

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNVAZİV ENFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER*
BAUMANNII SUŞLARINDAKİ DİRENÇ GENLERİNİN KLİNİĞE
YANSIMASI VE İZOLATLAR ARASINDAKİ KLONAL YAYGINLIĞIN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Barış BORAL

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2015

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNVAZİV ENFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER*
BAUMANNII SUŞLARINDAKİ DİRENÇ GENLERİNİN KLİNİĞE
YANSIMASI VE İZOLATLAR ARASINDAKİ KLONAL YAYGINLIĞIN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Barış BORAL

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Özgen ESER

ANKARA

2015

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması, gerçekleştirilmesi ve yazımı sırasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen Prof. Dr. Özgen Köseoğlu Eser'e teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca öğrenim hayatım süresince katkıları ile her zaman yanımda olan anabilim dalımızın tüm değerli hocalarına, sevgili asistan arkadaşlarıma, canım aileme ve eşime teşekkür ederim.

Dr. Barış BORAL

ÖZET

Acinetobacter baumannii enfeksiyonu tüm dünyada artmaktadır. Mikroorganizma, modern sağlık sistemlerindeki en başarılı patojenlerden biridir. *A. baumannii*'de direnç oranları son yıllarda hızla artmıştır. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'deki beş coğrafik bölgedeki yoğun bakım ünitesinde tedavi gören, invaziv *A. baumannii* enfeksiyonu olan hastaların demografik özelliklerinin araştırılması ve klinik izolatların antimikrobiyal direncinin ve moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesidir.

Çalışmada; Türkiye'de Ege, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Marmara ve Akdeniz Bölgelerindeki 10 tıp merkezinden 6 ay boyunca toplanan, yoğun bakım ünitesinde tedavi gören invaziv *A. baumannii* enfeksiyonu olan hastalardan alınan örnekler ve *A. baumannii* kolonizasyonunu belirlemek için çevresel örnekler değerlendirildi. Çalışmaya 10 merkezden toplam 164 klinik *A. baumannii* izolatı ile 4 merkezden toplam 12 çevresel *A. baumannii* izolatı dahil edildi. İzolatlar öncelikle otomatize sistemlerle tanımlandı, daha sonra konvansiyonel testlerle ve *bla*_{OXA-51} geni pozitifliği ile doğrulandı.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri CLSI M100-S24 kriterleri dikkate alınarak, 6 farklı antibiyotik (amikasin, ampicilin-sulbaktam, seftazidim, siprofloksasin, imipenem ve kolistin) kullanılarak mikrodilüsyon yöntemiyle gerçekleştirildi. İzolatlar ve merkezler arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için pulse-field jel elektroforez (PFGE) yöntemi kullanıldı.

164 hasta için atfedilebilir mortalite oranı %58 olarak belirlendi. Atfedilebilir mortalite için risk faktörleri arasında diabetes mellitus [risk oranı (HR): 2.74; p=0.026], karaciğer yetmezliği (HR: 4.27; p=0.047), kemoterapi (HR: 3.69; p=0.03) ve önceden kinolon kullanımının (HR: 3.64; p=0.01) yer aldığı görüldü.

Antibiyotik duyarlılık testleri ile PCR uygulanan 171 *A. baumannii* izolatından, 169'unun (%98.8) *bla*_{OXA-23}, beşinin (%2.9) *bla*_{OXA-58}, bunlardan birinin (%0.6) her iki geni taşıdığı ve beş (%2.9) izolatın *bla*_{PER-1} pozitif olduğu görüldü. İzolatlarda *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} tespit edilmedi. Antibiyotik direnç oranları amikasin, ampicilin-sulbaktam, seftazidim, imipenem, siprofloksasin ve kolistin için sırasıyla; %91.8, %99.4, %99.4, %99.4, %100.0 ve %1.2 olarak belirlendi.

Toplam 4 merkezden 12 çevresel *A. baumannii* izolatı; hasta masasından, lavabodan, musluktan ve pompadan izole edildi. Çok ilaca direnç gösteren çevresel ve hasta izolatlarında en duyarlı antibiyotik kolistin olarak belirlendi. Çevresel izolatları da kapsayan 173 izolatın PFGE analizi ile 87 pulstip belirlendi. 16 izolat klonal olarak ilişkisiz bulundu. Kalan 157 izolatın (%90.8), %85 benzerlik seviyesinde 14 farklı grupta (I–XIV) yer aldığı ve Grup VI (*n*=29), Grup II (*n*=24) ve Grup IX (*n*=21)'un ana gruplar olduğu görüldü. Grup VI'da yer alan izolatların tümü İç Anadolu Bölgesi'ndeki 5 merkezden elde edildi.

Bu çalışma, Türkiye'de *A. baumannii* enfeksiyonlarına yönelik olarak gelecekteki profilaktik ve terapötik seçeneklerin oluşturulmasında önemli bir temel oluşturmaktadır. İnvaziv ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarında kolistin halen en etkili antibiyotiktir ve bu hastaların tedavisinde karbapenemlerin yerine geçmiştir.

İzolatların %90.8'sinde görülen klonal ilişki, Türkiye'deki farklı bölgelerdeki invaziv çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarının dağılımının büyük farklılıklar oluşturmadığını göstermektedir.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, risk faktörleri, antimikrobiyal duyarlılık, direnç mekanizmaları, polimeraz zincir reaksiyonu, pulsed field jel elektroforezi, klonal ilişki.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii infections are increasing throughout the world. It is one of the most successful pathogen in modern healthcare system. The antibiotic resistance rates of *A. baumannii* have increased rapidly in recent years. The aim of the study is to investigate demographic characteristics of patients hospitalized in ICUs with invasive *A. baumannii* infections and the determination of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of clinical isolates from five geographical regions of Turkey.

Patients with invasive *A. baumannii* infections in ICUs and their environment for *A. baumannii* colonization were prospectively evaluated in 10 medical centers including regions of Aegean, Central, Eastern, Marmara and Mediterranean of Turkey in a six month period. A total of 164 *A. baumannii* clinical isolates from 10 centers and 12 environmental isolates from four centers were included in the study. *A. baumannii* isolates were initially identified by automated systems and then identification was confirmed with conventional tests and positivity of *bla*_{OXA51} gene. Antimicrobial susceptibility testing was performed according to CLSI M100-S24 criteria for six different antibiotics (amikacin, ampicillin-sulbactam, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem and colistin) by microdilution method. PFGE was performed to determine the genetic relatedness among the isolates and centers.

The attributable mortality rate of the 164 patients was 58.5%. The risk factors for attributable mortality contained diabetes mellitus [hazard ratio (HR): 2.74; p=0.026], liver failure (HR: 4.27; p=0.047), the use of chemotherapy (HR: 3.69; p=0.03) and previous use of quinolone (HR: 3.64; p=0.01).

Among the 171 *A. baumannii* isolates, 169 (98.8%) carried *bla*_{OXA-23}, five (2.8%) carried *bla*_{OXA-58} and one isolate (0.6%) was positive for both genes. Antibiotic resistance rates for amikacin, ampicillin-sulbactam, ceftazidime, ciprofloxacin and colistin were 91.8%, 99.4%, 99.4%, 99.4%, 100% and 1.2% respectively.

Total of 12 environmental *A. baumannii* isolates were isolated from patient's tables, sinks, taps and pumps. These isolates were obtained from four centers. Environmental isolates were multidrug resistant (MDR) and colistin was the most susceptible antibiotic both in the patient isolates and the environmental isolates. PFGE analysis of 173 isolates including environmental ones, showed 87 pulsotypes. Sixteen isolates were found to be clonally unrelated. PFGE revealed that 157(90.8%) of the isolates were in 14 different clusters (I–XIV) at a similarity level of 85% and cluster VI (*n*=29), II (*n*=24) and IX (*n*=21) were the major ones. The isolates in cluster VI were all from the five medical centers in Central Anatolia region.

This study provides an important baseline to assess the future prophylactic and therapeutic options in *A. baumannii* in Turkey. Colistin is still the most effective antibiotic in invasive MDR *A. baumannii* infections and replaced carbapenems as the cornerstone of therapy in patients with invasive MDR *A. baumannii* infections. Clonal relatedness in 90.8% of the isolates suggested that the distribution of invasive *A. baumannii* isolates from different regions of Turkey was not diverse verifying multidrug resistance in all clusters.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, risk factors, antimicrobial susceptibility, resistance mechanisms, polymerase chain reaction, pulsed field gel electrophoresis, clonal relatedness.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
TABLolar	ix
ŞEKİLLER	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Taksonomi ve Tarihçe	3
2.2. Mikrobiyolojik, Metabolik Özellikler ve Laboratuvar Tanısı	4
2.3. <i>A. baumannii</i> Epidemiyolojisi	6
2.4. <i>A. baumannii</i> 'de Antimikrobiyal Direnç ve Mekanizmaları	8
2.4.1. β -Laktamaz Enzimleri	11
2.4.2. İlaç Atım Pompaları	13
2.4.3. İntegronların Direnç Gelişimindeki Rolü	14
2.4.4. Permeabilite Bozuklukları	14
2.4.5. Aminoglikozitleri Modifiye Eden Enzimler	14
2.4.6. Hedef Bölge Değişiklikleri	15
2.5. <i>A. baumannii</i> 'de Risk faktörleri, Korunma ve Kontrol Önlemleri	15
2.6. <i>A. baumannii</i> Virülans Faktörleri ve Patogenez	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Bakteri İzolatları	18
3.2. İzolatların Tanımlanması	18
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	19
3.3.1. Antibiyotiklerin Hazırlanması	19
3.3.2. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması	20
3.3.3. İzolatların Hazırlanması	20
3.3.4. Sonuçların Kalite Kontrolü	20
3.4. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi	22

3.4.1. DNA ekstraksiyonu	22
3.4.2. Multipleks Polimeraz Zincir Yöntemi	22
3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi	27
3.5. PFGE	27
3.5.1. İzolatların hazırlanması	27
3.5.2. İzolatların agaroz gömülmesi	28
3.5.3. Agaroz içerisindeki hücrelerin parçalanması	28
3.5.4. Lizis işleminden sonra kalıpların yıkanması	29
3.5.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi	29
3.5.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi	29
3.5.7. Elektroforez	30
3.5.8. Sonuçların gözlenmesi ve analizi	30
4. BULGULAR	31
4.1. Hastaların Klinik Özellikleri	31
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	38
4.3. Moleküler Çalışma Sonuçları	38
4.4. Pulse Field Jel Elektroforez (PFGE) Sonuçları	41
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	66
EKLER	77
Ek 1. Hastaların demografik bilgileri	77
Ek 2. Mikroorganizma bilgi formu	78

SİMGELER ve KISALTMALAR

ÇİD	: Çok ilaca dirençli
TİD	: Tüm ilaçlara dirençli
TSI	: Üç şekerli demirli besiyeri
ARDRA	: Amplifiye edilmiş 16S rRNA gen restriksiyon analizleri
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
PFGE	: Pulsed-field jel elektroforezi
Rep-PCR	: Repetitive extragenic palindromic PCR
CRAB	: Karbapenem dirençli <i>A. baumannii</i>
MBL	: Sınıf B metalo- β -laktamaz
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
LPS	: Lipopolisakkarit
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz
PBP	: Penisilin bağlayan proteinler
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute

TABLULAR

Tablo 1.	Acinetobacter baumannii'de belirlenen direnç mekanizmaları ve özellikleri	10
Tablo 2.	Antibiyotikler için kullanılan çözücü ve seyrelticiler	19
Tablo 3.	CLSI tarafından bildirilen <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 suşlarına ilişkin MİK değerleri.	21
Tablo 4.	<i>A. baumannii</i> 'ye ilişkin CLSI tarafından bildirilen direnç sınır değerleri.	21
Tablo 5.	<i>A. baumannii</i> 'ye ilişkin EUCAST tarafından bildirilen direnç sınır değerleri.	21
Tablo 6.	Çalışmada kullanılan PCR karışımının içeriği.	23
Tablo 7.	Çalışmada kullanılan PCR karışımının içeriği.	25
Tablo 8.	Çalışmada kullanılan PCR karışımının içeriği.	26
Tablo 9.	Çalışmaya dahil edilen hastalarda tespit edilen altta yatan hastalıkların yüzdelik dağılımı.	33
Tablo 10.	ÇİD <i>A. baumannii</i> enfeksiyonu tanısı konulmadan önce kullanılan antibiyotiklerin dağılımı	35
Tablo 11.	ÇİD <i>A. baumannii</i> enfeksiyonuna yönelik monoterapi ve kombine terapi alan hasta sayıları ve hastaların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin dağılımı	36
Tablo 12.	İnvaziv örneklerinden <i>A. baumannii</i> izole edilen 164 hastanın mortalite için risk faktörleri	37
Tablo 13.	Çalışmada incelenen klinik ve çevresel izolatlarla ilişkin MİK50, MİK90 değerleri, MİK dağılımı ve direncin görülme yüzdesi.	38
Tablo 14.	Çalışmada incelenen direnç genlerinin merkezlere göre dağılımı.	41
Tablo 15.	Acinetobacter klinik izolatlarında PFGE grupları ile antibiyotik duyarlılık profillerinin korelasyonu	43

ŞEKİLLER

Şekil 1.	<i>A. baumannii</i> izole edilen klinik örneklerin dağılımı	32
Şekil 2.	Çalışmaya dahil edilen hastaların başvuru anındaki tanılarının yüzdeler dağılımı	34
Şekil 3.	Çalışmada kullanılan moleküler ağırlık standardı baz çifti (bp) dizilimleri	39
Şekil 4.	<i>A. baumannii</i> izolatlarına ait <i>bla</i> _{OXA} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık standardı; 1 ve 3: <i>bla</i> _{OXA-51} ve <i>bla</i> _{OXA-58} pozitif izolatlar; 2, 4 ve 5: <i>bla</i> _{OXA-51} ve <i>bla</i> _{OXA-23} pozitif izolat.	39
Şekil 5.	<i>A. baumannii</i> izolatlarına ait <i>bla</i> _{OXA} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık standardı; 2: <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} ve <i>bla</i> _{OXA-58} pozitif izolat; 3-9: <i>bla</i> _{OXA-51} ve <i>bla</i> _{OXA-23} pozitif izolatlar. P: Pozitif kontrol; N: Negatif kontrol.	40
Şekil 6.	<i>A. baumannii</i> izolatlarına ait <i>bla</i> _{PER-1} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık standardı; 1-4,6: <i>bla</i> _{PER-1} negatif izolatlar; 5 ve 7 <i>bla</i> _{PER-1} pozitif izolatlar.	40
Şekil 7.	Çalışmada değerlendirilen <i>A. baumannii</i> izolatlarına ilişkin PFGE dendogramı	44
Şekil 8.	Gazi Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendogramı.	48
Şekil 9.	Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi'nde izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendogramı.	48
Şekil 10.	Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendogramı.	49
Şekil 11.	Ankara Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendogramı.	50

Şekil 12. Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.	51
Şekil 13. İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan merkezlerden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.	52
Şekil 14. Ege Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.	53
Şekil 15. Mersin Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.	54
Şekil 16. Atatürk Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.	55
Şekil 17. Lütfü Kırdar Eğitim Araştırma Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.	56
Şekil 18. Çanakkale Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen <i>A. baumannii</i> suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.	57

1. GİRİŞ

Acinetobacter baumannii toprakta, suda ve doğal çevrede sık bulunan bir kokobasildir. Dünyada yaygın olarak izole edilen fırsatçı bir patojendir ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen gram negatif non-fermenter mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas aeruginosa*'dan sonra ikinci sırada yer alır. Sağlıklı kişilerde deri, üst solunum yolları ve genital sistemde kolonize olabilen mikroorganizmanın, sıklıkla hastane enfeksiyonu şeklinde ortaya çıkan enfeksiyonları arasında; ventilatör ile ilişkili pnömoni, bakteriyemi, menenjit ve üriner sistem, deri ve yumuşak doku, santral sinir sistemi ve kemik enfeksiyonları yer almaktadır. *A. baumannii*, hasta morbidite ve mortalitesini artırması sebebiyle önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (1-5).

A. baumannii, gerek çok ilaca dirençli (ÇİD), gerekse tüm antibiyotiklere dirençli (TİD) suşları nedeniyle son 20 yıl içinde önemi artan bir enfeksiyon etkeni olmuştur. Enfeksiyonlarında tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması, bakterinin biyofilm oluşturabilme özelliği ile hastane ortamlarında canlılığını koruyabilmesi ve kolonizasyonun genellikle invaziv enfeksiyon ve salgınlarla sonuçlanması sebebiyle *Acinetobacter* kolonizasyonu/enfeksiyonu için önlemler alınması gerekmektedir (3,5) .

Ülkemizde *A. baumannii*'ye ilişkin çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalarda hastanelerdeki *A. baumannii* izolatları arasında %60-70 oranlarında klonal ilişki saptanmış, ulusal düzeyde yaygın olan klonun ve hastaneler arası geçiş derecesinin belirlenebilmesi için çok merkezli çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır (6-9) .

Ulusal düzeyde çok merkezli yürütülecek bu çalışma ile; (i) invaziv hastane enfeksiyonlarına yol açan *A. baumannii* izolatlarının doğru tanımlanması, (ii) antibiyotik direnç paternlerinin saptanması, (iii) izolatlar arasındaki klonal benzerliklerin ortaya konulması, (iv) antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi, (v) ülke ekonomisinde büyük kayıplara yol açan, hasta morbidite ve mortalitesini artıran ÇİD *A. baumannii*'nin etken olduğu hastane enfeksiyonlarının tedavisinde yeni, ucuz ve kısa süreli tedavi alternatiflerinin belirlenmesi ve (vi) uygun olmayan ve yüksek maliyetli

antibiyotik tedavilerinin önlenmesine katkı sunulması amaçlanmıştır. Ayrıca (vii) ülkemiz *A. baumannii* suşlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin diğer ülkelerin *A. baumannii* suşları ile karşılaştırılması, (viii) suşların yayılım ve bulaş özelliklerinin gösterilmesi, (ix) enfeksiyon kontrol önlemlerine yönelik yeni hedeflerin belirlenmesi de çalışma amaçları arasında yer almaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taksonomi ve Tarihçe

Acinetobacter cinsinin taksonomisinin renkli bir geçmişi vardır. Ayırt edici özelliklerinin kısıtlı olmasından dolayı 1970'li yıllardan önce sıklıkla yanlış tanımlanan *Acinetobacter* cinsinin taksonomik tarihi yirminci yüzyılın ilk dönemlerine uzanır. İlk kez 1911 yılında, Hollandalı bir mikrobiyolog olan Beijerinck tarafından topraktan izole edilen ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilen bu bakteri günümüze kadar birçok taksonomik değişikliğe uğramıştır (1) . *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella iwoffi*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella Iwoffi* var. *glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum* ve *Achromobacter mucosus* bunlardan bazılarıdır.

Günümüzdeki cins tanımı ise 1954 yılında Brisou ve Prevot tarafından, benzer morfolojik özellik gösteren *Achromobacter* cinslerinden hareketsiz olanları ayırarak, Yunanca'da 'hareketsiz' anlamına gelen 'akinetos' kelimesinden esinlenerek '*Acinetobacter*' adının verilmesiyle oluşturulmuştur (1,2) . Baumann ve arkadaşları 1968 yılında *Acinetobacter* türlerini ayrıntılı olarak tanımlamış ve 1971 yılında *Acinetobacter* cinsi, *Moraxella* ailesi içinde incelenmiştir. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*'de 1974 yılında *Acinetobacter* cinsi listelenmiş ve *Acinetobacter calcoaceticus* tanımlanmıştır (1) . Bouvet ve Grimont 1986 yılında ise DNA-DNA hibridizasyon tekniği ile *Acinetobacter* cinsinde yer alan on iki adet tür tanımlamışlardır (1,3-5).

Günümüzde, *Acinetobacter* cinsi DNA-DNA hibridizasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların sonuçlarına göre 25 adet DNA homoloji grubu içermektedir. Bu gruplardan sadece 11'i isimlendirilmiş olup, en az 19 türe ilişkin biyokimyasal testler yayınlanmıştır (6-8) . Güncel taksonomik verilere göre *Acinetobacter* cinsi *Gammoproteobacteria* takımında, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* ve ilgili mikroorganizmaları kapsayan *Moraxellaceae* ailesi içinde incelenmektedir (2).

2.2. Mikrobiyolojik, Metabolik Özellikler ve Laboratuvar Tanısı

Acinetobacter cinsi; gram negatif, katalaz-pozitif, oksidaz-negatif, hareketsiz ve non-fermenter kokobasiller olarak tanımlanmaktadır. Ancak; boyayı zor bıraktıkları için yanlışlıkla gram negatif veya gram-pozitif koklar olarak tanımlanabilmektedirler (1) .

İnsandan izole edilen türler, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan, koyun kanlı agar veya triptik soy agar gibi katı besiyerlerinde 37 °C'de iyi ürerler. Mikroorganizmanın izolasyonunda, karbon kaynağı olarak asetat vb.; nitrojen kaynağı olarak nitrat içeren, zenginleştirilmiş ve pH'sı düşük sıvı besiyerinin kullanımı önerilmektedir (1) . Bu amaçla seçici-ayrıt edici besiyerleri geliştirilmiş olup bunlar arasında en sık Difco Herellea agar (Becton Dickinson, New Jersey, ABD) ve Leeds *Acinetobacter* Medium (Santa Maria, ABD) kullanılmaktadır (1,10,11) .

Acinetobacter türlerinin kolonileri düzgün kenarlı, bazen mukoid ve grimsi-beyaz renktedir. *A. calcoaceticus* - *A.baumannii* kompleks'in kolonileri *Enterobacteriaceae* kolonilerine benzer ancak, daha küçük ve şeffaftırlar. MacConkey agar besiyerinde enterik basillerden daha küçük, opak, pigmentsiz ve S tipi koloniler oluştururlar. Üç şekerli demirli (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar (11). *A. baumannii* izolatları genellikle glukozu oksitler, koyun kanlı agarda hemoliz oluşturmaz ve 44°C'de üreyebilme yeteneğiyle diğer *Acinetobacter* türlerinden ayrıt edilebilir. *A. Iwoffii* glukozu oksitlemeyen ve hemoliz yapmayan türdür. *A. haemolyticus* hemoliz yapan bir türdür. *A. johnsonii* ise 37°C'de üreyememesi ile diğer türlerden ayrıt edilebilir(12) .

Rutin tanı laboratuvarlarında diğer bakterileri tür düzeyinde tanımlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan basit fenotipik testler, en yaygın *Acinebacter* türlerini dahi tanımlamada yeterli değildir. *Acinetobacter* türlerini diğer non-fermenter gram negatif bakterilerden ayrıt etmeyi sağlayacak kesin bir metabolik test bulunmamaktadır. Bouvet ve Grimont 28 fenotipik testi içeren bir *Acinetobacter* tanımlama şeması oluşturmuştur. Bu şemanın etkinliğinin %95.6 olarak belirtilmesine ve 12 genomik türün 11'inin tanımlanabilmesine karşılık, yeni belirlenen türler bu şema kullanılarak

tanımlanamamakta ve özellikle *A. baumannii* ile *Acinetobacter* genomik tür 13TU birbirinden ayırt edilememektedir (1,13).

Acinetobacter türlerinin tanısında DNA-DNA hibridizasyon testi referans standart olarak kabul edilmesine karşılık, uygulaması zahmetlidir. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanım için uygun olmayan bu yöntemler dünyada sadece birkaç referans laboratuvarında kullanılmaktadır.

