



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARBAPENEM DİRENÇLİ *Acinetobacter*  
*baumannii* KLİNİK İZOLATLARININ  
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİNİN  
ARAŞTIRILMASINDA FARKLI YÖNTEMLERİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

Gülşen ULUÇAM ATAY

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU

TRABZON-2019

## ONAY

Bu tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Faruk AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Gülşen ULUÇAM ATAY'ın hazırladığı "Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojisinin Araştırılmasında Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

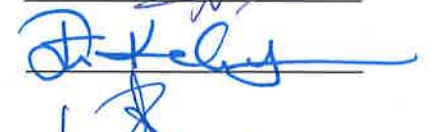
Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU



Prof. Dr. İlknur TOSUN



Prof. Dr. Ersan KALAY



Doç. Dr. Aziz Ramazan DİLEK



Doç. Dr. Emel UZUNOĞLU KARAGÖZ



Tarih: / /2019

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

10/01/2019

Gülşen ULUÇAM ATAY

## ***İthaf***

*Maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim eşime ve aileme ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde danışmanlığımı üstlenen, doktora eğitimimde de danışmanım olmaya devam eden, tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, motive edici desteği ve hoşgörüsü için sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na, destekleri için Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Faruk AYDIN'a ve bölüm hocalarımız Prof. Dr. Ali Osman KLIÇ, Prof. Dr. İlknur TOSUN, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Doç. Dr. Kurtuluş BURUK'a teşekkür ederim.

DNA dizi analizi çalışmalarında bilgi ve teknik imkânlarını paylaşma nezaketinde bulunan Prof. Dr. Ersan KALAY, Arş. Gör. İdris ER, Arş. Gör. Gülden BUDAK ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Veri analizlerinde bilgi ve yardımları için Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Bilişimi ve Teknolojileri Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Ülkü ÜNSAL'a teşekkür ediyorum.

Destek, samimiyet ve yardımlarından dolayı anabilim dalımızda doktora eğitimlerini tamamlayan Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ, Dr. Mujib ABDULKADIR ABDURRAHMAN, Dr. Jaleel SAMANJE'ye ve Tıbbi Mikrobiyoloji Rutin Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

*Acinetobacter baumannii* EU klonu I, II ve III (RUH 875, RUH 134 ve LUH 5875) suşlarını temin ettiğimiz Prof. Dr. Alexandr Nemeč'e (Laboratory of Bacterial Genetics, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic) teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda hissettiğim, paylaştığımız vakitlerde birbirimize kattığımız bilgi, deneyim, tecrübe ve insani değerlerden dolayı dostlarım Dr. Ahu REİS, Dr. Merve CORA, Arş. Gör. İnci DURUKAN ve Dilek KOCABAŞ'a çok teşekkür ederim.

Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU yönetimindeki TDK-2016-5654 sayılı projeyi destekleyerek bu tezin yapılmasına katkı sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde her zaman yanımda ve büyük emeği olan değerli anneme ve hayat görüşüyle model aldığım değerli babama; desteğini ve sevgisini sürekli

hissettiğim, sevgili kardeşlerime tüm samimiyetimle teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Hayatıma girdiği andan itibaren hoşgörüsü ve sevgisiyle, her zaman her konuda yanımda olan kıymetli eşim Serdal ATAY'a desteği, sağduyusu ve özverisi için çok teşekkür ederim.

Gülşen ULUÇAM ATAY



**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
<b>KABUL ve ONAY</b>	
<b>BEYAN</b>	
<b>İthaf</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b>	
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	<b>xii</b>
<b>KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	<b>6</b>
4.1. <i>Acinetobacter</i> spp.	6
4.1.1. Tarihçe ve Taksonomi	6
4.1.2. <i>Acinetobacter</i> Türlerinin Tanımlanması	7
4.1.3. Patogenezi ve Virulans Özellikleri	8
4.1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> Enfeksiyonları	10
4.1.5. Epidemiyoloji	11
4.1.5.1. Epidemiyolojik Terminoloji	11
4.1.5.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> Epidemiyolojisi, Potansiyel Kaynakları ve Risk Faktörleri	11
4.1.5.3. Uluslararası Klon I	13
4.1.5.4. Uluslararası Klon II	14
4.1.5.5. Uluslararası Klon III	15
4.1.5.6. Diğer Klonlar	15
4.2. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları	16
4.2.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	17
4.2.2. Beta-laktamazlar	17
4.2.3. Karbapenemazlar	19

4.2.3.1. Sınıf A Karbapenemazlar	21
4.2.3.2. Sınıf B Karbapenemazlar	21
4.2.3.3. Sınıf D Karbapenemazlar	22
4.2.4. Karbapenemaz Tanısında Kullanılan Yöntemler	26
4.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> Tiplendirmesinde Moleküler Epidemiyolojik Yöntemler	27
4.3.1. Direk Genotipleme	28
4.3.1.1. Plazmid Analizi	28
4.3.1.2. Ribotipleme	28
4.3.1.3. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE; Pulsed-field Gel Electrophoresis)	28
4.3.2. PZR Temelli Yöntemler	29
4.3.2.1. Repetitive Extragenic Palindromic Element-PCR (Rep-PCR)	29
4.3.2.2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	30
4.3.2.3. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	30
4.3.3. DNA Dizi Analizine Dayalı Yöntemler	30
4.3.3.1. Multilokus Dizi Tiplendirmesi (MLST; Multilocus sequence typing)	30
4.3.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> Tiplendirmesinde MALDI-TOF MS Yöntemi	32
<b>5.GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>35</b>
5.1. Gereç	35
5.1.1. Çalışma Grubu	35
5.1.2. Araç ve Gereçler	37
5.1.3. Kimyasallar	38
5.1.4. Besiyerleri	38
5.1.5. Solüsyonlar	39
5.1.5.1. DNA İzolasyonu için Kullanılan Solüsyonlar	39
5.1.5.2. Master Mix için Kullanılan Solüsyonlar	39
5.1.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi için Kullanılan Solüsyonlar	40
5.1.5.4. PFGE için Kullanılan Solüsyonlar	40
5.2 Yöntem	42
5.2.1. İzolatların İdentifikasyonu, Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Stok Koşulları	42



5.2.2. DNA İzolasyonu	42
5.2.3. Master Mix Hazırlanması	43
5.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	43
5.2.4.1. OXA Varlığını Araştırmak için Kullanılan Primerler	43
5.2.4.2. <i>bla</i> <sub>OXA23-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub> Genlerinin Amplifikasyonu	44
5.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	45
5.2.4.4. <i>bla</i> <sub>OXA23-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub> Genlerinin DNA Dizi Analizi	45
5.2.5. PFGE Yöntemi	47
5.2.5.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması	47
5.2.5.2. Bakterinin Agaroz Gömülmesi	47
5.2.5.3. Bakteriyel DNA'nın İzolasyonu	47
5.2.5.4. DNA'nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi	48
5.2.5.5. Elektroforez Jelinin Hazırlanması	48
5.2.5.6. PFGE Elektroforez Koşulları	49
5.2.5.7. PFGE Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi	49
5.2.6. MLST Yöntemi	49
5.2.6.1. MLST için DNA İzolasyonu	49
5.2.6.2. MLST için Kullanılan Primerler	50
5.2.6.3. MLST için Master Mix Hazırlanması	50
5.2.6.4. MLST Genlerinin Amplifikasyonu	51
5.2.6.5. MLST Genlerinin Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizleri	51
5.2.7. MALDI-TOF MS Yöntemi	52
5.2.7.1. Bakteriyel Ekstraktların Hazırlanması	52
5.2.7.2. Bakteriyel Ekstraktların MALDI-TOF MS ile Analizi	52
5.2.8. PFGE, MLST ve MALDI-TOF MS Yöntemlerinin İstatiksel Analizi	53
<b>6. BULGULAR</b>	<b>54</b>
6.1. Araştırmaya Dahil Edilen İzolatların Genel Özellikleri	54
6.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları	54
6.2.1. İzolatların Antibiyotiklere Duyarlılık Yüzdeleri	57

6.3. Oksasilinaz Enziminin PZR Yöntemiyle Belirlenmesi	57
6.3.1. <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> Geninin Amplifikasyonu	57
6.3.2. <i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub> Geninin Amplifikasyonu	57
6.3.3. <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> Geninin Amplifikasyonu	57
6.3.4. <i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub> Geninin Amplifikasyonu	58
6.3.5. <i>bla</i> <sub>OXA23-like</sub> ve <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> Genlerinin DNA Dizi Analizi	58
6.4. Karbapenemaz Geni Taşıyan İzolatların PFGE Yöntemiyle Klonal İlişkilerinin Araştırılması	60
6.4.1. Kümeler İçindeki Suşların Epidemiyolojik İlişkileri	62
6.5. İzolatların MLST Analizi	64
6.5.1. Sekans Tiplerinin PHYLOVİZ Analizi	65
6.6. MALDI-TOF MS Bulguları	66
6.6.1. MALDI-TOF MS PCA Dendogram Analizi	68
6.7. PFGE, MLST ve MALDI-TOF MS Yöntemlerinin İstatiksel Analiz Bulguları	71
<b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>72</b>
<b>8. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>92</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>95</b>
<b>10. ETİK KURUL ONAYI</b>	<b>116</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>119</b>

## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> <i>A. baumannii</i> 'nin klonal kökenleri	16
<b>Tablo 2.</b> Beta-laktamazların sınıflandırılması	18
<b>Tablo 3.</b> Karbapenemazların sınıflandırılması	19
<b>Tablo 4.</b> <i>A. baumannii</i> 'de karbapenemaz tespitinde kullanılan yöntemler	27
<b>Tablo 5.</b> İzolat kodu, izolasyon tarihi ve materyalin gönderildiği birim	35
<b>Tablo 6.</b> PZR için master mix bileşenleri ve miktarları	43
<b>Tablo 7.</b> OXA direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primerler	44
<b>Tablo 8.</b> DNA dizi reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	46
<b>Tablo 9.</b> MLST için kullanılan primerler	50
<b>Tablo 10.</b> MLST PZR için master mix bileşenleri ve miktarları	51
<b>Tablo 11.</b> <i>A. baumannii</i> izolatlarının kliniklere göre dağılımı	54
<b>Tablo 12.</b> <i>A. baumannii</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	55
<b>Tablo 13.</b> National Center for Biotechnology Information'a (NCBI) göre OXA genlerinin eşleştikleri gen erişim numaraları ve yüzdeleri	59
<b>Tablo 14.</b> PFGE grup numaraları ve jel sıraları	60
<b>Tablo 15.</b> Çalışılan izolatlara ait gen allelleri, sekans tipleri ve PFGE pulsotipleri	64
<b>Tablo 16.</b> Bakteriyel ekstraksiyon tanımlama sonuç ve skorları	66

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b>Şekil</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.</b>	<i>A. baumannii</i> izolatlarının 12 antibiyotiğe duyarlılık yüzdeleri	57
<b>Şekil 2.</b>	AB076 izolatının gen bankası no: NG_049833.1 ile OXA-92 dizilim şeması	59
<b>Şekil 3.</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> ve <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> geni taşıyan <i>A. baumannii</i> izolatlarının PFGE profillerinin dendogramı	61
<b>Şekil 4.</b>	MALDI-TOF MS PCA dendogram	69



**RESİMLER DİZİNİ**

<b>Resim</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Resim 1.</b>	MALDI-TOF MS tekniğinin görsel şeması	34
<b>Resim 2.</b>	OXA genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	58
<b>Resim 3.</b>	PFGE üçüncü grup agaroz jel elektroforez görüntüsü	60
<b>Resim 4.</b>	<i>A. baumannii</i> izolatlarının goeBURST PHYLOVİZ diyagram görüntüsü	65



## KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

<b>AB</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>AFLP</b>	Amplified fragment length polymorphism
<b>atm</b>	Atmosfer
<b>bp</b>	Base pair
<b>CC</b>	Klonal kompleks
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>ÇİD</b>	Çoklu ilaca dirençli
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotidtrifosfat
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EtBr</b>	Etidyum bromür
<b>EDTA</b>	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>EU</b>	European clones
<b>LB</b>	Luria bertani
<b>MALDI-TOF MS</b>	Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrofotometry
<b>MBL</b>	Metallo beta laktamaz
<b>MİK</b>	Minimum inhibitör konsantrasyon
<b>MLST</b>	Multilokus dizi tiplendirme (Multilocus sequence typing)
<b>NCBI</b>	National center for biotechnology information
<b>OXA</b>	Oksasilinaz
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PCA</b>	Principal component analysis
<b>PDR</b>	Pandrug dirençli
<b>PFGE</b>	Değişken alanlı (pulsed-field) jel elektroforezi
<b>rpm</b>	Revolutions per minute
<b>ST</b>	Sekans tipi
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>TBE</b>	Tris boric acid EDTA
<b>UV</b>	Ultraviyole

<b>XDR</b>	Extensively drug resistant
<b>YBÜ</b>	Yoğun bakım ünitesi
<b>Formüller</b>	
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>Simgeler</b>	
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>mL</b>	Mililitre
<b>M</b>	Molarite
<b>mg</b>	Miligram
<b>mM</b>	Milimolar

## 1. ÖZET

### **Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojisinin Araştırılmasında Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması**

Karbapenemler; dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir ve kullanımına paralel olarak artan oranlarda özellikle oksasilinaz (OXA) enzimleri ile karbapenem direnci görülmektedir. Karbapenemaz üreten *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin hızlı ve güvenilir bir yöntemle saptanması, yayılmasını sınırlayıcı önlemlerin alınması ve antibiyotik tedavisinin yönlendirilmesinde çok önemlidir. Bu çalışmada, karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında OXA genlerinin ve OXA genlerini taşıyan izolatların 'European klonları' (EU) ile ilişkisinin farklı epidemiyolojik yöntemlerin karşılaştırılması yoluyla araştırılması amaçlanmıştır. Ocak 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında 72 hastanın kan kültürlerinden izole edilen karbapenem dirençli ve orta duyarlı *A. baumannii* izolatı çalışmaya dahil edildi. *A. baumannii* izolatlarında OXA genlerinin varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle saptanmış ve DNA dizi analizi yöntemiyle doğrulanmıştır. İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek amacıyla değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE; Pulsed-field gel electrophoresis), Multilokus dizi tiplendirme (MLST; Multilocus sequence typing) ve 'Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry' (MALDI-TOF MS) analizi yapılmış ve yöntemler karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma yapılırken; yöntemler arasındaki ayırıcılık 'Simpson Index of Diversity' (SID) kullanılarak, yöntemlerin uyumu 'Wallace katsayısı' ile istatistiksel olarak belirlenmiştir. Tüm izolatlarda PZR ile *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genleri birlikte bulunmuştur. PFGE ile izolatlar A, B, C, D ve E olmak üzere beş pulstipe ayrılmıştır. A5 alttipinde EU klon II; C1 alttipinde EU klon I ve E pulstipinde EU klon III bulunmuştur. Her alttipten seçilen örneklerin MLST analizi ile; ST1, ST2, ST81, ST157 ve ST604 sekans tipleri bulunmuştur. MALDI-TOF MS yöntemiyle MLST ve PFGE verileri arasında uyum görülmemiştir. Bu çalışmayla, PFGE metodu ayırıcılık olarak en yüksek metod olarak bulunmuştur. Wallace katsayısı ile PFGE'nin MLST ile %100 eşleştiği ve sonuç olarak bu yöntemlerin epidemiyolojik araştırmalar için daha uygun olduğu ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, MALDI-TOF MS, MLST, PFGE



## 2. SUMMARY

### **Comparison of Different Methods in the Investigation of Molecular Epidemiology of clinical isolates of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii***

Carbapenems are commonly used antibiotics in the treatment of resistant *Acinetobacter baumannii* infections, and in parallel with its use, increasing rates of carbapenem resistance caused by oxacillinase (OXA) enzymes are seen. The rapid and reliable detection of clonal relationship between the carbapenemase producing *A. baumannii* isolates is very important in taking the measures to limit the spread and directing the antibiotic treatment. In this study, we aimed to investigate the OXA genes in carbapenem resistant *A. baumannii* isolates, and the association between the isolates with OXA genes and European clones (EU) by comparing different epidemiological methods. Carbapenem resistant and intermediate resistant *A. baumannii* isolates isolated from blood cultures of 72 patients between January 2014 and August 2015 was included in the study. The presence of OXA genes in *A. baumannii* isolates were determined by Polymerase Chain Reaction (PCR), and results were confirmed by DNA sequence analysis. In order to determine the clonal relationship between the isolates, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), Multilocus sequence typing (MLST) and Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis were performed and the methods were compared each other. The discriminatory power of the methods was determined statistically by the Simpson Index of Diversity (SID). Congruence between methods was estimated by the Wallace Coefficient. *bla<sub>OXA-23</sub>*-like and *bla<sub>OXA-51</sub>*-like genes were found together with PCR in all isolates. The isolates were divided into five pulsotypes which were A, B, C, D and E with PFGE. The A5 and C1 subtypes, and E pulsotype were found to be same subtype with EU clone II, I and III, respectively. With MLST analysis of the samples selected from each subtypes; ST1, ST2, ST81, ST157 and ST604 sequence types were found. In this study, PFGE method was found to be the highest discriminatory power. PFGE were 100% matched with MLST according to the Wallace coefficient. As a result, these methods were found to be more suitable for epidemiological studies.

**Key Words:** *Acinetobacter baumannii*, MALDI-TOF MS, MLST, PFGE

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

*Acinetobacter baumannii*, hastane kaynaklı bakteriyemi, sepsis, pnömoni, menenjit, idrar yolu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilen nonfermentatif Gram-negatif bir bakteridir. *A. baumannii*'nin hastane ortamında bulaşı; kişiden kişiye temas, su ve gıda kontaminasyonu ve kontamine olmuş hastane ekipmanıyla olabilmektedir. Hastane ortamında uzun süre hayatta kalması nedeniyle sıklıkla salgınlara neden olmaktadır (1-4).

*Acinetobacter baumannii*, ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, sefazolin gibi birinci kuşak sefalosporinler ile sefotaksim, seftriakson gibi üçüncü kuşak sefalosporinlere ilaveten aztreonam gibi bir çok antibiyotiğe doğal dirençlidir (5). Klinik izolatların çoğu karbapenemler de dahil tüm antimikrobiyal ajanlara dirençlidir. Moleküler çalışmalar, antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu genleri ve direnç mekanizmalarının çoğunu karakterize etmiştir. Çoklu ilaç direnci, mutasyonlardan ve/veya diğer bakteri cinslerinden direnç genlerinin aktarılmasından kaynaklanabilmektedir. Direnç genleri; plazmidler, transpozonlar ve integronlar ile aktarılabilir. *A. baumannii*'nin beta-laktamaz enzim üretimi antibiyotiklere karşı başlıca direnç mekanizmalarından biridir. Bunun dışında dış zar proteinlerindeki değişiklik, penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklik ve efluks pompa aktivitesi de direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır (2, 6). *A. baumannii*'nin sebep olduğu nozokomiyal enfeksiyonlarda son çare olarak kullanılan en etkin antimikrobiyal ajanlardan karbapenemlere direnç artan oranlarda bildirilmektedir. Karbapenemleri hidrolize eden *A.baumannii*'de en yaygın sınıf D karbapenemazlar; oksasilinaz (OXA) enzimleridir (6, 7). *A. baumannii* ile ilişkili OXA beta-laktamazlar; intrinsik kromozomal OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like ve OXA-235-like olarak beş alt sınıfa ayrılmaktadır (7-9).

