitesi ve Diğer Ünitelerde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında İn-vitro Antibiyotik Direnci. *Ankem Derg* 2005;19:115-118.
78. Avcı M, Özgenç O, Coşkun A, Mermut G, Arı A. Yoğun Bakım Ünitesi'nde Hastane Enfeksiyonu Etkenleri ve En Sık Soyutlanan Mikroorganizmalarda Yıllara Göre Değişen Antibiyotik Direnç Profili. *Ankem Derg* 2007;21:179-183.
79. Gülhan B, Özekinci T, Atmaca S, Bilek H. 2004-2006 Yıllarında İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında antibiyotik Direnci. *Ankem Derg* 2007;21:32-36.
80. Valentine S. C, Contreras D, Tan S, Real L. J, Chu S, Xu H. H. Phenotypic and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Nosocomial Outbreaks in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol* 2008;2499-2507.
81. Ece G, Erac B, Cetin H. Y, Ece C, Baysak A. Antimicrobial Susceptibility and Clonal Relation Between *Acinetobacter baumannii* Strains at a Tertiary Care Center in Turkey. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8:15612.
82. Köseoğlu Eser Ö, Ergin A, Tunçkanat F, Hasçelik G. In vitro activity of tigecycline as a therapeutic option against multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. *New Microbiologica* 2008;31:535-542.
83. Eraç B, Yılmaz F. F, Hoşgör Limoncu M, Öztürk İ, Aydemir Ş. Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014;48:70-81.
84. Higgins P. G, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. In vitro activity of tigecycline as a therapeutic option against multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemoth* 2004;54:821-823.

85. Vila J, Ruiz J, Gonı P, Marcos A, Jimenez de anta T. Mutation in the gyrA Gene of Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Ch* 1995;1201–1203.
86. Webber MA, Goldham. Measuring the Activity of Active Efflux in Gram Negative Bacteria. In: Gillespie S.H., McHugh T.B. editors. *Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Methods in Molecular Biology*, Springer Science Business Media. 2010;173.
87. Schumacher A, Trittler R, Bohnert J. A, Kümmerer K, Page's J, Kern W. V. Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *J Antimicrob Chemoth* 2007;59:1261–1264.
88. Özer C. Bakterilerde Dışa-Atım Pompası Yolu İle Antimikrobiyal Direnç Gelişimini Saptamada Mikrodilüsyon Yöntemi ve bis-benzimidin Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi 2013.
89. Coban A. Y, Guney A. K, Tanriverdi Cayci Y, Durupinar B. Effect of 1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine, an Efflux Pump Inhibitor, on Antimicrobial Drug Susceptibilities of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Curr Microbiol* 2011;62:508–511.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Turgutlu/Manisa’da doğdu. İlköğrenimini Cumhuriyet İlköğretim okulunda, ortaöğretimini Arif Canpoyraz İlköğretim okulunda ve lise eğitimini Turgutlu Anadolu Lise’sinde tamamladı. 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji opsiyonu ile mezun oldu. Stajlarını özel hastane, devlet hastanesi ve adli tıp kurumunda yaptı. 2012 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

Elektronik posta adresi: glsh_glr@hotmail.com