Manuel ve yarı-otomatize ticari tanımlama sistemlerinden API 20NE, Vitek 2, Phoenix ve MicroScan WalkAway kullanılmakta olan sistemler olmasına rağmen, tanımlamada bazı sorunlar gösterebilmektedir (14-17) . Bu sistemler en sık enfeksiyona neden olan *Acinetobacter* türlerini tanımlamakta bile yetersiz kalabilmektedir. Özellikle, *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* kompleksinde yer alan ve klinik açıdan önemli olan üç tür mevcut ticari tanımlama sistemleri ile ayırt edilememektedir. En yaygın kullanılan tanımlama sistemlerinde, *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU türlerinin tümü *A. baumannii* olarak tanımlanmaktadır (1) .

*Acinetobacter*leri tür düzeyinde tanımlamak için önerilen moleküler tanımlama yöntemleri ise şunlardır: Amplifiye edilmiş 16S rRNA gen restriksiyon analizleri (ARDRA), çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizimi (AFLP), yüksek çözünürlüklü parmak izi analizleri, ribotiplendirme, tRNA "spacer" parmak izi, 16S-23S rRNA intergenik "spacer" dizisi restriksiyon analizi, 16S-23S rRNA gen "spacer" bölgesi dizi analizi, RNA polimeraz β alt ünitesi (*rpoB*) geni ile komşu bölgelerinin dizi analizi (13) .

Acinetobacter türlerinin tanımlanması için kullanılan en yaygın moleküler temelli yöntemler 16S rRNA gen restriksiyon analizi (18) ve AFLP'dir (19,20) . Diğer yöntemlerden biri olan tRNA parmak izi tekniği (14) ile *A. baumannii* ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU ayırt edilememektedir. Ribotiplendirme (21) ve 16S-23S rRNA gen bölgesinin dizi analizi (22) ile *A. calcoaceticus* ve *A. baumannii* kompleks ayırt edilebilmektedir. *rpoB* geni dizi analizi (23) umut vaat eden bir yöntem olarak görünse de, daha fazla çalışma ile yöntemin validasyonunun sağlanması gerekmektedir (1) .

Yeni gelişmeler ise *A. baumannii* ile ilişkili olan ve bu türde intrensek olarak bulunan *bla_{OXA-51}*-benzeri kabapenemaz geninin tespitine yönelik doğrulama testleridir. “Polimerase Chain Reaction-electrospray ionization mass spectrometry (PCR–ESI-MS)” (24) ile Higgins ve ark. (25) tarafından geliştirilen ve *A. baumannii* ile *Acinetobacter* genomik tür 13TU’unun *gyrB* geninden yararlanılarak ayırt edilmesini sağlayan, basit ve PCR temelli yöntem de bu gelişmeler arasındadır (1) .

Moleküler temelli yöntemler güvenilir ve duyarlı yöntemler olmalarına karşılık yüksek maliyetli ve zahmetlidir. Ayrıca çeşitli ekipman ve deneyimli personel gereksinimi nedeniyle *Acinetobacter* türlerinin tanımlanmasında rutin laboratuvarlarda bu yöntemlerin kullanımı kısıtlıdır.

Yapılan çalışmalarda “Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight MS (MALDI-TOF MS)” yöntemi ile de umut verici sonuçlar alınmıştır. Yöntem 1 saatten kısa sürede tür tanımlamasına olanak verse de pahalı ekipman ve veri tabanı gerektirir (1) .

2.3. *A. baumannii* Epidemiyolojisi

Antibiyotik direncinin küresel bir sağlık endişesine dönüştüğü günümüzde Dünya Sağlık Örgütü, takip ve görüntüleme sistemlerindeki eksikliklerin antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasında ve yayılmasında önemli yere sahip olduğunu belirtmektedir. Şu anda kullanılan takip ve izleme sistemlerinin en önemli eksiği bakteri izolatlarına ilişkin yeterli genetik verinin bulunmamasıdır. Bu sebeple nozokomiyal salgınlara neden olan klinik izolatların genetik özelliklerini kesin olarak anlamak için mikrobiyolojik genotiplendirme kaçınılmazdır (26) .

Acinetobacter türlerine ilişkin epidemiyolojinin belirlenmesinde ise genotiplendirme yöntemlerinden yararlanır. Sıklıkla kullanılan suş tiplendirme yöntemleri arasında serotiplendirme (27) , multilokus enzim elektroforezi (28) , DNA temelli yöntemlerden “Repetitive extragenic palindromic” dizi analizi temelli PCR (29) , ARDRA, pulsed-field jel elektroforezi (PFGE), AFLP (18) , ribotiplendirme (30-32) “Repetitive extragenic palindromic PCR (Rep-PCR)” yer almaktadır. Bu yöntemlerle

suşların tanımlanmasının ardından o mikroorganizmaya ilişkin klonların belirlenebilmesi mümkün olmaktadır. Bu yöntemler arasında en güvenilir olanı PFGE'dir ve *Acinetobacter* tiplendirmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir.

PFGE, sınırlı sayıda ve büyük DNA parçalarından oluşan DNA profilleri ortaya çıkaran ve böylece kolay ayırt edilebilmeyi sağlayan bir makro-restriksiyon analiz yöntemidir. PFGE yönteminde DNA'yı kesen restriksiyon enzimi olan Apal, *Acinetobacter* kromozomunu çeşitli yerlerden keserek büyüklükleri 10-700 bp uzunluğunda değişen 10'dan fazla; fakat 30'dan az farklı parça oluşturur. Suşların birbiri ile olan epidemiyolojik ilişkisi PFGE paternlerinin benzerliğine göre değerlendirilir (33) . Çalışmalarda PFGE dışında, Rep-PCR ve "Multilocus Sequence Typing (MLST)" yöntemleri de sıklıkla kullanılmaktadır (34) .

MLST, yakın bakteri türlerini ayırt etmede kullanılan yüksek çözünürlüklü bir moleküler yöntemdir. MLST verileri tekrarlanabilir ve taşınabilir verilerdir ve bu verilerin dünya çapındaki laboratuvarlar arasında karşılaştırılması kolaydır. Ancak, MLST uygulamaları gerçek zamanlı bir süzgeç etkinliği sağlayamaz (24) .

Yukarıda anılan moleküler temelli yöntemler; yüksek tekrarlanabilirlik, güvenilirlik ve ayırt edicilik yönleri ile uygun teknik ve bilgisayar programının geliştirilmesini takiben ulusal ve uluslararası düzeyde geniş veri tabanları oluşturulmasını sağlamaktadır.

A. baumannii en önemli ÇİD gösteren nozokomiyal patojenlerden biridir. Hastane kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonlarında, belli başlı epidemik klonal kompleksler rol oynamaktadır. Salgınlara neden olan kısıtlı sayıdaki epidemik klonları tespit edebilmek amacıyla 1996 ve 2003 yılında AFLP, ribotiplendirme ve hücre protein analizi gibi yöntemler kullanılarak Avrupa klon I, II ve III adı altında salgın yapan klonlar tanımlanmıştır(35,36) . Özellikle Avrupa klonu I ve II'nin ÇİD göstermesi nedeniyle tedavide kullanılacak antimikrobiyal ilaçlar sınırlı kalmaktadır. Diğer taraftan salgınlara neden olan epidemik klonlar dışındaki *A. baumannii* klinik izolatları, henüz birçok antimikrobiyal ilaca duyarlıdır. Öyle ki, Avrupa klonu I ve II'nin

daha sık görüldüğü Asya ve Avrupa kıtasındaki *A. baumannii* izolatlarının antimikrobiyal direnç oranlarının, Amerika kıtasındakilere göre çok daha yüksek olduğu ve 2004-2009 yılları arasında antimikrobiyal direncin önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Bu klonlara yönelik alınacak önlemler hiç şüphesiz nozokomiyal salgınların önüne geçecektir. Bu nedenle *A. baumannii* epidemik klonlarının, non-epidemik *A. baumannii* klonlarından ve *A. nosocomialis* ve *A. pittii* gibi non-*baumanni* *Acinetobacter* türlerinden ayırt edilmesi son derece önemlidir (26,34) .

2.4. *A. baumannii*'de Antimikrobiyal Direnç ve Mekanizmaları

Dünya genelinde ÇİD *A. baumannii* hızla artmaktadır. 2004-2009 yılları arasında 10.149 *A. baumannii* izolatının dahil edildiği bir çalışmada tüm antibiyotiklere karşı minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde anlamlı bir artış saptanmıştır. Bu çalışmada en yüksek direnç oranları 2009 yılında Ortadoğu'da seftriakson, piperasilin tazobaktam ve seftazidime karşı sırasıyla %83.6, %82, %80.3 olarak bulunmuştur(37) .

Dünyada ilk ÇİD *A. baumannii* 1998 yılında Tayvan'da saptanmıştır. Bu tarihten sonra Tayvan'da ÇİD *A. baumannii*'ye bağlı salgınlar hızla görülmeye başlanmıştır(34) . Tayvan antimikrobiyal direnç sürveyans programının 2012 yılında açıklanan sonuçlarına göre, 2002 yılında %3.4 olan imipenem direnci 2010 yılında %58.7'ye yükselmiştir(38) .

Karbapenem dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları Avrupa'da birçok ülkede tedavi açısından sorun yaratmaktadır. Avrupa'da direnç oranlarının en yüksek olduğu ülkelerin başında Türkiye, Yunanistan, İtalya, İspanya ve İngiltere gelmektedir(1) .

Klinik izolatlarda yüksek düzey karbapenem direncinin bildirilmesi ile birlikte diğer sınıf antimikrobiyal ilaçlara veya kombinasyon tedavilerine acilen ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarında tedavi seçeneği olarak polimiksinler ve tigesiklinin dahil olduğu kısıtlı sayıda seçenek bulunmaktadır(34) .

Kolistin dirençli *A. baumannii* izolatı ilk olarak 1999 yılında Çek Cumhuriyeti'nde tanımlanmıştır(39) . Daha sonra Li ve arkadaşları 2006

yılında ilk kez kolistine heterodirençli bir izolat tanımlamıştır(40) . Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Latin Amerika ve Asya-Pasifik bölgesinde 2001-2011 yılları arasında yapılan SENTRY antimikrobiyal sürveyans sonuçlarına göre kolistin direncinin hala düşük seviyelerde (%0.9-%3.3) olduğu gösterilmiştir (41) .Tüm Dünyada kolistin dirençli *A. baumannii* izolatları dikkat çekerken, en yüksek direnç oranları Asya'dan bildirilmektedir. Kuzey Tayvan'da İD *A. baumannii* suşlarının klonal yayılımı ile ilgili bir çalışmada kolistin, rifampisin ve tigesikline karşı antimikrobiyal duyarlılık sırasıyla %10.4, %47.8 ve %45.5 olarak bulunmuştur (42) . Tüm bu yapılan çalışmalar kolistin İD *A. baumannii* enfeksiyonlarında tek etkili tedavi seçeneği olduğunu göstermektedir.

A. baumannii enfeksiyonlarında çok sayıda antibiyotiğe karşı direncin ortaya çıkması tedavi alternatiflerini kısıtlamakta ve bu durum hastaneye yatış s resinde 13 günlük bir uzamaya ve tedavi maliyetinde 3.758 dolarlık bir artışa neden olmaktadır. Bu durum yeni antimikrobiyal ilaçlara olan ihtiyaı da artırmaktadır (43) .

İD *A. baumannii*, klinikte kullanılan pek çok ilaca yüksek oranda dirençlidir. Günümüzde belirlenmiş birçok direnç mekanizması arasında β -laktamaz enzimlerinin varlığı, ilacın aktif pompa sistemi ile dışarı atımı, aminoglikozitleri modifiye eden enzimler, geçirgenlik bozuklukları ve hedef bölgelerde meydana gelen modifikasyonlar sayılabilir (Tablo1). *A. baumannii* izolatlarında direncin yayılmasında ise plazmit konjugasyonu, transpozonlar ve integronlar etkili olabilmektedir (34) .

Tablo 1. Acinetobacter baumannii’de belirlenen direnç mekanizmaları ve özellikleri

Direnç Mekanizması	Sınıf/Familya	Protein	Direnç mekanizması	Sınıf/Familya	Protein				
β-laktamazlar	Sınıf A	TEM-1, TEM-92	β-laktamazlar	Grup OXA-51	OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-75, OXA-76, OXA-77, OXA-79, OXA-80, OXA-104, OXA106~OXA-112				
		SHV-5			Grup OXA-58	OXA-82, OXA-83, OXA-84, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-91, OXA-92, OXA-93, OXA-94, OXA-95, OXA-96, OXA-113			
		CTX-M-2				OXA-58, OXA-96, OXA-97			
		CTX-M-15				Yeni gruplar	OXA-143, OXA-182, OXA-235		
		GES-11					Efflux pompaları	RND	AdeABC, AdeFGH, AdeIJK
		GES-12						MFS	TetA, CmlA, MdfA, CraA, AmvA
		GES-14					MATE	AbeM	
		SCO-1					SMR	AbeS	
		PER-1					AME	AAC	AAC3 (aacC1, aacC2), AAC (6') (aacA4)
		PER-2						ANT	ANT (2'') (aadB), ANT (3'') (aadA1)
	PER-7	APH		APH			APH (3') (aphA1), APH (3'')		
	VEB-1				Permeabilite bozuklukları			CarO, 47-kDa OMP, 44-kDa OMP, 37- kDa OMP, 33-36- kDa OMP, 22-33- kDa OMP, 43-kDa OMP, Lipopolisakkarit, OmpA	
	CARB-4	Hedef bölge değişiklikleri		PBP			PBP2		
	CARB-10			değişikliği		DNA giraz	GyrA/ParC		
	KPC-10	Dar spektrum		Ribozomal koruma		Dihidrofolat redüktaz	Dfr veya Dhfr, Fola		
	SINIF B						VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4 VIM-11	16S rRNA metilasyonu	ArmA
		IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5							
		IMP-6							
		IMP-8							
		IMP-11							
IMP-19									
IMP-24									
SIM-1									
NDM-1									
NDM-2									
SINIF C	AmpC								
SINIF D									
Grup OXA-3	OXA-21								
Grup OXA-20	OXA-37								
Grup OXA-10	OXA-128								
CHDL'ler									
Grup OXA-23	OXA-23 OXA133								
Grup OXA-24	OXA-40/24 OXA-40,OXA-72, OXA-25, OXA-26								
Grup OXA-51	OXA-27,OXA-51, OXA-64								

2.4.1. β -Laktamaz Enzimleri

Geniş spektrumlu β -laktamlar arasında yer alan karbapenemler 1985 yılında tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Karbapenemler bugüne dek ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir yere sahip olmakla birlikte bu antibiyotikleri klinik kullanıma yaygın olarak girmesi ile artan direnç oranları diğer antimikrobiyal ilaçlara karşı da dirençli olan bu bakterilerin tedavisinde önemli sorun yaratmıştır. Tüm dünyada karbapenemazların artışı ve hızlı yayılımı, bu enzimlerin erken dönemde saptanmasını önemli hale getirmiştir. Böylece, uygun antibiyotik tedavisinin başlanması ve tedavi başarısızlığına neden olan bu enfeksiyonların önlenmesi için enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması mümkün olabilmektedir (43) .

ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarında β -laktamaz enzimi yapımı β -laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir rol oynamaktadır ve dirençten en çok sorumlu olan mekanizmadır. Ambler sınıflama sisteminde yer alan dört grup β -laktamaz enzimi de ÇİD *A. baumannii*'de bulunabilir (34) . Bunlar arasında kromozomal veya plazmite bağlı olarak taşınabilen *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24/40} ve *bla*_{OXA-58} benzeri genler *A. baumannii*'deki karbapenem direncinde en sık rol oynayan mekanizmalardır(43) .

A. baumannii türleri zayıf karbapenemaz aktivitesine sahip OXA-51/69 benzeri kromozomal β -laktamaz enzimi üretirler. Bu enzim 2004 yılında ÇİD *A. baumannii*'de yeni bir alt grup olarak tanımlanmıştır. Çalışmalarda IS4 ailesine ait ISAb1'in promotor bölgede düzenleyici bir rol oynadığı ve karbapenemaz aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Bunun dışında, karbapenemlere karşı etkili ve yaygın olan üç adet kazanılmış sınıf D OXA tipi β -laktamaz alt grubu tanımlanmıştır. *A. baumannii*'de ilk alt grup, 1985'te İskoçya'da imipenem tedavisi almamış olan bir hastadan izole edilen bakteride saptanmıştır. Genetik ve biyokimyasal incelemeler sonunda bu enzim OXA-23 olarak adlandırılmıştır(44,45) . İkinci alt grup OXA-40/OXA-24 grubudur. Bu grup içerisinde, aralarında birkaç aminoasit farklılığı bulunan OXA-25, OXA-26, OXA-40 ve OXA-72 enzimleri yer alır. OXA-26 ilk olarak Belçika'daki bir izolatta gösterilmiştir. OXA-40 ise İspanya ve Portekiz'deki *A. baumannii* suşları arasında yaygındır. Üçüncü alt grup ise, ilk olarak

Fransa'da sonrasında dünyanın ve özellikle Avrupa'nın birçok bölgesinde saptanan OXA-58'dir. OXA-58 enziminin aşırı exprese edildiği durumlarda karbapenemlere yüksek düzeyde bir direnç geliştiği bildirilmiştir (34,45) .

A. baumannii'de karbapenem direncinden sorumlu diğer bir β -laktamaz grubu, Sınıf B metalo- β -laktamaz (MBL)'lar arasındaki beş enzim (IMP, VIM, SPM, GIM ve SIM)'in yer aldığı gruptur. MBL üreten bakteriler genellikle sefalosporinlere, penisilinlere, karbapenemlere ve β -laktamaz inhibitörlerine dirençlidir. Kazanılmış sınıf B karbapenemazlar içinde yer alan MBL ilk kez 1991 yılında, Japonya'da 1988 yılında izole edilmiş bir suşta IMP-1 olarak tanımlanmıştır. Enzimi kodlayan *bla*_{IMP} geninin sınıf I integronlarda bulunan bir gen kaseti içinde yer aldığı bildirilmiştir (46,47) . Kazanılmış sınıf B karbapenemazlar içinde diğer bir grup, VIM tipi MBL'dir. VIM tipi MBL, ilk kez 1999 yılında, İtalya'da 1997 yılında izole edilmiş bir suşta tanımlanmıştır (48) . *A. baumannii*'de IMP ve VIM tipi MBL'lerin her ikisi de bulunmaktadır. VIM tipi MBL'leri kodlayan genler tıpkı IMP enzimini kodlayan genler gibi sınıf I integronlar üzerinde, hareketli gen kasetleri içinde taşınırlar. *bla*_{IMP} ve *bla*_{VIM} genleri integronlar üzerinde taşınabilmeleri sebebiyle horizontal olarak aktarılabilirler. Bu şekilde hızlı yayılabilme özellikleri nedeniyle bakterilerdeki IMP ve VIM β -laktamaz üretimi de hızla artmaktadır.

İlk VIM tipi MBL'ların tanımlanmasından sonra *A. baumannii*'de de VIM-1, VIM-3, VIM-4 ve VIM-11 gibi diğer varyantlar da tanımlanmıştır. Eş zamanlı olarak IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8, IMP-11, IMP-19 ve IMP-24 tipi MBL'ler de dünya genelinde *A. baumannii*'nin de dahil olduğu birçok gram negatif basilde tanımlanmıştır. Yakın zamanda ise *A. baumannii*'de NDM (Yeni Delhi metallo- β -laktamaz)-1 ve NDM-2 tipi MBL'ler saptanmıştır (34) .

Sınıf A β -laktamazlar özellikle karbapenem direncinde minör rol oynayabilmektedir. Bunlara örnek olarak TEM, SHV, CTX-M, GES, SCO, PER ve KPC tipi β -laktamazlar verilebilir (34) . *A. baumannii*'de tanımlanan ilk KPC tipi, ilk kez 2010 yılında Porto Riko'da tanımlanan KPC-10'dur (49) . *Acinetobacter* izolatlarında farklı genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL)

varlığı da gösterilmiştir. Bunlar arasında TEM, SHV, CTX-M, PER ve VEB dünyanın çeşitli ülkelerinden bildirilmiştir. Bu enzimler arasında en sık rapor edilen GSBL PER-l'dir. Ayrıca, CTX-M enzimleri de tıpkı MBL'ler gibi integronlarla veya plazmitlerle türler arasında aktarılabilmektedir (50-52) .

Acinetobacter türlerinde β -laktamaz üretiminin saptanması için çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. PCR yöntemi ile *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{VIM} gen varlığı gösterilebilmektedir. *A. baumannii*'de özellikle *bla*_{OXA-23}'ün bakteride ÇİDin göstergesi olabileceği belirtilmektedir (53,54) .

2.4.2. İlaç Atım Pompaları

İlaç atım pompaları, özellikle ÇİD gram negatif bakterilerde dirençten sorumlu diğer önemli bir mekanizmadır. İlaç atım pompalarına bağlı olarak tigesiklin ve imipenem başta olmak üzere farklı sınıfta yer alan birçok antimikrobiyal ilaca direnç geliştirebilmektedir (55) . Oldukça kısıtlı tedavi seçeneklerine sahip olan ÇİD ve TİD görülen *A. baumannii* izolatlarında atım pompa inhibitörlerinin yeni ilaç hedefi olarak kullanılması ÇİD'in ekspresyonunun önlenmesi ve tedavide kullanılacak ilacın etkinliğinin korunması açısından önemlidir (56) .

A. baumannii'de direnç gelişimine neden olan ilaç atım pompaları; "resistance-nodulation-division (RND) superfamily", "the major facilitator superfamily" (MFS), "the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family" ve "the small multidrug resistance (SMR) family" olarak sınıflandırılmaktadır. Bu ailelerden RND ve MFS en sık çalışılan ve dirençle güçlü ilişkisi bulunan ilaç atım pompalarıdır (34) . Dışa atım sistemi olan "RND süperailisi taşıyıcı genleri" çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarını ayırt edici özelliğe sahiptir (57) . RND ailesinde yer alan *AdeABC* ilk kez ÇİD *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır. Diğer aile üyeleri arasında ise, *AdeDE*, *AdeXYZ* ve *AdelJK* genleri yer almaktadır. Bunlar arasında *AdeABC* ve *AdelJK*'nın ÇİD ile güçlü ilişkisi olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. MFS ailesinde de *TetA*, *CmlA*, *MdfA*, *CraA* ve *AmvA* genlerinin *A. baumannii*'de farklı sınıf antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumlu

olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır. Bu durum, atım pompaları ile direncin, birlikte eksprese olabileceğini düşündürmektedir (34,57) .

2.4.3. İntegronların Direnç Gelişimindeki Rolü

İntegronlar, bakteriyal kromozom veya plazmit üzerinde bulunan özellikle gram negatif basillerde plazmitler üzerinde taşınan ve birçok antibiyotiğe karşı direnç gen kasetini taşıyan yapılardır. Horizontal gen transferi ile direnç genlerinin başarılı bir şekilde aktarılmasını ve yayılmasını sağlamaktadırlar. Özellikle sınıf I integronlar, antimikrobiyal direncin yayılmasında büyük önem taşımaktadır. *A. baumannii* izolatlarında, ÇİD ile sınıf I integronlar arasında bir ilişki olabileceği belirtilmiştir (58-60) .