1980'lerin başından bu yana, çoğul dirençli uluslararası *A. baumannii* klonları olan EU klon I, II ve III'ün dünya çapında hastane salgınlarına sebep olan üç baskın klon olduğu bilinmektedir. EU klon I İspanya, Polonya ve İtalya; EU klon II Çek Cumhuriyeti, İspanya, Portekiz, Güney Afrika, Fransa, Yunanistan ve Türkiye; EU klon III ise Fransa, İtalya, Yunanistan ve Hollanda'dan bildirilen epidemik Avrupa klonlarıdır (2, 6). Karbapenem dirençli *A. baumannii*'nin etken olduğu salgınların

moleküler epidemiyolojik analiziyle klonların kökeni belirlenmektedir. Özellikle Avrupa’da ve dünyadaki salgınlarla ‘EU klon I, II ve III’ veya ‘International Clonal Complexes CC1, CC2 ve CC3’ klonlarıyla ilişkisi, epidemik kökenlerinin prevalansındaki artış ve enfeksiyon kontrol önlemleri açısından büyük önem taşımaktadır. Ülkemizde *A. baumannii* klonal kökenleri genellikle EU klon I ve II ile ilişkili bulunmaktadır. *A. baumannii* izolatlarının, bu kökenlerle klonal yakınlığının araştırılması için moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Özellikle karbapenemaz üreten *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin hızlı ve güvenilir bir yöntemle saptanması, yayılmasını sınırlayıcı önlemlerin alınması ve antibiyotik tedavisinin yönlendirilmesinde çok önemlidir (6-10). Moleküler tiplendirme yöntemleri arasında, PFGE altın standart yöntem olarak kullanılmakla birlikte geç sonuç veren, zahmetli ve pahalı bir yöntemdir. Nisbeten yeni bir teknik olan MLST epidemiyolojik ilişkiyi belirlerken izolatların temel metabolik fonksiyonlarını kodlayan genlerin allelik profillerini güncel PubMed MLST veritabanlarıyla karşılaştırılıp sekans tiplerini belirleyen tiplendirme yöntemidir MLST yakın ilişkili genomik türleri ayırt etmek için PFGE ile kıyaslanabilecek kadar güçlü bir araçtır ve en büyük dezavantajı ise maliyetinin yüksek olmasıdır (6, 9, 11, 12). MALDI-TOF MS yöntemi son yıllarda küçük çaptaki salgınları tiplendirmede kullanıma girmiş, ribozomal proteinlerin iyonizasyonu esasına dayanan, bakteri tanımlamada hızlı bir identifikasyon ve tiplendirme yöntemidir (13). Türleri tanımlama işlemi, tiplendirme iş akışında ilk adımdır. Bakteriyel izolatları hızlı ve güvenilir bir şekilde ayırt etme veya “tiplendirme” yeteneği, bakteriyel tiplendirme çalışmaları ve daha büyük ölçekli epidemiyolojik sürveyans projeleri için çok önemlidir. Yöntemin, alt-türler düzeyinde ya da tür düzeyinde epidemiyolojik analizler için kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir (14). *A. baumannii* için MALDI-TOF MS ile klonal ilişkinin değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (13). *A. baumannii* için izolat sayısı az iken epidemiyolojik ilişki değerlendirmesi yapılabilirken, izolat sayısının fazla olduğu geniş çapta çalışma sayısı azdır (10, 15, 16). MALDI-TOF MS ile hızlı ve güvenilir epidemiyolojik ilişki değerlendirilmesi yapan, çalışılan örnek sayısının artırıldığı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Epidemiyolojik ilişkiyi belirlemede hızlı, güvenilir, uygulaması kolay, laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği ve ayırıcılık gücü yüksek, maliyet etkin en uygun

yöntemin belirlenmesi; salgın yönetimi ve enfeksiyon kontrolü için ihtiyaç duyulan en büyük faktörlerden biridir. En uygun yöntemin belirlenmesi için çalışmalar devam etmektedir ve patojenlerin yayılmasını önleyecek enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasını hızlandırabilecektir (11, 12). Çalışmamızda, karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının OXA genlerinin ve OXA genlerini taşıyan izolatların EU klonlarıyla ilişkisinin PFGE pulsotipi, MLST ve goeBURST tiplendirilmesi, MALDI-TOF MS ile Principal Component Analysis (PCA) dendogram analizleri ile belirlenerek, yöntemlerin ayırıcılığının ve uyumunun karşılaştırmalı olarak istatistiksel değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. *Acinetobacter* spp.

#### 4.1.1. Tarihçe ve Taksonomi

*Acinetobacter* türlerini ilk kez 1911’de Beijerinck tarafından, kalsiyum asetat ile zenginleştirilmiş minimal ortam kullanarak topraktan izole etmiştir (1, 2). *Acinetobacter* türlerinin tanımlanmasında uzun süre yetersiz kalınmış ve 1950’lerde *Achromobacter anitratus*, *Achromobacter mucosus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Cytophaga*, *Diplococcus mucosus*, *Bacterium anitratum*, *Herelleavaginicola*, *Lingelsheimia*, *Mimapolymorpha*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Moraxella lwoffii* ve *Neisseria winogradskyi* gibi farklı cinsler içinde sınıflandırılmıştır (3, 4). Başlangıçta *Micrococcus calcoaceticus* olarak bilinen *Acinetobacter* cinsi; Yunanca’da “akinetos: hareketli olmayan” anlamına gelmektedir. 1954 yılında Brisou ve Pre’vot tarafından *Achromobacter* ailesi içinden hareketsiz olmaları nedeniyle ayrılmıştır (4, 6). Baumann ve ark. 1968 yılında *M. calcoaceticus*, *A. hemolysans*, *M. polymorpha*, *M. lwoffii*, *H. vaginicola* ve *B. anitratum* gibi mikroorganizmaların fenotipik özelliklerine göre *Acinetobacter* cinsi içinde olduğunu çalışmalarında yayınlamışlardır. Bununla birlikte taksonomi komitesi 1971’de *Acinetobacter*’i cins olarak kabul etmiştir. 1974’te, Bergey’in Bakteriyoloji El Kitabında, bu bakteriler, sadece *Acinetobacter calcoaceticus* adlı tür olarak *Neisseriaceae* familyasında yer almıştır (2, 6, 9). Literatürde *A. calcoaceticus* türü benzer özelliklerine göre; *A. anitratus* ve *A. calcoaceticus* bv. *lwoffii* olarak iki alttüre ayrılmıştır (6).

*Acinetobacter* cinsi; Gram-negatif, aerobik, nonfermentatif, hareketsiz, katalaz-pozitif, oksidaz-negatif özellikli bakteri türlerini içerir. 1986’da Bouvet ve Grimnot tarafından gerçekleştirilen DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucu, *Acinetobacter* cinsi 26 tür ve dokuz genomik türden oluşmaktadır (6). *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik türler 13TU fenotipik benzerliklere sahiptir. Tanımlamada ayırt edilmeleri güçtür ve bu nedenle sıklıkla *A. calcoaceticus-complex* olarak adlandırılır (17).

*Acinetobacter* türlerinin genetik yapısı ileri düzey moleküler yöntemler ile yıllar içinde büyük ölçüde taksonomik değişimlere uğramıştır. Bakteri taksonomistleri tarafından yapılan sınıflamada; *Pseudomonadales* ve *Moraxellaceae* familyasında yer

aldığı gamma *Proteobacteria* grubunda kabul edilmiştir. Böylece taksonomik sınıflandırma; Alem: Bakteri, Şube: *Proteobacteria*, Sınıf: Gama *Proteobacteria*, Takım: *Pseudomonadales*, Familya: *Moraxellaceae*, Cins: *Acinetobacter* sıralamasıyla olmaktadır. Bu türlerden *A. baumannii*, *A. haemolyticus* ve *A. calcoaceticus* türleri klinik öneme sahiptir (4).

#### 4.1.2. *Acinetobacter* Türlerin Tanımlanması

*Acinetobacter* türleri Gram-negatif, kısa, dolgun, tipik olarak 1.0–2.5 µm boyutlarında kokobasillerdir. Üremenin logaritmik fazında yapılan gram boyamalarda basil, duraklama fazında ise genellikle çiftler halinde veya değişken uzunlukta kokobasil formunda bulunurlar (4). Kanlı agar besiyerinde 37°C'de 18–24 saat inkübasyondan sonra koloniler; normal şekilde ve büyüklükte, renksiz (beyaz veya krem renkli), pürüzsüz veya mukoid (kapsül mevcut olduğunda), 1-2 mm çapındadır. Eozin Metilen Blue agar üzerinde mavimsi-gri renkte koloniler oluştururlar. MacConkey agar üzerindeki kolonileri renksiz ya da hafif pembemsi renktedir (2). *Acinetobacter* cinsi, zorunlu aerob, hareketsiz, katalaz pozitif, indol negatif, oksidaz negatif, sitrat pozitif ve G+C içeriği %39-47 olan nonfermentatif bakterilerdir (6, 18). *Acinetobacter* izolatlarının büyük kısmı nitratı nitrite indirgeyemez. *Acinetobacter*'in hücre duvarı Gram-negatif bakterilerinkine özgüdür. Gram boyamada alkol dekolarizasyonuna dirençli olması Gram-pozitif kok olarak hatalı saptanmasına yol açabilir (2).

*Acinetobacter*'lerin tanımlanmasında; diğer Gram-negatif nonfermentatif bakterilerden ayırabilen metabolik test bulunmamaktadır. Tanımlamada ticari sistemlerden faydalanılmaktadır. Bu sistemlerden API 20 NE *Acinetobacter* cinsine ait yeni türlerin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Birbirleriyle oldukça benzer ve ilişkili olan *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* ve *A. nosocomialis*'in fenotipik özelliklerinden yararlanılarak birbirlerinden ayrılması zordur (19). Moleküler teknikler bu türlerin ayırımında kullanılmakta ve türlerin tümü *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* kompleks olarak adlandırılmaktadır (6).

Tür tanımlamada; günümüzde rutin laboratuvarlarda manuel tekniklerden yararlanıldığı ve 'API20 NE, Vitek 2:0, Phoenix ve Microscan WalkAway' gibi yarı ve gelişmiş otomatize sistemler de kullanılmaktadır. *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomik

tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13 TU bu sistemlerde *A. baumannii* olarak tanımlanmaktadır (6).

Rutin laboratuvarlarda son yıllarda tür tanımlamasında kullanılan bir diğer yöntem ise ‘Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrofotometry (MALDI-TOF MS)’dir. MALDI-TOF MS yöntemi manuel ile otomatize sistemlere göre basit, hızlı ve güvenilir bir tekniktir. MALDI-TOF MS mikrobiyal tanımlamada etkili, doğru ve uygun maliyetli alternatif yöntem olarak kullanılmaktadır (20). Bu teknolojinin bakteriyel tanımlama için kullanılmasının başlıca avantajlarından biri; 24 saat ile 48 saat arasında alınan tanımlama sonucunu, bir saatten daha az bir zamana indirmesidir. Tanımlaması rutin yöntemlerle yapılamayan ve 16S rRNA gen dizilemesiyle tanımlanan birçok bakterinin günümüzde MALDI-TOF MS ile tanımlanması yapılmaktadır (20, 21).

#### **4.1.3. Patogenez ve Virulans Özellikleri**

Virulansı ile ilgili yapılan kapsamlı araştırmalara göre *Acinetobacter* türlerini gerçek patojenik potansiyeli veya virülans repertuarı hakkında hala çok az bilgi bulunmaktadır. Birkaç faktörün *A. baumannii*'nin virülansına katkıda bulunabileceği düşünülürken, özellikle dış membran proteinlerinin (OMP'ler) bir üyesi olan OmpA, patojenik potansiyeline önemli ölçüde katkıda bulunduğu bilinmektedir. *A. baumannii* OmpA, konak hücrenin mitokondrisi ve epiteline bağlanır, OmpA mitokondriye bağlandığında mitokondriyal disfonksiyonu indükler ve mitokondrilerin şişmesine neden olur. Bu durum, apoptozom oluşumuna yol açan bir heme proteini olan sitokrom c'nin salınmasını izler. Bu reaksiyonların hepsi hücrenin apoptozuna katkıda bulunur (22). Patojen üzerinde fazlaca bulunan yüzey proteini olan OmpA; biyofilmlerin tamamlanmasına ve oluşumuna karşı dirençlidir. Bu iki temel stres sağkalım stratejisi, konakçı içinde ve dışında bakteriyel sağkalımı desteklemeye yardımcı olan önemli virülans faktörleridir (23, 24).

*A. baumannii*'nin biyofilm yapısı, elverişsiz koşullarda bulunduğu ortama tutunmasından sorumludur. *A. baumannii*'nin; yoğun bakım ünitelerinde kullanılan cam materyaller ve ekipmanlar gibi abiyotik yüzeyler üzerinde ve epitelyal hücreler gibi biyotik yüzeylerde biyofilm oluşturabildiği bilinmektedir. Biyofilm oluşumu kontrolünden sorumlu en yaygın faktörler; ortamda besin maddesi bulunuşu, yüzeylere

tutunmasından sorumlu pili (fimria) yapısı, dış zar proteinleri ve makromoleküler sekresyonlardır (23). Pili ve biyofilm-ilişkili protein üretiminin, her ikisi de *A. baumannii*'nin belirli yüzeylere yapışmasından sonra biyofilm üretimi ve olgunlaşmasının başlamasına katkıda bulunur. Pili abiyotik yüzeylere yapıştığında, mikrokolonilerin oluşumunu başlatır, bunu biyofilm yapılarının gelişimi izler. Biyofilm-ilişkili protein, bakteri hücrelerinin yüzeyinde bulunur. Bu protein; olgun biyofilmin abiyotik veya biyotik yüzeyler üzerinde stabilize olmasıyla biyofilm gelişmesine ve olgunlaşmasına katkıda bulunur. Metal katyonlar gibi çevresel sinyaller *A. baumannii*'nin belirli yüzeylere tutunma kabiliyetini artırır (25).

*Acinetobacter baumannii* virülansına katkıda bulunduğu gösterilen diğer proteinler fosfolipaz D ve C enzimleridir. Fosfolipaz D; insan serumuna, epitelyal hücre kaçağına ve patogeneze karşı direnç gösterir. Fosfolipaz C ise epitelyal hücrelerdeki toksisiteyi artırır (26). OmpA ile birlikte, bakteri hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen fimbria ise konak epiteline patojenin adezyonundan sorumludur (27).

*Acinetobacter baumannii* patojenitesinden sorumlu olan diğer virülans faktörleri arasında lipopolisakkarid (LPS) ve kapsüler polisakkaritler (CPS) bulunmaktadır. *A. baumannii* LPS'nin rolü ile ilgili çalışmalar, yüzey karbonhidrat kalıntılarının virulansa katkısını göstermiştir (28). Endotoksinler, hem toll-like reseptör (TLR) 2 hem de TLR4 reseptörlerine bağlı olarak insan monositik hücrelerinde enflamatuar sinyalleme güçlü bir uyarıcısı olarak düşünülürler. Bu nedenle, *Acinetobacter* enfeksiyonlarının patolojisi LPS'e karşı aşırı doğal bağışıklık yanıtı ile ilişkili olabilir (29-31). *A. baumannii*'nin virülansında rol oynayan diğer belirleyiciler, kapsüler polisakkaritlerdir. Russo ve ark.'larının çalışması, *A. baumannii* AB307-0294 klinik izolatından elde edilen K1 kapsülünün *in vivo* ve *in vitro* olarak bakteriyel korunmada önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. *A. baumannii*'nin kapsüler polisakkaritinin aktif koruması, komplement sisteminin bakterisid aktivitesini engellemesini sağlar (32). Genom dizilemesi, genetik manipülasyonlar ve hayvan modelleri uygulamaları ile ilgili güncel analizler, virülans faktörlerine ilişkin mevcut bilgilere katkıda bulunacağı ve genişletileceği yönündedir (33).



#### 4.1.4. *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonları

*Acinetobacter baumannii*'nin cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve sekonder menenjit içeren geniş bir aralıkta ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (34). Bununla birlikte, en yüksek mortalite oranlarına sahip en önemli enfeksiyonlar ventilatör ilişkili pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır (35). Enfeksiyonlar, altta yatan bir hastalığı olan veya büyük cerrahi operasyonlar geçirmiş hastalarda daha yaygındır. *A. baumannii*; açık yaralar, intravasküler kateterler ve mekanik ventilatörler yoluyla vücuda kolayca girebilir. *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlar, özellikle uzun süreli hastanede yatış ile ilişkilidir (6). *A. baumannii* patojenlerinin çoğunluğu hastanede yatan hastaların solunum yollarından izole edilir ve üst solunum yolu kolonizasyonunu gerçek pnömoniden ayırt etmek çok zordur. Bununla birlikte, tüm Gram-negatif bakteriler arasında en yaygın ikinci etiyolojik ajandır (36).

*Acinetobacter baumannii*'nin pnömoni ve bakteriyemi gibi toplum kaynaklı enfeksiyonlara daha az neden olabildiği bilinmektedir. Diğer olası toplum kaynaklı enfeksiyonlar arasında deri, yumuşak doku ve oküler enfeksiyonlar, ikincil menenjit ve endokardit bulunur (37, 38). Bu enfeksiyonlar erkeklerde daha sık görülür ve bireylerde yaşlılık, alkol kullanımı, aşırı sigara tüketimi, diyabet, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve böbrek hastalığı ile ilişkilidir. Toplum kökenli *A. baumannii* pnömonisi, nozokomiyal pnömoniden daha ciddidir, genellikle fulminanttır (tanıdan 8 gün sonra ölüm) ve mortalite oranları %60 kadar yüksek olabilir. Toplum kaynaklı pnömoni sıklıkla yaz aylarında tropikal ve subtropikal iklimlerde rastlandığı rapor edilmiştir (38).

*Acinetobacter baumannii*, nadir bir idrar yolu enfeksiyonu (İYE) etkenidir. Bu organizma genellikle kateterle ilişkili enfeksiyon veya kolonizasyon ile bağlantılıdır. *A. baumannii*'nin ayaktan tedavi gören hastalarda İYE'ye neden olması nadirdir (6, 39).

*Acinetobacter baumannii* endokarditi, daha az sayıda rapor edilen enfeksiyonlar arasında bulunmaktadır. Endokardit vakalarının çoğunluğu protez kapakçıklarının *A. baumannii* enfeksiyonundan kaynaklanmaktadır. *A. baumannii*, endoftalmi veya keratite neden olabilir (6, 34).

## 4.1.5. Epidemiyoloji

### 4.1.5.1. Epidemiyolojik Terminoloji

Suş ve klon gibi epidemiyolojik terimlerin kullanımı ve tanımı tekrar tekrar tartışılmıştır. Örneğin, “izolat”, genellikle ön izolasyonda saf kültür plağından tek bakteri kolonisinin sub-kültüre edilmesiyle tanımlanan genel bir terimdir (40, 41). Bir “suş”, bir dizi fenotipik ve/veya genotipik özellik ile aynı tür içinde diğer izolatlardan ayırt edilebilen bir izolat veya izolat grubunu temsil edebilir. Enfeksiyon salgını, belirli bir lokasyonda belirli bir sürede bu zaman dilimi boyunca enfeksiyon insidansının artmasıdır. Bir salgın suşu (bir enfeksiyon salgınının ortaya çıkmasından sorumlu olan bir suş) tanımı; tek bir ortak öncü izolatın bir nesli olarak kabul edilir. Bu suş; fenotipik, genotipik ve epidemiyolojik olarak ilgili izolat grubunu temsil eder (41).

Bir klonal kompleks (CC), MLST temelli dizi tiplerinde (ST'ler) alelleri 5/7 veya 6/7'sini paylaşan ve temsil eden bir terimdir. Bununla birlikte, bir klon, epidemiyolojik olarak ilgisiz bir grup (farklı kaynaklardan, farklı yerlerde ve belki de farklı zamanlarda bağımsız olarak elde edilen), ancak genotipik ve fenotipik olarak ilişkili izolatları tanımlamak için kullanılması gereken genel bir terimdir. Bu izolatlar için; geçmişte bir tek ortak öncü izolat olduğuna inanılmaktadır (42). “Klonal kompleks” ve “klon” terimleri birbirleriyle uyumlu değildir. Bir klonal kompleks, sadece epidemiyolojik olarak ilgisiz izolatlar içerdiğinde bir klonu temsil eder. Bir klon, bir ST/CC'ye ait, ancak birden fazla ülkeden elde edilen bir grup izolat olarak tanımlanmaktadır (43).

### 4.1.5.2. *Acinetobacter baumannii* Epidemiyolojisi, Potansiyel Kaynakları ve Risk Faktörleri

*Acinetobacter* türleri sağlıklı bireylerin ağız boşluğunda, deri florasında, bağırsak florasında ve dışkıında bulunabilmektedir (2). Genellikle toprak, su ve hayvanlardan izole edilen *A. baumannii*; *Acinetobacter* cinsinin diğer türlerinin aksine; özellikle hastane ortamında yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) bulunmaktadır (44). *A. baumannii*; septisemi, bakteriyemi, ventilatör ilişkili pnömoni, yara sepsisi, endokardit, menenjit ve idrar yolu enfeksiyonları gibi salgınlar ve nozokomiyal enfeksiyonların nedeni olarak belirtilmiştir (45). Çoğul dirençli *Acinetobacter* türleri, sağlık çalışanlarında ya da hasta yakınları gibi sağlıklı bireylerde nadiren ciddi enfeksiyona

neden olması nedeniyle normal bireylerde büyük bir tehdit unsuru değildir. Sağlık bakım ortamlarında ve hastanelerde insanlarda kolonize olabilir (46).