2.4.4. Permeabilite Bozuklukları

Porinler, membranlar üzerinde birçok fonksiyonu gerçekleştiren ve moleküllerin çift katlı lipid bariyerlerden geçişini sağlayan protein yapıdaki kanallardır. Porinler *A. baumannii*'de OMP38 ile epitel hücre apoptozisini uyurabilir. Biyofilm formasyonu ise OmpA ile ilişkilidir. Bu dış membran proteinleri sadece bakterinin virülansını etkilemez aynı zamanda direnç gelişiminde de oldukça önemli rol oynar (34) . Yapılan çalışmalarda karbapenemaz etkinliği bulunmayan *Acinetobacter* klinik izolatlarında 29-kDa'luk OMP kaybının imipenem direnci ile ilişkili olduğu (61) ; *ompA* geninin ortadan kaldırılmasıyla kloramfenikol, aztreonam ve nalidiksik asit MİK değerlerinde azalma olduğu bildirilmiştir (62) Avustralya'da yapılan bir çalışmada ise, dış membrandaki lipopolisakkarit (LPS) kaybının, membran geçirgenliğinde azalmaya ve kolistin direncinin ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir (63) .

2.4.5. Aminoglikozitleri Modifiye Eden Enzimler

Aminoglikozitleri modifiye eden enzimler, aminoglikozitlere karşı gelişen dirençte temel basamaktır. Aminoglikozit direncinden çoğunlukla asetiltransferaz, adeniltransferaz ve fosfotransferaz olarak tanımlanan 3 sınıf enzim sorumludur. Bu enzimleri kodlayan genler plazmit, transpozon ve

integronlar ile aktarılabilir. *Acinetobacter* türlerinde diğer patojenlere göre aminoglikozit direnci daha fazladır. Yapılan çalışmalarda *A. baumannii*'de değişik tipte aminoglikozitleri modifiye eden enzim varlığı bildirilmiştir (34,45)

2.4.6. Hedef Bölge Değişiklikleri

A. baumannii'de penisilin bağlayan proteinlerdeki (PBP) değişikliklerin, β -laktam direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, dirençli *A. baumannii* suşlarının 24-kDa'luk PBP'yi aşırı ürettiği, duyarlı suşlar ile karşılaştırıldığında dirençli suşların sahip olduğu 6 PBP'nin daha fazla eksprese edildiği (45) ve imipenem direncinin, diğer direnç mekanizmalarının yokluğunda, imipeneme afinitesi düşük PBP'nin aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (34) .

Mutasyona bağlı olarak DNA giraz veya topoizomerez IV enzimlerinde gerçekleşen yapısal değişiklikler de *A.baumannii* suşlarında kinolon direncine neden olmaktadır (45) .

2.5. *A. baumannii*'de Risk faktörleri, Korunma ve Kontrol Önlemleri

A. baumannii; diğer bakterilere göre kuru yüzeylerde veya cansız ortamlarda uzun süre canlı kalabilmesi nedeniyle invaziv girişimlerde bulunan hastalarda ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda kolonize olmakta ve salgınlara neden olabilmektedir (64) .

Hastanede yatan hastalarda yüksek oranda taşıyıcılık, özellikle salgınlar sırasında saptanmaktadır. Yoğun bakım hastalarından alınan dışkı örneklerinde ÇİD *Acinetobacter* türleri izole edilmiş ve trakeostomili hastaların %45'inde kolonizasyon saptanmıştır (64) .

A. baumannii kompleks adı altında toplanan *A. baumannii*, *A. nosocomialis* ve *A. pittii* sıklıkla yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan ve sağlık çalışanlarından izole edilmekte olup, özellikle *A. baumannii*, ventilatörle ilişkili pnömoni, bakteriyemi, menenjit, üriner sistem ve yara enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir (65) . Tüm *Acinetobacter* türleri arasında *A. baumannii*, enfeksiyonlarla ve salgınlarla

ilişkili en önemli türdür; ancak karbapenem dirençli *A. baumannii*, *A. baumannii* kompleksten fenotipik yöntemlerle ayırt edilememektedir (66) .

Toplum kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonlarında alkol ve sigara alışkanlıkları, diabetes mellitus ve kronik akciğer hastalığı risk faktörleri arasında yer alır. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ise hastanede yatış süresi, cerrahi girişim, enfeksiyon varlığı ve antibiyotik kullanım öyküsü, intestinal kolonizasyon, malignensi, immün baskılanma, parenteral beslenme, intravenöz veya üriner kateter varlığı, yanık veya yoğun bakım ünitesinde yatış ve mekanik ventilasyon risk faktörleri arasında sayılabilir. *Acinetobacter* enfeksiyonları dezenfekte edilmiş solunum aletlerinin kullanımını takiben dahi gelişebilmektedir. Bu nedenle riskin yüksek olduğu servislerde, tıbbi aletlerin dekontaminasyonuna, el yıkama ve diğer hijyen kurallarına ve akılcı antibiyotik kullanımına dikkat edilmelidir (64) .

2.6. A. baumannii Virülans Faktörleri ve Patogenez

A.baumannii enfeksiyonlarının patogenezinde rol oynayan faktörler tam olarak bilinmemektedir. Mevcut bilgiler mikroorganizmanın toksin üretmediği ve sitolizin özelliğinin olmadığı yönündedir. *A. baumannii*'de çok az sayıda virülans faktörü gösterilmiş durumdadır. Pilus yapımı, demir alımı ve metabolizması, "quorum sensing" ile tip IV ve tip V sekresyon sistemlerinin virülanstan sorumlu olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (67-69) . Enfeksiyonları sırasında mikroorganizmanın virülansını artıran özellikler ise şöyle sıralanabilir: (i) fimbria ve/veya kapsüler polisakkarit varlığında insan epitel hücrelerine adezyon, (ii) polisakkarit kapsül varlığı, (iii) bazı suşların protez ve kateterlere aderansını artıran yüksek yüzey hidrofobisitesi, (iv) demir şelasyonu yapan besiyerlerinde, demir ile düzenlenen siderofor salımı ile üreyebilme ve (v) özellikle idrar yolu ve diğer dokularda patogenezde etkili olan, fare mesane dokusuna adezyondur (69) .

Bakteride ince fimbria varlığı polistrene adezyonda rol oynayan önemli bir faktördür ve mikroorganizmanın farklı polimerlere, özellikle kateter ve protez gibi plastik yüzeylere tutunmasında rol oynar (70) . *Acinetobacter*

yüzey hidrofobisitesi ve bakterinin polistren yüzeylere tutunması yüksek oranda ilişkilidir (71) .

A. baumannii biyolojik yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturur. Biyofilm yapımı “*quorum sensing*” ile düzenlenen birkaç yolağı içerir. Biyofilm oluşumunda fimbria varlığı başlangıç adhezyonu için gereklidir. Ekzopolisakkarit yapımı biyofilmin maturasyonuna neden olurken (67,68) , dış membran proteinlerinin birikimi ise biyofilm yapımını belirgin oranda artırmaktadır. Yapılan çalışmalarda, biyofilm yapımı ile PER-1 β -laktamaz arasında pozitif; siprofloksasin direnci ile biyofilm yapımı arasında ise negatif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (72) .

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatları

Çalışma kapsamında 2012 yılı içerisinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Dr. Lütfü Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Aziziye Hastanesi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran hastalardan ve çevreden izole edilen 171 adet hastane kaynaklı *A. baumannii* izolatu incelendi.

Araştırmaya katılan merkezlerde hastane enfeksiyonu olarak tanımlanan, özellikle yoğun bakım üniteleri ve cerrahi servislerinde tedavi gören hastaların kan, beyin omurilik sıvısı ve diğer steril vücut sıvısı gibi örneklerden elde edilen ve invaziv enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen *A. baumannii* izolatları çalışmaya dahil edildi.

Araştırmaya katılan tüm merkezlerde proje kapsamında daha önceden düzenlenen bir hasta bilgi formu, her merkezde hastaları izleme alan Enfeksiyon Hastalıkları Uzmanı tarafından dolduruldu. Bu formlarda hastaların demografik bilgileri (yaş, cinsiyet, meslek, vb.) ile altta yatan hastalık, risk faktörleri, hastanede yatış süresi, invaziv girişim veya operasyon varlığı, antibiyotik tedavisi ve tedavi yanıtı gibi bilgilere yer verildi. (Ek1). Aynı şekilde araştırmaya katılan tüm merkezlerde, proje kapsamında daha önceden düzenlenen mikroorganizma bilgi formu her merkezde araştırmaya katılan Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı tarafından dolduruldu (Ek 2).

3.2. İzolatların Tanımlanması

Öncelikle izole edildikleri merkezlerde konvansiyonel yöntemlerle ve otomatize sistemlerle *Acinetobacter* olarak tanımlanan izolatlar, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda konvansiyonel yöntemlerle çalışılarak, tür düzeyinde tanımlama doğrulandı. Ayrıca, izolatlar

tür düzeyinde tanımlama amacıyla *bla_{OXA-51}* gen varlığı yönünden de incelendi. Tanımlanması doğrulanmış izolatlar gliserollü buyyonda -80 °C'de saklandı.

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri “Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)” sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre gerçekleştirildi(73) .

İzolatların antimikrobiyal duyarlılık testleri için CLSI önerilerine göre hazırlanan katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) (BD, ABD) besiyeri kullanıldı.

3.3.1. Antibiyotiklerin Hazırlanması

Çalışmada sulbaktam-ampisilin (Avis İlaç AŞ, İstanbul, Türkiye), seftazidim (Glaxo Smith Kline AŞ, İstanbul, Türkiye), amikasin (Zentiva İlaç AŞ., İstanbul, Türkiye), siprofloksasin (Sanovel İlaç AŞ, İstanbul, Türkiye), imipenem (Merck Sharp and Dohme İlaç AŞ, İstanbul, Türkiye), kolistin (Sigma, İsviçre) antibiyotikleri kullanıldı.

Antibiyotikler, uygun çözücü ve seyrelticiler ile sulandırıldı. Her bir antibiyotik için antibiyotiklerin konsantrasyonu 1024 µg/ml olacak şekilde stok çözültisi hazırlandı. (Tablo 2)

Tablo 2. Antibiyotikler için kullanılan çözücü ve seyrelticiler

Antibiyotikler	Çözücü	Seyreltici
Sulbaktam-ampisilin	Fosfat tamponu pH 8.0 0.1 mol/L	Su
Seftadizim	Sodyum karbonat	Su
Amikasin	Su	Su
Siprofloksasin	Su	Su
İmipenem	Fosfat tamponu pH 7.2 0.01 mol/L	Fosfat tamponu pH 7.2 0.01 mol/L
Kolistin	Su	Su

Antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılacak antibiyotikler 0.125-256 µg/ml konsantrasyon aralığında test edildi.

3.3.2. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması

Antibiyotiklerin seri dilüsyonları önce tüplerde yapıldı. Daha sonra uygun konsantrasyondaki antibiyotik çözeltileri mikropklara dağıtıldı. Her antibiyotik seti için bir besiyeri kontrol ve bir bakteri kontrolü çalışıldı. Standart suşlar ile hazırlanan plaklardan biri test edildi. MİK değerleri beklenen sınır değerinde bulunan plaklar daha sonra -80°C'de saklandı. İmipenem ve kolistin mikropkları ise her kullanım öncesinde yeniden hazırlandı.

3.3.3. İzolatların Hazırlanması

- 1) Test edilecek izolatlar koyun kanlı agar plaklarına pasajlandı.
- 2) Ertesi gün çalışılacak izolatlardan öze yardımı ile alınan bir koloni, 2 ml steril MHB içeren tüplere aktarılarak 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı.
- 3) -80 °C'da saklanan antibiyotik içeren mikropklar oda sıcaklığına getirildi.
- 4) Her bir izolata ait bakteri süspansiyonları 1/10 oranında sulandırılıp vortekslendi. Oda sıcaklığına gelen mikropkların her bir sırasında yer alan 12 kuyucuk içine tek bir izolata ait bakteri süspansiyonundan 50'şer µl konuldu.
- 5) Mikropklar etüvde 35±2 °C'de 24 saat inkübe edildi.
- 6) Ertesi gün mikropklar okunarak MİK değerleri kaydedildi.

3.3.4. Sonuçların Kalite Kontrolü

Antibiyotik duyarlılık testlerinde sulbaktam-ampisilin için *Escherichia coli* ATCC 35218, diğer antimikrobiyaller için *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pozitif kontrol suşları olarak kullanıldı. (73) (Tablo 3).

Tablo 3. CLSI tarafından bildirilen *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına ilişkin MİK değerleri.

Antibiyotik	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Sulbaktam-ampisilin	8/4–32/16	-
Seftazidim	-	1–4
Amikasin	-	1–4
Siprofloksasin	-	0.25–1
İmipenem	-	1–4
Kolistin	-	0.5–4

İzolatların MİK değerleri 2014 yılı CLSI (73) (Tablo 4) ve 2014 yılı EUCAST rehberlerine ait (74) direnç sınır değerleri esas alınarak duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi. (Tablo 5)

Tablo 4. *A. baumannii*'ye ilişkin CLSI tarafından bildirilen direnç sınır değerleri.

Antibiyotik	Duyarlı ($\mu\text{g/ml}$)	Orta dirençli ($\mu\text{g/ml}$)	Dirençli ($\mu\text{g/ml}$)
Sulbaktam-ampisilin	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
Seftazidim	≤ 8	16	≥ 32
Amikasin	≤ 16	32	≥ 64
Siprofloksasin	≤ 1	2	≥ 4
İmipenem	≤ 2	4	≥ 8
Kolistin	≤ 2	-	≥ 4

Tablo 5. *A. baumannii*'ye ilişkin EUCAST tarafından bildirilen direnç sınır değerleri.

Antibiyotik	Duyarlı ($\mu\text{g/ml}$)	Orta dirençli ($\mu\text{g/ml}$)	Dirençli ($\mu\text{g/ml}$)
Sulbaktam-ampisilin	-	-	-
Seftazidim	-	-	-
Amikasin	≤ 8	-	> 16
Siprofloksasin	≤ 1	-	> 1
İmipenem	≤ 2	-	> 8
Kolistin	≤ 2	-	> 2

3.4. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi

3.4.1. DNA ekstraksiyonu

1. Kanlı agara tek koloni ekim yöntemi ile ekilen bakterilerin 18-24 saatlik inkübasyonu sonunda, bakteri kültüründen tek koloni alındı, MHB'a ekildi ve 37°C 18 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyonun ardından süspansiyon, 15 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı döküldü. Kalan kısım üzerine 1ml Tris/EDTA (TE) tamponu eklenerek vortekslendi ve ependorf tüplere aktarıldı.
3. Süspansiyon tekrar 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve üstteki sıvı atıldı.
4. Çökelti üzerine 1 ml TE tamponu eklenerek birkaç kez pipetaj işlemi uygulandı. Tüpler vortekslendi ve mikrosantrifüjde 1 dakika santrifüj edildi.
5. Üstte kalan sıvı alındıktan sonra yıkama işlemi (4. basamak) en az 3 kez tekrarlandı. En son yıkamadan sonra üstteki sıvı atıldı, çökeltiye 100 µl TE tamponu eklendi ve tüpler ısı bloğuna konarak 15 dakika 100 °C'da bekletildi.
6. Bu işlemi takiben bakteriler mikrosantrifüjde 1 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı çökeltiye dokunmadan yeni bir steril ependorfa alındı ve elde edilen DNA, ileri moleküler testlerin uygulanması aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

3.4.2. Multipleks Polimeraz Zincir Yöntemi (PCR)

3.4.2.1. *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58} PCR Protokolü

3.4.2.1.1 Multipleks PCR

Multipleks PCR ile *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58} genlerinin saptanması, Woodford ve ark.'ları (75) tarafından tanımlandığı şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler 100 pmol/µl sulandırıldı.

***bla*_{OXA-51}:** F-5'-TAA TGC TTT GATCGG CCT TG-3'
R-5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3' (353 bp)

***bla*_{OXA-23}:** F-5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCAGA-3'
R-5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3' (501 bp)

***bla*_{OXA-24}:** F-5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'
R-5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3' (246 bp)

***bla*_{OXA-58}:** F-5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'
R-5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3' (599 bp)

3.4.2.1.2. PCR karışımı:

Çalışmada kullanılan PCR karışımı Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	Miktar
<i>Taq</i> DNA tamponu (10x) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	2.5 µl
dNTP (200 mM) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	0.5 µl
Primerler (30 µmol)	
<i>bla</i> _{OXA-51} F	0.3 µl
<i>bla</i> _{OXA-51} R	0.3 µl
<i>bla</i> _{OXA-23} F	0.3 µl
<i>bla</i> _{OXA-23} R	0.3 µl
<i>bla</i> _{OXA-24} F	0.3 µl
<i>bla</i> _{OXA-24} R	0.3 µl
<i>bla</i> _{OXA-58} F	0.3 µl
<i>bla</i> _{OXA-58} R	0.3 µl
<i>Taq</i> polimeraz (5 U/µl) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	0.2 µl
DNA	5 µl
Su	14.4 µl
Toplam	25 µl

3.4.2.1.3. PCR koşulları:

DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

5 dakika 94 °C

25 saniye 94 °C

40 saniye 55 °C

50 saniye 72 °C olacak şekilde toplam 30 döngü olarak ayarlandı.

Amplifikasyonun sonunda tüplerin 72 °C'de 6 dakika bekletilmesi ile reaksiyon sonlandırıldı.

3.4.2.2. *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} PCR Protokolü

Multiplex PCR protokolü Poirel ve ark.'ları (76) tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Kullanılan primerler:

***bla*_{NDM}:** F-5' - GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC-3'
R-5' - CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC-3' (621 bp)

***bla*_{KPC}:** F-5' - CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG-3'
R-5' - CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG-3' (798 bp)

***bla*_{OXA-48}:** F-5' - GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC-3'
R-5' - CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG-3' (438 bp)

3.4.2.2.1. PCR karışımı:

Kullanılan PCR karışımı Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	Miktar (µl)
Taq DNA tamponu (10x) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	2.5
dNTP (200 mM) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	0.5
Primerler (30 µmol)	
<i>bla</i> _{NDM} F	0.3
<i>bla</i> _{NDM} R	0.3
<i>bla</i> _{KPC} F	0.3
<i>bla</i> _{KPC} R	0.3
<i>bla</i> _{OXA-48} F	0.3
<i>bla</i> _{OXA-48} R	0.3
Taq polimeraz (5 U/µl) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	0.2
DNA	5.0
Su	15.0
Toplam	25.0

3.4.2.2.2. PCR koşulları:

DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

10 dakika 94 °C

30 saniye 94 °C

40 saniye 55 °C

50 saniye 72 °C olacak şekilde toplam 36 döngü olarak programlandı. Amplifikasyonun sonunda tüplerin 72 °C'de 5 dakika bekletilmesinin ardından reaksiyon sonlandırıldı.

3.4.2.3. *bla*_{PER-1} ve, *bla*_{IMP} PCR Protokolü

PCR yöntemi ile *bla*_{PER-1} ve *bla*_{IMP} genlerinin varlığı, Weldhagen ve ark'larının tanımladığı şekilde gerçekleştirildi(77) . Primerler 100 pmol/μl olacak şekilde sulandırıldı.

***bla*_{PER-1}:** F- 5'-ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC-3'

R- 5'-ATT TGG GCT TAG GGC AGA A -3' (920 bp)

***bla*_{IMP}:** F-5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3'

R- 5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3' (501 bp)

3.4.2.3.1. PCR karışımı

Kullanılan PCR karışımı Tablo 8'de özetlenmiştir.

Tablo 8. Çalışmada kullanılan PCR karışımının içeriği.

Malzeme	Miktar (μl)
Taq DNA tamponu (10x) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	2.5
dNTP (200 mM) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	0.5
Primerler (30 μmol)	
<i>bla</i> _{PER-1} F veya <i>bla</i> _{IMP} F	0.3
<i>bla</i> _{PER-1} R veya <i>bla</i> _{IMP} R	0.3
Taq polimeraz (5 U/μl) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)	0.2
DNA	5.0
Su	16.2
Toplam	25.0

3.4.2.3.2. PCR koşulları:

DNA amplifikasyonu ThermalCycler (Global Genomics Partner, MyGenie96) cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı;

10 dakika 94 °C

30 saniye 94 °C

40 saniye 55 °C

50 saniye 72 °C olacak şekilde toplam 36 döngü olarak programlandı.

Amplifikasyonun sonunda 72 °C'de 5 dakika polimerizasyonun ardından reaksiyon sonlandırıldı.

3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Hazırlan 50X TAE (242 g tris; 57.1 ml glasiyal asetik asit, 0.5 M EDTA, pH 8) solüsyonundan 20 ml alınarak 1 litre distile su ile karıştırıldı ve 1X TAE tamponu hazırlandı.

PCR ürünlerini yürütmek için 250 ml 1X TAE içerisine %2'lik olacak şekilde agaroz tartılarak eklendi. Tamponunun içerisinde agaroz eritildikten sonra 45-50°C'ye soğutuldu ve içerisine 25 µl etidyum bromür çözeltisi eklendi. Düz bir zeminde agarozun döküleceği kalıp hazırlandı ve jel kalıba dökülerek donduruldu. Önceden hazırlanan 1X TAE tamponu elektroforez tankının içine yerleştirilmiş olan jelin üzerine döküldü.

PCR ürünlerinin herbirinden 10 µl alındı ve 10 µl orange G yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Moleküler ağırlık standardı olarak 100 bp ladder (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) kullanıldı. Yürütme işlemi 110 voltta 120 dakikada gerçekleştirildi. Yürütülen jel distile su ile çalkalanarak fazla boyanın uzaklaşması sağlandı ve jel BioSpectrum 500 (UVP, Cambridge, UK) ile ultraviyole ışık altında incelendi. PCR ürünlerindeki *bla*_{PER-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58} genlerinin varlığı araştırıldı.

3.5. PFGE

Çalışmaya dahil edilen 173 izolatın tiplendirmesi PFGE yöntemi ile *Apal* enzimi kullanılarak Durmaz R. ve ark.'nın belirttiği şekilde gerçekleştirildi (6) .

3.5.1. İzolatların hazırlanması

- 1) Tür düzeyinde tanımlanan izolatların kanlı agar plaklarına tek koloni ekimi yapıldı.
- 2) 37 °C'de bir gece inkübasyon sonunda kültürlerin saflığı kontrol edildi.
- 3) Saf kültür olarak elde edilen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (100Mm tris HCl, 100Mm EDTA pH 8) içinde süspanse edildi.

- 4) Bakteri yoğunluğu 4 McFarland olacak şekilde ayarlandı.
- 5) Hücre süspansiyonu, 2500 rpm'de, 4°C'de, 15 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonrası üstteki HST atıldı.
- 6) Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek kısa süreli vorteks yapıldı.

3.5.2. İzolatların agaroz gömülmesi

- 1) HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz hazırlandı. Balon joje içerisine 9 ml HST ve % 2'lik (0,2 g) düşük erime ısılı agaroz (BIO-RAD Low melting agar 161-3113EDU) eklendi. Balon jolenin ağız kısmı alüminyum folyo ile kapatıldı ve mikrodalga fırında 10 saniye bekletilip çıkarıldıktan sonra hafifçe karıştırıldı. Agaroz tamamen çözülene dek işlem tekrarlandı.
- 2) Agaroz çözüldükten sonra balon joje, sıcaklığı 45-50°C'ye ayarlanmış su banyosuna bırakıldı.
- 3) Ardından içine %1 sodyum dodesil sülfat (SDS) eklendi ve stok solüsyondan 1,5 ml'lik ependorflara 200 µl dağıtılarak, kuru ısı bloğunda 45-50°C'de kullanıma hazır şekilde bekletildi.
- 4) HST içerisinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısılı agaroz-SDS bulunan tüpe eklendi. Birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandı.
- 5) Karışım bekletilmeden agaroz kalıbına (10mm x 5mm x 1,5mm, Bio Rad Laboratories) aktarıldı.
- 6) Kalıplar 4 °C'de 20 dakika bekletildi.

3.5.3. Agaroz içerisindeki hücrelerin parçalanması

- 1) Lizis solüsyonu (50 Mm Tris, 50 Mm EDTA, %1 sarkozil, 20 mg/ml proteinaz K) hazırlandı ve 500 µl steril kapaklı tüplere dağıtıldı.
- 2) +4°C'deki kalıplar lizis solüsyonu içerisine yerleştirildi.
- 3) Solüsyonlar 55 °C'de 2 saat süreyle çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

3.5.4. Lizis işleminden sonra kalıpların yıkanması

- 1) Lizis aşamalarının ardından kalıplar 2 kez ultra-saf su ile ve 3 kez TE tamponu ile 15'er dakika yıkandı. Böylece saflaştırılmış olan DNA kalıpları restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirildi.

3.5.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

- 1) *A. baumannii* için etkinliği daha önceden araştırılan *Apal* enzimi kullanıldı.
- 2) DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bistüri yardımıyla 1/4 oranında kesildi. Parçalardan biri 200 µl RE tamponu içerisinde 25 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 3) Her kalıp 30 ünite *Apal* karışımı ile 37 °C'de 2 saat inkübe edilerek kesim işleminin gerçekleşmesi sağlandı.
- 4) Kesim işleminden sonra kalıplar 200 µl 0.5X TBE tamponu ile yıkanarak elektroforez tankına yüklenmeye hazır hale getirildi.

3.5.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

- 1) 100 ml 0.5X TBE tamponu içinde %1'lik agaroz (Pulsed-field certified agarose, BioRad Laboratories) hazırlandı.
- 2) Düz bir zeminde agarozun döküleceği kalıp hazırlandı.
- 3) RE ile kesilmiş olan agaroz kalıpları tarağın uç kısmına paralel olarak yerleştirildi.
- 4) Kurutma kağıdı veya kağıt havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı.
- 5) 45-50°C ye kadar soğuyan agar kasetin üzerine döküldü.
- 6) Oda sıcaklığında 20 dakika katılaşması için bekletildi ve katılaştıktan sonra taraklar çekildi.
- 7) Agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve içinde 1900-2000 ml 0,5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

3.5.7. Elektroforez

CHEFF-DR II cihazında (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) elektroforez yapıldı. Aşağıdaki elektroforez şartları; başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 20 sn, vuruş açısı 120° , akım $6V/cm^2$, sıcaklık $14^\circ C$ ve süre 19 saat olarak ayarlandı.

3.5.8. Sonuçların gözlenmesi ve analizi

- 1) Elektroforez işleminden sonra jel, $5 \mu g/ml$ etidyum bromür içeren 400 ml ultra-saf su içinde 20 dakika bekletilerek boyandı.
- 2) UV ışık altında görüntülendi.
- 3) Gel logic 1500 görüntüleme sistemi (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bantlarının fotoğrafı çekildi ve fotoğraflar TIFF formatında bilgisayara kaydedildi.
- 4) BioNumerics yazılım sistemi (Applied Maths, Austin, ABD) kullanılarak bant profillerinin analizi gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

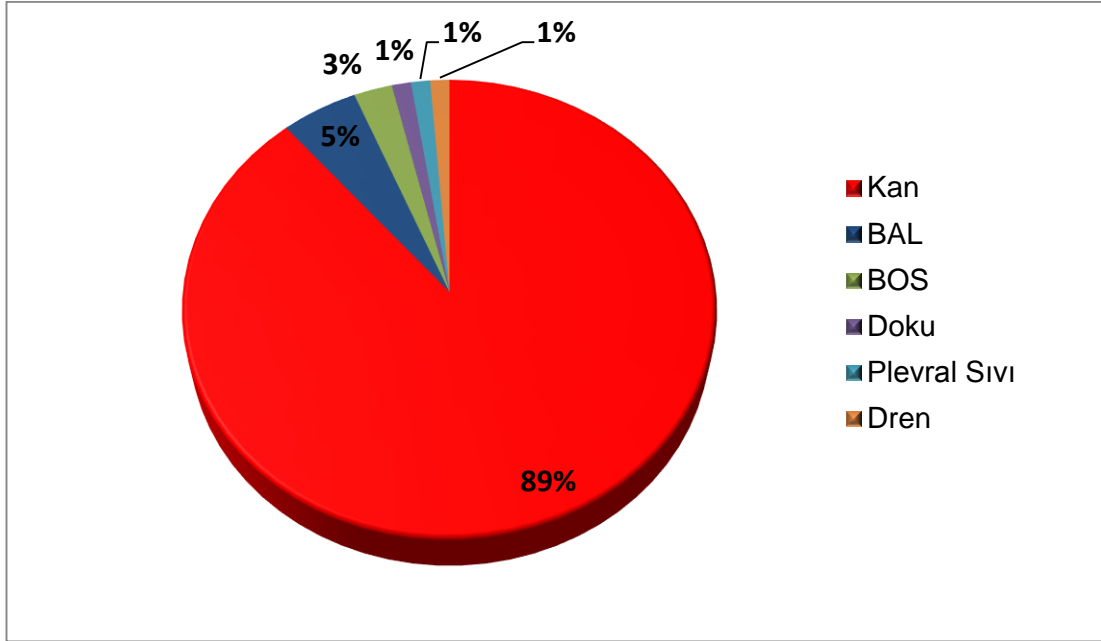
4.1. Hastaların Klinik Özellikleri

Çalışmaya katılan hastalara ilişkin kayıtlar incelendiğinde, *A. baumannii* izole edilen 164 hastanın, 88'inin erkek 76'sının kadın olduğu ve her iki cinsiyette yaş dağılımının 0-78 yaş arasında değiştiği kaydedilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların ortalama yaşı 60.1 olup, hastaların 160'ı erişkin, 4'ü çocuk yaş grubundadır. Hastaların %30.5'i dahili yoğun bakım ünitelerinde, %52.4 cerrahi yoğun bakım ünitelerinde, %11'i yanık ünitelerinde ve %6.1'i acil servislerde yatarak tedavi görmektedir. Hastaların, sırasıyla %11 ve %9'unda kortikosteroid ve kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü bulunurken; organ veya kemik iliği transplantasyonu yapılmış hasta bulunmamaktadır. Santral ve üriner kateterizasyon, mekanik ventilasyon gibi invaziv girişimler ise hastaların tümünde saptanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve risk faktörleri (n=164).

	Sayı (n)	Bulunma yüzdesi (%)
Cinsiyet		
Erkek	88	53.6
Kadın	76	46.3
Bulunduğu Bölüm		
Dahili yoğun bakım üniteleri	50	30.5
Cerrahi yoğun bakım üniteleri	86	52.4
Yanık yoğun bakım üniteleri	18	11
Acil yoğun bakım üniteleri	10	6.1
İmmünsüpresyon		
Kortikosteroid kullanımı	18	11
Transplantasyon (organ, kemik iliği)	-	-
Kemoterapötik ilaç kullanımı	15	9.1
İnvaziv İşlemler		
Santral kateterizasyon	125	76.2
Üriner kateterizasyon	161	98.2
Mekanik ventilasyon	112	68.7
Nazogastrik tüp	86	52.4
Orotakeal entübasyon	74	45.4
Diğer	32	19.5
Mortalite	96	58.5

Çalışmada *A. baumannii* izole edilen hasta örnekleri incelendiğinde, kan örneklerinin en sık izolasyon yapılan klinik örnek türü olduğu görüldü (Şekil 1).

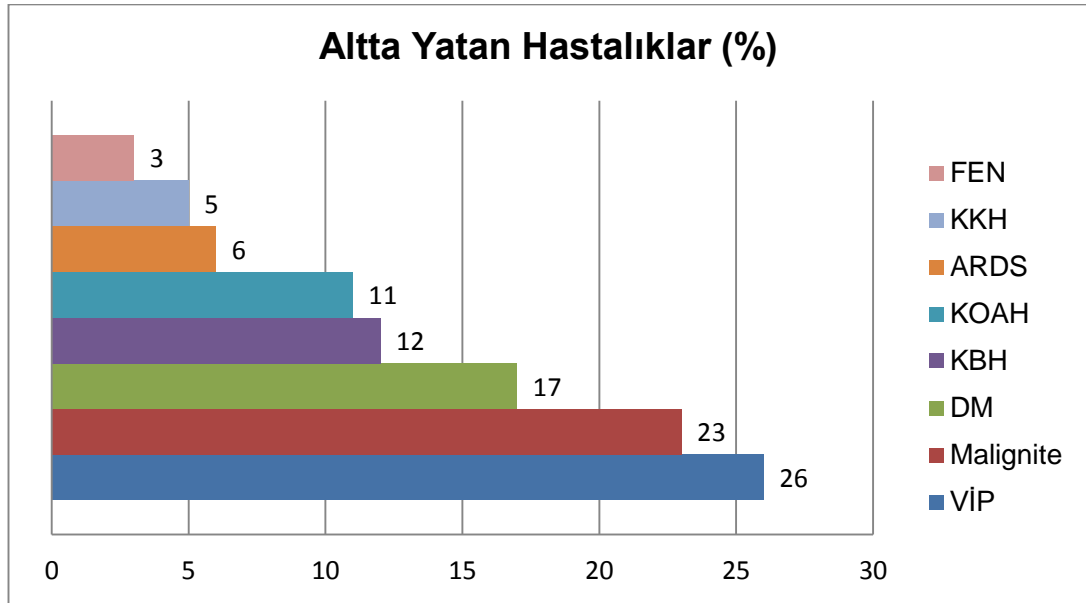


BAL: Bronkoalveolar lavaj, BOS: Beyin omurilik sıvısı

Şekil 1. *A. baumannii* izole edilen klinik örneklerin dağılımı (n=164).

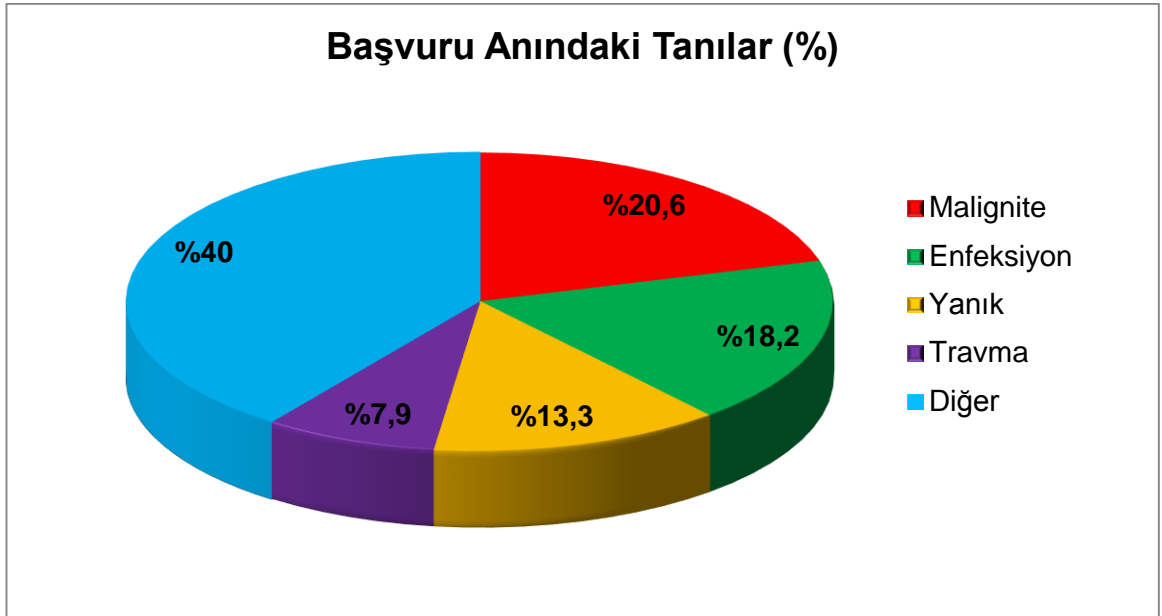
Çalışmaya dahil edilen 164 hastanın %95'inde, ventilatör ilişkili pnömöni (VİP), hematolojik veya solid tümörler, diabetes mellitus (DM), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), kronik böbrek hastalığı (KBH), kronik karaciğer hastalığı (KKH) ve febril nütropeni (FEN) gibi altta yatan çeşitli hastalıklar saptandı (Tablo 10).

Tablo 10. Çalışmaya dahil edilen hastalarda tespit edilen altta yatan hastalıkların yüzdelik dağılımı (n=164).



FEN: Febril nütropeni, KKH: Kronik karaciğer hastalığı, ARDS: Akut respiratory distress sendromu, KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, KBH: Kronik Böbrek Hastalığı, DM: Diabetes mellitus, VİP: Ventilatör ilişkili pnömöni

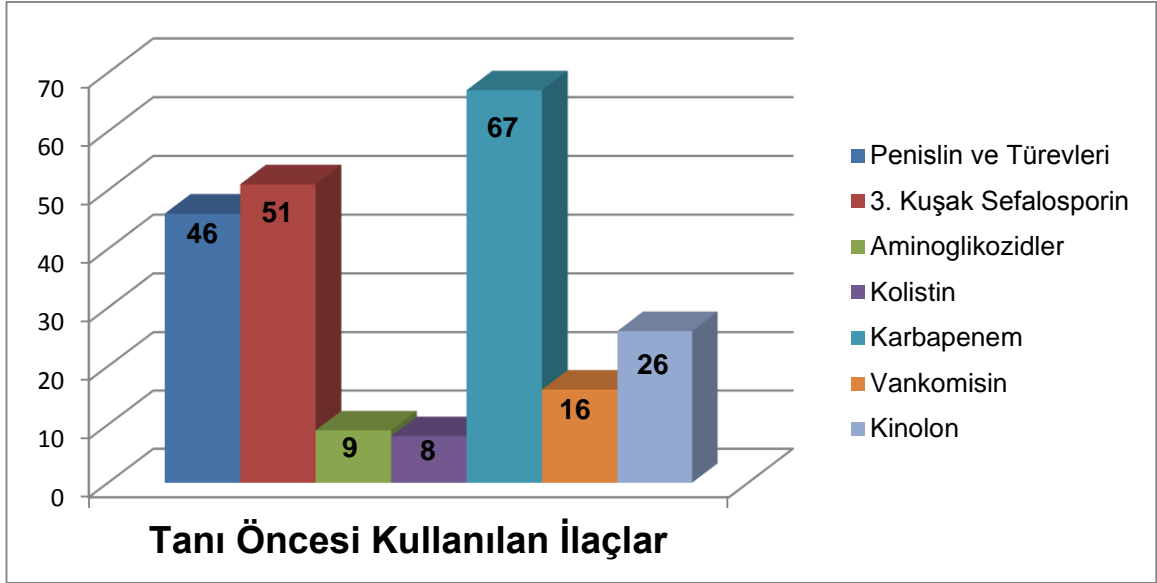
Çalışmaya dahil edilen hastaların başvuru anındaki tanıları incelendiğinde, ilk sırada malignitelerin (%20.6), ikinci sırada ise enfeksiyon hastalıklarının (%18.2) yer aldığı görüldü (Şekil 2).



Şekil 2. Çalışmaya dahil edilen hastaların başvuru anındaki tanılarının yüzdelik dağılımı (n=164).

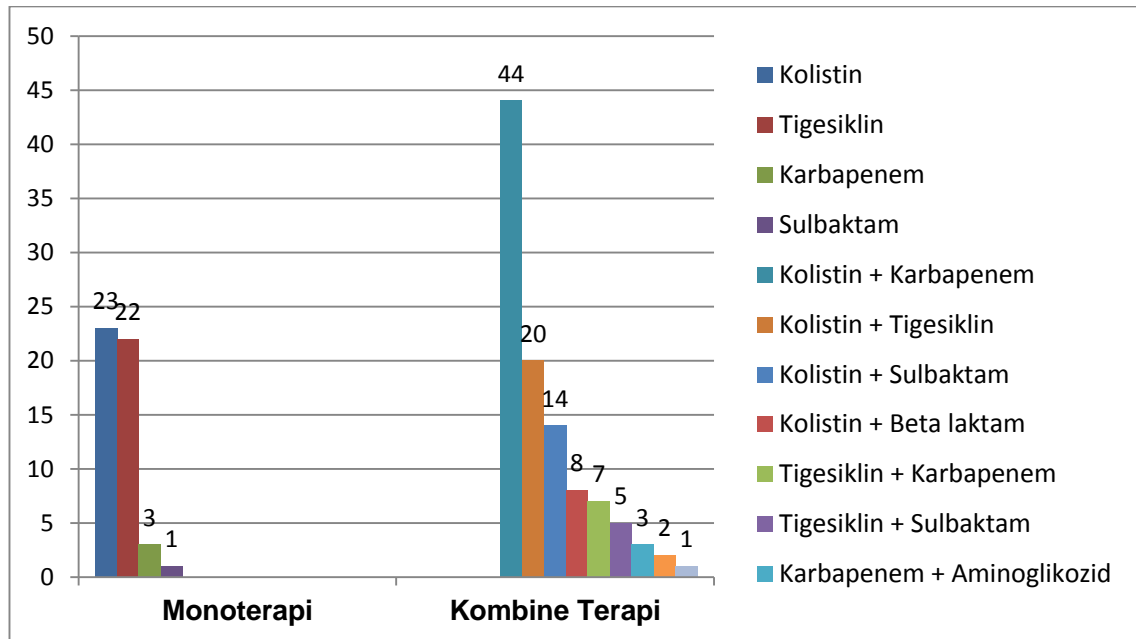
ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonu tanısı konulmadan önce hastalarda kullanılan antibiyotikler incelendiğinde ilk sırada karbapenemler (67/153), ikinci sırada 3. kuşak sefalosporinler (51/153) yer aldığı saptandı (Tablo 11).

Tablo 11. ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonu tanısı konulmadan önce kullanılan antibiyotiklerin dağılımı (n=153).



ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlu 153 hastanın tedavisinde kullanılan ilaçlar incelendiğinde; %32.2'sinin monoterapi, %67.7'sinin ise kombine terapi aldığı; monoterapide en sık kolistinin, kombine terapide ise en sık kolistin ve karbapenemlerin kullanıldığı belirlendi (Tablo 12).

Tablo 12. ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonuna yönelik monoterapi ve kombine terapi alan hasta sayıları ve hastaların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin dağılımı (n=152)



Çalışmaya dahil edilen hastaların mortalite için risk faktörleri değerlendirildiğinde, 65 yaşın üzerinde olmak, diabetes mellitus, karaciğer yetmezliği gibi altta yatan hastalıklar, kemoterapötik ilaç kullanımı ve daha önceden kinolon kullanımı mortalite ile ilişkili bulundu (Tablo 13).

Tablo 13. İnvaziv örneklerinden *A. baumannii* izole edilen 164 hastanın mortalite için risk faktörleri

	Tek yönlü varyans analizi			
	Mortalite (n=96)	Sağ kalım (n=68)	Risk oranı (%95 CI)	P
Demografik Özellikler				
Yaş			1,863 (1,251-2,775)	0,001
<64	39	45		
≥65	57	23		
Cinsiyet			1.380 (0,939-2,028)	0,093
Erkek	48	43		
Kadın	48	25		
Komorbidite				
DM	23	7	2.746 (1.103-6.833)	0.026
KOAH	12	6	1,476 (0.525-4.149)	0.458
KBH	12	8	1.071 (0.413-2.781)	0.887
KC yetmezliği	11	2	4,271 (0.915-19.932)	0.047
KS kullanımı	8	11	0.471 (0.179-1.242)	0.122
Nötropeni	4	2	1.435 (0.255-8.065)	0.680
Malignite	27	12	1.826 (0.849-3.924)	0.120
Kemoterapi	14	3	3.699 (1.020-13.421)	0.035
İnvaziv İşlemler				
Mekanik ventilasyon	67	38	1.824 (0.955-3.484)	0.067
Santral kateterizasyon	74	54	0.872 (0.409-1.858)	0.723
Üriner kateterizasyon	94	66	1.424 (0.196-10.368)	0.726
Tanı Öncesi Kullanılan İlaçlar				
Penisilin ve türevleri	29	15	1.529 (0.744-3.142)	0.246
3. kuşak sefalosporin	32	23	1.067 (0.542-2.099)	0.852
Kinolon	22	5	3.646 (1.30-10.227)	0.010
Aminoglikozit	7	2	2.512 (0.504-12.510)	0.246
Karbapenem	49	37	0.840 (0.438-1.610)	0.599
Kolistin	3	5	0.391 (0.090-1.699)	0.196

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

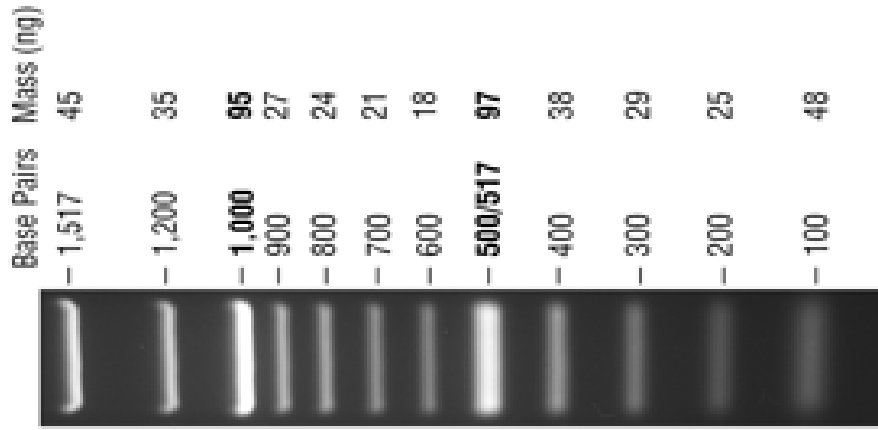
Hastaların temas ettiği ortamlardan izole edilen 12 çevresel izolat ve 164 klinik izolatın mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilen antibiyotik duyarlılık testleri sonunda MİK değerlerinin dağılımı, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve direnç yüzdeleri belirlendi (Tablo 14).

Tablo 14. Çalışmada incelenen klinik ve çevresel izolatlara ilişkin MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri, MİK dağılımı ve direncin görülme yüzdesi (n=171).

Antimikrobiyal	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Dağılımı	Direnç (%)
Amikasin	≥256	≥256	1 – ≥256	91.8
Ampisilin-sulbaktam	256	≥256	4 – ≥256	99.4
Seftazidim	256	≥256	0.125 – ≥256	99.4
Siprofloksasin	128	≥256	0.5 – ≥256	100.0
İmipenem	64	128	0.125 – ≥256	99.4
Kolistin	0.5	1	0.25 – 64	1.2

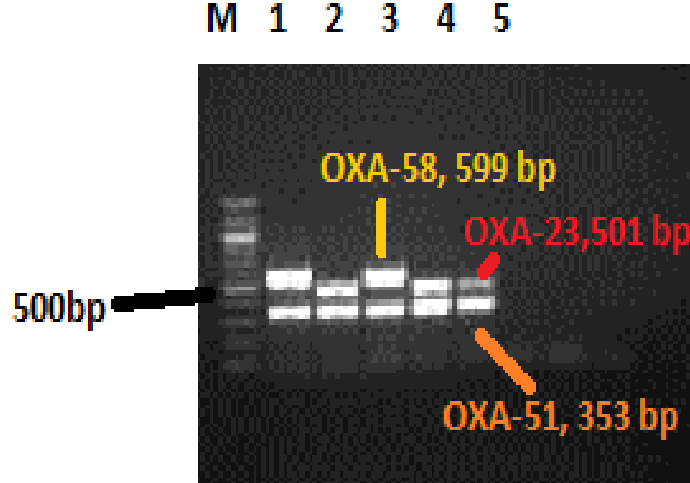
4.3. Moleküler Çalışma Sonuçları

ÇİD *A. baumannii* izolatlarında direnç genlerinin belirlenmesine yönelik kullanılan moleküler ağırlık standardı (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, İngiltere) baz dizilimleri Şekil 3'de gösterilmiştir.