Birçok çalışma, çoklu ilaca dirençli salgın suşlarının edinimi için daha fazla risk taşıyan hastaların genel özelliklerini tanımlamıştır (47). Bu risk faktörleri, özellikle uzun süreli, hastanede veya yoğun bakımda kalış esnasında mekanik ventilasyon desteği, hastane ortamında enfekte veya kolonize hastalara daha fazla maruz kalma, daha fazla sayıda cerrahi girişim, kan transfüzyonu, ve özellikle üçüncü kuşak sefalosporinler, karbapenemler ve fluorokinolonlar gibi geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanların kullanılmasıdır (48).

Hastane ortamının kolonizasyonu, salgın sırasında çoklu ilaca dirençli *A. baumannii*'nin hastalar arasında aktarılmasında büyük önem taşımaktadır. Kolonizasyon, mekanik ventilatörlerin solunum devresinin açılması ile damlacıkların yayılmasıyla kolaylaşabilir (48, 49). Kolonize olma olasılığı en yüksek olan hasta yakınlarıdır ve maruz kaldığı çevresel ortamlar, örneğin, yastık tüyleri, yatak örtüleri ve etrafındaki perdeler gibi fomitler, yatak örtüleri, başucu masaları, nazogastrik beslenme veya vantilatör durulama için kullanılan su ve yatakların arkasındaki gaz musluklarıdır. Ayrıca, ellerin sık sık dokunduğu alanlar; kapı kolları, bilgisayar klavyeleri, lavabolar ve hatta temizlik ekipmanları da kolonize olabilir. Buna göre, sağlık personelinin elleri *A. baumannii* salgın izolatları ile kolonize olabilmekte ve böylece hastalara yayılımı kolaylaşmaktadır. Sağlık personeli hasarlı deriye sahip olması durumunda, *A. baumannii* ile el kolonizasyonunun gelişme riski altındadır (48-50).

Hastalar için kullanılan çeşitli tipte cihazların da salgın sırasında çoğul ilaca dirençli *A. baumannii* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Konu ile ilgili raporlara bakıldığında, mekanik ventilasyon veya emilim için kullanılan solunum ekipmanı gibi cihazlardan bahsedilmektedir. Ek olarak, infüzyon pompaları, basınç transdüktörleri ve sürekli hemofiltrasyon sistemleri gibi intravasküler erişim ile ilgili cihazlar da *A. baumannii*'nin aktarım kaynağı olarak bildirilmiştir. *A. baumannii* ile kontamine olabilen diğer tıbbi ekipman türleri arasında kan basıncı manşetleri, pulse oksimetreleri ve laringoskop bıçakları bulunur (51-54).

Belirli prosedürler, muhtemelen kullanılan spesifik materyallerin kontaminasyonu nedeniyle salgın sırasında *A. baumannii*'nin hastalar arasında

aktarımıyla epidemiyolojik olarak ilişkilendirilmiştir. Prosedürler arasında, yaraların hidroterapi veya pulsatil lavaj tedavisi, spesifik cerrahi müdahaleler, kateterizasyon ve trakeostomi yer almaktadır (55-59).

Hastalardan, sağlık personelinden ve çevresel alanlardan elde edilen sürveyans kültürleri, potansiyel salgın kaynaklarının tanımlanmasına ve belirli kontrol önlemlerinin uygulanmasına yardımcı olabilir. Aksiller, faringeal veya rektal svablar ve trakeal yıkamaların kültürleri, *A. baumannii* ile hasta kolonizasyonunun saptanması için kullanılabilir (48). Bir yoğun bakım ünitesine beş aylık zaman diliminde, yeni kabul edilen 73 hastada haftalık faringeal ve rektal svab kültürlerinin uygulanması, 48 hastanın 46'sını (%96) *A. baumannii* ile kolonize olduğunu göstermiştir (60). Epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin kullanımı; bir salgın sırasında sporadik ve salgın suşları arasındaki ayırım yoluyla, *A. baumannii*'nin bulaşma biçimlerinin tanımlanmasında daha fazla yardımcı olmaktadır (61). Antibiyotipleme, biyotipleme ve elektroforetik tiplendirme gibi fenotipik testler; plazmid profil analizi, PFGE, ribotipleme, 'Amplified Fragment Length Polymorphism' (AFLP), PZR-bazlı testler ve MLST gibi daha gelişmiş genotipleme yöntemleri gibi ayırıcı değildir (48).

*Acinetobacter baumannii*'nin antimikrobiyal ajanlara direnci ve kurumaya direnci sebebiyle salgınlara neden olma eğilimi fazladır (62). *A. baumannii*'nin klinik önemi, 1980'lerin sonlarından bu yana, çoğul dirençli "uluslararası klonal soylar" (ICL) ICL1 ve ICL2'nin olduğu ve dünya çapında hastane salgınlara neden olabilen üç baskın klonun ortaya çıkışı ve yayılmasıyla önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, şu anda 400'den fazla MLST dizi tipi (ST) *A. baumannii* MLST veritabanında (63) listelenmiştir ve yapılan analizlerde, dünya çapında en az altı ana ICL'nun varlığı kanıtlanmıştır (43). Bu altı ICL, orijinal olarak tanımlanan üç ana salgın klonunu içerir ve yeni salgın klonlarının endişe verici şekilde ortaya çıkışını gösterir (64).

#### **4.1.5.3. Uluslararası Klon I**

Multilokus dizi tiplendirmesi Bartual şeması ile CC109B ve MLST Pasteur şeması ile CC1P olarak tanımlanan *A. baumannii* klonu; 31 ülkeden (Almanya, İtalya, Norveç, Bulgaristan, İngiltere, Polonya, Slovenya, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, İrlanda, Belçika, İsviçre, İspanya, Fransa, Yunanistan, Hollanda, Romanya, Türkiye, Hindistan, Çin, Japonya, Kore, Güney Afrika, Singapur, Libya, Cezayir, Lübnan,

Birleşik Arap Emirlikleri, Bahreyn, Arjantin, ABD ve Avustralya) geniş bir uluslararası dağılım ile izole edilen ikinci büyük *A. baumannii* klonudur (43). CC92B/CC2P klonuna benzer şekilde, CC109B/CC1P birçok salgın ve çoklu dirençli suşları içermektedir. *bla<sub>VIM-4</sub>*, *bla<sub>OXA-23-like</sub>* ve *bla<sub>OXA-58-like</sub>* karbapenemaz genlerini taşıdıkları bildirilmiştir. CC109B/CC1P izolatlarının hiçbirinde *bla<sub>OXA-24-like</sub>* enzimi üretimi bulunamamıştır. CC109B/CC1P klonunun, intrinsik *bla<sub>OXA-51-like</sub>* geninin varyantları olan OXA-69 gen grubu (*bla<sub>OXA-69</sub>*, *bla<sub>OXA-107</sub>*, *bla<sub>OXA-110</sub>* ve *bla<sub>OXA-112</sub>* varyantları) ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tablo 1) (65, 66).

#### 4.1.5.4. Uluslararası Klon II

Klonal kompleks CC92B/CC2P Uluslararası klon II olarak da bilinen, *A.baumannii*'de dünyanın önde gelen klonudur. Avrupa'da (İtalya, İspanya, Almanya, Yunanistan, Hollanda, Birleşik Krallık, Danimarka, Çek Cumhuriyeti, Fransa, Polonya, Türkiye, Norveç, İsveç, Portekiz, İrlanda, Belçika, Romanya), Asya'da (Japonya, Çin, Kore, Tayland, Hindistan, Malezya, Filipinler, Tayvan, Singapur, Vietnam, Lübnan, Nepal, Irak, Kuveyt), Amerika (Brezilya, ABD), Güney ve Kuzey Afrika'nın yanı sıra Avustralya'da da rapor edilmiştir (43). Bu klon karbapenemler de dahil olmak üzere epidemik ve çoklu dirençli suşları, aynı zamanda kolistin ve tigesiline dirençli suşları içerir (64). Çeşitli karbapenemazların da (*bla<sub>VIM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-23-like</sub>*, *bla<sub>OXA-24-like</sub>* ve / veya *bla<sub>OXA-58-like</sub>*) CC92B/CC2P izolatları arasında taşındığı tespit edilmiştir (67). Bu klonun eski iki izolatu, 1982'de Hollanda'dan (bir MDR salgın suşunu temsil eden RUH 134) ve 1984'te Danimarka'dan (RUH 3422, bir antibiyotik duyarlı sporadik izolat) toplanmıştır (64). Kolistin, polimiksin B ve tigesiklin dahil olmak üzere mevcut tüm antimikrobiyal ajanlara dirençli ST92B izolatlarının varlığı yakın zamanda Kore'den de bildirilmiştir (68).

CC92B/CC2P'nin epidemik klonal yayılım yeteneğini açıklamak için çeşitli faktörlerden bahsedilmektedir. İnsan bağışıklık sistemi ve antibiyotik tedavisi, klinik olarak ilgili bakteriler için ana stres koşulları ve hayati evrimsel darboğazlardır. Bu koşullar genellikle biyoçeşitliliği azaltır ve bir bakteri popülasyonunda klonalitenin ortaya çıkmasını destekler. Buna göre, virulans ve antibiyotik direnci, stres koşulları altında hayatta kalmak için, *A. baumannii* CC92B/CC2P klonu gibi, belirli bakteri suşları ve klonları tarafından kullanılan, hayati uyarılma mekanizmalarıdır (69).

CC92B/CC2P'nin başarılı bir şekilde ortaya çıkması; öncelikle tek bir atadan kapsamlı klonal yayılması ve belli bir doğruluk derecesinde, sürdürülebilir ve uzun süreli bir uluslararası salgının ortaya çıkışını gösterir. Bu teori Kore'de yapılan; beş şehirden elde edilen tüm karbapenem dirençli ST92B izolatlarının bir salgın pulsotipine ait olduğunu gösteren bir çalışma ile desteklenmiştir (70). Benzer şekilde, üç kıtadan elde edilen dokuz karbapenem dirençli ST92B izolatının sekizi ilgili PFGE paternlerini göstermiştir (71). Lokal, ulusal ve uluslararası izolatların dolaşımı, muhtemelen farklı hastaneler ve farklı ülkeler arasında hastaların transferi de dahil olmak üzere uluslararası seyahatlerdeki artışla kolaylaşmaktadır (6). Alternatif olarak, CC92B/CC2P'nin yaygın dağılımı, muhtemelen ortak fakat antik bir atayı paylaşan çeşitli progenitörlerden genişleyen küçük kümelerin bağımsız fakat paralel olarak ortaya çıkmasıyla ilişkili olabilir. Çin'deki 16 şehirden elde edilen karbapenem dirençli ST92B izolatları en az üç farklı salgın pulsotipi arasında dağılmıştır (72). Benzer şekilde, Çin'den bir dizi karbapenem dirençli ST92B izolatının sporadik pulsotiplere ait olduğu bulunmuştur (70). Ek olarak, Norveç'te toplanan CC92B'ye ait izolatların ayrı pulsotiplere sahip olduğu bildirilmiştir (73). Bu bağlamda, farklı pulsotiplerin (bağımsız olarak ortaya çıkması öngörülen) izolatları arasındaki direnç özelliklerine ve belirleyicilere benzerliği, dünyanın farklı bölgelerindeki benzer seçim baskılarından kaynaklanabilir (74).

#### **4.1.5.5. Uluslararası Klon III**

CC187B/CC3P veya uluslararası klon III, çok çeşitli dirençli suşları içeren *A.baumannii*'deki bir başka önemli klondur ve Avrupa'da (Fransa, Almanya, İspanya, Hollanda, İtalya, Belçika) ve Amerika Birleşik Devletleri, Lübnan ve Irak'ta dahil olmak üzere birçok ülkede tespit edilmiştir. Bu klonun, intrinsik gen *bla<sub>OXA-51</sub>*'in varyantı olan OXA-71 ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (43, 75, 76).

#### **4.1.5.6. Diğer Klonlar**

Uluslararası klon I-III'e ek olarak; CC15P, Güney Amerika'da (Norveç, Portekiz, Çek Cumhuriyeti, Türkiye, İspanya, Yunanistan, Arjantin ve Brezilya) ve Avrupa'da bildirilen başka bir uluslararası klondur. Epidemik suşları içeren bu klonun, *bla<sub>OXA-51</sub>* varyantları ve *bla<sub>OXA-132</sub>* taşıdığı bilinmektedir (43, 75-77). *A. baumannii*'nin moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar; CC20B (Avrupa, Afrika, Doğu Asya),

CC110B (Kore, Arjantin, ABD), CC32P (Avrupa), CC25P (Avrupa, Asya, ABD), CC85P (Avrupa, Asya) gibi ulusal düzeyde salgınlardan sorumlu uluslararası klonların çeşitli bölgelerde ve ülkelerde varolduğu da bildirilmiştir (43, 76, 78-80).

**Tablo 1.** *Acinetobacter baumannii*'nin klonal kökenleri (Zarrilli'den, 76)

AFLP	Klonlar MLST (Pasteur)	Klonlar MLST (Bartual)	<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>
I	CC1	CC109	OXA-69
II	CC2	CC92	OXA-66
III	CC3	CC187	OXA-71
Cluster A	CC15	CC103	OXA-51, OXA132
	ST78	ST196	OXA-90
	CC25	CC276	OXA-64
Cluster B	CC10		OXA-68, OXA-128
	CC32	ST120	OXA-100
Cluster 6	ST52		
Cluster C	CC79	CC113	OXA-65
	CC85		OXA-94

Güncel verilere göre *A.baumannii*'de MLST Pasteur şemasına göre 1234 ve Oxford şemasına göre 1845 sekans tipi bulunmaktadır (63).

#### 4.2. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

*Acinetobacter baumannii*; ampisilin, amoksisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere doğal dirençli oldukları gibi yeni antibiyotiklere de son derece hızlı bir şekilde direnç geliştirebilme yeteneğine sahiptir. *Acinetobacter* türleri 1970'lerde ampisilinden nalidiksik aside çoğu antibiyotiğe karşı genellikle duyarlı bildirilmiştir. 1980'lerde, çeşitli antibiyotik sınıflarına karşı direnç ortaya çıkmış, 1990'ların başlarında, imipenem dirençli suşlar ortaya çıkmıştır (6, 34, 44, 49, 81). *A. baumannii*, antimikrobiyal ajanların birçoğuna karşı oldukça dirençlidir. Ancak son on yılda, antibiyotiklerin batı ülkelerinde yaygın olarak kullanılmasının bir sonucu olarak, diğer antibiyotiklere karşı artan direnç rapor edilmiştir (82). Ne yazık ki, karbapenem dirençli *A. baumannii* suşları çoğu zaman kolistin ve tigesiklin de dahil olmak üzere antimikrobiyallerin tüm sınıflarına karşı dirençli bulunmaya başlanmıştır (81, 82). Sonrasında kolistin ve tigesikline dirençli *Acinetobacter* suşları bildirilmiştir (83, 84).

Karbapenem dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları; hastaların hastanede kalış süresini ve yoğun bakım süresini uzatmış ve mortalite oranlarını artırmıştır (81). *A. baumannii* izolatlarının amikasin, genişlemiş spektrumlu sefalosporinler, karbapenemler ve tigesiklin gibi geniş spektrumlu antibiyotiklere direncinin artması, hekimlerin gittikçe daha az etkili tedavi seçeneği ile karşılaşacağıının öngörüsüdür (85).

*Acinetobacter baumannii* gibi antimikrobiyal ajanlara dirençli patojenleri uluslararası merkezlerin ortak bir girişimi ile; edinilmiş direnç profillerini tanımlamak için standartlaştırılmış bir uluslararası terminoloji oluşturulmuştur. Terminolojide üç önemli ‘Çok ilaca dirençli/multidrug resistant (ÇİD/MDR), yaygın ilaca dirençli/extensively drug-resistant (XDR) ve pandrug-dirençli/pandrug-resistant (PDR)’ tanımları tıbbi literatüre kazandırılmıştır. Buna göre ÇİD; üçten fazla antimikrobiyal grupta birden fazla gruba, XDR; bir yada iki ilaç grubuna, PDR; tüm ilaç gruplarına dirençli olarak tanımlanmıştır (86).

*Acinetobacter baumannii*; geniş spektrumlu beta-laktamaz üretimi, aminoglikozit modifiye edici enzimler, efluks pompaları, dış membran geçirgenliğinde azalma ve hedef bölgelerin modifikasyonları dahil olmak üzere bir dizi direnç mekanizmasına sahiptir (87).

#### **4.2.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları**

Beta laktamlara direnç; beta-laktamaz üretimi, penisilin bağlayan proteinlerdeki porin proteinlerindeki değişiklik mekanizmaları ile gelişir. Beta laktam ajanların beta-laktamazlar ile inaktivasyonu, *A. baumannii*'de önemli bir antibiyotik direnç mekanizmasıdır. *A. baumannii* beta-laktamlara karşı doğal direnç taşıdıkları gibi kromozomal genlerde bazı mutasyonlarla veya plazmid, transpozon gibi genetik meteryallerin aktarımıyla kazanılmış direnç de geliştirebilmektedir. *A. baumannii*'de kromozal AmpC geni kodlayan sefalosporinazlar olarak bilinen grup Ambler Sınıf C içerisinde yer almaktadırlar. Plazmid aracılı direnç gelişiminde; TEM-1, TEM-2 ve SHV gibi enzimler kazanılmış beta-laktamazlara örnek gösterilebilir (88, 89).

#### **4.2.2. Beta-laktamazlar**

Beta-laktamazlar; beta-laktam antibiyotiklere, bakteriyel direncin en yaygın nedenleridir. Beta-laktam halkasındaki amid bağı hidrolize ederek neredeyse tüm beta-laktam antibiyotikleri inaktive edebilirler. Beta-laktamazlar 1980 yılında Ambler



tarafından sınıflandırılmış ve 1989 yılında Bush tarafından geliştirilmiştir. Sekans homolojisine dayanarak; beta-laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört grup olarak sınıflandırılmıştır. Bush-Jacoby-Medeiros 1995 yılında sınıflandırmayı güncellemiş; enzimleri substrat ve inhibitörlerine göre dört gruba ayırmıştır (88, 89). Beta-laktamazların sınıflandırılması Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2.** Beta-laktamazların sınıflandırması (Olsen’den, 89)

Ambler Sınıfı	Bush-Jacoby-Medeiros Sınıfı	Karakteristik Özellikleri	Bilinen Enzim Sayısı	
<b>C</b>	1	Gram negatiflerde kromozal enzimlerdir. Bazıları plazmid aracılıdır. Klavulanik asite dirençlidir.	51	
	2a	Stafilokokal ve enterokokal penisilinazlar	23	
<b>A</b>	2b	Geniş-spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, SHV-1), genellikle Gram-negatiflerde bulunurlar.	16	
	2be	Geniş-spektrumlu Beta-laktamazlar (GSBL)	200	
	2br	İnhibitör-dirençli TEM (IRT) Beta-laktamazlar	24	
	2c	Karpenisilin-hidrolize eden enzimler	19	
	2d	Kloksasilin (oksasilin) hidrolize eden enzimler	31	
	2e	Sefalosporinazlar	20	
<b>A</b>	2f	Klavulanik asit tarafından inhibe olan karbapenem hidrolize eden enzimlerdir	4	
	3	Monobaktamlar haricinde karbapenemleri ve diğer Beta-laktamları hidrolize eden metallo-enzimlerdir. Klavulanik asit tarafından inhibe edilmez.	24	
	<b>B</b>			
<b>D</b>	4	Çeşitli enzimler	9	

Beta-laktamazların sınıflandırılması, fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre yapılabilir. Bush ve ark.'ları bilinen beta-laktamazları, gruba spesifik substrat veya inhibitör profillerine göre dört ana fonksiyonel grupta (Grup 1-4) sınıflandırmıştır. Grup 2, çoklu alt gruplara ayrılmıştır. Güncellenen sistem Grup 1 (Sınıf C) sefalosporinazları; Grup 2 (A ve D sınıfları) geniş spektrumlu, inhibitör dirençli ve GSBL'ler ve serin karbapenemazları; ve Grup 3 metallo-beta-laktamazları (MBL) ifade eder. Bu fonksiyonel sınıflandırma şemasında, karbapenemazlar öncelikle Grup 2f ve 3'te bulunur. İkincisi, daha az rastlanan beta-laktamaz grubu ya da Sınıf B beta-laktamazlardır. Bu grup; bir histidin veya sistein kalıntısına bağlı, çoğunlukla çinkolu, iki değerli bir geçiş metali iyonunu kullanır. İki değerlikli geçiş metali iyonu; monobaktamlar hariç çoğu penisilin, sefalosporin ve karbapenemin amid bağının karbonil grubuyla reaksiyona girmektedir (88, 89).