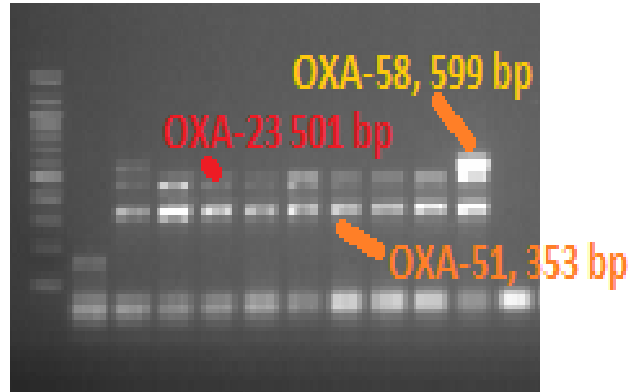
Şekil 3. Çalışmada kullanılan moleküler ağırlık standardı baz çifti (bp) dizilimleri

Çalışmaya dahil edilen izolatların tümünde *bla*_{OXA-51}, 169 (%98.8) izolatta *bla*_{OXA-23} ve 5 (%2.9) izolatta *bla*_{OXA-58} saptanırken; hiçbir izolatta *bla*_{OXA-24} saptanmadı (Şekil 4).



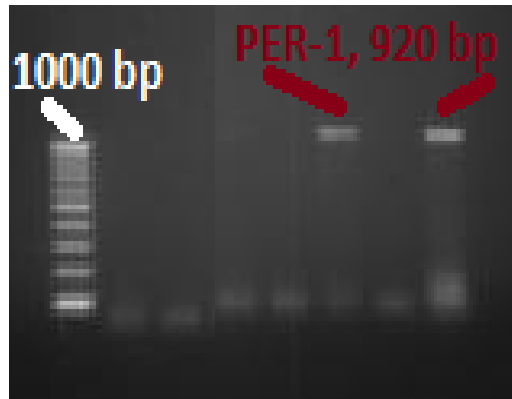
Şekil 4. A. baumannii izolatlarına ait *bla*_{OXA} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık standardı; 1 ve 3: *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58} pozitif izolatlar; 2, 4 ve 5: *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-23} pozitif izolat.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 P N



Şekil 5. *A. baumannii* izolatlarına ait *bla*_{OXA} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık standardı; 2: *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-58} pozitif izolat; 3-9: *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-23} pozitif izolatlar. P: Pozitif kontrol; N: Negatif kontrol.

M 1 2 3 4 5 6 7

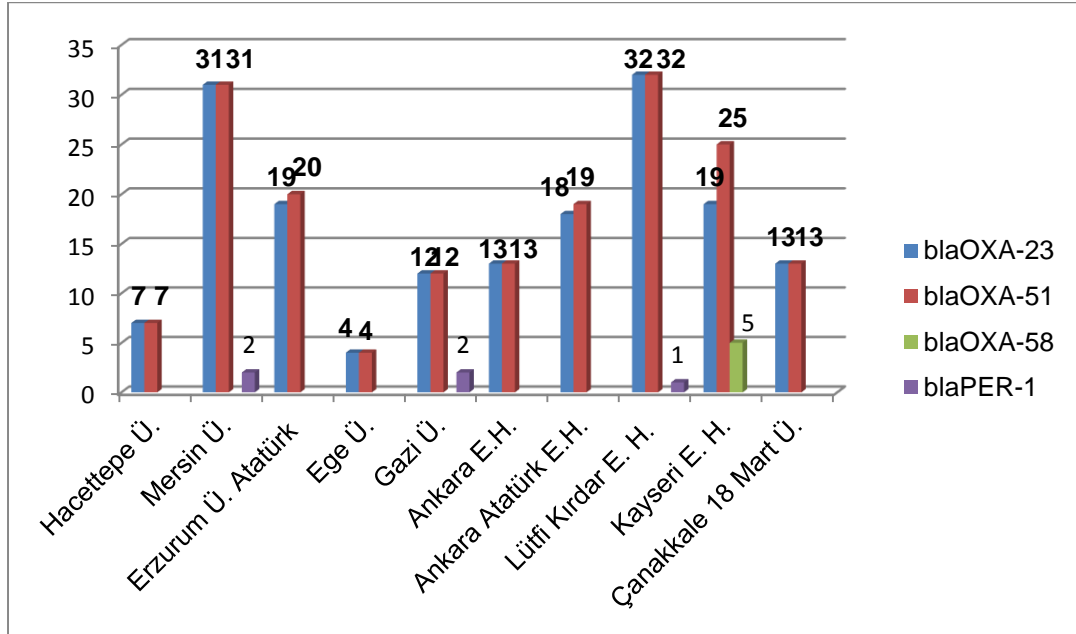


Şekil 6. *A. baumannii* izolatlarına ait *bla*_{PER-1} PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp moleküler ağırlık standardı; 1-4,6: *bla*_{PER-1} negatif izolatlar; 5 ve 7 *bla*_{PER-1} pozitif izolatlar.

Merkezlere göre direnç geni dağılımı değerlendirildiğinde, blaOXA-23 geni her merkezden izole edilirken; blaOXA-58 geni sadece Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarında tespit edildi.

Ayrıca blaOXA-58 direnç geni saptanan bir suşta blaOXA-23 geni de saptandı. Çalışmada araştırılan diğer bir direnç geni blaPER-1 ise beş izolatta tespit edildi ve bu izolatların ikisi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden, ikisi Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden, biri ise Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden elde edildi. Ayrıca, bu izolatlarda *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} ve *bla*_{IMP} genleri de incelendi ancak izolatların hiçbirinde bu genler tespit edilmedi (Tablo 15).

Tablo 15. Çalışmada incelenen direnç genlerinin merkezlere göre dağılımı.



4.4. Pulse Field Jel Elektroforez (PFGE) Sonuçları

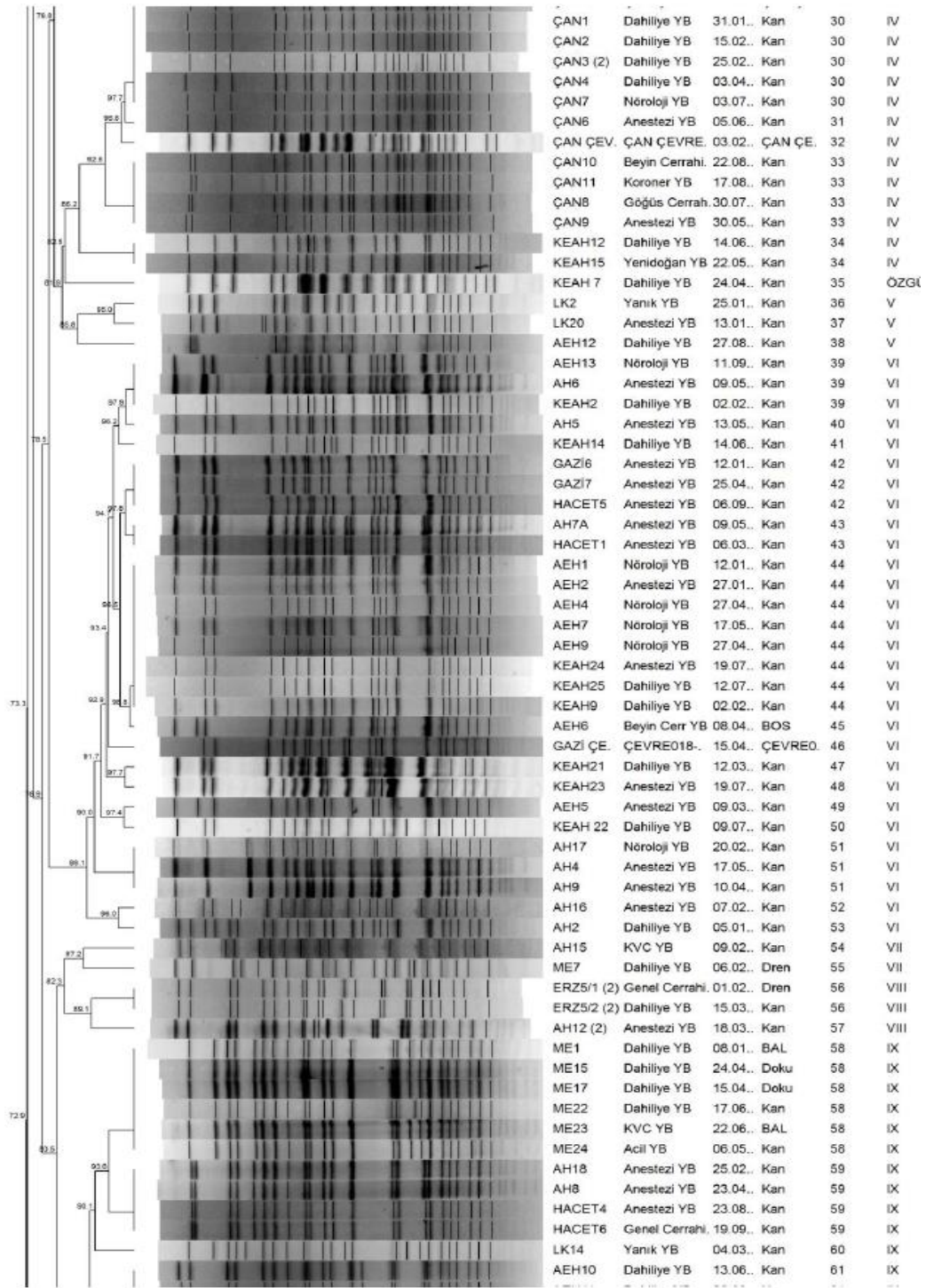
Tiplendirmeye alınan 173 *A. baumannii* izolatına ilişkin PFGE dendrogramı şekil 7'de gösterildi. Bu verilere göre izolatlar arasında 89 farklı pulstip saptandı. Pulstiplerden 29 tanesinin birbirleriyle ayırt edilemez profili gösteren ≥ 2 suş içerdiği belirlendi. Kümelerin genişliğinin 2–10 suş arasında değiştiği ve 14 farklı PFGE grubu olduğu gösterildi. Kümeleşme oranı %65.3 olarak hesaplandı. Pulstipler arasındaki benzerlik oranının ≥ 85 alınması nedeniyle 16 suşun klonal yönden ilintisiz olduğu, 157

(%90.7) suşun ise birbirleriyle ilişkili 14 grup içerisinde toplandığı kaydedildi (Şekil 7).

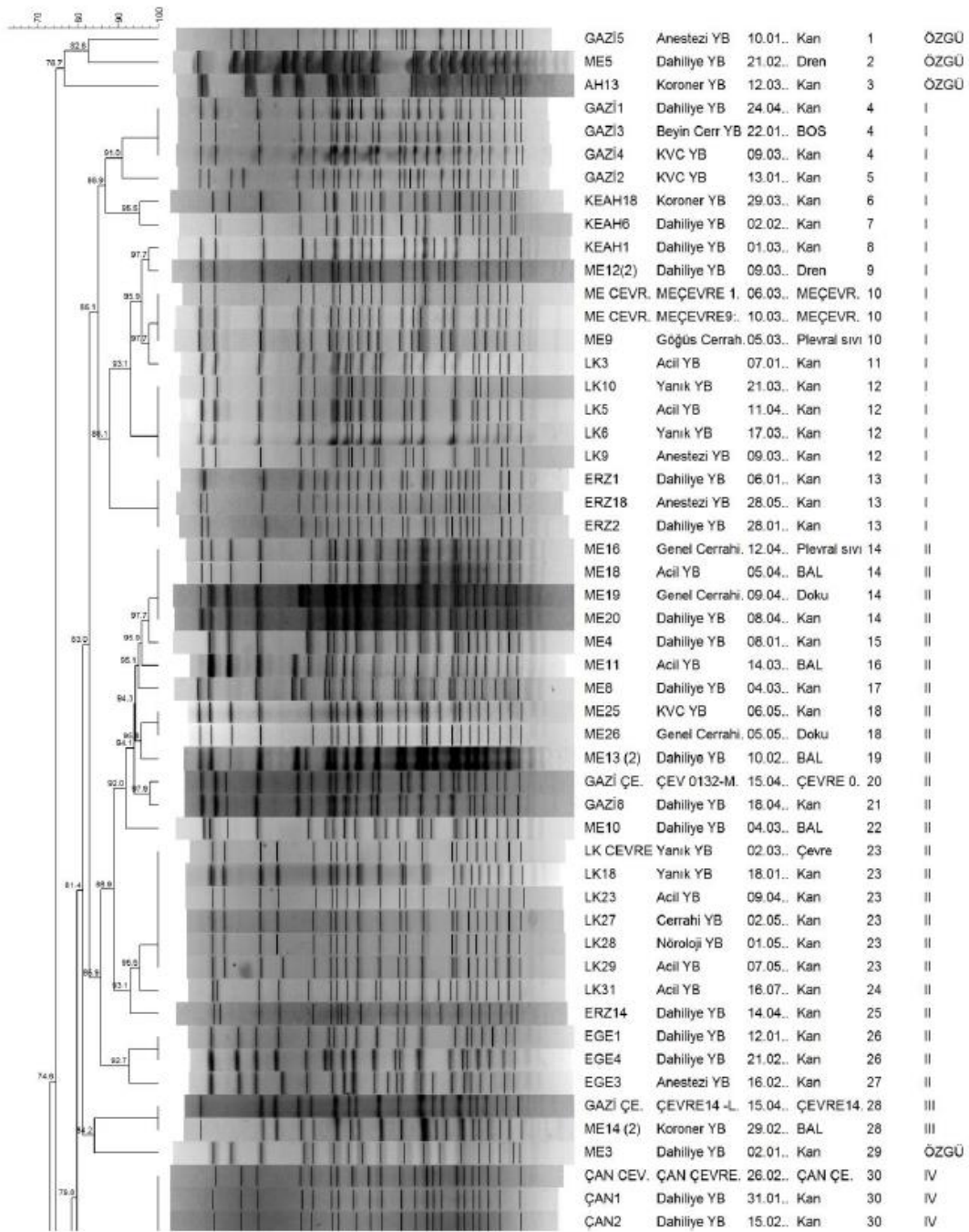
PFGE grupları incelendiğinde en geniş grubu, VI numaralı grubun ($n=29$) oluşturduğu; bu grubu sırasıyla II ve IX numaralı grupların ($n=24$, $n=21$) takip ettiği görüldü. Elde edilen veriler antibiyotik duyarlılık test verileri ile değerlendirildiğinde elde edilen PFGE gruplarındaki antibiyotik direnç oranları Tablo 16'da gösterildi.

Tablo 16. Acinetobacter klinik izolatlarında PFGE grupları ile antibiyotik duyarlılık profillerinin korelasyonu

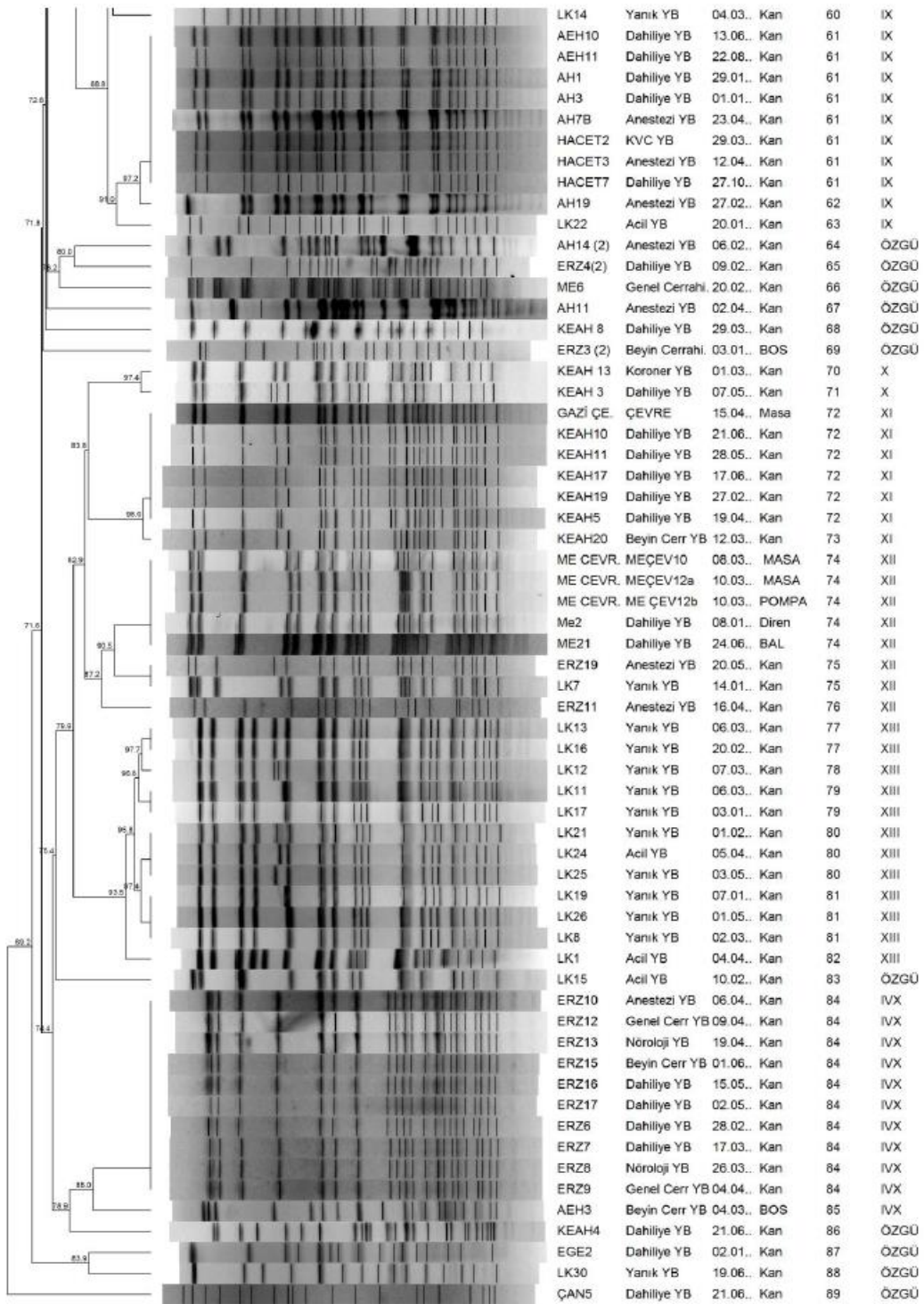
PFGE grup	PFGE kümelerindeki dirençli izolatların sayısı (%)														Kümelenmeyen dirençli izolatlar
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Antibiyotik															
Seftazidim	19 (100)	24 (100)	2 (100)	14 (100)	3 (100)	29 (100)	2 (100)	3 (100)	21 (100)	2 (100)	7 (100)	3 (42,8)	12 (100)	10 (90,9)	14 (87,5)
İmipenem	19 (100)	24 (100)	2 (100)	14 (100)	3 (100)	29 (100)	2 (100)	3 (100)	21 (100)	2 (100)	7 (100)	6 (85,7)	12 (100)	11 (100)	15 (93,7)
Siprofiloksasin	19 (100)	24 (100)	2 (100)	14 (100)	3 (100)	29 (100)	2 (100)	3 (100)	21 (100)	2 (100)	7 (100)	7 (100)	12 (100)	11 (100)	15 (93,7)
Sulbaktam-ampisilin	18 (94,7)	24 (100)	2 (100)	14 (100)	3 (100)	29 (100)	2 (100)	3 (100)	21 (100)	2 (100)	7 (100)	7 (100)	12 (100)	11 (100)	15 (93,7)
Amikasin	16 (84,2)	24 (100)	2 (100)	14 (100)	3 (100)	29 (100)	1 (50)	3 (100)	21 (100)	2 (100)	7 (100)	6 (85,7)	12 (100)	1 (9)	13 (81,2)
Kolistin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)



Şekil 7. Çalışmada değerlendirilen *A. baumannii* izolatlarına ilişkin PFGE dendogramı



Şekil 7 (Devamı). Çalışmada değerlendirilen *A. baumannii* izolatlarına ilişkin PFGE dendrogramı.



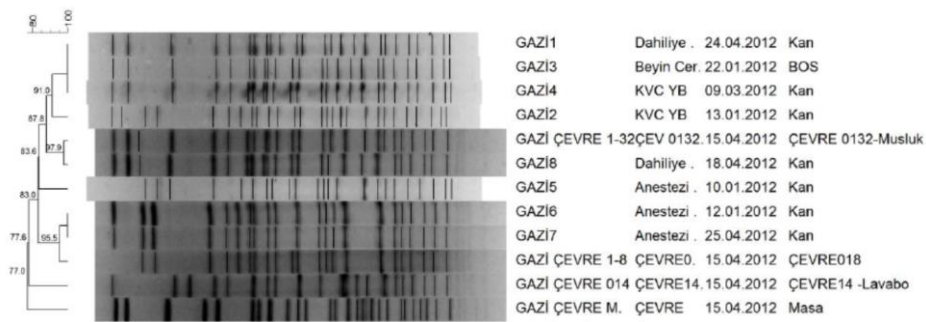
Şekil 7 (Devamı). Çalışmada değerlendirilen *A. baumannii* izolatlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

Tiplendirilen 173 *A. baumannii* izolatına ilişkin veriler (epidemiyolojik özellikleri ve antibiyotik duyarlılık testleri ile moleküler testlerin sonuçları) merkezlere göre şöyle değerlendirildi:

1) Gazi Üniversitesi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden 10 Ocak 2012–25 Nisan 2012 tarihleri arasında tiplendirilen suşların 7/12'si kandan, 1/12'i BOS'dan ve 4/12'ü çevreden izole edildi. Tiplendirilen 4 izolatın PFGE Grup I, 3 izolatın Grup VI, 2 izolatın Grup II, 1'er izolatın Grup XI ve Grup III'te yer aldığı belirlendi. Tiplendirilen 1 izolatın ise herhangi bir PFGE grubunda yer almadığı ve tiplendirmeye alınan pulsotiplerden 2'sinin birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği görüldü (Şekil 4.3).

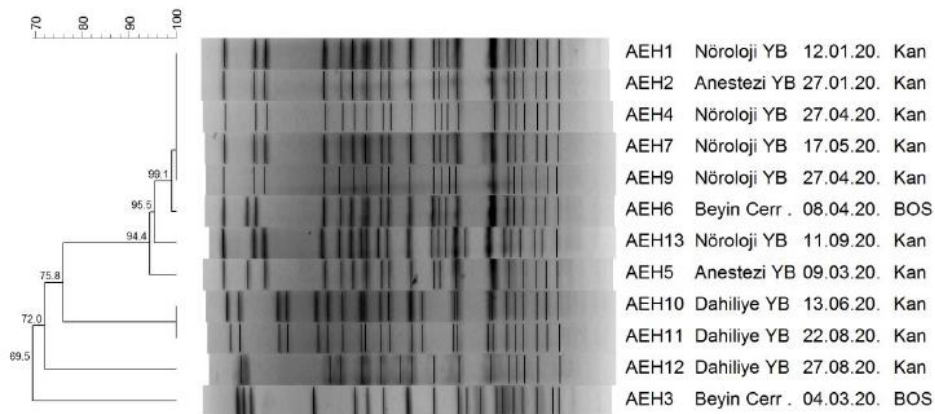
Çevresel örnekler ile klinik örnekler karşılaştırıldığında 15 Nisan 2012 tarihinde izole edilen GAZİ ÇEVRE1–32 örnekleri ile 18 Nisan 2012 tarihinde Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nde tedavi gören bir hastanın kanından izole edilen GAZİ8 örneği arasında %97.7 oranında benzerlik saptandı. Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi'nde tedavi gören hastalardan izole edilen GAZİ6 ve GAZİ7 örnekleri ile çevreden izole edilen GAZİ ÇEVRE1–8 örnekleri arasında %95.5 oranında benzerlik olduğu tespit edildi. Diğer çevresel örnekler ve klinik örnekler arasında böyle bir benzerlik görülmedi (Şekil 8).



Şekil 8. Gazi Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

2) Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi

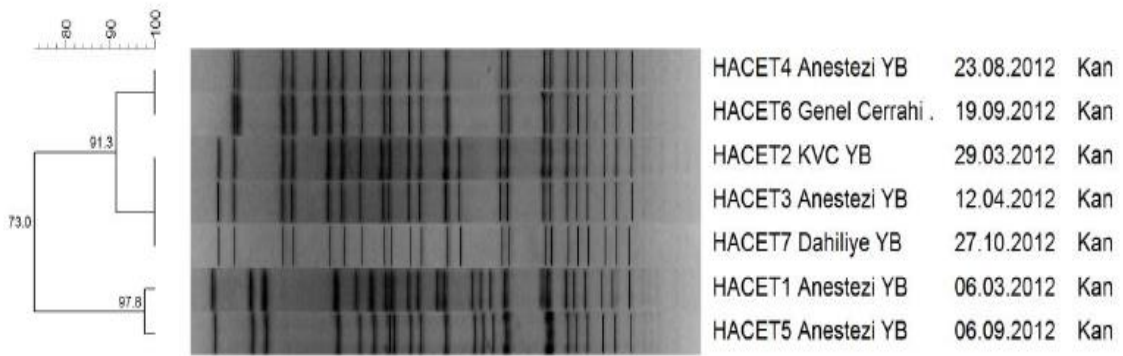
Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi'nden, 12 Ocak 2012–11 Eylül 2012 tarihleri arasında dört yoğun bakım ünitesinden 10'u kan ve ikisi BOS örneklerinden olmak üzere 12 *A. baumannii* suşu izole edildi. Genotiplendirilen sekiz izolatin PFGE Grup VI, iki izolatin Grup X ve birer izolatin Grup V ile Grup XIV'de yer aldığı bildirildi. Tiplendirilen pulsotiplerden 2'sinin birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği görüldü (Şekil 9).



Şekil 9. Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi'nde izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

3) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

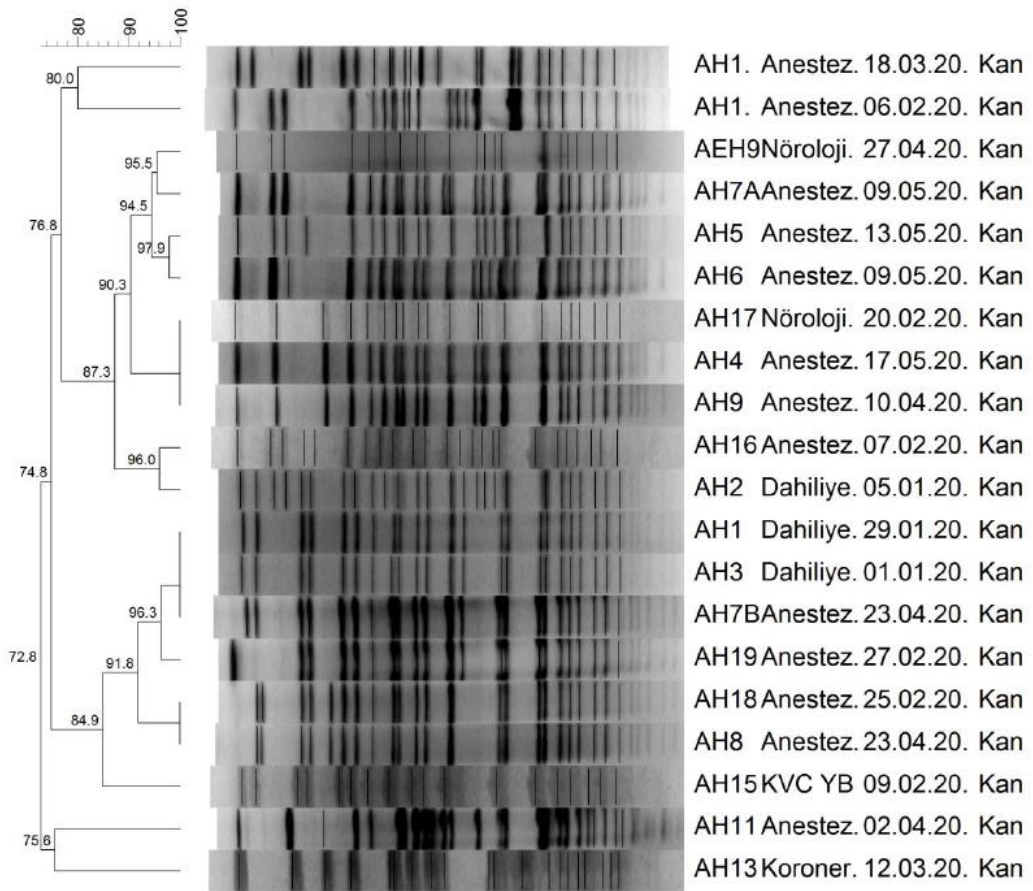
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden 06 Mart 2012–27 Ekim 2012 tarihleri arasında dört farklı yoğun bakım ünitesinden, tümü kan örneklerinden, toplam yedi *A. baumannii* suşu izole edildi. Bu izolatlardan beşinin PFGE Grup IX'da ve iki suşun Grup VI'da yer aldığı görüldü. Tiplendirilen pulsotiplerden ikisinin birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği bildirildi (Şekil 10).



Şekil 10. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

4) Ankara Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi

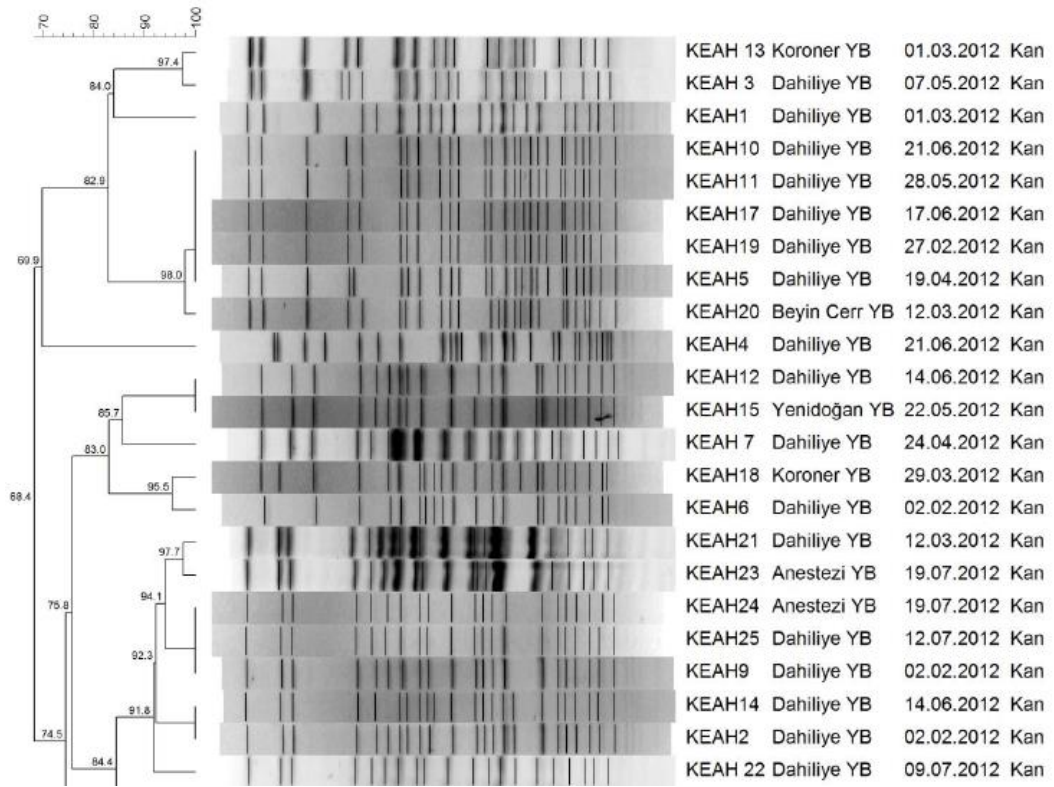
Ankara Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi'nden 01 Ocak 2012–17 Mayıs 2012 tarihleri arası beş farklı yoğun bakım ünitesinden, tümü kandan, toplam 19 (AAEH10 yok) *A. baumannii* izole edildi. Tiplendirilen izolatlar incelendiğinde sekizinin PFGE Grup VI'de, 6'sının Grup IX'de, birer izolatın Grup VII ve Grup VIII'de yer aldığı; üç izolatın ise herhangi bir grupta yer almayıp özgül pulsotipler oluşturduğu belirlendi. Tiplendirilen pulsotiplerden üçünün birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği görüldü (Şekil 11).



Şekil 11. Ankara Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

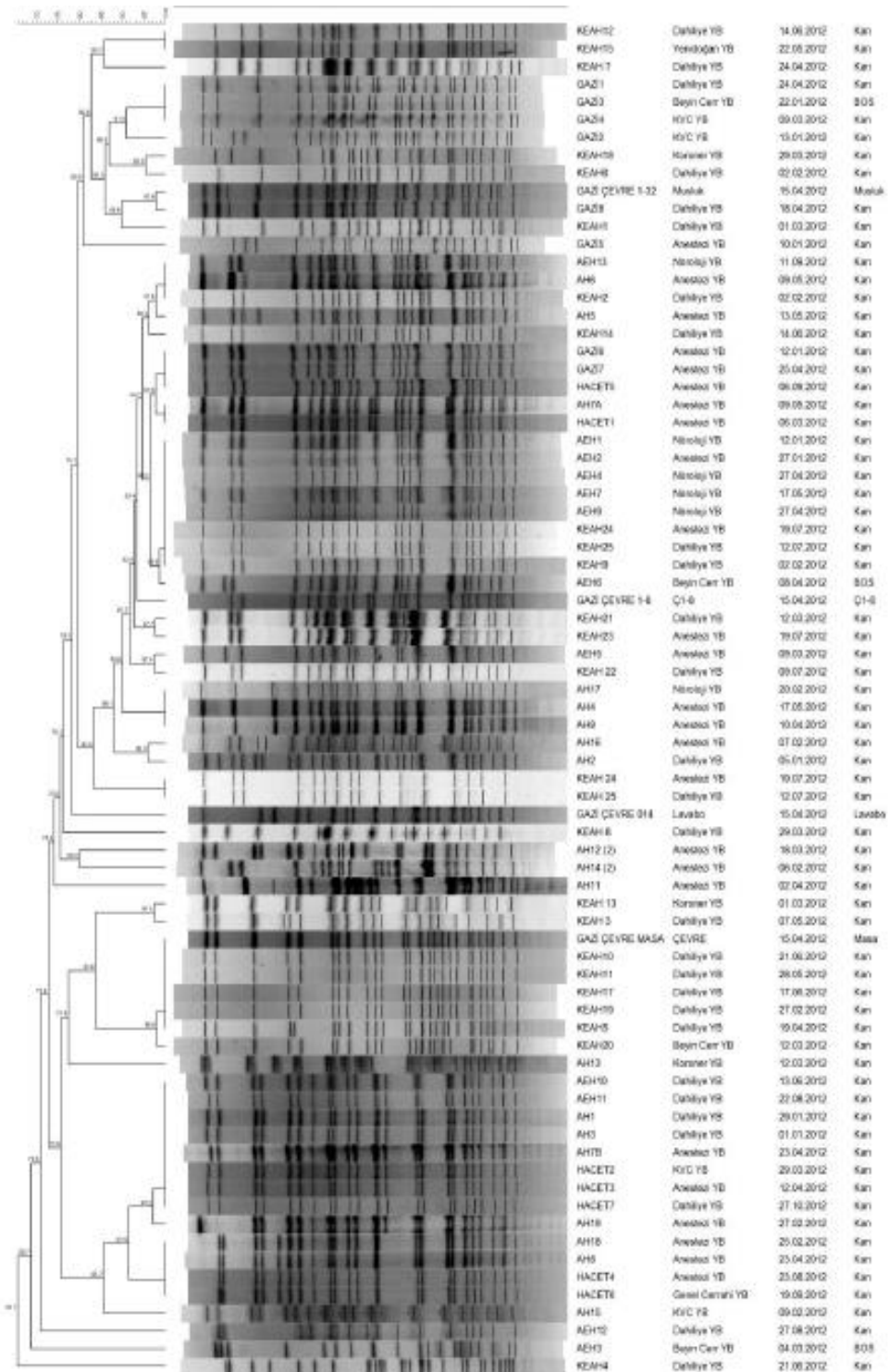
5) Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi

Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi'nden 2 Şubat 2012–19 Temmuz 2012 tarihleri arasında beş farklı yoğun bakım ünitesinden toplam 24 (KEAH 16 yok) *A. baumannii* izole edildi. Tiplendirilen suşlardan sekizi PFGE Grup VI'de, altısı Grup XI'de, üçü Grup I'de, ikisi Grup X'da, ikisi Grup IV'de yer alırken; üç suşun herhangi bir grupta yer almadığı belirlendi. Tiplendirilen pulstotiplerden dördünün birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği görüldü (Şekil 12).



Şekil 12. Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

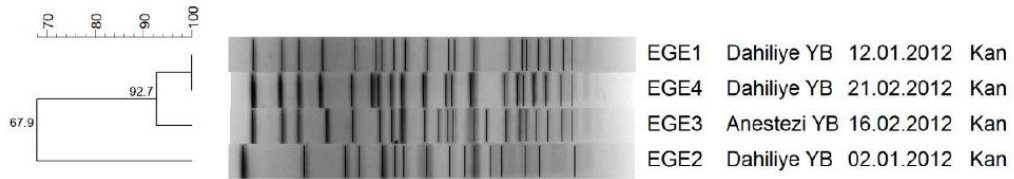
İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan merkezlere ilişkin veriler birlikte değerlendirildiğinde, farklı merkezlerdeki suşların aynı pulstip içerisinde yer aldığı tespit edildi. Gazi Üniversitesi Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nden elde edilen bir çevresel izolat ile Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarının aynı pulstip içerisinde yer aldığı saptandı (Şekil 13).



Şekil 13. İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan merkezlerden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

6) Ege Üniversitesi

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden, 02 Ocak 2012–21 Şubat 2012 tarihleri arasında iki farklı yoğun bakım ünitesinden ÇİD dört *A. baumannii* suşu izole edildi. İzolatların üçü II numaralı PFGE grubunda yer alırken, ikisi aynı pulsotip içerisinde yer aldı (Şekil 14).



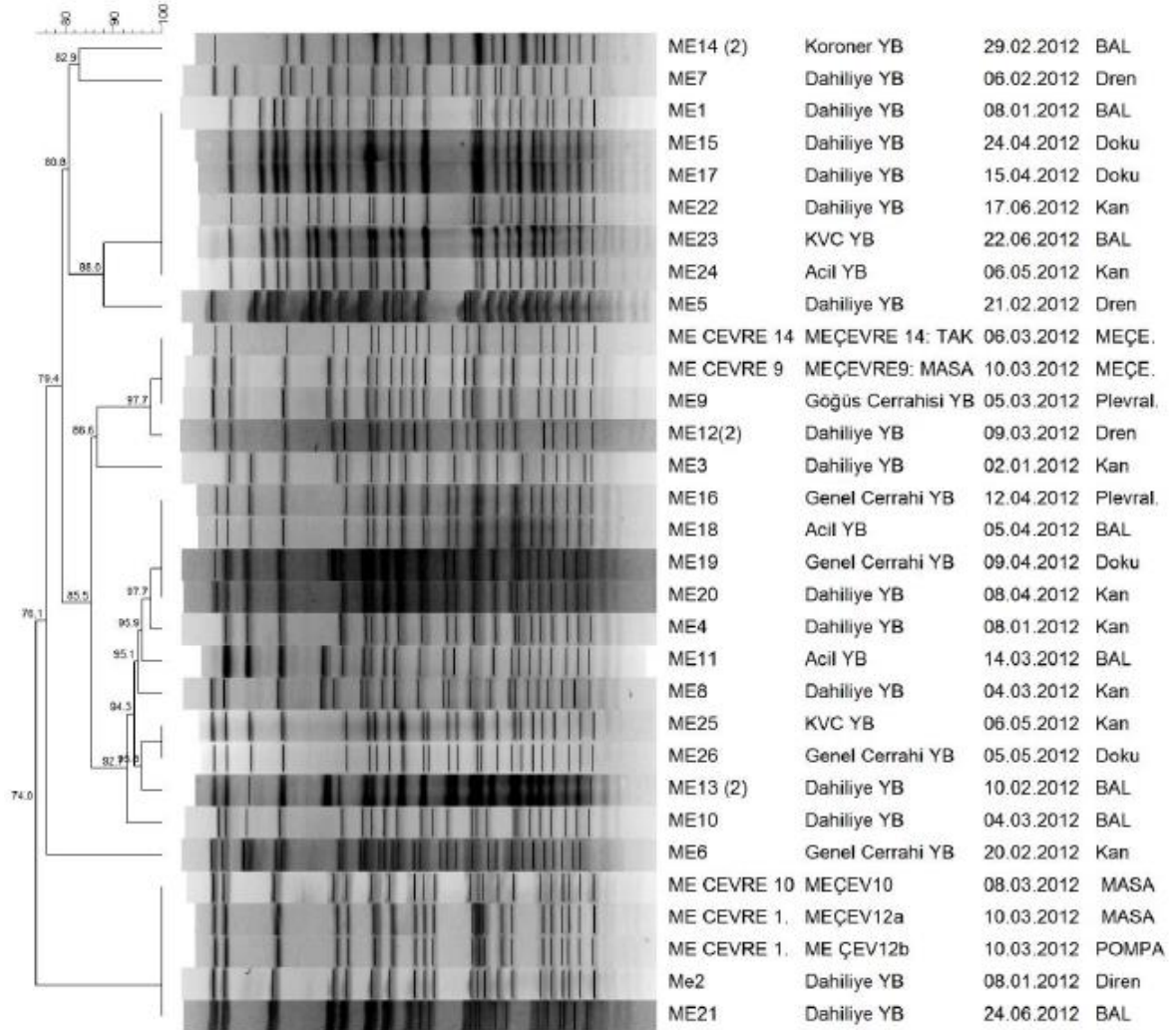
Şekil 14. Ege Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

7) Mersin Üniversitesi

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden 2 Ocak 2012–24 Haziran 2012 tarihleri arasında beş farklı yoğun bakım ünitesinden ÇİD'li 31 *A. baumannii* izole edildi. Tiplendirilen 5/31 örnek yoğun bakım ünitelerindeki çevreden, 26/31 örnek ise hastalardan alınan invaziv örneklerden izole edildi. Tiplendirilen bu 11/31 suş PFGE Grup II'de, 6/31 suş Grup IX'da, 5/31 suş Grup XII'de, 4/31 suş Grup I'de, 1/31 suş Grup III'te ve 1/31 suş Grup VII'de yer aldı. Kalan üç suş ise herhangi bir PFGE grubu içerisinde yer almadı. Tiplendirilen pulsotiplerden beşinin birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği görüldü.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden izole edilip tiplendirilen *A. baumannii* izolatlarının PFGE dendrogramı incelendiğinde ME ÇEVRE10, 12a ve 12b isimli Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'ndeki masalardan ve pompadan alınan örneklerden elde edilen izolatların; ME2 ve ME21 hasta izolatları ile aynı pulsotip içerisinde yer aldığı; Göğüs Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi'nden izole edilen ME ÇEVRE14, ME ÇEVRE9 suşları ile ME9 klinik izolatlarının aynı pulsotip içerisinde yer aldığı tespit edildi. Ayrıca ME1, 15, 17,

22, 23, 24 numaralı suşların aynı pulsotip içerisinde yer almalarına karşın farklı yoğun bakım ünitelerinden izole edildiği belirlendi (Şekil 15).



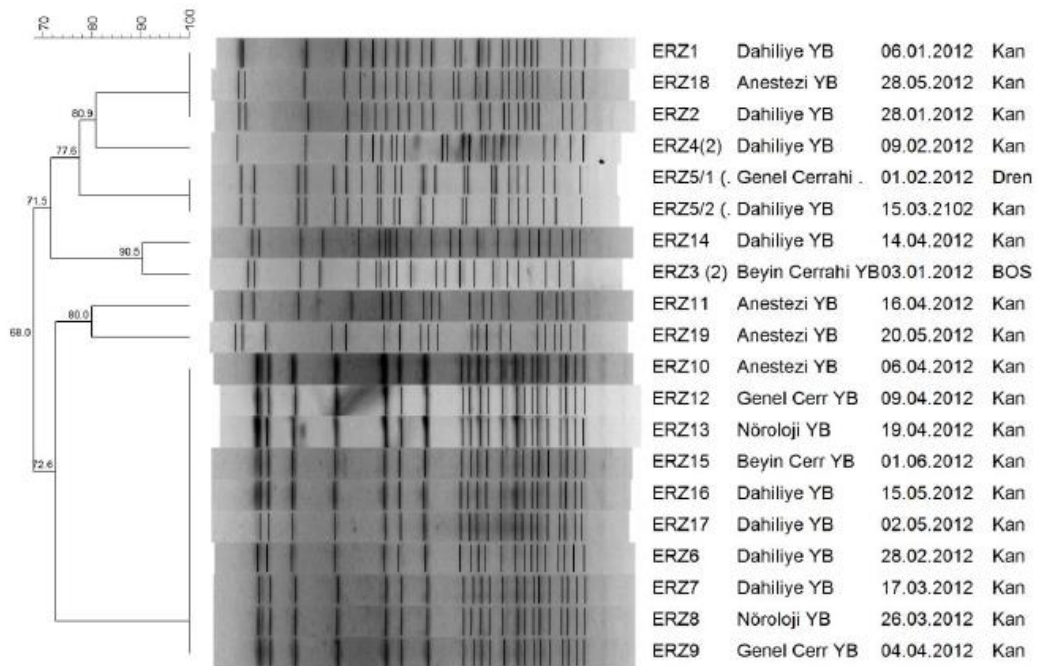
Şekil 15. Mersin Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

8) Atatürk Üniversitesi (Erzurum)

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 3 Ocak 2012–6 Haziran 2012 tarihleri arasında beş farklı yoğun bakım ünitesinden toplam 20 *A. baumannii* izole edildi. Tiplendirilen izolatlardan 10/20'ü PFGE Grup XIV, 3/20'ü Grup I, 2/20'si Grup VII, 2/20'si Grup XII, 1/20'i ise Grup II'de yer aldı. İki izolatin ise

herhangi bir PFGE grubunda yer almadığı ve tiplendirilen pulsotiplerden üçünün birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği görüldü.

Tiplendirilen 10/20 izolat beş farklı yoğun bakımdan izole edilmelerine rağmen aynı paterni gösterdi. Aynı pulsotip içerisinde yer alan 10 izolatin ilki 28 Şubat'ta Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nde; son izolat ise 1 Haziran'da Beyin Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi'nde izole edildi ve bu izolat 4 aylık dönemde beş farklı yoğun bakım ünitesinde saptandı (Şekil 16).