#### 4.2.3 Karbapenemazlar

Karbapenemler ilk kez 1980 yılında ortaya çıkmıştır. Genellikle çoklu ilaç dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kullanılırlar. Karbapenemler; Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen GSBL ve AmpC'de dahil olmak üzere beta-laktamazların neden olduğu enfeksiyonlarda da kullanılmaktadır. Moleküler çalışmalara dayanarak, karbapenem hidrolize edici enzimler aktif bölgelerindeki yapılarına göre iki gruba ayrılabilir. Sınıf A, C ve D karbapenemazlar; aktif bölgelerinde serin aminoasidine sahiptir. Sınıf C MBL'lar ise enzim aktivitesi için metal kofaktör çinkoya gereksinim duyarlar (91, 92).

**Tablo 3.** Karbapenemazların sınıflandırılması (Dahiya'den ve Poirel'den, 90, 91)

Ambler Sınıf	Karbapenemaz	Açıklama
Sınıf A Karbapenemazlar	KPC ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase)	KPC enzimleri Plazmid aracılı aktarılır
	SME ( <i>Serratia marcescens</i> enzyme)	<i>Serratia marcescens</i> 'de kromozomal kodlanır
	IMI (imipenem-hydrolysing beta- lactamase)	<i>Enterobacter cloacae</i> 'de kromozomal kodlanır

**Tablo 3.** (Devam)

<b>Ambler Sınıf</b>	<b>Karbapenemaz</b>	<b>Açıklama</b>
<b>Sınıf A Karbapenamazlar</b>	NMC (not metalloenzyme carbapenemase)	<i>Enterobacter cloacae</i> 'de kromozomal kodlanır
	GES (Guyana ESBLs)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> ve <i>Escherichia coli</i> 'de plazmid aracılı aktarılır
<b>Sınıf B Karbapenamazlar</b>	IMP-karbapenemaz (MBL)	İlk 1990'da Japonya'da <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> ve <i>Acinetobacter</i> türlerinde bildirilmiştir
	VIM (Verona integron MBL)	Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika yayılmıştır <i>P. aeruginosa</i> 'da yaygın, <i>Enterobacteriaceae</i> 'da nadir görülmemektedir
	SPM-1 (Sao Paulo MBL)	1997'de <i>P. aeruginosa</i> izolatında Sao Paulo Brezilya'dan bildirilmiştir
	GIM (German imipenemaz)	2002'de Almanya'da <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> izolatlarında tesbit edilmiştir
	SIM-1 (Seoul imipenemaz)	2005'de Güney Kore'de <i>A.</i> <i>baumannii</i> izolatında tanımlanmıştır
<b>Sınıf D Karbapenamazlar</b>	NDM-1 (New Delhi MBL)	2009'da New Delhi'de tanımlanmıştır
	OXA (Oksasilinazlar)	Özellikle <i>Acinetobacter</i> türlerinde görülmektedir

#### 4.2.3.1. Sınıf A Karbapenemazlar

Sınıf A serin karbapenemazlar, fonksiyonel Grup 2f'nin üyeleridir (88). Kromozomal yada plazmid aracılı kodlanabilirler. Karbapenemler, sefalosporinler, penisilinler ve aztreonam dahil olmak üzere çok çeşitli beta-laktamları hidrolize edebilirler. Bununla birlikte, hepsi klavulanat ve tazobaktam tarafından inhibe edilir (89). *Enterobacteriaceae* ile karakterize edilen enzimler (Tablo 3) arasında 'not-metalloenzyme karbapenemase-A' (NMC-A), *Serratia marcescens* enzim (SME), "imipenem-hidrolize eden beta-laktamaz- 1" (IMI-1), *K. pneumoniae* karbapenemazlar 1-3 (KPC ) ve Guyana geniş spektrumlu beta-laktamaz (GES-2) tipi enzimler tanımlanmıştır (90, 91)

#### 4.2.3.2. Sınıf B Karbapenemazlar

Sınıf B karbapenemazlar; karbapenemleri hidrolize edebilirler ve beta-laktamaz inhibitörlerine karşı dirençlidirler. Ancak metal iyon şelatörleri tarafından inhibisyona duyarlılık gösterebilirler. Substrat spektrumu oldukça geniş olan sınıf B karbapenemazlar; karbapenemlere ek olarak, tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilirler. Ancak, aztreonamı hidrolize edemezler (92). Hidroliz mekanizması enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonlarının beta-laktamlar ile etkileşimine dayanır. Çinko ( $Zn^{2+}$ ) ve diğer iki değerlikli katyonların bir şelatörü olan etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) tarafından inhibisyonu mümkündür. En yaygın metallo-laktamazlar, IMP, VIM, SPM, GIM, SIM ve NDM-1'dir (Tablo 3). Bu enzimleri kodlayan genler genellikle çeşitli integron yapıları içinde bulunur ve gen kasetleri ile aktarılabilir (90, 92).

IMP tipi metallo-beta-laktamazlar 1990 yılında Japonya'da tanımlanmıştır. Günümüzde 18'den fazla tipi olduğu bilinmektedir. 1997'de ilk kez Avrupa'da bildirildikten sonra Brezilya ve Kanada'dan da rapor edilmiştir. Uzak Doğu'daki diğer ülkelere ve daha sonra Amerika Birleşik Devletleri ve Avustralya'ya yavaş yavaş yayıldığı da bilinmektedir. IMP tipi karabapenemazların çoğu *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinde ve *Enterobacteriaceae* familyasında saptanmıştır (92, 93).

VIM tipi karabapenemazlar, 1997 yılında Verona, İtalya'da izole edilmiş ve çoğunlukla integron ile aktarılan metallo-beta-laktamazlardır (92). *Enterobacteriaceae*'de nadiren rastlanır fakat yaygın olarak *Pseudomonas aeruginosa* ve

*Pseudomonas putida*'da görülür. 14 tipi olduğu bilinmektedir. VIM ve IMP tipi karbapenemazlar aminoasit dizilimleri bakımından %70 benzerlik gösterirler. Her ikisi de monobaktamlar hariç tüm beta-laktamları hidrolize edebilirler ve tüm beta-laktam inhibitörlerine karşı duyarlıdırlar (94).

NDM-1 2009 yılında New Delhi'de tanımlanmıştır. 2010 yılının ortasına kadar, dünya çapında turistler aracılığıyla Avrupa ve ABD dahil diğer ülkelere yayılmıştır (95). Bu grupta sekiz varyant tanımlanmıştır. *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında NDM genleri baskındır ancak *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* türleriyle de ilişkili bulunmuştur (94, 95).

#### 4.2.3.3. Sınıf D Karbapenemazlar

Ambler'in moleküler sınıflamasında D grubunda, fonksiyonel sınıflamada ise 2d grubunda yer alan aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunduran karbapenemaz grubudur. Sınıf D beta-laktamazlar oksasilinaz veya OXA enzimleri olarak da bilinmektedirler (92). OXA enzimlerinin bu şekilde adlandırılması; penisilin ve oksasilin hidrolizinin benzilpenisilinden %50 daha yüksek oranda olmasından kaynaklanmaktadır. Sınıf D beta-laktamazlar genellikle klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam ile inhibe olmazken, in vitro sodyum klorür (NaCl) ile inhibe edilebilirler. Bu özellik diğer sınıf beta-laktamazlarda bulunmamakta, böylece in vitro tanımlama için ayırıcı bir özellik olarak tanımlanmaktadır (96, 97).

Oksasilinaz genleri; *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas* ve *Burkholderia* gibi çeşitli bakteri türlerinin hem kromozomlarında hem de plazmidlerinde bulunabilirler. Kromozomal oksasilinazların çoğu plasmidlerle de aktarılmakta ve daha büyük bir klinik tehdit oluşturmaktadır. Bazı OXA enzimlerinin hidroliz mekanizmasına göre substrat profilide sınırlıdır. Dar spektrumlu profil sadece penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edenler; genişlemiş spektrumlu profil sonraki kuşak sefalosporinleri ve karbapenemazlar karbapenem grubu antibiyotikleri hidrolize edenler olarak adlandırılırlar (93, 97).

Sınıf D karbapenemazların; 400'den fazla varyantı olduğu bilinmektedir. Bu çeşitlilik, özellikle amino asit benzerliği seviyesinde, tanım için literatürde karışıklıklar oluşturabilmektedir. Bu sınıfa daha açık bir organizasyon sağlamak, Sınıf D beta-laktamaz ailesini gruplara ayırmak için %80 amino asit benzerliği kullanılmaktadır. Her

grup içinde de altgrupları en az %95 amino asit benzerliğine sahip olanlar oluşturmaktadır (96).

Metallo-beta-laktamazlar ile karşılaştırıldığında etkinlikleri karbapenemlere karşı daha düşüktür. İmipenem genellikle meropenem veya doripenemden (OXA-2 ve OXA-10 hariç) daha hızlı hidrolize olur. Bununla birlikte, OXA enzimlerinin çoğu, karbapenemler için genellikle nanomolar aralıkta çok yüksek afinite gösterirler. Bu afinite; *Acinetobacter* veya *Pseudomonas* türlerinde minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleriyle açıklanabilir. Bu organizmalar, azalmış zar geçirgenliği ve effluks sistemleri sayesinde sitoplazmalarında az miktarda yabancı madde biriktirirler. Effluks pompalarının aşırı miktarda ekspresyonu veya porin kaybı bu mikroorganizmalarda MİK değerlerini yükseltmektedir (88, 96).

*Acinetobacter baumannii*'de karbapenemaz aktivitesine sahip en yaygın beta-laktamaz grubu çoğunlukla bu türe özgü olan karbapenem-hidrolize edici sınıf D beta-laktamazlardır (98). *A. baumannii* ile ilişkili OXA beta-laktamazlar; 90'ın üzerinde varyantı olan intrinsik kromozomal OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like ve OXA-235-like olarak altı alt sınıfa ayrılmaktadır (98-100).

#### 4.2.3.3.1. OXA-23-like Beta-laktamazlar

*Acinetobacter baumannii*'de tanımlanan karbapenem dirençli ilk OXA-tipi-beta-laktamaz grubu OXA-23 grubudur. İlk olarak ARI-1 olarak tanımlanmıştır. OXA-23 beta-laktamaz 1985 yılında Edinburgh, Birleşik Krallık'ta bir *A. baumannii* izolatında, imipenemin ilk kez kullanım için onaylandığı yıl içinde tanımlanmıştır (100). İzolatın, imipenem MİK değeri 16 mg/litre ve direnç fenotipinin ise transfer edilebilir bir plazmitte olduğu bulunmuştur (101). Bu enzim grubundaki genler kromozomal taşıdığı gibi sıklıkla plazmid aktarımıyla görülmektedir. *Acinetobacter* türünde olduğu gibi *Enterobacteriaceae*'ye ait türlerinde birçoğunda plazmid ile aktarım saptanmıştır. *A. radioresistens* izolatlarının kromozomu üzerinde çeşitli *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genleri (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-102</sub>, *bla*<sub>OXA-103</sub>, *bla*<sub>OXA-105</sub>, *bla*<sub>OXA-133</sub> ve *bla*<sub>OXA-134</sub>) keşfedilmesi, bu türün bu enzim grubunun muhtemel doğal kaynağı olduğunu göstermektedir. Singapur'da izole edilmiş bir klinik *A. baumannii* suşunda OXA-23'ün aminoasit türevi olan OXA-27 geni tanımlanmıştır. Fransa'dan karbapenem dirençli bir *Proteus mirabilis* izolatında

OXA-27'nin kromozomal olarak taşındığı bildirilmiştir. OXA-27'nin penisilinler, karbapenemler ve sefalosporinleri çok daha düşük oranda hidrolize ettiği bilinmektedir. Tazobaktam ve daha az olarak klavulanik asite duyarlıdır (100, 102, 103). OXA-23'ün kromozomla kodlanmış OXA-102, OXA-103 ve OXA-105 türevlerinin sırasıyla altı, üç ve üç amino asit farklılığı vardır. OXA-146, alanin 220'nin dublikasyonundan dolayı OXA-23'ten farklıdır. OXA-23'ün aksine, OXA-146 diğer beta-laktamlar için çok benzer substrat profilini korurken, seftazidimi etkili bir şekilde hidrolize eder (104).

OXA-23-like enzimler; karbapenemlere ek olarak oksiminosefalosporinleri, aminopenisilinleri, piperasilini, oksasilin ve aztreonamı hidrolize edebilirler. *A. baumannii* suşu tarafından OXA-23 üretiminin karbapenemlere direnç kazandırmak için yeterli olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bir çalışmada; *bla*<sub>OXA-23</sub> geni taşıyan düşük kopya sayısına sahip plazmid vektörü, duyarlı *A. baumannii* CIP70.10 tipi suşuna klonlanmıştır. Karbapenemlere karşı MİK değeri 16 µg/ml bulunmuştur. Bununla birlikte; *bla*<sub>OXA-23</sub> geni, AdeABC effluks pompasını da eksprese eden bir suşa transfer edildiğinde, MİK değeri >32 µg/ml'ye yükselmiştir. Bu durum, diğer OXA tipi karbapenemazlardan farklı olarak, OXA-23 taşıyan bir suşun karbapenem dirençli olmak için başka direnç mekanizmalarına gereksinimi olmadığı, yüksek direnç düzeylerinin sadece başka mekanizmalar mevcut olduğunda elde edilebileceğini göstermektedir (100, 105).

OXA-23-pozitif *A. baumannii* suşlarının tüm dünyaya; Fransa, Bulgaristan, İran, Birleşik Arap Emirlikleri, Tunus, Brezilya ve Avustralya'ya yayıldığı görülmektedir. Buna ek olarak OXA-23 üreten izolatların; Fransız Polinezyası, Kolombiya, Birleşik Krallık, Türkiye, Çin ve Kore'de hastane salgınlarına sebep olduğu bilinmektedir (97).

#### **4.2.3.3.2. OXA-24/40-like Beta-laktamazlar**

OXA-24, 1997'de İspanya'da izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* klinik suşunun kromozomunda tanımlanmıştır. Günümüzde, OXA-24 için rapor edilen sekans dizilimi güncellenmiş ve OXA-40 ile %99 üzerinde benzer olduğu ortaya çıkmıştır. Bu enzim sıklıkla OXA-24/40 olarak da tanımlanmaktadır. Bu enzim ailesi ağırlıklı olarak *A. baumannii* suşlarında bildirilmesine rağmen, OXA-24/40-like enzimler *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter baylyi* ve *P. aeruginosa*'da türlerinde de raporlanmıştır (106). OXA-24 alt grupları; OXA-25, OXA-

26, OXA-40, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207 beta-laktamaz enzimlerinden oluşmaktadır. Bu kümenin üyeleri arasındaki dizi farklılıkları 1 ila 5 amino asit arasında değişir. Genel olarak, OXA-24-like enzimler penisilinleri hidrolize edebilirler, fakat sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı zayıf aktivite gösterirler (100, 107). OXA-24/40-like enzimler; Avrupa, Kuzey Amerika, Asya ve Güney Amerika dahil olmak üzere dünya çapında dağılıma sahiptir (106). İlk kez 2013 yılında Türkiye’de İzmir’den bildirilmiştir (108).

#### 4.2.3.3.3. OXA-51-like Beta-laktamazlar

Bugüne kadar tanımlanan en büyük OXA tipi beta-laktamaz grubu OXA-51-like beta-laktamazlardır. Grubun kurucu üyesi OXA-51, ilk olarak 1996 yılında Arjantin’de *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. Bu enzimler *A. baumannii*’ye özgüdür ve bu türün kromozomunda bulunur. Bugüne kadar 95 enzim varyantı belirlenmiştir. Çok sayıda varyantının olması, kromozomal olarak kodlanan bu enzimlerin antibiyotik kullanımından önemli ölçüde seçici baskı altında olduklarının bir göstergesidir. Bu enzimler iyi seyirli enzimler olmadığı gibi dirençte de büyük rol oynarlar. En yaygın bilinen OXA-51-like enzimler OXA-66 ve OXA-69’dur (100, 109). Karbapenem hidrolizi zayıf olmasına rağmen, OXA-51’in bazı durumlarda aşırı eksprese edilebildiği ve karbapenemlere karşı duyarlılık düzeyinin azaldığı sonucunu düşündürmektedir. Bu durum *bla*<sub>OXA-51/69-like</sub> geninin üst kısmında işlev gören *ISAbal1* elemanının bulunması ile ilişkilidir. Bu nedenle, *A. baumannii*’nin doğal *bla*<sub>AmpC</sub> geninde de gözlemlendiği gibi, *ISAbal1*; ilişkili genlerin ekspresyonunu arttıran promotör dizileri sağlayabilir. Bu promotör diziler muhtemelen *A. baumannii*’de direnç gelişimi için son derece verimlidir. *ISAbal1*’in *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geninin üst kısmına yerleşmesi, gerçek bir karbapenem direnci mekanizması veya en azından azaltılmış duyarlılığı temsil edebilir (98).

#### 4.2.3.3.4. OXA-58-like Beta-laktamazlar

İlk kez OXA-58 enzimi 2003 yılında Fransa’da; çoğul dirençli *A. baumannii* klinik izolatında bulunmuştur. OXA-58-like genler *Acinetobacter* spp. türlerinde dünya çapında yayılmaktadır. Altgrupları; OXA-96, OXA-97, OXA-164 gibi enzimlerden oluşmaktadır. Karbapenemlere ve penisilin’e karşı zayıf aktivite gösterirken; sefpirom ve sefalotini hidrolize edebilirler (100). Birçok ülkeden toplanan *Acinetobacter* türlerine ait izolatlar, OXA-58-like enzimlerinin; ilk tanımlanmadan önce en az 10 yıl süreyle



mevcut olduğunu göstermektedir (110). *A.baumannii* suşlarında OXA-58-like genlere veya enzimlere çok sık rastlanmasına rağmen diğer türlerde de tanımlanmıştır. Tayvan ve İspanya'da *A. nosocomialis*; İskoçya, Tayvan ve İspanya'da *A. pittii*; Çin'de *A. haemolyticus*; ve Hindistan'da *A. junii* ve *A. radioresistens* türlerinde tanımlanmıştır (96). *bla*<sub>OXA-58</sub> geni taşıyan birçok izolat eş zamanlı olarak ISAb<sub>1</sub>, ISAb<sub>2</sub> veya ISAb<sub>3</sub> gibi insersiyon sekansları da taşır. Bu durum da artan karbapenemaz üretimi ve dolayısıyla daha yüksek karbapenem direnci seviyeleri ile ilişkilendirilmektedir. Bir raporda, artan gen kopya sayısı, daha yüksek seviyede enzim üretimi ve fenotipik karbapenem direnci artışı ile ilişkilendirilmiştir (100, 111).

#### **4.2.3.3.5. OXA-143-like Beta-laktamazlar**

Karbapenemler de dahil olmak üzere neredeyse tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli, fakat PZR ile karbapenem hidrolize eden beta-laktamaz genleri negatif sonuç veren üç *A. baumannii* izolatı 2004 yılında Brezilya'dan bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarla OXA-143 adında yeni bir enzim tespit edilmiştir. *A. baumannii*'deki diğer edinilmiş OXA-tipi beta-laktamazlarda olduğu gibi, OXA-143 için enzim kinetikleri düşük seviyelerde karbapenem hidrolizi göstermiştir (100, 112).