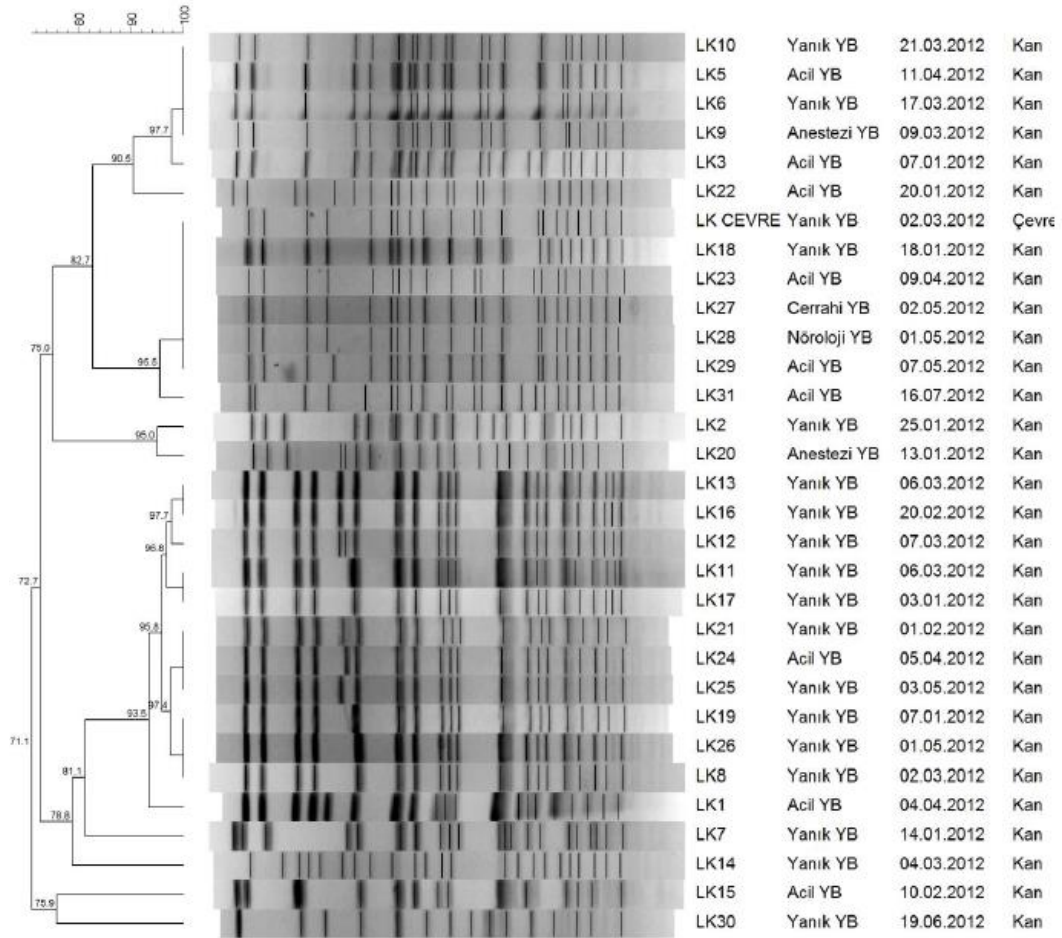
Şekil 16. Atatürk Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

9) Lütfü Kırdar Eğitim Araştırma Hastanesi

Lütfü Kırdar Eğitim Araştırma Hastanesi'nden 3 Ocak 2012–16 Temmuz 2012 tarihleri arasında 5 farklı yoğun bakım ünitesinden 31 *A. baumannii* izole edildi. Bu izolatlardan 1/31'i yoğun bakım ünitesinde bulunan eşyalardan, 30/31 ise hastaların kan kültürlerinden izole edildi. Tiplendirilen 12/31 suş PFGE Grup XIII'de, 7/31'i Grup II'de, 5/31'i Grup I'de, 2/31'i Grup IV'de, 2/31'i Grup IX'da ve 1/31'i Grup XII'de yer aldı. 2/31 suş herhangi bir

grupta yer almadı ve tiplendirilen pulsotiplerden altısının birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği belirlendi.

Suşlara ilişkin dendrogramda çevreden izole edilen suşla aynı pulsotipe sahip beş suşun olduğu ve bu suşların dört farklı yoğun bakım ünitesinden izole edildiği saptandı (Şekil 17).



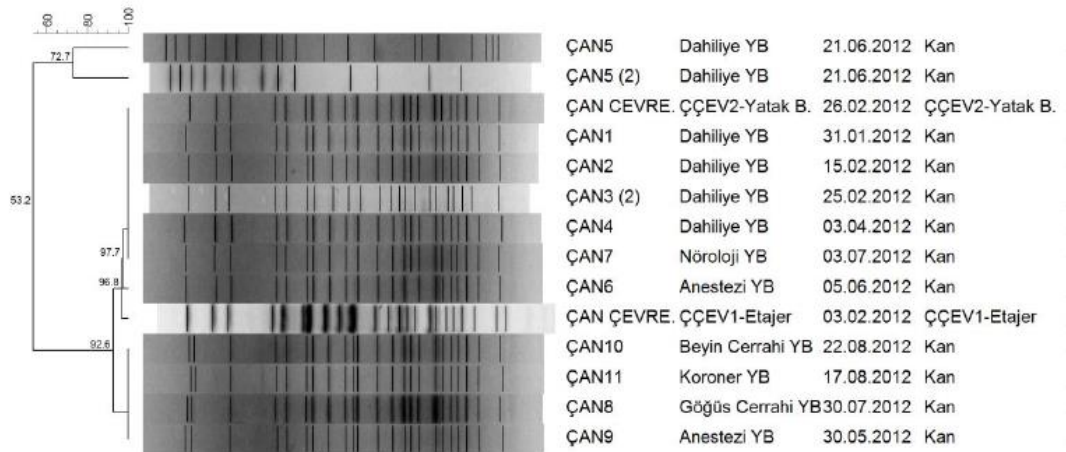
Şekil 17. Lütfü Kırdar Eğitim Araştırma Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

10) Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi'nden 31 Ocak 2012–22 Ağustos 2012 tarihleri arasında altı farklı yoğun bakım ünitesinden 13 *A. baumannii*

izole edildi. Tiplendirilen suşlardan ikisi yoğun bakım ünitelerindeki eşyalardan, diğerleri ise bu yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastaların kan kültürlerinden izole edildi. Tiplendirilen 13 suş IV numaralı PFGE grubunda yer alırken bir suşun herhangi bir PFGE grubunda yer almadığı belirlendi. Tiplendirilen pulsotiplerden ikisinin birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren ≥ 2 suş içerdiği ve bu iki pulsotipten birinde altı, diğerinde ise dört suş bulunduğu belirtildi (Şekil 18).

Suşların analizinde yoğun bakım ünitesindeki bir yataktan izole edilen suş ile beş suşun aynı paternde olduğu ve diğer çevre suşunun da bu pulsotip ile %97.7 oranında benzerlik gösterdiği saptandı (Şekil 18).



Şekil 18. Çanakkale Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen *A. baumannii* suşlarına ilişkin PFGE dendrogramı.

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde ve ülkemizde *A. baumannii*'nin etken olduğu çok ilaca dirençli enfeksiyonlar hızla artmaktadır. Birçok antibiyotiğe doğal dirençli olması ve hızlı şekilde direnç mekanizmaları kazanabilmesi nedeniyle *A. baumannii*, hastane ortamına hızlı ve kolay bir şekilde uyum sağlar ve kontrol edilmesi güç salgınlar oluşturabilir. Özellikle ventilatörle ilişkili ÇİD *Acinetobacter* enfeksiyonları yoğun bakım ünitelerinde önemli bir sorun haline gelmekte; mortalite ve morbiditede önemli bir artışa neden olmaktadır.

Karbapenem dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları Avrupa'da birçok ülkede tedavi açısından sorun yaratmaktadır. Avrupa'da direnç oranlarının en yüksek olduğu ülkelerin başında Türkiye, Yunanistan, İtalya, İspanya ve İngiltere gelmektedir (1) . 2001-2011 yılları arasında Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Latin Amerika ve Asya-Pasifik bölgesinde yapılan SENTRY antimikrobiyal sürveyans sonuçlarına göre, karbapenem direncinin yüksek olmasına rağmen kolistin direncinin hala düşük seviyelerde (%0.9-%3.3) olduğu gösterilmiştir (41) . Bizim çalışmamızda da mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilen antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre invaziv ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarında kolistinin halen en etkili antimikrobiyal ilaç olduğu belirlenmiştir.

Tayvan'da 2014 yılında yapılan ve *A. baumannii* enfeksiyonlarında mortalite açısından risk faktörlerinin incelendiği bir çalışmada, uzun süre yoğun bakım ünitesinde tedavi görmek, APACHE II skorunun >20 olması, solunum yolu kökenli bakteriyemi varlığı, enfeksiyon tanısı öncesinde 3. kuşak sefalosporin kullanımı ve karaciğer sirozu varlığının mortaliteyi artırdığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada 182 *A. baumannii* izolatının karbapenemlere duyarlılığı 0, kolistin ve tigesikline duyarlılıkları sırasıyla %100 ve %40.1 olarak kaydedilmiş ve bu izolatların PFGE yöntemine göre 38 farklı pulstotip içerdiği belirtilmiştir (66) . Çalışmamızda; altta yatan hastalıklar, yaş, cinsiyet, hastalara uygulanan invaziv işlemler ve tanı öncesi kullanılan antibiyotikler ile mortalite ilişkisi de araştırılmıştır. Sonuçta, 65 yaşın üzerinde olmak, diabetes mellitus, karaciğer yetmezliği, kemoterapik ilaç kullanımı ve tanı öncesi

kinolon kullanımı mortalite ile ilişkili bulunurken, karbapenem veya 3. kuşak sefalosporin kullanımının mortalite ile ilişkisi gösterilememiştir.

Tayland'da Inchai ve ark., tarafından ventilatör ilişkili *A. baumannii* pnömonisi tanısı konulan hastalarla yapılan bir çalışmada, önceden karbapenem kullanımının ÇİD *A. baumannii*; önceden kolistin kullanımının ise TİD *A. baumannii* enfeksiyonları için risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir (78) . Çalışmamızda TİD *A. baumannii* suşlarının nicelik bakımından uygun olmaması ve iki grup oluşturulamaması nedeniyle benzer bir değerlendirme yapılamamış olsa da; ÇİD *A. baumannii* suşlarının izole edildiği hastaların %43.7'sinin enfeksiyon tanısı öncesinde karbapenem, %5.2'sinin ise kolistin kullanım öyküsü bulunmaktadır.

A. baumannii'de karbapenem direncinin yayılmasında büyük öneme sahip genlerden biri 1985 yılında İskoçya'nın Edinburg şehrindeki bir klinikte izole edilmiştir. Plazmit aracılı aktarılabilen ve karbapenem direncinin küresel olarak yayılmasına önemli katkıda bulunan bu gen daha sonra *bla_{OXA-23}* olarak isimlendirilmiştir. Bu genin dışında *bla_{OXA-24}* ve *bla_{OXA-58}* gen kümelerinin de yüksek düzey karbapenem direncine neden olduğu gösterilmiştir (45) .

Ülkemizde *A. baumannii*'nin direnç genleri ile ilişkin çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle bakterinin klinik örneklerden izolasyon sıklığı ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları ile ilgili çalışmaları kapsamaktadır. Konya'da karbapeneme dirençli 105 *A. baumannii* suşu ile yapılan bir çalışmada *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-58}* genleri sırasıyla %46.7 ve %53.3 olarak tespit edilmiştir (81) . 2013 yılında Çiftçi ve ark.nın yaptığı bir çalışmada coğrafik olarak farklı 13 bölgeden izole edilen *A. baumannii* suşlarının %23.7'sinde *bla_{OXA-23}*, %12.5'inde *bla_{OXA-58}* geni saptanmıştır. Sadece karbapenem dirençli izolatlara bakıldığında bu oranlar sırasıyla, %74.4 ve %17.3'e yükselmektedir (82) . Her iki çalışmada da *bla_{OXA-24}* geni saptanmamıştır. Vahaboğlu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise, *bla_{OXA58}* geni örneklerin %13.2'sinde tespit edilmiştir (83) . 2014 yılında Çiçek ve ark.nın yaptığı bir çalışmada *bla_{OXA-23}* geni örneklerin %78.2'sinde saptanırken, *bla_{OXA-58}* veya *bla_{PER-1}* saptanmamıştır. Yine aynı

çalışmada, Türkiye’de ilk kez bir izolatta *bla_{OXA40}* geni gösterilmiştir (84) . Ergin ve ark.nın Ankara’da 2004–2010 yılları arasında izole edilen invaziv *A. baumannii* suşları ile gerçekleştirdikleri çalışmada *bla_{OXA-23}* geninin tüm izolatların %31’inde, *bla_{OXA-58}* geninin ise tüm izolatların %23’ünde bulunduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada bu direnç genlerinin görülme sıklıkları incelenmiş ve *bla_{OXA-58}* geninin 2010 yılında görülme sıklığının azalmaya başladığı ancak, *bla_{OXA-23}* geninin görülme sıklığında 2008–2010 yılları arasında artış olduğu vurgulanmıştır (85) . Keskin ve ark.nın 2014 yılında yaptığı çalışma sonuçlarına göre, *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-58}* sıklığı sırasıyla %91.5 ve %7 olarak bulunmuştur (86) . Çalışmamızın sonuçları, yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumlu olup *bla_{OXA-58}* geninin sıklığı düşük olarak saptandı. Tüm merkezlerden elde edilen izolatlarda *bla_{OXA-23}* geninin sıklığı %98.8 iken, *bla_{OXA-58}* geninin sıklığı %2.9 olarak bulundu. Kaydedilen karbapenem MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri yüksek olup, sırasıyla 64–128 mg/L olarak belirlendi.

Türkiye’de 2014 yılında 11 hastaneden izole edilen 763 *A. baumannii* suşu ile Aşık ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada PER-1 sıklığı %24.6 olarak bulunmuştur. 2008 yılından 2010 yılına kadar olan dönemde PER-1 enziminin sıklığı sırasıyla %52.9, %35.9 ve %8.3 olarak saptanmış ve PER-1 tipi genişlemiş spektrumlu β- laktamaz üretiminde azalma olduğu vurgulanmıştır (87) . Çalışmamızda da PER-1 enziminin sıklığı %2.9 olarak belirlendi. Keskin ve ark.nın Nisan 2010–Aralık 2011 tarihleri arasında yaptığı çalışmanın sonucunda ise PER-1 enziminin sıklığı %21 olarak bulunmuştur (86) .

Farklı ülkelerde karbapeneme dirençli *A. baumannii* ile yapılan çalışmalarda *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-58}* geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının salgınlara neden olduğu belirtilmektedir. Bu ülkelerde saptanan direnç genlerinin sıklığı ülkemizdeki oranlara benzer olup, yıllara göre karbapenem MİK değerlerindeki artış vurgulanmaktadır (88,89) .

Yunanistan’da yapılan bir çalışmaya göre, 2010 yılında *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA58}* direnç genlerinin sıklığı sırasıyla %71.8 ve %27.6 ve her iki geni birlikte taşıyan izolatların görülme sıklığı %0.6 iken; 2011 yılında *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA58}* taşıyıcılığı sırasıyla %95 ve %4.7, her iki geni birlikte taşıyan

izolatların görülme sıklığı ise %0.78 olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada 1999–2009 yılları arasında özellikle İtalya, Yunanistan, Lübnan ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde *bla*_{OXA-58} genini taşıyan izolatlar baskın iken; 2009 yılından itibaren bu oranın değiştiği; başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere Avrupa ülkelerinin çoğunda *bla*_{OXA-23} geninin görülme sıklığının hızla artma eğiliminde olduğu ve bu durumun yapılan çalışmalarla desteklendiği belirtilmektedir. Ayrıca *bla*_{OXA-23} geninin *bla*_{OXA-58}'e göre daha yüksek bir karbapenem direncine neden olduğu; 2010 yılında kaydedilen karbapenem MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 16–256 mg/L iken, 2011 yılında bu değerlerin sırasıyla, 128–256 mg/L'ye ulaştığı belirtilmektedir (79) .

İtalya'da Principe ve ark.nın karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının prevalansını belirlemek için 2014 yılında yaptıkları çalışmanın sonucunda tüm izolatların kolistine duyarlı olduğu ve *bla*_{OXA-23} ile *bla*_{OXA-58} sıklığının sırasıyla %81.7 ve %4.5 olduğu bildirilmiştir. Bu izolatlarla gerçekleştirilen genotiplendirme çalışmaları sonucu uluslararası klon 2 (IC2)'nin baskın olduğu ve bu klon içerisinde en baskın tipin sekans tipi 2 (ST2) olduğu saptanmıştır (80) .

Günümüze dek yapılan çalışmalar, salgınlardan sorumlu olan *A. baumannii* klonlarının kısıtlı sayıda olduğunu göstermektedir (91) . Bu kısıtlı olan klonları tespit edebilmek amacıyla 1996 yılında Dijkshoorn ve ark. Kuzey Avrupa'nın farklı bölgelerinden topladıkları suşlara farklı tiplendirme yöntemleri uygulayarak Avrupa klonu I ve II'yi tanımlamıştır (35) . 2003 yılında ise Hollanda'da yapılan bir çalışmada salgınlara neden olan bir başka klon olan Avrupa klonu III tanımlanmıştır (36) . Laboratuvarlar arasında bir standart oluşturmak amacıyla Diancourt ve ark. salgınlara neden olan suşları MLST yöntemi ile tiplendirerek; Avrupa klonu I, II ve III'e karşılık gelen klonal kompleksleri (CC) tanımlamışlardır. Bu çalışmaya göre daha önce Avrupa klonu I olarak tanımlanan izolatlar, 5 farklı sekans tipi (ST1, ST7, ST8, ST19 ve ST 20) olarak CC1 adı altında, Avrupa klonu II'ye karşılık gelen izolatlar 3 farklı sekans tipi (ST2, ST45, ST47) olarak CC2 içerisinde, Avrupa klonu III'e karşılık gelen izolatlar ise 2 farklı sekans tipi (ST3 ve ST14) olarak CC3 içerisinde sınıflandırılmıştır (91) .

Amerika Birleşik Devletleri'nde karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında direnç genlerinin ve klonal yayılımının incelendiği 6 hastanenin katıldığı çok merkezli bir çalışmanın sonuçlarına göre *bla_{OXA-23}* geni %42 oranında saptanmış, yapılan tiplendirme sonucunda klonal kompleks (CC2)'nin baskın olduğu bulunmuştur. İzolatlar arasında yapılan PFGE tiplendirme sonuçlarına göre sadece aynı hastanelerde izole edilen izolatların birbirleriyle küme oluşturduğu saptanırken, MLST yöntemi ile tiplendirildiğinde izolatların aynı klonal kompleks (CC2) içinde yer aldığı tespit edilmiştir (44) . İzolatlar aynı ST içerisinde yer alsa da hastaneler arasındaki PFGE paternlerinin genellikle farklı olduğu vurgulanmıştır. Bu bulgunun kullanılan iki tiplendirme yönteminin çalışma karakteristiği ile uyumlu olduğu belirtilmiştir, öyle ki PFGE zamansal ve mekânsal epidemiyolojik özellikleri iyi yansıtırken, MLST'nin zamanla daha geniş bölgelerden gelen izolatlar arası klonal ilişkiyi tanımlamada avantajlı olduğu belirtilmiştir (44) .

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise birçok araştırmacının çalışmakta olduğu hastanelerdeki *A. baumannii* suşları üzerinde yaptıkları moleküler tiplendirme çalışmaları mevcuttur (6,7) . Bu araştırmalarda, hastanelerdeki *A. baumannii* izolatları arasında %60-70 gibi oldukça yüksek oranlarda klonal ilişki saptanmış ve ulusal düzeyde yaygın klonun ortaya konulabilmesi ve hastaneler arası suş geçiş derecesinin belirlenebilmesi için çok merkezli çalışmaların gerekliliğine vurgu yapılmıştır.

Çalışmamızda Türkiye genelini temsil eden 7 il ve 5 bölgedeki hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen suşlar tiplendirildi. Her hastanın bulunduğu çevreden örnek alınmasına karşın, sadece 12 çevre örneğinden *A. baumannii* izole edildi. Çevresel izolatlarla aynı ortamda bulunan hastalardan elde edilen klinik izolatlar karşılaştırıldığında bazılarının aynı pulstip içerisinde olduğu, bazılarının ise aynı grup içerisinde yer aldığı gösterildi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hastanesi ve Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin çevresel izolatları ile bu merkezlerin yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalardan elde edilen klinik izolatlar benzer pulstip içerisinde yer almaktadır. (i) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin bir çevresel

izolatı ile Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin bir klinik izolatının birebir aynı olması, (ii) yoğun bakım üniteleri arasında küçük çaplı salgınlara neden olan aynı pulsotipteki izolatların farklı merkezlerde saptanması ve (iii) tiplendirilen izolatların %90.7'sinin birbirleriyle ilişkili olması hastane enfeksiyonuna neden olan izolatlar arasında çok büyük farklılıklar olmadığını göstermektedir.

Merkezlerden izole edilen örnekler PFGE grupları açısından incelendiğinde enfeksiyon etkeni olan suşların, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hastanesi'nde 1, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 6, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 1, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 3, Ankara Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi'nde 4, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 4, Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi'nde 6, Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi'nde 5 farklı grupta toplandığı ve merkezlerdeki suşların birbirleriyle ilişkili olduğu görüldü.

Merkezlerdeki suşlar salgın açısından incelendiğinde, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi'ndeki yoğun bakım ünitelerinden elde edilen 11 klinik izolatın 10'unun ve 2 çevresel izolatın aynı PFGE grubu içerisinde yer aldığı görüldü. Suşların tümünün IV numaralı PFGE grubu içerisinde bulunduğu ve çevresel izolatlar da dahil izolatların identik oldukları saptandı. Çevresel ve klinik izolatlar arasındaki benzerlik ve ilk izole edilen klinik izolatlar ile çevresel izolatların yakın zaman diliminde Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nden çıkması muhtemel bir salgını işaret etmektedir. Ayrıca, bu izolatların daha sonra diğer yoğun bakım ünitelerine yayıldıkları da görülmektedir. Bu grup içerisinde yer alan ve salgına neden olan tüm örnekler *bla_{OXA-23}* ve doğal bir β -laktamaz geni olan tüm *A. baumannii* suşlarında bulunmasına rağmen, zayıf düzey karbepenemaz aktivitesine sahip ve diğer direnç genleri ile birlikte bulunarak, sinerjik bir etki gösteren *bla_{OXA-51}* direnç genlerini taşımaktadır.

PFGE grupları arasında en geniş kümeyi VI numaralı grup oluşturmaktadır. Bu grup incelendiğinde; suşların tümünün İç Anadolu Bölgesi'ndeki beş merkezden izole edildiği görülmektedir. Bu izolatların

bazıları tamamen identik olup aynı pulsotip içerisinde yer almaktadır. Bu grup içerisinde yer alan suşlardan bazılarının Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi'nde, Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi'nde ve Ankara Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi'nde muhtemel küçük salgınlar oluşturduğu görülmektedir. Bu gruptaki tüm suşlar da *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-51}* genlerini birlikte bulundurmaktadır.

On iki numaralı PFGE grubu incelendiğinde, tamamının Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi'ndeki klinik izolatlardan oluştuğu görülmektedir. Bu izolatların 11'i Yanık Ünitesi'nde, biri ise Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nde tedavi gören hastalardan izole edilmiştir. Hastaların neredeyse tümünün aynı üniteye tedavi görüyor olması ve suşlar arasında %93.5 oranındaki benzerlik muhtemel bir salgın varlığını düşündürmektedir. Alınan çevre örneklerinde etkenin izole edilmemiş olması; salgının muhtemelen sağlık personeli aracılığı ile yayıldığını düşündürmekte ve bu konudaki enfeksiyon kontrol önlemlerinin artırılması gerektiğini göstermektedir.