#### **4.2.3.3.6. OXA-235-like Beta-laktamazlar**

*Acinetobacter baumannii*'de saptanan OXA-235, OXA-236 ve OXA-237, esas olarak ABD'den köken alan izolatlarda tanımlanmış, Meksika'da da bir izolatta bildirilmiştir. Aminoasit dizilimleri OXA-23, OXA-24, OXA-58 ve OXA-143 ile %57 benzerlik ve intrinsik OXA-51 ile %56 benzerlik gösterdiğinden OXA ailesinin yeni bir alt sınıfını temsil etmektedir. OXA-235 penisilinler ve karbapenemleri hidrolize edebilirler, ancak diğer KHDL'lerde olduğu gibi genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere karşı aktivite göstermemişlerdir (99).

#### **4.2.4. Karbapenemaz Tanısında Kullanılan Yöntemler**

Klinik laboratuvarlarda; karbapenemazların tanısında bir dizi yöntem kullanılabilir. Bunlar arasında otomatik sistemler, disk difüzyon, MİK belirlenmesi, seçici ve kromojenik agarlar, modifiye-Hodge testi, sinerji testleri (örn., E-testleri veya çift disk sinerji testleri), CarbaNP gibi biyokimyasal metodlar, tüm genom dizilemesi ve moleküler yöntemler de bulunmaktadır (94). Kullanılan fenotipik, biyokimyasal ve moleküler testler Tablo 4'de verilmiştir.

**Tablo 4.** *A. baumannii*'de karbapenemaz tespitinde kullanılan yöntemler (Nowak'dan, 33)

<b>Grup</b>	<b>Metod</b>
Fenotipik yöntemler	Çift-Disk Sinerji Testi Kombine Disk Testi E-test MBL
Biyokimyasal yöntemler	CarbAcineto NP test Rapid CARB Blue Kit UV spektrometre MALDI-TOF MS
Moleküler Yöntemler	PZR Real-time PZR Loop mediated isothermal amplification (LAMP) DNA chip

### **4.3. *Acinetobacter baumannii* Tiplendirmesinde Moleküler Epidemiyolojik Yöntemler**

*Acinetobacter baumannii*'nin hastane ortamında yayılmasını kontrol etmek için, organizmanın potansiyel rezervuarlarını ve bulaşma yollarını tanımlamak gerekmektedir. Salgın suşunu epidemiyolojik olarak ilgisi olmayan *Acinetobacter*'lerden ayırmak için, alt türler düzeyinde izolatların karşılaştırılması gereklidir. Bu amaçla kullanılan yöntemler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri olarak tanımlanmıştır. Tiplendirme yöntemleri, epidemik suşlar için kaynakların ve aktarım metodlarının belirlenmesi için önemli araçlardır. *Acinetobacter* türlerini tiplendirmek için şimdiye kadar tek bir tiplendirme yöntemi kabul edilmemiştir (6, 34). Direk genotipleme, PZR temelli ve DNA dizi analizine dayalı yöntemler moleküler epidemiyolojik tiplendirme için kullanılmaktadır. Her yöntemin avantajı ve dezavantajı olmaktadır. Yakından ilişkili türleri ayırt etmek için en sık MLST, PFGE, 'Amplified Fragment Length Polymorphism' (AFLP) gibi etkin yöntemler kullanılmaktadır. PFGE yöntemi maliyeti fazla, zaman alıcı, ve zahmetlidir. Genellikle daha az maliyetli AFLP yöntemine ek olarak yardımcı bir yöntem olarak PFGE kullanılmaktadır. Diğer genotipleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında MLST'nin başlıca avantajı ise verilerin internet veritabanlarında paylaşılabilmesidir (12).

### 4.3.1. Direk Genotipleme

#### 4.3.1.1. Plazmid Analizi

*Acinetobacter baumannii* suşlarının epidemiyolojik tiplemesinde plazmid analizi, kullanılan tipleme yöntemleri arasındadır. Plazmid profil analizi *A. baumannii* grubu dışındaki *Acinetobacter* türlerinin epidemiyolojisini incelemek için de uygulanan birkaç yöntemden biridir. Yöntem oldukça kullanışlı olmasına rağmen, sonuçları yorumlarken birçok plazmidin kolayca aktarılabileceği ve kazanılabileceği veya kaybedilebileceği durumlar olabileceğinden; *Acinetobacter*'lerin epidemiyolojik çalışmaları için plazmid profillemenin yerine diğer moleküler yöntemlerle değiştirilmesi önerilmektedir (34).

#### 4.3.1.2. Ribotipleme

Ribotipleme öncelikle *Acinetobacter*'leri, özellikle *A. calcoaceticus-A. baumannii* kompleksini tür seviyesine tanımlamak için geliştirilmiştir. Bu yöntemde rRNA'yı kodlayan kromozomal saf DNA; *EcoRI*, *ClaI* ve *SalI* enzimleri ile kesilerek ürünlerin fragment uzunluğu analiz edilir. Bununla birlikte, ribotiplemenin ayırıcı gücü sınırlıdır ve PFGE gibi diğer yöntemlerin ayırım gücü fazla olduğundan tercih edilmemektedir (113).

#### 4.3.1.3. Değişken Alanlı Jel Elektrofrez (PFGE; Pulsed-field Gel Electrophoresis)

'Değişken Alanlı Jel Elektrofrez' yöntemi ilk kez 1983 yılında uygulamaya girmiştir. Moleküler epidemiyolojik yöntemler arasında "altın standart" olarak kabul edilmektedir. PFGE araştırma aracı olarak ve klinik tanı laboratuvarlarında rutin epidemiyolojik analizlerde yardımcı araç olarak kullanılmasıyla protokol geliştirilmesine yardımcı olmuştur (114, 115).

Bu yöntem, megabaz büyüklüğündeki bakteri kromozomunun klasik elektrofrez tekniklerinden ziyade farklı elektrofrez tank koşullarında farklı yönlerden belirli sürelerle gelen elektrik akımı yani 'pulse' ile restriksiyon endonükleazlarla kesimi ile megabaz büyüklüğündeki parçaların, bu elektriksel alanda belli açılarla büyüklüklerine göre periyodik olarak ilerlemesi ve görüntülenmesidir. DNA parçaları küçük ve büyük boyutlu olduğundan elektrofrez işlemi boyunca kısa ve/veya uzun 'switch' zamanları kullanılarak boyutlarına göre DNA parçalarının ayrımı

sağlanmaktadır. Elektroforez koşulları; sıcaklık, açı, süre, akım şiddeti, başlangıç ve bitiş vuruş süresi çalışılan bakteriye göre değişebilmektedir. PFGE tekniğinde kullanılan elektroforetik alanlar yediye ayrılmaktadır. En çok kullanılan ise 'counter-clamped homogenous electric field' (CHEF) gibi 3Mb büyüklüğünden fazla olan DNA parçalarını ayıran altıgen bir sistemdir. Elektrik alanda; elektrotlardan 120°C'lik açılarla sabit akım gelmektedir. Bunun sonucunda DNA parçaları büyüklüklerine göre bozulmadan hareket edebilirler (114-117).

Restriksiyon enzimlerinin seçimi PFGE işleminde önemli bir faktördür ve kritiktir. Seçilen enzim sonuçların kalitesini, analizini ve tekrarlanabilirliğini etkilemektedir. *A baumannii* için en yaygın olarak kullanılan kesim enzimleri *ApaI*'dir, bunu *SmaI* takip eder (117). PFGE jel görüntüleri ve sonuçları genellikle bilgisayar destekli analiz programlarında değerlendirilmektedir. En çok kullanılan yazılım programı 'Gel Compar ve BioNumerics (Applied Maths, Belgium)'dir. Bu yazılım programlarında izolatların DNA fragment büyüklükleri için 'Dice benzerlik katsayısı' baz alınarak 'dendogram' adı verilen ağaç yapıları oluşturulmaktadır. Dice benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı %1-1.5 olarak belirlenmiştir. İzolatlar %80'in üzerinde benzerlik gösterirse aynı genotip olarak;  $\geq$ %85 ise yakın ilişkili olarak, %50'nin altında ise ilişkisiz olarak değerlendirilir (118-120).

Yüksek ayırım gücünden dolayı; tiplendirme teknikleri arasında PFGE tercih edilmektedir. PFGE çalışma protokolü: laboratuvarında uzun süreli yoğun çalışma (2-4 gün) gerektirmektedir. Bununla birlikte, yöntemdeki ana boşluk laboratuvarlar arası karşılaştırması zordur. Bu karşılaştırılabilirlik eksikliği, PFGE'yi önemli ölçüde sınırlandırmakta epidemiyolojik değerlendirmelerde nozokomiyal patojenlerin epidemiyolojisi hakkında daha derin araştırmayı engelleyebilmektedir (117).

#### **4.3.2. PZR Temelli Yöntemler**

##### **4.3.2.1. Repetitive Extragenic Palindromic Element-PCR (Rep-PCR)**

Repetitive extragenic palindromic element-PCR (rep-PCR) yönteminde bakteriyel genom boyunca tekrarlayan dizilerin amplifikasyon kopyaları elde edilir. Bu tekrarlanan sekanslar arasındaki bölgeleri hedef alan primerlerin kullanıldığı PZR reaksiyonu sonucunda değişik uzunluktaki DNA fragmentleri oluşabilir. Bu tekrarlayan sekansların sayısı, farklılıkları tipe özgü profil oluşturmaktadır (120).

#### **4.3.2.2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

Geleneksel PZR analizinden farklı olarak, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), hedef organizmanın DNA dizisi hakkında herhangi bir özel bilgi gerektirmez. Rastgele seçilen primerler, tamamlayıcı olan pozisyonlara bağlı olarak bir DNA segmentini amplifiye edebilir, değişik uzunluklarda ürünler elde edilebilir. Bu, bakterilerin epidemiyolojik tiplendirilmesi için basit bir yöntemdir. PFGE ve RAPD arasındaki korelasyonu *A. baumannii* salgınlarının epidemiyolojik araştırmaları için yararlı olduğunu göstermektedir. RAPD hastanelerde epidemik *A. baumannii* suşlarının klonal yayılımını araştırmak için büyük ölçüde uygulanmıştır (117).

#### **4.3.2.3. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analizi 1990'larda kullanılmaya başlanmıştır. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra selektif amplifikasyon ile fragmanların elektroforezle ayrılması ve görüntülenmesiyle yapılan DNA fingerprint yöntemidir. Yarı otomatize prosedürlerde sekanslama platformu üzerindeki parçaların lazerle tespit edilmesiyle uygulandığından, pahalı bir yöntemdir. Ortaya çıkan karmaşık profiller sayısallaştırılır ve genellikle uygun bir yazılım ile analiz edilir.

Bakteriyel taksonomide güçlü bir araç olmasının yanı sıra, bu yüksek çözünürlüklü parmak izi yönteminin *Acinetobacter* suşlarının alt tür düzeyinde tanımlanması ve salgın araştırması için kullanıldığı bilinmektedir. AFLP analizi kullanışlı bir yöntem olmasına rağmen, patern analizine yardımcı olacak karmaşık bilgisayar programları kullanıldığında, bantlama modellerinin yorumlanmasında yüksek bir standardizasyon ve kapsamlı deneyim gerektirmektedir. Bu nedenle, bu yöntemin kullanılması referans laboratuvarlarla sınırlıdır ve rutin epidemiyolojik analizler için uygun değildir (6, 12).

#### **4.3.3. DNA Dizi Analizine Dayalı Yöntemler**

##### **4.3.3.1. Multilokus Dizi Tiplendirmesi (MLST; Multilocus sequence typing)**

Multilokus dizi tiplendirmesi (MLST; Multilocus sequence typing), geniş bir patojen spektrumu için klonalite ve popülasyon yapısını incelemek için kullanılan en başarılı ve yaygın kabul gören tiplendirme tekniklerinden biridir. Bu yöntemle;

mikroorganizmanın temel metabolik sürecinde yer alan yedi adet ‘housekeeping geni’ hedefleyerek bir popülasyonda yavaşça biriken nötr genetik varyasyon değerlendirilir. Bir MLST şemasında, yedi genin internal fragmanları sıralanır; bir genin her sekansı alel tipi olarak kabul edilir. Bir MLST şemasında bulunan her gen için alel tiplerinin kombinasyonu bir sekans tipini (ST) tanımlar. *Acinetobacter baumannii* için; iki MLST şeması geliştirilmiştir. Bunlardan ilki Bartual ve ark.’nın; housekeeping yedi genin (*gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, *rpoD*) korunmuş bölgelerinin sekans analizine dayanan yöntemdir. Günümüzde MLST<sup>B</sup> olarak adlandırılmaktadır. MLST<sup>B</sup>, PFGE ve AFLP yöntemleri arasında iyi bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Bu MLST<sup>B</sup> şeması Oxford veritabanında mevcuttur (117, 120). 2010 yılının Şubat ayında; bu veri tabanında aleller, sekans tipleri ve klonal kompleksler şema değişiklikleriyle sonuçlanan büyük modifikasyonlar yapılmıştır. İkinci şema Diancourt ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (64). Pasteur-MLST<sup>P</sup> olarak tanımlanan yöntem; housekeeping yedi genin (*cpn60*: 60-KDa chaperonin, *fusA*: elongation factor EF-G, *gltA*: citrate synthase, *pyrG*: CTP synthase, *recA*: homologous recombination factor, *rplB*: 50S ribosomal protein L2, *rpoB*: RNA polymerase subunit B) sekans dizilimine dayanır. Veri tabanı MLST Pasteur web sitesinde mevcuttur. Mevcut PubMed verilerine bakıldığında, *A. baumannii* popülasyon yapısı hakkında bir fikir edinmek ve küresel soyları sınıflandırmak için MLST<sup>P</sup> veya MLST<sup>B</sup> yöntemleriyle çok sayıda çalışmanın olduğu vurgulanmaktadır (64, 121).

Multilokus dizi tiplendirmesinin, popülasyon yapısı araştırmaları için yöntemi altın standart haline getiren birçok avantajı vardır. Avantajları; bir veritabanında saklanabilen yüksek standartlı, arşivlenebilir veri üretebilmesi; uzun vadeli küresel epidemiyolojik çalışmalarda yüksek ayırım gücüne sahip olmasıdır. Bu yüksek ayırım gücünün nedeni; hedeflenen genetik varyasyondan kaynaklanmaktadır. MLST’nin temel amacı, klonların (aynı ST’ye sahip izolatlar kümesi) ve klonal komplekslerin (yakından ilişkili ST’ne sahip izolatların kümesi) tanımlanmasıyla bir patojenin popülasyon yapısının belirlenmesidir. Mevcut popülasyon yapısı çalışmalarının sayısı çok sınırlıdır. MLST veri tabanları sürekli olarak genişlediği için MLST ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (43, 64, 76, 121).

Multilokus sekans tiplendirmesi ve ‘Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis’ (MLVA) gibi metodlar, çok sayıda bakteri türü için epidemiyolojik

mikrobiyal tiplendirme ve bakteriyel popülasyon çalışmalarında global olarak kullanılmaktadır. Yetmiş farklı mikroorganizmanın üzerinde, PubMLST, Institut Pasteur MLST Veritabanları, EcMLST ve ERI'de MLST olmak üzere farklı çevrimiçi kullanıma açık MLST veri tabanları bulunmaktadır. Bu durum; epidemiyoloji, popülasyon genetiği ve evrim bağlamında bu verileri anlamlandıracak algoritmalara olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır. PHYLOViZ programı, dizi tabanlı yöntemlerin analizi için kullanımı ücretsiz olan ve kolay bir yazılım aracı olarak günümüzde kullanılmaktadır. Kullanıcı dostu olma, platform bağımsızlığı, modülerlik, yeniden kullanılabilirlik ve verimlilik üzerine odaklanarak sürekli bir gelişim halinde olması kullanıcılara belirli ihtiyaçlara göre uyarlanmış modüller oluşturma olanağı sağlamaktadır. Epidemiyolojik veri analizi açısından esnekliği, MLST ve MLVA gibi yöntemleri değerlendirmek için uygundur. Veri analizi ve mikrobiyal yazılım verilerinin analizi için mevcut ücretsiz yazılım araçları; START, eBURST, goeBURST gibi algoritmalar dahil olmak üzere MLST analizinde kullanılmaktadır. Bu araçlar, epidemiyolojik verileri birleştirme kapasitesinden yoksundur (122-124).

Potansiyel kullanıcılar ile veri analizi ve dizi tabanlı yazılım yöntemlerinin görselleştirilmesi için mevcut araçlar arasındaki boşluğu kapatmak, epidemiyolojik ve popülasyon verilerini değerlendirmek için PHYLOViZ geliştirilmiştir. Günümüzde mevcut olan en benzer araç; eBURST yazılımıdır (<http://eburst.mlst.net>). Oluşturulan ağaçların radyal statik gösterimi ve sadece MLST verilerinin analiz edilmesi için tasarlanmış bir algoritmadır. PHYLOViZ, goeBURST uygulaması ile kullanıma açık tasarlanmıştır. Analiz edilebilecek veri tiplerinin ve analiz etmek için kullanılan algoritmaların ve ölçübirimlerinin genişletilmesine izin verir. Programın ana hedefi, birçok bilgi kaynağını birleştirmek ve görüntülemektir. Mevcut uygulamada, hem MLST'den hem de MLVA'dan ve nükleik asit sekansı verilerinden alınan alellik verilerin PHYLOViZ tarafından analizi mümkündür (124).

#### **4.3.4. *Acinetobacter baumannii* Tiplendirmesinde MALDI-TOF MS Yöntemi**

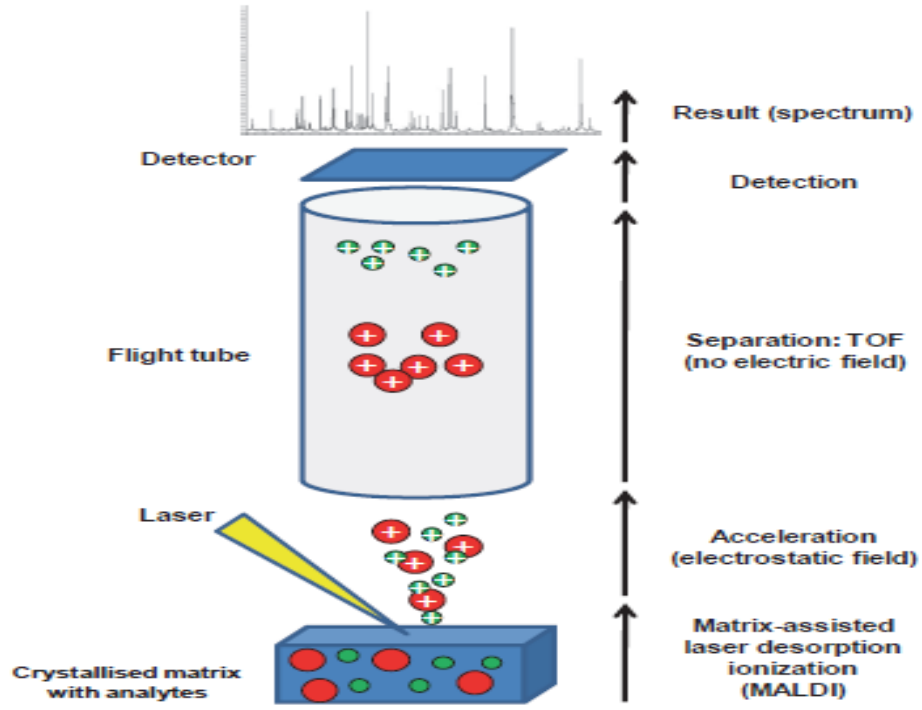
1980'lerin sonunda Tanaka ve ark.'ları tarafından geliştirilen MALDI ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) gibi tekniklerin evrimi, intakt proteinler gibi büyük biyomoleküllerin MS ile analizini mümkün kılmıştır (125). MALDI-TOF'un, hücresel ekstraksiyon ve saflaştırmayı takiben protein profilleri tanımlanabilmektedir. Ancak,

Holland ve ark.'ları 1996 yılında ilk kez, MS analizinden önce ön hazırlık aşaması olmaksızın tüm bakteri hücrelerinin MALDI-TOF spektralarının değerlendirilebileceğini bildirmiştir (126). Bu yaklaşım daha sonra cins ve tür bazında bakterileri tanımlamak için kullanılmıştır. 1990'ların sonlarından bu yana, bakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanması aynı zamanda mantar ve maya gibi mikroorganizmaların da MALDI-TOF MS ile tanımlanması mümkün olmuştur. MALDI-TOF hızlı, doğru sonuç veren ve uygun maliyetli bir mikrobik karakterizasyon ve tanımlama yöntemidir. Bu teknoloji, karakteristik kütle spektraları üretir. Her mikroorganizma için spesifiktir ve bu nedenle cins ve tür seviyelerinde doğru bir mikrobiyal tanımlama için idealdir (127).

Yöntemde mikroorganizmaların protein profilleri, cihazdaki profillerle karşılaştırılarak mevcut veritabanıyla tanımlanır. Çalışma prensibi ise; test edilecek mikroorganizmadan elde edilen saf kültürden alınan koloninin matriks materyali üzerine (target'a) yerleştirilip, lazer atışı ile iyonize edilmesidir. Biyomoleküller, çoğunlukla proteinler; her bir molekülün kütesinin "time of flight" uçuş süresine, hızına ve ayrılma süresine göre kaydedilir. Organizmanın iyonlarının kütesinin uçuş süresi sinyalleri bileşimi ile bir spektrum oluşturur. Bu da ilişkili olduğu mikroorganizmayı sistemin kütüphanesindeki verilerle karşılaştırarak tanımlar (Resim 1). Kullanımı kolay bu cihazlar aynı zamanda güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Cihazın kullanımı için tanımlanan sınırlamalar ve laboratuvar prosedürleri vardır, fakat diğer teknolojilerden farklılıkları yoktur. Mikroorganizmaların geniş bir yelpazede tanımlanması ve klinik laboratuvara entegre edilmesi bu teknolojinin kullanımını artırmaktadır (127, 128).

*Acinetobacter baumannii* izolatlarının sebep olduğu hastane salgınlarını belirlemek için çeşitli DNA tipleme yöntemleri ile kullanılmaktadır. Tiplendirme yöntemlerinden bazıları, gerçek zamanlı salgınları değerlendirebilmektedir (15, 125, 126). Son zamanlarda, MALDI-TOF MS patojenlerin hızlı epidemiyolojik tespiti için geliştirilmiştir. MALDI-TOF MS'nin, *A. baumannii* ve farklı bakteri türlerinin nozokomiyal salgınlarının kolay ve erken tespiti için tiplendirdiğini gösteren bildiri sayısı giderek artmaktadır (127-130).





**Resim 1.** MALDI-TOF MS tekniğinin görsel şeması (Croatto'dan, 127)

MALDI-TOF MS kullanılarak elde edilebilen veri analizinin doğruluğu ve hızı; çeşitli patojen organizmaların neden olduğu nozokomiyal salgınların hızlı ve hassas bir şekilde tanımlanması için potansiyel olarak yöntemi önemli bir araç haline getirmektedir. Son çalışmalarla paralel olarak, mevcut çalışmaların sonuçları şunu göstermektedir: MALDI-TOF MS, diğer mikroorganizmalar için tanımlandığı gibi, nozokomiyal *A. baumannii* salgınlarının hızlı ve optimal bir şekilde saptanması için kullanılabilir (15).

## 5. GEREÇ-YÖNTEM

### 5.1. Gereç

#### 5.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında gönderilmiş olan kan kültürlerinden izole edilmiş, 78 karbapenem orta duyarlı ve dirençli *A. baumannii* izolatu çalışmaya dahil edildi. Her hastadan ilk izole edilen *A. baumannii* izolatu çalışıldı. Çalışma grubu olarak belirlenen 78 *A. baumannii* suşundan 72 tanesi besiyerinde üretilebildi. Bakteri izolatlarına ait bilgiler Tablo 5'te gösterildi.

**Tablo 5.** İzolat kodu, izolasyon tarihi ve materyalin gönderildiği birim

İzolat Kodu*	Yatış Tarihi	İzolasyon Tarihi	Materyalin Gönderildiği Birim
AB075	19.12.2013	14.1.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB076	08.01.2014	14.01.2014	İç Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi
AB077	22.11.2013	14.01.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB078	13.01.2014	22.01.2014	Pediyatri Yoğun Bakım Servisi
AB079	25.01.2014	27.01.2014	Koroner Bakım Servisi
AB080	04.01.2014	28.01.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB081	14.01.2014	28.01.2014	Genel Cerrahi Servisi
AB082	21.01.2014	29.01.2014	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB083	27.01.2014	01.02.2014	İç Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi
AB084	28.01.2014	03.02.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB085	28.01.2014	05.02.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB086	14.02.2014	22.02.2014	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB087	11.02.2014	25.02.2014	Koroner Bakım Servisi
AB088	21.02.2014	13.03.2014	Pediyatri Yoğun Bakım Servisi
AB089	28.02.2014	14.03.2014	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB090	20.03.2014	20.03.2014	Göğüs Hastalıkları Servisi
AB091	25.03.2014	28.03.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB092	22.02.2014	04.04.2014	Kardiyovasküler
AB093	04.04.2014	18.04.2014	Koroner Bakım Servisi
AB094	03.02.2014	01.05.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB095	14.04.2014	02.05.2014	Genel Cerrahi Servisi
AB096	02.05.2014	14.05.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB097	03.06.2014	04.06.2014	Enfeksiyon Hast. Serv.
AB098	06.06.2014	18.06.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi

**Tablo 5. (Devam)**

<b>İzolot Kodu*</b>	<b>Yatış Tarihi</b>	<b>İzolasyon Tarihi</b>	<b>Materyalin Gönderildiği Birim</b>
AB099	11.06.2014	22.06.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB100	11.06.2014	03.07.2014	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB101	18.08.2014	18.08.2014	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi
AB102	15.08.2014	18.08.2014	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB103	19.08.2014	19.08.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB104	22.08.2014	28.08.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB105	27.08.2014	06.09.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB106	01.09.2014	09.09.2014	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB107	05.09.2014	15.09.2014	Kardiyoloji Servisi
AB108	11.08.2014	17.09.2014	Genel Cerrahi Servisi
AB109	02.09.2014	20.09.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB110	29.08.2014	29.09.2014	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB111	19.09.2014	02.10.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB112	26.08.2014	19.10.2014	Dahiliye - Onkoloji 2 Servisi
AB113	26.06.2014	23.10.2014	Pediyatri Yoğun Bakım Servisi
AB114	20.10.2014	30.10.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB115	25.10.2014	01.11.2014	Göğüs Cerrahisi Servisi
AB116	26.10.2014	06.11.2014	Ortopedi Servisi
AB117	29.10.2014	10.11.2014	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB118	10.11.2014	10.11.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB119	10.11.2014	24.11.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB120	24.11.2014	02.12.2014	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB121	28.11.2014	06.12.2014	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB122	23.12.2014	01.01.2015	Koroner Bakım Servisi
AB123	22.12.2014	04.01.2015	Genel Cerrahi Servisi
AB124	14.01.2015	28.01.2015	Pediyatri Yoğun Bakım Servisi
AB125	09.01.2015	02.02.2015	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB126	16.01.2015	10.02.2015	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servis
AB127	26.02.2015	28.02.2015	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB128	13.02.2015	28.02.2015	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB129	17.03.2015	17.03.2015	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım
AB130	13.03.2015	25.03.2015	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB131	20.02.2015	28.03.2015	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB132	13.03.2015	30.03.2015	Koroner Bakım Servisi
AB133	26.03.2015	02.04.2015	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB134	07.04.2015	08.04.2015	İç Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi

**Tablo 5.** (Devam)

İzolant Kodu*	Yatış Tarihi	İzolasyon Tarihi	Materyalin Gönderildiği Birim
AB135	10.04.2015	24.04.2015	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB136	13.04.2015	27.04.2015	Koroner Bakım Servisi
AB137	30.04.2015	01.05.2015	Enfeksiyon Hast. Serv.
AB138	04.05.2015	09.05.2015	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB139	15.05.2015	22.05.2015	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım
AB140	16.05.2015	26.05.2015	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
AB141	29.05.2015	06.06.2015	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB142	03.04.2015	07.06.2015	Nöroşirürji Yoğun Bakım Servisi
AB143	13.05.2015	09.06.2015	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB144	24.05.2015	20.06.2015	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
AB145	24.06.2015	05.07.2015	Koroner Bakım Servisi
AB146	23.07.2015	03.08.2015	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi

### 5.1.2. Araç ve Gereçler

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait; 37°C'lik etüv (Memmert BM 600, Almanya), pastör fırını (Nüve, Türkiye), biyogüvenlik kabini (Class II Safety Cabinet, Powtech, Türkiye), 4°C buzdolabı (Profilo), -20°C derin dondurucu (Bosch, Almanya), -80°C soğutucu (New Brunswic Scientific Mod U570 premium, Thermo, ABD), dikey model otoklav (Kermanlar, İstanbul), otomatik pipetler (20 µL, 200 µL, 1000 µL) (Gilson, ABD), çalkalayıcı su banyosu (Memmert GFL 1086, Almanya), pH metre (Hanna, Romanya), manyetik karıştırıcı (Stuart, İstanbul), vorteks (Isolab, Almanya), santrifüj (Thermo, ABD), santrifüj (Sigma, Almanya), buz makinesi (Beckman Coulter, ABD), CrystalSpec™ nefelometre (Becton Dickinson Company, ABD), hassas terazi (Kern & Sohn, GmbH, Almanya), mikrodalga fırın (Beko 1550, Türkiye), termal döngü cihazı (Techne, TC 512, ABD), elektroforez tankı (Owl, ABD), dijital güç kaynağı (EC-105), jel dökümantasyon sistemi (Bio-rad, ABD), Chef-DR III Pulsed Field Jel elektroforez sistemi (Bio-Rad, ABD), VersaDoc görüntüleme sistemi (Bio-Rad, ABD), UV illüminatör (UUP, ABD), MALDI-TOF MS (Microflex™, Bruker, Almanya), Phoenix™ 100 (Becton Dickinson diagnostic instrument systems, Sparks, Md, ABD) deiyonize su cihazı (Barnstead, İstanbul) ve distile su cihazı (GFL, Ankara) gibi cihazlar ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ait; ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer

(Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanıldı. Cam biyokimya tüpleri, 250 mL'lik erlenmayer, 50 mL'lik mezür, cam balon joje, 50 mL'lik ve 15 mL'lik falkon tüpler, kaynatma kabı, jel dökme tepsi ve tarak kullanıldı. Sarf malzeme; 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri, 0.2 mL'lik PZR tüpleri (Grainer bio-one, Almanya), pipet ucu (10 µL, 100 µL, 1000 µL) malzemeler kullanıldı.

### 5.1.3. Kimyasallar

Sodium klorür (NaCl) (Merck, Almanya), Sodium hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya), Hidroklorik asit (HCl) (Merck, Almanya), Tris HCl (Sigma, Almanya), Tris Baz (Sigma, Almanya), EDTA (Sigma, Almanya), N-lauroilsarkozin (Sigma, Almanya), Borik asit (Bio Basic INC, ABD), Ertapenem 10 µg (Bioanalyse, Türkiye), Meropenem 10 µg (Bioanalyse, Türkiye), İmipenem 10 µg (Bioanalyse, Türkiye), Trifloroasetik asit (Merck, Almanya), Asetonitril (Sigma, Almanya), Formik asit (Sigma, Almanya), a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix (Bruker, Almanya), Luria Bertani (LB) Broth (Oxoid, UK), Blood Agar (Condolab, İtalya), Mueller-Hinton Agar (SRL, Hindistan), SeaKem düşük erimeli agoraz (Lonza, ABD), Agaroz (Sigma, Almanya), Etidyum bromür (Merck, Almanya), Gliserol (Merck, Almanya), Sephadex-50G (Sigma, Almanya), ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD), 3130 and 3100-Avant Capillary Array (Thermo Fisher Scientific, ABD), 310 and 31xx Running Buffer (Thermo Fisher Scientific, ABD), 3130 POP-7 Polymer (Thermo Fisher Scientific, ABD), Proteinaz K (AppliChem, Almanya), *ApaI* enzim seti (Promega, ABD), Lambda ladder marker (Promega, ABD), NucleoSpin Gel ve PZR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Almanya), Amplifikasyon seti (Promega, ABD), dNTP seti (Promega, ABD), Primerler (Macrogen, ABD), 100 bp DNA marker (Solisbiodyne, Estonya) kullanıldı.

### 5.1.4. Besiyerleri

#### Triptik Soy Broth Besiyeri

30 g triptik soy broth, 150 mL gliserol ve 850 mL distile suda eritildi. 1 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra 1.5 mL'lik mikrosantifüj tüplerine 1 mL hacimlerde dağıtıldı. Bu besiyerinden izolatların saklanması için %15'lik gliserol içeren tüplere dağıtıldı.

## **Kanlı Agar Besiyeri**

38 g Kanlı Agar Besiyeri 1000 mL distile suda eritildi ve 1 atm basınç ve 121°C’de 15 dk otoklavlandı. 55°C’ye kadar soğutulduktan sonra kan konsantrasyonu %5 olacak şekilde besiyerine eklendi ve petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülerek donduruldu. Bu besiyeri suşları canlandırmak için kullanıldı.

### **5.1.5. Solüsyonlar**

#### **5.1.5.1. DNA İzolasyonu için Kullanılan Solüsyonlar**

##### **Tris HCl (1 M)**

Beher içerisine 80 mL distile su eklenerek üzerine 15.7 g Tris HCl konuldu. Solüsyon homojen olduğunda pH metre ile pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim mezür aracılığı ile 100 mL’ye tamamlandı. Kapaklı cam şişe içerisine konulup, otoklavlanarak steril edildi.

##### **EDTA (0.5 M)**

Beher içerisine 29.2 g EDTA (MW:292.2) distile su ile 200 mL’ye tamamlandı. Solüsyon homojen olduğunda pH metre ile pH 8.0 olana kadar NaOH pelleti ilave edildi. Kapaklı cam şişe içerisine konulup, otoklavda steril edildi.

##### **Tris-EDTA (TE) Tamponu**

Beher içerisine son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1 mL, EDTA (0.5 M) stok solüsyonundan 200 µL alınarak 98.8 mL steril distile su eklendi.

#### **5.1.5.2. Master Mix için Kullanılan Solüsyonlar**

##### **dNTP Mix**

1.5 mL’lik santrifüj tüplerine 100 mM’lık dTTP, dATP, dGTP, dCTP’in her birinden 40 µL koyuldu ve her birinin üzerine 680 µL steril distile su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa bir süre vortekslendi. Böylece 5.0 mM konsantrasyonunda dNTP karışımı elde edildi. Hazırlanan karışım 200 µL olarak yeni, steril, mikrosantrifüj tüplerine bölünerek kullanılmaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

## **Primer Mix**

Liyofilize haldeki primerler stok konsantrasyonu 100 pmol/ $\mu$ L olacak şekilde steril distile suyla sulandırılarak stok çözeltiler elde edildi. Her bir primer çifti için, 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine stok çözeltilerden her biri için 20  $\mu$ L koyuldu ve üzerine 360  $\mu$ L steril distile su eklenerek son konsantrasyonu 5 pmol/ $\mu$ L olan primer mix hazırlandı. Kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### **5.1.5.3. Agaroz jel Elektroforezi için Kullanılan Solüsyonlar**

#### **5X TBE Tamponu**

Beher içerisine 54 g Tris Base, 27.5 g Boric Acid, 3.72 g EDTA yaklaşık 700 mL distile su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözülüp berraklaştıktan sonra hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve pH metre ile pH 8.3'e ayarlandı.

#### **Yükleme Tamponu**

Beher içerisinde 30 mL gliserol, 250 mg bromfenol mavisi, 250 mg ksilen siyanol distile su içinde karıştırıldı ve hacim 100 mL'ye tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine 1 mL olarak dağıtıldı ve kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

#### **Etidyum Bromür**

50 mg Etidyum bromür (EtBr) 10 mL distile su ile son konsantrasyonu 5 mg/mL olmak üzere manyetik çalkalayıcı üzerinde karıştırılarak homojen olarak çözünmesi sağlandı. Koyu renkli cam şişeye konuldu. Oda ısısında muhafaza edildi.

### **5.1.5.4. PFGE için Kullanılan Solüsyonlar**

#### **1 M Tris (FW:121.14) (pH:8)**

Tris'den (MW: 121.14) 12.1 g tartılarak üzerine yaklaşık 80 mL distile su konulduktan sonra HCl ilave edilerek pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim mezür aracılığı ile 100 mL'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

#### **%10 Sarkozil**

Sarkozilden 1 g tartılarak 10 mL DiethylenePyrocarbonate-H<sub>2</sub>O (DEPC-H<sub>2</sub>O) 90 mL distile su ile tamamlandı.

### **Hücre Süspansiyon Tamponu (HST) (pH:8)**

Son konsantrasyonları 100 mM Tris ve 100 mM EDTA olacak şekilde HST tamponu hazırlandı. Bunun için Tris (1 M) stok solüsyonundan 10 mL ve EDTA (0.5 M) stok solüsyonundan 20 mL hacminde alınıp 70 mL steril distile su üzerine eklenerek tampon hazırlandı.

### **TE Tamponu (pH:8)**

Son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde TE tamponu hazırlandı. Bunun için Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1 mL ve EDTA (0.5 M) stok solüsyonundan 200 µL hacminde alınıp 98.8 mL steril distile su üzerine eklenerek tampon hazırlandı. Vortekslenerek karıştırıldı.

### **Hücre Lizis Solüsyonu (HLS)**

Son konsantrasyonları %1 wt/vol N-lauryl sarcosine, 50 mM Tris HCl, 50 mM EDTA (pH:9.5) ve 500 µg/mL Proteinaz K olacak şekilde hücre lizis tamponu hazırlandı.

### **Proteinaz K Hazırlama Tamponu**

Kalsiyum klorürden 0.29 g tartılarak üzerine 50 mL gliserol ve 1 mL 1 M Tris HCl (pH:8) koyuldu. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

### **Proteinaz K (10mg/mL)**

Proteinaz K'dan 100 mg tartıldı ve 10 mL hazırlama tamponu içine koyuldu. Kristaller çözünene kadar alt üst edilerek karıştırıldı. Küçük hacimlere bölünerek kullanıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### **Restriksiyon Tamponu**

Bir örnek için, 10 µL *ApaI* tamponu (10x) ve 180 µL deiyonize su mikrosantrifüj tüpüne koyuldu ve vortekslenerek karıştırıldı.

### **Restriksiyon Endonükleaz Enzim Karışımı**

Bir örnek için, 10 µL *ApaI* tamponu (10x), 2 µL Bovin Serum Albumin (BSA) (100x), 2 µL *ApaI* enzimi ve 176 µL deiyonize su mikrosantrifüj tüpüne kondu ve vorteksleyerek karıştırıldı.



## 5.2. Yöntem

### 5.2.1. İzolatların İdentifikasyonu, Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Stok Koşulları

Retrospektif olarak çalışmaya dahil edilen tüm izolatların identifikasyon aşamaları sırasıyla; %5 koyun kanlı agar ve EMB agara ekilerek inkübe edildi. Üreyen mikroorganizmalar klasik yöntemlere ilaveten identification/antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) otomotize mikrobiyoloji sistemi ile tür düzeyinde tanımlandı. İzolatlar ID/AST otomotize mikrobiyoloji sisteminde üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. *A. baumannii* olarak tiplendirilen izolatların antibiyotik duyarlılıkları NMIC/ID-55 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix sistemi kullanılarak yapıldı. Duyarlılık testlerinin sonuçları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (131). Suşlar, DNA izolasyonu yapılmaya kadar %15 gliserol içeren triptik soy buyyon besiyerinde -80°C’de saklandı.

### 5.2.2. DNA İzolasyonu

*Acinetobacter baumannii* izolatlarının DNA izolasyonu, kaynatma metodu ile hücre duvarı ve membranı parçalanarak gerçekleştirildi. Tür düzeyinde tanımlanan ve -80°C’de saklanan bakteri izolatları %5 koyun kanlı agar besiyerine ekildi. Aerobik koşullarda 35±2°C’de 20-24 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden 3 mL LB sıvı besiyerine pasaj yapıldı. Çalkalayıcı su banyosunda 37°C’de 200 rpm’de bir gece inkübe edildi. Kültürün 1.5 mL’si steril eppendorf (1.5 mL) tüplere transfer edildi ve 5000 rpm’de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı ve peletin üzerine 1 mL TE tamponu eklenerek vortekslendi. Santrifüj işlemi 5000 rpm’de 5 dk tekrar edilerek çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant kısmı atılarak peletin üzerine 1 mL saf su eklenerek vortekslendi. Santrifüj işlemi aynı şartlarda bir kez daha tekrar edilip süpernatant kısmı döküldü ve peletin üzerine 500 µL saf su eklendi. Oluşan bakteri süspansiyonu 95°C’de 10 dk kaynatıldı. İşlemin ardından bakteri süspansiyonu 13000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 400 µL alınıp steril 1.5 mL’lik PZR tüplerine koyuldu (132). Çalışma için kullanılmaya kadar, izole edilen DNA -20°C’de muhafaza edildi.