On dört numaralı PFGE grubunu Erzurum Atatürk Üniversitesi'nden izole edilen suşlar oluşturmaktadır. Suşların birbiriyle identik olması ve izolasyon tarihlerinin yakın olması 5 farklı yoğun bakım ünitesini kapsayan bir salgın ihtimalini düşündürmektedir. Ayrıca salgına neden olduğu düşünülen suşların tamamında *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-51}* genleri birlikte bulunmaktadır.

Çalışmamızın bazı kısıtlı yönleri bulunmaktadır. Çalışmamızda atfedilen mortalite değerleri kullanılmıştır. Hastaların sıklıkla immünsüpresif olması ve altta yatan birçok hastalığı bulunması nedeniyle çalışmamızda kullanılan mortalite verileri göreceli, subjektif verilerdir. Çalışmamızın bir diğer kısıtlı noktası ise, *A. baumannii* üremesi olan çevresel örneklerin sayısının az olmasıdır. Bu nedenle meydana gelen salgının çevreden mi yoksa bir indeks vakadan mı kaynaklandığı tam olarak ayırt edilememektedir.

A. baumannii'ye bağlı gelişen enfeksiyonların %80'i hastane kaynaklıdır. ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonu yoğun bakım ünitelerinde yatış süresini 5 güne dek uzatmaktadır ve bu yatan hastalarda mortaliteyi yaklaşık %50 oranında artırmaktadır (90) . Gün geçtikçe artan *A. baumannii*

enfeksiyonlarını kontrol altına almak için enfeksiyon kontrol uygulamalarına titizlikle uyulması çok önemlidir. Ciddi hastalığı olanlarda ÇİD bu suşların hızla artması; salgınların önlenmesi ve enfeksiyonun kontrolü açısından surveyans programının ne kadar kritik bir rolü olduğunu göstermektedir. Çevresel kontaminasyon, çapraz kontaminasyon, hava yolu ve hastalar yoluyla transfer *A. baumannii* epidemilerine neden olan anahtar faktörlerdir. Ayrıca klonal yayılımın da ÇİD *A. baumannii* artışında önemli rolü vardır (34) . Bu nedenle ortam temizliğine önem verilmesi, hasta izolasyonu, el yıkama alışkanlığının kazandırılması, gereksiz hasta yatışının önlenmesi, gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınılması ve personel eğitimi gibi uygulamalara önem verilmelidir. Yapılan çalışmalar *A. baumannii*'nin ventilatörlerde, paspaslarda, lavabolarda, radyolojik malzemelerde beş aya dek canlılığını koruyabildiğini göstermektedir. Bu nedenle ortam dekontaminasyonunda kullanılan ürünler, bu ürünlerin dilüsyonu ve ortamın temizlenme sıklığı önemlidir. Bir salgın sırasında bakteri için potansiyel kaynak oluşturan, hastaların odasındaki perde, yastık ve minderlerin incelenmesini içeren ek çevresel dekontaminasyon stratejileri de göz önünde bulundurulmalıdır (90) .

Türkiye'de invaziv *A. baumannii* izolatlarında antibiyotik direncine neden olan moleküler mekanizmalar ve mikroorganizmanın ülke çapındaki klonal yayılımına ilişkin çok az veri bulunmaktadır. Bu araştırmanın, çok merkezli bir araştırma olarak yoğun bakım ünitelerinde ortaya çıkan invaziv ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarında hem antibiyotik direnç mekanizmalarının belirlenmesi hem de klonal ilişkinin gösterilmesi açısından önemli bir veri tabanı oluşturduğu kanaatindeyiz. İzolatlar arasında klonal farklılığın düşük olması yanı sıra bu izolatlarda en etkin antibiyotiğin kolistin ile sınırlı kalması yakın gelecekte ulusal çapta hastanelerimizde PDR *A. baumannii* enfeksiyonlarıyla karşı karşıya kalınacağına göstergesi olarak kabul edilebilir.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında PFGE grupları arasında en sık saptanan pulstotiplerin belirlenmesi ve bu suşların MLST yöntemi ile tiplendirilerek, Avrupa ve dünyadaki salgınlara neden olan suşlarla karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L. (2008) Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21 (3), 538-582.
2. Baumann, P. (1968) Isolation of Acinetobacter from soil and water. *J Bacteriol*, 96 (1), 39-42.
3. Bouvet, P.J., Grimont, P.A. (1987) Identification and biotyping of clinical isolates of Acinetobacter. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 138 (5), 569-578.
4. Nishimura, Y., Kanzaki, H., Iizuka, H. (1988) Taxonomic studies of Acinetobacter species based on the electrophoretic analysis of enzymes. *J Basic Microbiol*, 28 (6), 363-370.
5. Tjernberg, I., Ursing, J. (1989) Clinical strains of Acinetobacter classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS*, 97 (7), 595-605.
6. Durmaz, R., Otlu, B., Koksall, F., Hosoglu, S., Ozturk, R., Ersoy, Y. ve diğeri. (2009) The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of Acinetobacter baumannii, Escherichia coli and Klebsiella spp. *Jpn J Infect Dis*, 62 (5), 372-377.
7. Cetin, E.S., Durmaz, R., Tetik, T., Otlu, B., Kaya, S., Çalışkan, A. (2009) Epidemiologic characterization of nosocomial Acinetobacter baumannii infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *American journal of infection control*, 37 (1), 56-64.
8. Guducuoglu, H., Durmaz, R., Yaman, G., Cizmeci, Z., Berktaş, M., Durmaz, B. (2005) Spread of a single clone Acinetobacter baumannii strain in an intensive care unit of a teaching hospital in Turkey. *New Microbiol*, 28 (4), 337-343.
9. Ayan, M., Durmaz, R., Aktas, E., Durmaz, B. (2003) Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired Acinetobacter baumannii infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect*, 54 (1), 39-45.
10. Jawad, A., Hawkey, P.M., Heritage, J., Snelling, A.M. (1994) 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*, 32 (10), 2353-2358.
11. KJ, T. (1998). Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9 th ed.
 12. PC, S. (1999). Manuel of Clinical Microbiology. 7 th ed. Washington DC: ASM presManuel of Clinical Microbiology. 7 th ed. Washington DC: ASM pres.
 13. Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A.,Sleator, R.D. (2012) *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3 (3), 243-250.
 14. Ehrenstein, B., Bernards, A.T., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Towner, K.J., Bouvet, P.J. ve diğ erleri. (1996) *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 34 (10), 2414-2420.
 15. Zbinden, A., Böttger, E., Bosshard, P.,Zbinden, R. (2007) Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 45 (7), 2270-2273.
 16. Rhoads, S., Marinelli, L., Imperatrice, C.A.,Nachamkin, I. (1995) Comparison of MicroScan WalkAway system and Vitek system for identification of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol*, 33 (11), 3044-3046.
 17. Snyder, J.W., Munier, G.K.,Johnson, C.L. (2008) Direct comparison of the BD phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae and nonfermentative gram-negative organisms. *J Clin Microbiol*, 46 (7), 2327-2333.
 18. Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P., Claeys, G. ve diğ erleri. (1995) Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol*, 33 (1), 11-15.

19. Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouvet, P., Kersters, K. ve diğerleri. (1997) Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol*, 47 (4), 1179-1187.
20. Nemeč, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T.J., Dijkshoorn, L. (2001) *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51 (Pt 5), 1891-1899.
21. Gerner-Smidt, P. (1992) Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol*, 30 (10), 2680-2685.
22. Chang, H.C., Wei, Y.F., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, C.T., Chang, T.C. (2005) Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol*, 43 (4), 1632-1639.
23. La Scola, B., Gundi, V.A., Khamis, A., Raoult, D. (2006) Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*, 44 (3), 827-832.
24. Ecker, J.A., Massire, C., Hall, T.A., Ranken, R., Pennella, T.T., Agasino Ivy, C. ve diğerleri. (2006) Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 44 (8), 2921-2932.
25. Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Krut, O., Seifert, H. (2007) A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect*, 13 (12), 1199-1201.
26. Suzuki, M., Hosoba, E., Matsui, M., Arakawa, Y. (2014) New PCR-Based Open Reading Frame Typing Method for Easy, Rapid, and Reliable Identification of *Acinetobacter baumannii* International Epidemic Clones without Performing Multilocus Sequence Typing. *Journal of clinical microbiology*, 52 (8), 2925-2932.

27. Traub, W.H. (1989) *Acinetobacter baumannii* serotyping for delineation of outbreaks of nosocomial cross-infection. *J Clin Microbiol*, 27 (12), 2713-2716.
28. Seltmann, G., Beer, W., Claus, H., Seifert, H. (1995) Comparative classification of *Acinetobacter baumannii* strains using seven different typing methods. *Zentralbl Bakteriologie*, 282 (4), 372-383.
29. Bou, G., Cervero, G., Dominguez, M.A., Quereda, C., Martinez-Beltran, J. (2000) PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*, 6 (12), 635-643.
30. Koeleman, J.G., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.H., Vandembroucke-Grauls, C.M. (1998) Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*, 36 (9), 2522-2529.
31. Misbah, S., Hassan, H., Yusof, M.Y., Hanifah, Y.A., AbuBakar, S. (2005) Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Med J*, 46 (9), 461-464.
32. Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P., Liesack, W. (1997) Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol*, 47 (3), 837-841.
33. Silbert, S., Pfaller, M.A., Hollis, R.J., Barth, A.L., Sader, H.S. (2004) Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infection Control*, 25 (10), 847-851.
34. Lin, M.-F., Lan, C.-Y. (2014) Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 2 (12), 787.
35. Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E., Garaizar, J. ve diğeri. (1996) Comparison of outbreak and

- nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol*, 34 (6), 1519-1525.
36. van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., van den Broek, P. ve diğerleri. (2004) Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol*, 155 (2), 105-112.
 37. Morfin-Otero, R., Dowzicky, M.J. (2012) Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2009. *Clin Ther*, 34 (1), 101-112.
 38. Kuo, S.-C., Chang, S.-C., Wang, H.-Y., Lai, J.-F., Chen, P.-C., Shiau, Y.-R. ve diğerleri. (2012) Emergence of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex over 10 years: nationwide data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) program. *BMC infectious diseases*, 12 (1), 200.
 39. Hejnar, P., Kolar, M., Hajek, V. (1999) Characteristics of *Acinetobacter* strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of beta-lactamases) isolated from haemocultures from patients at the Teaching Hospital in Olomouc. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*, 142, 73-77.
 40. Li, J., Rayner, C.R., Nation, R.L., Owen, R.J., Spelman, D., Tan, K.E. ve diğerleri. (2006) Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (9), 2946-2950.
 41. Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., Bai, N. (2012) Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother*, 67 (7), 1607-1615.
 42. Chang, K.C., Lin, M.F., Lin, N.T., Wu, W.J., Kuo, H.Y., Lin, T.Y. ve diğerleri. (2012) Clonal spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in eastern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, 45 (1), 37-42.

43. Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P. (2010) Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*, 16 (1), 35-40.
44. Adams-Haduch, J.M., Onuoha, E.O., Bogdanovich, T., Tian, G.B., Marschall, J., Urban, C.M. ve diğerleri. (2011) Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol*, 49 (11), 3849-3854.
45. Çiftçi, İ.H., Aşık, G. (2011) *Acinetobacter baumannii*'nin direnç mekanizmaları. *Ankem Derg*, 25 (3), 196-207.
46. Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S. (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35 (1), 147-151.
47. Yum, J.H., Yi, K., Lee, H., Yong, D., Lee, K., Kim, J.M. ve diğerleri. (2002) Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the blaVIM-2 gene cassettes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49 (5), 837-840.
48. Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R. ve diğerleri. (1999) Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 43 (7), 1584-1590.
49. Robledo, I.E., Aquino, E.E., Santé, M.I., Santana, J.L., Otero, D.M., León, C.F. ve diğerleri. (2010) Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54 (3), 1354-1357.
50. Yong, D., Shin, J.H., Kim, S., Lim, Y., Yum, J.H., Lee, K. ve diğerleri. (2003) High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (5), 1749-1751.
51. Naas, T., Bogaerts, P., Bauraing, C., Degheldre, Y., Glupczynski, Y., Nordmann, P. (2006) Emergence of PER and VEB extended-spectrum

- β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (1), 178-182.
52. Sinha, M., Srinivasa, H., Macaden, R. (2007) Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. *Indian journal of medical research*, 126 (1), 63.
53. Adams-Haduch, J.M., Paterson, D.L., Sidjabat, H.E., Pasculle, A.W., Potoski, B.A., Muto, C.A. ve diğ erleri. (2008) Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52 (11), 3837-3843.
54. Carvalho, K.R., Carvalho-Assef, A.P.D.A., Peirano, G., dos Santos, L.C.G., Pereira, M.J.F., Asensi, M.D. (2009) Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *International journal of antimicrobial agents*, 34 (1), 25-28.
55. Hu, W.S., Yao, S.-M., Fung, C.-P., Hsieh, Y.-P., Liu, C.-P., Lin, J.-F. (2007) An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51 (11), 3844-3852.
56. Wiczorek, P., Sacha, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Krawczyk, M., Trynieszewska, E. (2008) Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*-the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 46 (3), 257-256.
57. Lin, L., Ling, B.-D., Li, X.-Z. (2009) Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeABC, adeDE and adeJJK, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *International journal of antimicrobial agents*, 33 (1), 27-32.
58. Gaur, A., Prakash, P., Anupurba, S., Mohapatra, T.M. (2007) Possible role of integrase gene polymerase chain reaction as an epidemiological marker: study of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated

- from nosocomial infections. *International journal of antimicrobial agents*, 29 (4), 446-450.
59. Koeleman, J.G., Stoof, J., Van Der Bijl, M.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Savelkoul, P.H. (2001) Identification of Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* by Integrase Gene PCR. *Journal of clinical microbiology*, 39 (1), 8-13.
 60. Oh, J.Y., Kim, K.S., Jeong, Y.W., Cho, J.W., Park, J.C., Lee, J.C. (2002) Epidemiological typing and prevalence of integrons in multiresistant *Acinetobacter* strains. *Apmis*, 110 (3), 247-252.
 61. Limansky, A.S., Mussi, M.A., Viale, A.M. (2002) Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *Journal of clinical microbiology*, 40 (12), 4776-4778.
 62. Smani, Y., Fàbrega, A., Roca, I., Sánchez-Encinales, V., Vila, J., Pachón, J. (2014) Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58 (3), 1806-1808.
 63. Moffatt, J.H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J.D., Vinogradov, E., Seemann, T. ve diğerleri. (2010) Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54 (12), 4971-4977.
 64. Prof. Dr. Ayşe WILLKE TOPÇU, P.D.G.S., Prof. Dr. Mehmet DOĞANAY. (2008). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.
 65. ERAÇ, B., Yılmaz, F.F., LİMONCU, M.H., ÖZTÜRK, İ., AYDEMİR, Ş. (2014) Investigation of the Virulence Factors of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates i. *Mikrobiyol Bul*, 48 (1), 70-81.
 66. Liu, C.P., Shih, S.C., Wang, N.Y., Wu, A.Y., Sun, F.J., Chow, S.F. ve diğerleri. (2014) Risk factors of mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect*.
 67. Gaddy, J.A., Actis, L.A. (2009) Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol*, 4 (3), 273-278.

68. Lee, H.W., Koh, Y., Kim, J., Lee, J.C., Lee, Y.C., Seol, S.Y. ve diğerleri. (2008) Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical microbiology and infection*, 14 (1), 49-54.
69. Choi, A.H., Slamti, L., Avci, F.Y., Pier, G.B., Maira-Litran, T. (2009) The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol*, 191 (19), 5953-5963.
70. Magnusson, K.E. (1982) Hydrophobic interaction--a mechanism of bacterial binding. *Scand J Infect Dis Suppl*, 33, 32-36.
71. Rosenberg, M., Bayer, E.A., Delarea, J., Rosenberg, E. (1982) Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (4), 929-937.
72. Gordon, N.C., Wareham, D.W. (2010) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 35 (3), 219-226.
73. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informatinal Supplement M100-S24. (2014).
74. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2015), Clinical breakpoints - bacteria (v 5.0) http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf.
75. Woodford, N., Ellington, M.J., Coelho, J.M., Turton, J.F., Ward, M.E., Brown, S. ve diğerleri. (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*, 27 (4), 351-353.
76. Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P. (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70 (1), 119-123.

77. Weldhagen, G.F., Poirel, L., Nordmann, P. (2003) Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*, 47 (8), 2385-2392.
78. Inchai, J., Liwsrisakun, C., Theerakittikul, T., Chaiwarith, R., Khositsakulchai, W., Pothirat, C. (2015) Risk factors of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia in a Medical Intensive Care Unit of University Hospital in Thailand. *J Infect Chemother*.
79. Liakopoulos, A., Miriagou, V., Katsifas, E.A., Karagouni, A.D., Daikos, G.L., Tzouveleki, L.S. ve diğeri. (2012) Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Euro Surveill*, 17 (11).
80. Principe, L., Piazza, A., Giani, T., Bracco, S., Caltagirone, M.S., Arena, F. ve diğeri. (2014) Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. *J Clin Microbiol*, 52 (8), 3004-3010.
81. Keyik, S., Arslan, U., Turk Dagi, H., Seyhan, T., Findik, D. (2014) [Investigation of OXA type beta-lactamases and PFGE patterns in *Acinetobacter baumannii* strains resistant to carbapenems]. *Mikrobiyol Bul*, 48 (4), 556-565.
82. Ciftci, I.H., Asik, G., Karakece, E., Oksuz, L., Yagci, S., Sesli Cetin, E. ve diğeri. (2013) [Distribution of blaOXA genes in *Acinetobacter baumannii* strains: a multicenter study]. *Mikrobiyol Bul*, 47 (4), 592-602.
83. Vahaboglu, H., Budak, F., Kasap, M., Gacar, G., Torol, S., Karadenizli, A. ve diğeri. (2006) High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *J Antimicrob Chemother*, 58 (3), 537-542.
84. Cicek, A.C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A.O., Peleg, A.Y. ve diğeri. (2014) OXA- and GES-type beta-lactamases predominate in

- extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect*, 20 (5), 410-415.
85. Ergin, A., Hascelik, G., Eser, O.K. (2013) Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scand J Infect Dis*, 45 (1), 26-31.
 86. Keskin, H., Tekeli, A., Dolapci, I., Ocal, D. (2014) [Molecular characterization of beta-lactamase-associated resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical samples]. *Mikrobiyol Bul*, 48 (3), 365-376.
 87. Asik, G., Ozdemir, M., Kurtoglu, M.G., Yagci, S., Oksuz, L., Gul, M. ve diğ erleri. (2014) Detection of the frequency of PER-1 type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Turkey: a multicenter study. *Turk J Med Sci*, 44 (6), 1041-1046.
 88. Zarrilli, R., Casillo, R., Di Popolo, A., Tripodi, M.F., Bagattini, M., Cuccurullo, S. ve diğ erleri. (2007) Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect*, 13 (5), 481-489.
 89. Yang, H.Y., Lee, H.J., Suh, J.T., Lee, K.M. (2009) Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 beta-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J*, 50 (6), 764-770.
 90. Rebmann, T., Rosenbaum, P.A. (2011) Preventing the transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: an executive summary of the Association for Professionals in infection control and epidemiology's elimination guide. *Am J Infect Control*, 39 (5), 439-441.
 91. Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S. (2010) The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*, 5 (4), e10034.

EKLER

Ek 1. Hastaların demografik bilgileri

ÇOK MERKEZLİ İNVAZİV ACINETOBACTER BAUMANNII ÇALIŞMASI
HASTA BİLGİ FORMU

Başvuru hastanesinin adı	
Doktor adı	
Hasta Bilgileri	
Hasta adı	
Hasta yaşı /cinsiyeti	
Başvurduğu bölüm	
Hastaneye yatış tarihi	
Yatan hasta servisi/giriş tarihi	
Yoğun bakım bölümü/giriş tarihi	
Başvuru tanısı	
Mikroorganizma bilgileri	
İnvaziv <i>A.baumannii</i> enfeksiyonu başlangıç tarihi	
<i>A.baumannii</i> izole edilen klinik örnek	
<i>Acinetobacter</i> dışında üreyen mikroorganizma	
İnvaziv <i>A.baumannii</i> tedavisinde kullanılan antibiyotikler	
Kan kültüründe <i>A.baumannii</i> pozitifliği	
Kan kültüründen <i>A.baumannii</i> izole edilme sayısı	
<i>A.baumannii</i> enfeksiyonuna eşlik eden risk faktörleri	
Alta yatan hastalıklar	
Diabetes mellitus	
KOAH	
Kronik Böbrek hastalığı	
Nötropeni	
Malignensi	
Karaciğer yetmezliği	
ARDS	
Ventilatör ilişkili pnömoni	
Kortikosteroid kullanımı	
Kemoterapi ve/veya sitotoksik ilaç kullanımı	
Diğer	
Tanı öncesi antibiyotik kullanım öyküsü	
Kullanılan antibiyotikler	
Mekanik ventilasyon varlığı	
İntravasküler alet varlığı	
Kateter varlığı/ kateter tipi	
Santral venöz kateter	
Diğer invaziv girişimler	
Orotrakeal intübasyon	
Üriner kateter	
Nazogastrik sonda	
Kemik iliği ve/veya organ nakli durumu	
Prognoz	
Klinik sonuç	
Ölüm nedeni	

Ek 2. Mikroorganizma bilgi formu

ÇOK MERKEZLİ İNVAZİV ACINETOBACTER BAUMANNII ÇALIŞMASI

MİKROORGANİZMA BİLGİ FORMU

Başvuru hastanesinin adı	
Doktor adı	

Hasta bilgileri

Hasta adı	
Hasta yaşı /cinsiyeti	
Başvurduğu bölüm	
Yatan hasta servisi/giriş tarihi	
Yoğun bakım bölümü/giriş tarihi	
Başvuru tanısı	

Hastada üreyen A.baumannii bilgileri

A.baumannii izole edilen klinik örnek	
A.baumannii'ye ek üreyen mikroorganizma	
<i>Gram negatif basiller</i>	
<i>Gram pozitif bakteriler</i>	
<i>Diğer</i>	
A.baumannii mikrobiyolojik tanı yöntemi	
<i>Konvansiyonel yöntemler</i>	
<i>Otomatize sistem</i>	
A.baumannii duyarlılık testleri	
<i>Kullanılan yöntem</i>	
<i>Çok ilaca direnç durumu</i>	
Çalışmaya alınan örnek dışı A.baumannii üremesi/örnek tipi	
Kan kültüründe A.baumannii pozitifliği	
Kan kültüründen A.baumannii izole edilme sayısı	

Çevre A.baumannii tarama kültürü

Kültür alınan servis/YBÜ adı	
Kültür yapılan tarih	
Kültür yapılan örnek tipi (lavabo, musluk, vs)	
A.baumannii üreyen örnek tipi	
A.baumannii üreme tarihi	
A.baumannii dışında üreyen mikroorganizma	
<i>Gram negatif basiller</i>	
<i>Gram pozitif bakteriler</i>	
<i>Diğer</i>	
A.baumannii mikrobiyolojik tanı yöntemi	
<i>Konvansiyonel yöntemler</i>	
<i>Otomatize sistem</i>	
A.baumannii duyarlılık testleri	
<i>Kullanılan yöntem</i>	
<i>Çok ilaca direnç durumu</i>	