### 5.2.3. Master Mix Hazırlanması

'Master mix' hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 6'de verildi. 'Master mix' hazırlarken bütün aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Buz üzerine steril 1.5 mL santrifüj tüpü yerleştirildi. Tablo 6'da gösterilen kimyasallar -20°C dondurucudan çıkartıldı. Taq polimeraz işlem sırası geldiğinde çıkartıldı. Çözünen kimyasallar 5-10 sn vortekslendikten sonra Tablo 6'de belirtilen sıraya göre pipet aracılığı ile karıştırıldı. Taq polimeraz kullanılmadan önce kısa bir santrifüj edildi. Yukarı aşağı pipetleyerek tüpe aktarıldı. Steril deiyonize su koyulduktan sonra tüp 30 sn vortekslenerek 'master mix' karıştırıldı. Bu işlemler sonunda 'master mix' hazırlanmış oldu. Hazırlanan 'master mix' 0.2 mL'lik PZR tüplerine 45 µL olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı ve numaralarına göre izole edilen DNA her bir tüpe 5'er µL pipet ile aktarıldı. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak OXA-23, OXA-51, OXA-58 geni bulundurduğu bilinen *A. baumannii* izolatından izole edilen DNA 5 µL eklendi. Bu şekilde hazırlanan tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi.

**Tablo 6.** PZR için master mix bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Stok Konsantrasyonu	Miktar (µL) (1x)
Buffer	5X	10
dNTP mix	2.5 mM	1
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5
Primer 1	5 pmol	1.5
Primer 2	5 pmol	1.5
Taq polimeraz	5 U/µl	0.3
ddw		25.7
Template		5
Toplam reaksiyon hacmi		50

### 5.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

#### 5.2.4.1. OXA Varlığını Araştırmak için Kullanılan Primerler

OXA enzimi kodlayan gen bölgelerini amplifiye etmek için; *bla*<sub>OXA-23-like</sub> geni için bir, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> geni için bir, *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni için bir, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> geni için bir

primer seti kullanıldı. İzole edilen ve -20°C’de muhafaza edilen kromozomal DNA, PZR için kalıp olarak kullanıldı. Her test iki defa tekrarlandı. Çalışılan primer setlerinin dizileri Tablo 7’de verildi.

**Tablo 7.** OXA direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primerler

Primer	Sekans (5’-3’)	Ürün uzunluğu (bp*)	Referans
OXA 23-like F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	133
OXA 23-like R	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
OXA 24-like F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246	133
OXA 24-like R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
OXA 51-like F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	133
OXA 51-like R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
OXA 58-like F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	133
OXA 58-like R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		

\*bp: Baz çifti

#### 5.2.4.2. *bla*<sub>OXA23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> Genlerinin Amplifikasyonu

*bla*<sub>OXA23-like</sub>, *bla*<sub>OXA 24-like</sub>, *bla*<sub>OXA 51-like</sub>, *bla*<sub>OXA 58-like</sub> genlerinin varlığını PZR ile göstermek için bu genlere ait sırayla 501 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-23-like-F ve OXA-23-like-R primerleri, 246 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-24-like-F ve OXA-24-like-R primerleri, 353 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-51like-F ve OXA-51-like-R primerleri, 599 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-58-like-F ve OXA-58-like-R primerleri kullanıldı (Tablo 7). DNA izolasyonu yapılan toplam 72 örnek *bla*<sub>OXA 23-like</sub>, *bla*<sub>OXA 24-like</sub>, *bla*<sub>OXA 51-like</sub>, *bla*<sub>OXA 58-like</sub> genleri varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan ‘master mix’ karışımı daha önce Tablo 6’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Karışım içeren tüpler termal döngü cihazına konularak 94°C’de 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 94°C’de 25 saniye denatürasyon, 53°C’de 40 saniye primer birleşmesi, 72°C’de 50 saniye uzama işlemlerinden oluşan 30 döngü olarak uygulandı. Son olarak 72°C’de 6 dakika uzama süresi eklendi (133).

### 5.2.4.3. Agaroz Jel Elektrofrez ve Görüntüleme

#### Jelin hazırlanması

1 gr agaroz 50 ml TBE tamponu ile karıştırılıp mikrodalga fırında agaroz partikülleri tamamen eriyinceye kadar ısıtıldı. İçinde erimiş agaroz bulunan erlen, 55°C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk bekletildikten sonra içine son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Elektrofrez için %2'lik agaroz jel hazırlandı.

#### Yükleme

Geniş kuyucuk oluşturan tarak, düz bir zemindeki tepsi üzerine oturtuldu. Jel tepsiye döküldükten sonra katılaşması için oda ısısında bırakıldı. Katılaşan agarozdan tarak çıkarıldıktan sonra tepsi ile birlikte yatay elektrofrez tankının içine yerleştirildi ve üzerini kapatacak şekilde TBE tamponu döküldü. PZR ürününü kuyucuklara pipetleyebilmek ve yürüyen ürünün konumunu belirlemek için yükleme tamponu kullanıldı. 10 µl PZR ürünü 3 µl yükleme tamponuna karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı. Örnekler ilk 10 dk 80 volta yürütüldükten sonra 100 volta çıkarılıp 30 dk daha yürütüldü. Oluşan bantlar UV transilluminatörde gözlemlendi. Jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekildi.

### 5.2.4.4. *bla*<sub>OXA23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> Genlerinin DNA Dizi Analizi

Çalışmamızda amplifikasyon reaksiyonu sonucunda OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 genleri için kullanılan primerler ile istenilen büyüklükte ürün veren bir *A. baumannii* izolatının DNA dizi analizi KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Applied Biosystems 3130 DNA dizi analizi cihazında gerçekleştirildi. Dizi analizinden önce üretici firmanın protokolü doğrultusunda NucleoSpin® Extract II Kiti (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Almanya) ile PZR ürünleri temizlendi. Temizlenen ürünler daha önce yöntemde (Bkz. 5.2.4.3) bahsedildiği gibi agaroz jelde yürütüldü.

**Tablo 8.** DNA dizi reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Stok konsantrasyonu	1X Miktar (µL)
Big dye rxs Karışımı	2.5X	1
Sekans Buffer'ı	5X	1.5
Primer F	10 pmol/µL	0.5
ddw		Değişken
Kalıp DNA		Değişken
Toplam hacim		10

Örnekler ABI Prism Big Dye™ Terminatör Reaksiyon Kiti ile döngü sekansı için Tablo 8'de belirtilen miktarlarda hazırlandı. Temizlenen PZR ürünleri bant profillerine göre belirlenen miktarlarda kalıp DNA olarak reaksiyona eklendi ve termal döngü cihazına yerleştirildi. 94°C'de 1 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 96°C'de 15 saniye denatürasyon, 50°C'de 40 saniye primer birleşmesi, 60°C'de 50 saniye uzama işlemlerinden oluşan 25 döngü uygulandı.

#### 5.2.4.4.1 Sefadeks Kolon Hazırlanması ve Örneklerin Kolondan Geçirilmesi

Sekans reaksiyonundan sonra, floresan ile işaretli ddNTP'leri ortamdan yok etmek için Sefadeks kullanıldı. 1 g sefadeks-G50 ve 15 mL enjeksiyonluk su 50 mL'lik falkon tüp içine koyuldu. Sefadeks homojen olana kadar tüp karıştırıldı. Kullanmadan önce tüp en az 30 dk 4°C'de bekletildi. Filtreli kolonların her birine 600 µL sefadeks koyuldu ve tüpler 850 g'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonlar alınıp yatık yüzü dikkate alınarak temiz bir ependorf tüpe yerleştirildi. Sekans reaksiyonundan alınan örnekler sefadeks kolonun tam orta kısmına kolonu zedelemeyen pipetle bırakıldı. Tüpler 850 g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra kolondan geçirilen örnekler Genetik Analizör cihazına yerleştirildi.

Sekans reaksiyonu sonuçlarını değerlendirmek için kromotogram dosyaları ile alınan sonuçlar ChromasPro programı ile diziler çıkartıldı, gelen dizilerin DNA dizi veritabanları ile BLAST yazılımında karşılaştırmaları yapıldı.

## 5.2.5. PFGE Yöntemi

### 5.2.5.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Tür düzeyinde tanımlanan, -80°C’de saklanan *A. baumannii* izolatları %5 koyun kanlı agar besiyerine ekildi. Aerobik koşullarda 35°C’de 20-24 saat inkübe edildi. Saf bir kültür elde etmek için tekrar %5 koyun kanlı agar besiyerine tek koloni pasajı yapıldı ve uygun koşullarda inkübe edildi (134).

Cam tüplere 3 mL HST tamponu dağıtıldı. Üreyen saf koloniler öze kullanılarak HST tamponu ile süspansiyon edildi. Bakteri yoğunluğu CrystalSpec™ nefelometre cihazı kullanılarak yaklaşık 4 McFarland olacak şekilde ayarlandı. HST süspansiyonu 2500 rpm’de 4°C’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döktüldükten sonra peletin üzerine tekrar 3 mL soğuk HST tamponu eklendi. Kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, tekrar yaklaşık 4 McFarland olacak şekilde ayarlandı (115).

### 5.2.5.2. Bakterinin Agaroz Gömülmesi

Erlen mayer içerisinde 23.5 mL TE tamponuyla 1 g düşük erime ısıları agarozun çözülmesi sağlandı. Hacmi %2 (wt/vol) yoğunlukta düşük erime ısıları agaroz, %20 SDS solüsyonundan 1.5 mL eklenerek 45-50 °C’lik su banyosunda soğumaya bırakıldı. Her bir izolat için 1.5 mL’lik santrifüj tüpüne sırasıyla 25 µL Proteinaz K (10 mg/mL), 250 mL bakteri süspansiyonu ve 250 mL düşük erime ısıları agaroz (%20 SDS içeren) eklendi. Altı yedi kez pipetle alt-üst yapılarak bakteri süspansiyonu, agaroz ve Proteinaz K’nin homojen olarak karışması sağlandı. Elde edilen ‘bakteri agaroz’ karışımı önceden 4°C’de soğutulmuş olan agaroz kalıbının kuyucuklarına pipet aracılığıyla koyuldu. Kalıplar önce oda ısısında 5 dakika, sonra 4°C’de 5 dk bekletilerek agarozun donması sağlandı (115, 134).

### 5.2.5.3. Bakteriyel DNA’nın İzolasyonu

Hücre lizis tamponu için son konsantrasyonları; N-lauryl sarcosine için %1 (wt/vol), EDTA (pH:8) için 0.5 M ve Proteinaz K için 500 µg/µL olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnek için hazırlanan lizis tampon, 5 mL olarak 10 mL’lik falkon tüplere çalışılacak örnek sayısı kadar dağıtıldı. Donmuş olan agaroz parçaları, kalıptan çıkarılarak içinde hücre lizis tamponu bulunan tüplere koyuldu. İki saat süreyle 56°C’de inkübe edildi (134).

İnkübasyon süresi bitiminde tüpler buz içerisinde yaklaşık 15 dakika bekletildi ve agarozların yeniden katılması sağlandı. Lizis solüsyonu, agaroz kalıplara zarar vermeden tüp içerisinden aspire edildi. Üzerine 10 mL 50°C'ye ısıtılmış steril saf su eklendi ve 50°C'de çalkalamalı su banyosunda 15 dk inkübe ederek yıkandı. Bu işlem toplamda üç kez distile su ve üç kez TE tamponu ile tekrarlandı (115, 134).

#### **5.2.5.4. DNA'nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi**

Agaroz kalıbı bistüri kullanılarak dört eşit parçaya kesildi ve parçalardan biri 1.5 mL'lik santirüfuj tüpüne koyuldu. Kalan parçalar TE içerisinde tekrar kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı. Her bir örnek için 200 mL *Apal* tamponu eklendi. Çalkalamalı su banyosunda 30°C'de 10 dakika inkübasyonun ardından tampon pipet yardımıyla aspire edildi. Sonrasında üzerine her bir izolat için 200 µL *Apal* enzim karışımı koyuldu. Çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İçinde agaroz bulunan bu tüpler 4°C'de 15 dakika bekletildi (134).

#### **5.2.5.5. Elektroforez Jelinin Hazırlanması**

100 mL 0.5X TBE tamponuyla 1 g pulsed-field certified agarose plus'ın çözülmesi ile %1 (wt/vol) yoğunlukta elektroforez jeli hazırlandı. Hazırlanmış olan agaroz, soğuması için 45-50°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda bekletildi. Elektroforez için hazırlanan agarozun döküleceği kaset eğimi su terazisi ile kontrol edilmiş bir zemine yerleştirildi. Elektroforez tarağının (15 dişli) dişlerinin her birinin uç kısmına enzimle kesim aşaması tamamlanmış agarozlar ve marker yerleştirildi. Agorozlar ve tarak dişleri üzerinde kalan sıvı kurutma kâğıdı kullanılarak uzaklaştırıldıktan sonra 5 dakika oda ısısında agarozun tarağa yapışması için bekletildi. Elektroforez tarağı elektroforez jelinin döküleceği kasete yerleştirildi. Elektroforez için 45-50°C'ye soğutulmuş olan %1'lik agaroz, hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kasete döküldü. Agarozun, oda ısısında 20-30 dakika bekletilerek katılmasından sonra, tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel altındaki tabla ile kasetten çıkarılıp içerisinde 1900-2000 mL 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi (134, 135).

#### **5.2.5.6. PFGE Elektroforez Koşulları**

CHEF-DR III sistemi kullanılarak gerçekleştirilen elektroforez işleminin koşulları; başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 20 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14°C ve toplam süre 20 saat olacak şekilde ayarlandı (115, 135).

#### **5.2.5.7. PFGE Sonuçlarının Gözlenmesi ve Analizi**

Elektroforez işlemi tamamlandığında jel boyama aşamasına geçildi. 400 mL ultra saf suya 10 mg/mL'lik etidyum bromür solüsyonu eklenerek, jel bu solüsyon içinde 30 dk boyandı. Sonrasında ise boya artıklarından jelin arınması için 45 dk 400 mL ultra saf su içerisinde bekletildi (135). VersaDoc™ görüntüleme sistemi kullanılarak DNA bantları görüntüledi ve fotoğrafı çekildi. Jel görüntülerinin TIFF formatı; dendogram analizi için 'GelCompar II version (version 6.6.11; Applied Maths, Belgium)' yazılım programı ile değerlendirildi. Her jel görüntüsünde üç adet standart marker (1., 8. ve 15. kuyucuklarda) yardımı ile görüntüler arası normalizasyon yapıldı. Her jelde; EU I, EU II ve EU III (RUH 875, RUH 134, LUH 5875) markerdan sonra kuyucuklarda çalışıldı. 'Unweighted pair group method with mathematical averaging' (UPGMA) metodu ve Dice benzerlik katsayısı kullanılarak PFGE profillerinin dendrogram analizi yapıldı. Değerlendirmede tolerans %1-1.5 olarak alındı. Tenover ve ark.'larının uyguladığı değerlendirme kriterleri esas alındı (41).

#### **5.2.6. MLST Yöntemi**

##### **5.2.6.1. MLST için DNA İzolasyonu**

Tür düzeyinde tanımlanan ve -80°C'de saklanan bakteri izolatları %5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye) besiyerine inokule edildi. Aerobik koşullarda 35±2°C'de 20-24 saat inkübe edildi. Saf kültür plaklarından 1 µL'lik öze yardımıyla alınan koloniler 200 µL'lik steril saf su içerisinde homojenize edildi. Bakteri süspansiyonu 96°C'de 10 dk kaynatıldı. Kaynatma işleminin ardından bakteri süspansiyonu 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant 1.5 mL'lik toplama tüplerine aktarıldı. İzole edilen DNA, çalışma için kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi (136).



### 5.2.6.2. MLST için Kullanılan Primerler

MLST yedi gen bölgesi için amplifikasyon ve sekans reaksiyonlarında kullanılan primerler Tablo 9’de listelendi (136). İzole edilen -20°C’de muhafaza edilen kromozomal DNA, PZR için kalıp DNA olarak kullanıldı. Her test iki defa tekrarlandı.

**Tablo 9.** MLST için kullanılan primerler

Primer	Sekans (5’-3’)	Ürün uzunluğu (bp*)
<i>cpn60</i> F	ACTGTA CT T GCTCAAGC	405 bp
<i>cpn60</i> R	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	
<i>fusA</i> F	ATCGGTATTTCTGCKCACATY GAT	633 bp
<i>fusA</i> R	CCAACATA CKYTGWACACCTTTGTT	
<i>gltA</i> F	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	483 bp
<i>gltA</i> R	GCAGAGATA CCAGCAGAGATACACG	
<i>pyrG</i> F	GGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG	297 bp
<i>pyrG</i> R	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA	
<i>recA</i> F	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	372 bp
<i>recA</i> R	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	
<i>rplB</i> F	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC	330 bp
<i>rplB</i> R	CACCACCAC CRTGYGGGTGATC	
<i>rpoB</i> F	GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA	456 bp
<i>rpoB</i> R	GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC	

### 5.2.6.3. MLST için Master Mix Hazırlanması

‘Master mix’ için kullanılan bileşenler ve miktarları üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır (Tablo 10). Master mix hazırlarken bütün aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Buz üzerine steril 1.5 mL santrifüj tüpü yerleştirildi. Tablo 9’da gösterilen kimyasallar -20°C dondurucudan çıkartılırken Taq polimeraz işlem sırası geldiğinde çıkartıldı. Çözünen kimyasallar 5-10 sn vortekslelendikten sonra Tablo 10’da belirtilen sıraya göre pipet aracılığı ile karıştırıldı. Taq polimeraz kullanılmadan önce kısa bir santrifüj edildi ve yukarı aşağı pipetleyerek tüpe aktarıldı. Steril deiyonize su konulduktan sonra tüp 30 sn vortekslenerek master mix karıştırıldı. Bu işlemler sonunda master mix hazırlanmış oldu. Hazırlanan master mix 0.2 mL’lik PZR tüplerine 48 µL olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı ve numaralarına

göre izole edilen DNA her bir tüpe ikişer  $\mu\text{L}$  pipet ile aktarıldı. Bu şekilde hazırlanan tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi.

**Tablo 10.** MLST PZR için master mix bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Stok Konsantrasyonu	Miktar ( $\mu\text{L}$ ) 1x
Buffer	10X	5
dNTP mix	1.25 mM	4
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3
Primer 1	10 $\mu\text{M}$	1
Primer 2	10 $\mu\text{M}$	1
Taq polimeraz	5 U/ $\mu\text{L}$	0.17
ddw		34
Template		2
Toplam reaksiyon hacmi		50

#### 5.2.6.4. MLST Genlerinin Amplifikasyonu

Sekans öncesi amplifikasyon için Tablo 9’da belirtilen ürün uzunluğu belirtilen fragmenti hedef alan *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rpIB*, *rpoB* yedi primer kullanıldı. DNA izolasyonu yapılan toplam 72 örnek, belirtilen yedi genin varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan master mix karışımı daha önce Tablo 10’da anlatıldığı gibi hazırlandı. Karışım içeren tüpler otomatik termal döngü cihazına konularak 94°C’de 2 dakika denatürasyon sonrası, her döngü; 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 50°C’de 30 saniye primer birleşmesi, 72°C’de 30 saniye uzama işlemlerinden oluşan 35 döngü uygulandı. Son olarak 72°C’de 5 dakika uzama süresi eklendi (136). Elde edilen PZR ürünleri daha önce yöntemde (Bkz. 5.2.4.3) bahsedildiği gibi agaroz jelde yürütüldü.

#### 5.2.6.5. MLST Genlerinin Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizleri

Sekans analiz işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Genetik Analizör (Applied Biosystems, ABD) 3130 DNA dizi analizi cihazında gerçekleştirildi. Dizi analizinden önce üretici firmanın protokolleri doğrultusunda NucleoSpin® Extract II Kiti (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Almanya) ile PZR ürünleri temizlendi. Temizlenen ürünler daha önce yöntemde (Bkz. 5.2.4.3) bahsedildiği

gibi agaroz jelde yürütüldü. Örnekler ABI Prism Big Dye™ Terminatör Reaksiyon Kiti ile döngü sekansı için hazırlandı. Bu amaçla Tablo 8’de verilen bileşenler örnek sayısı belirlendikten sonra gerekli hacimlerde hazırlandı. PZR tüplerine bölündü. Temizlenmiş PZR ürünleri jelde marker ile yürütüldükten sonra reaksiyona koyulacak miktarı belirlendi. Reaksiyonun cihaz koşulları; 94°C’de 2 dk denatürasyon sonrası, her döngü; 96°C’de 15 sn denatürasyon, 50°C’de 15 sn primer birleşmesi, 60°C’de 2 dk uzama işlemlerinden oluşan 28 döngü olarak uygulandı (136). Sekans reaksiyonundan sonra, floresan ile işaretli ddNTP’leri ortamdan yok etmek için daha önce yöntemde bahsedilen (Bkz. 5.2.4.4.1) Sephadex kullanıldı. Temizlenmiş sekans ürünü dizi analizi cihazına yerleştirildi.

Sekans sonuçları; kromotogram dosya formatında alınan sonuçlar ChromasPro programı ile dizilerin fasta formatı çıkartıldı. Gelen dizilerin PubMed’in (137) belirtilen adresinde sekans eşleşmeleri ve ST’lerinin değerlendirilmesi yapıldı. ST’lerin popülasyon yapısı PHYLOVIZ goeBURST yazılımı kullanılarak değerlendirildi (138).

## **5.2.7. MALDI-TOF MS Yöntemi**

### **5.2.7.1. Bakteriyel Ekstraktların Hazırlanması**

İzolatların kanlı agarda 37°C’de 24 sa inkübasyondan sonra elde edilen koloniler çalışmaya alındı. Kültür plaklarından 1 µL’lik öze yardımıyla alınan koloniler 300 µL’lik steril saf su ve 900 µL etanol içerisinde homojenize edildi. Bu işlemin ardından bakteri süspansiyonu 12000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelet 50 µL %70 Formik asit, 50 µL Asetonitril ile yeniden süspanse edildi. Bu işlemin ardından bakteri süspansiyonu 12000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar 1.5 mL’lik toplama tüplerine aktarıldı. İzole edilen ekstraktlar, çalışma için kullanılincaya kadar -20°C’de muhafaza edildi (139). Her izolatın ekstraksiyonu 1 µL ‘polish target’ olarak adlandırılan metal plak üzerine konuldu ve kurumaya beklendi. Kuruyan örneklerin üzerine 1 µL matriks solüsyonu eklenerek tekrar kurumaya bırakıldı. Target cihaza yerleştirildi.

### **5.2.7.2. Bakteriyel Ekstraktların MALDI-TOF MS ile Analizi**

*Acinetobacter baumannii* türlerinin dendogram analizi için hazırlanan bakteriyel ekstraktların ilk aşamada cihazda tanımlanması yapıldı. Ölçümler MALDI-TOF (Bruker Daltonics) cihazında gerçekleştirildi. Voltaj ayarları: sayısallaştırıcı 1000V, detektör

lineer voltaj sapması 2500V ve 1400V reflektör; spektrometre iyon kaynağı 1: 19.98kV, kaynak 2: 18.08kV ve 8kV lens protokolü uygulandı. Spektrumlar 2 ile 20 kDa aralığında kaydedildi. Her bakteriyel ekstrakt için; ölçülen spektrumlar, Flex Control yazılımı kullanılarak kaydedildi. Standart koşullarda MALDI Biotyper 3 yazılımı (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak kütle spektrum kütüphanesi ile karşılaştırılarak teyit edildi. Tanımlamanın doğruluğu belirlenirken; piklerin en uygun referans spektrumunun logaritmik skor değer tablosu esas alındı. Üretici firmanın önerilerine göre: bir log skoru >2.3 ise yüksek olasılıklı tür tanımlamaları; 2.0 ve 2.3 arasında bir skor değeri, güvenli cins tanımlaması ve muhtemel tür tanımlaması; 1.7 ve 2.0 arasında bir skor değeri, olası cins kimliği; ve <1,7 puan değeri güvenilir olmayan bir tanımlama olarak kabul edildi. Principal Component Analysis (PCA) dendogram analizleri; hiyerarşik mesafe analizi, öklid mesafe ölçüm algoritmaları kullanılarak oluşturuldu (139, 140).

#### **5.2.8. PFGE, MLST ve MALDI-TOF MS Yöntemlerinin İstatiksel Analizi**

Yöntemlerin ayırıcı özelliklerini kıyaslanmasında ‘Simpson’s Index of Diversity’ (SID) metodu kullanıldı. ‘Wallace katsayısı’ ile yöntemlerin benzerlikleri belirlendi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Araştırmaya Dahil Edilen İzolatların Genel Özellikleri

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında gönderilmiş olan kan kültürlerinden izole edilmiş, 78 karbapenem orta duyarlı ve dirençli *A. baumannii* izolatı stoklardan bulundu. Çalışma grubu olarak belirlenen 78 *A. baumannii* suşundan 72 tanesi besiyerinde üretilibildi. Her bir hastadan, ilk izole edilen olmak kaydıyla 72 *A. baumannii* izolatı çalışmaya dahil edildi. Bu izolatların gönderildikleri birimlere göre dağılımı Tablo 11’de gösterildi.

**Tablo 11.** *A. baumannii* izolatlarının kliniklere göre dağılımı

Birim		Birim	
YBÜ	Hasta Sayısı (n)	Servisler	Hasta Sayısı (n)
Anestezi YBÜ	17	Genel Cerrahi	4
Nöroloji YB	14	Enfeksiyon Hastalıkları	2
Nöroşirürji YBÜ	12	Dahiliye - Onkoloji 2	1
Koroner YBÜ	7	Göğüs Cerrahisi	1
Pediyatri YBÜ	4	Göğüs Hastalıkları	1
Göğüs Hastalıkları YBÜ	3	Kardiyoloji	1
İç Hastalıkları YBÜ	3	Kardiyovasküler	1
		Ortopedi	1
<b>Toplam (n)</b>	<b>60</b>	<b>Toplam (n)</b>	<b>12</b>
(%)	<b>83.3</b>	(%)	<b>16.7</b>

\*YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

### 6.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

Klinik kan örneklerinden izole edilen *A. buamannii* izolatlarının 12 antibiyotik için duyarlılık testleri çalışıldı. Çalışmaya dahil edilen karbapenem orta duyarlı ve dirençli izolatların kodları ve antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 12’de verildi.

**Tablo 12.** *A. baumannii* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

İzolasyon kodu	AK	SAM	FEP	CAZ	CRO	CIP	GM	IPM	LVX	MEM	TZP	SXT
AB075	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB076	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB077	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB078	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB079	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB080	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB081	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB082	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB083	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB084	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB085	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB086	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB087	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB088	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB089	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB090	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	R	R
AB091	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB092	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB093	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB094	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB095	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB096	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB097	S	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB098	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB099	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB100	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB101	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB102	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB103	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB104	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB105	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB106	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB107	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB108	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
AB109	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB110	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB111	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB112	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB113	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

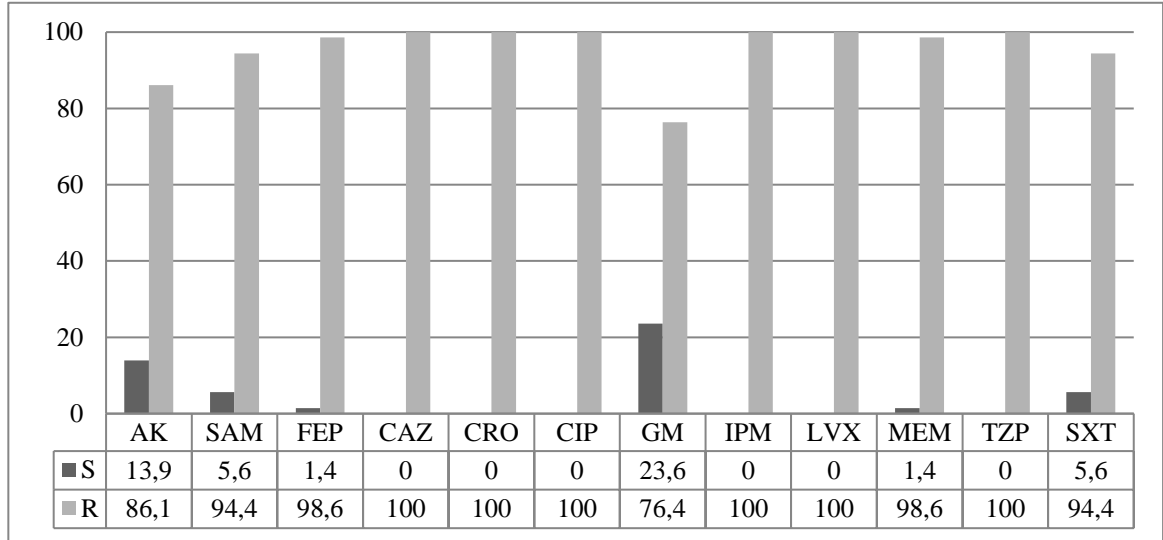
**Tablo 12.** (Devam)

İzolasyon kodu	AK	SAM	FEP	CAZ	CRO	CIP	GM	IPM	LVX	MEM	TZP	SXT
AB114	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB115	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB116	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB117	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB118	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB119	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB120	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB121	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB122	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB123	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB124	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB125	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB126	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
AB127	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB128	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB129	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB130	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB131	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB132	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB133	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
AB134	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB135	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S
AB136	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB137	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB138	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
AB139	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB140	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB141	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB142	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB143	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
AB144	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S
AB145	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AB146	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R

AK: Amikasin, SAM: Ampisilin/sulbaktam, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CRO: Seftriakson, CIP: Siprofloksasin, GM: Gentamisin, IPM: İmipenem, LVX: Levofloksasin, MEM: Meropenem, TZP: Piperasilin/tazobaktam, SXT: Trimetoprim/Sülfametaksazol

### 6.2.1. İzolatların Antibiyotiklere Duyarlılık Yüzdeleri

Çalışmaya dahil edilen 72 *A. baumannii* izolatının 12 antibiyotiğe duyarlılık sonuçlarının yüzdeleri Şekil 1’de gösterildi. Orta duyarlılar dirençli olarak verilmiştir.



Şekil 1 . *A. baumannii* izolatlarının 12 antibiyotiğe duyarlılık yüzdeleri. AK: Amikasin, SAM: Ampisilin/sulbaktam, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CRO: Seftriakson, CIP: Siprofloksasin, GM: Gentamisin, IPM: İmipenem, LVX: Levofloksasin, MEM: Meropenem, TZP: Piperasilin/tazobaktam, SXT: Trimetoprim/Sülfametaksazol

### 6.3. Oksasilinaz Enziminin PZR Yöntemiyle Belirlenmesi

#### 6.3.1. *bla*<sub>OXA-23</sub> like Geninin Amplifikasyonu

*bla*<sub>OXA-23</sub>-like genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 72 *A. baumannii* izolatının tümünde 501 bp büyüklüğünde ürün tanımlandı. Örneklerin bazılarına ait jel görüntüsü Resim 2’de sunuldu.

#### 6.3.2. *bla*<sub>OXA-24</sub> like Geninin Amplifikasyonu

*bla*<sub>OXA-24</sub>-like genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 72 *A. baumannii* izolatının hiçbirinde 246 bp büyüklüğünde ürün saptandı.

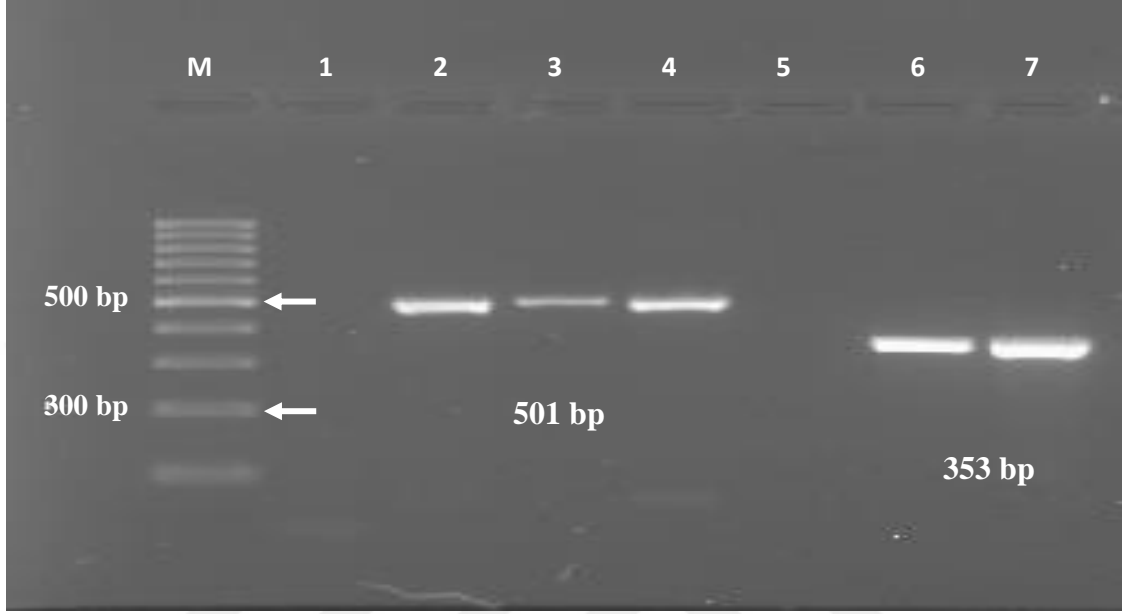
#### 6.3.3. *bla*<sub>OXA-51</sub> like Geninin Amplifikasyonu

*bla*<sub>OXA-51</sub>-like genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 72 *A. baumannii* izolatının tümünde 353 bp büyüklüğünde ürün tanımlandı. Örnekler a ait jel görüntüsü Resim 2’de sunuldu.



#### 6.3.4. *bla*<sub>OXA-58-like</sub> Geninin Amplifikasyonu

*bla*<sub>OXA-58-like</sub> genine özgül primerler kullanılarak amplifikasyon sonucu 72 *A. baumannii* izolatından hiçbirinde 599 bp büyüklüğünde ürün tanımlandı.



**Resim 2.** OXA genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü: M: 100 bp DNA Marker, 1: Negatif kontrol, 2: OXA-23 Pozitif kontrol 3: AB075, 4: AB076, 5: Negatif kontrol, 6: OXA-51 Pozitif kontrol, 7: AB075

#### 6.3.5. *bla*<sub>OXA23-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-51-like</sub> Genlerinin DNA Dizi Analizi

İzolatlar arasından rastgele seçilen dört örnekte OXA-23-like ve OXA-51-like genlerinin varlığına DNA dizi analizi yöntemiyle bakıldı. Kromotogram sonuçları izolatların fasta dosyaları ChromasPro programı aracılığıyla alındı, elde edilen nükleotid dizileri BLAST programında mevcut nükleotid dizileri ile karşılaştırıldı. AB076, AB114, AB118 ve AB138 kodlu izolatların bu okzasilinaz genlerini birlikte taşıdığı doğrulandı. Dizilim eşleşme sonuçları tüm örnekler ve genler için %98 üzerinde bulundu (Tablo 13). AB076 ve AB138 kodlu örneklerin; OXA-51-like gen grubunun alt grubu olan OXA-92 geniyle %99 oranında eşleştiği saptanmıştır. AB076 izolatının OXA-92 dizilim şeması Şekil 2’de verildi.

**Tablo 13.** National Center for Biotechnology Information'a (NCBI) göre OXA genlerinin eşleştikleri gen erişim numaraları ve yüzdeleri

İzolot Kodu	NCBI'a göre		
	Genler, benzerlik yüzdesi ve erişim numaraları		
	<i>bla</i> <sub>OXA23-like</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-92</sub>
AB076	%98 JQ409995.1		%99 NG_049833.1
AB114	%99 LC369767.1	%99 EU255288	
AB118	%99 LC096086.1	%98 MF594745.1	
AB138	%99 LC369767.1		%99 NG 049833.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
<b>569 bits(308)</b>	<b>1e-158</b>	<b>314/315(99%)</b>	<b>1/315(0%)</b>	<b>Plus/Plus</b>
Query 1	TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAATGGGA			60
Sbjct 255	TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAATGGGA			314
Query 61	TGGGGAAAAAAGGCTATTCCCAGAATGGGAAAAGAACATGACCCTAGGCGATGCTATGAA			120
Sbjct 315	TGGGGAAAAAAGGCTATTCCCAGAATGGGAAAAGAACATGACCCTAGGCGATGCTATGAA			374
Query 121	AGCTTCCGCTATTCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGTC			180
Sbjct 375	AGCTTCCGCTATTCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGTC			434
Query 181	TAAGGAAGTGAAGCGTGTTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTT			240
Sbjct 435	TAAGGAAGTGAAGCGTGTTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTT			494
Query 241	TTGGCTGGTGGGTCCTCTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCT			299
Sbjct 495	TTGGCTGGTGGGTCCTCTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCT			554
Query 300	AGCTAATAAAA-CGCT	314		
Sbjct 555	AGCTAATAAAAACGCT	569		

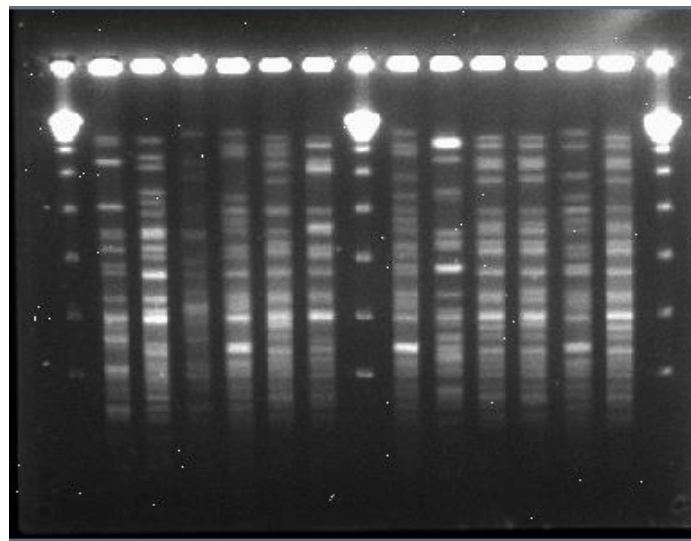
**Şekil 2.** AB076 izolatının gen bankası no: NG\_049833.1 ile OXA-92 dizilim şeması

#### 6.4. Karbapenemaz Geni Taşıyan İzolatların PFGE yöntemiyle Klonal İlişkilerinin Araştırılması

Direnç genlerini taşıdığı belirlenen 72 izolatın ve EU klon I, II, III ile epidemiyolojik ilişkileri PFGE yöntemiyle saptandı. İzolatların jel sırası izolasyon tarihlerine göre belirlendi (Tablo 14). Üçüncü gruba ait örnek jel görüntüsü Resim 3’de ve tüm izolatların dendogram görüntüsü Şekil 3’de gösterildi.

**Tablo 14.** PFGE grup numaraları ve jel sıraları

PFGE Grup no	İzolat sırası
1	M, RUH 875, RUH 134, LUH 5875, 75, 76,77, M, 78, 79, 80, 81, 82, 83, M
2	M, RUH 875, RUH 134, LUH 5875, 84, 85, 86, M, 87, 88, 89, 90, 91, 92, M
3	M, RUH 875, RUH 134, LUH 5875, 93, 94, 95, M, 96, 97, 98, 99, 100, 101, M
4	M, RUH 875, RUH 134, LUH 5875, 102, 103, 104, M, 105, 106, 107, 108, 109, 110, M
5	M, RUH 875, RUH 134, LUH 5875, 111, 112, 113, M, 114, 115, 116, 117, 118, 119, M
6	M, RUH 875, RUH 134, LUH 5875, 120, 121, 122, M, 123, 124, 125, 126, 127, 128, M
7	M, RUH 875, RUH 134, LUH 5875, 129, 130, 131, M, 132, 133, 134, 135, 136, 137, M
8	M, RUH 875, RUH 134, LUH 5875, 138, 139, 140, M, 141, 142, 143, 144, 145, 146, M



**Resim 3:** PFGE üçüncü grup agaroz jel elektroforez görüntüsü; M, EUI, EUII, EUIII, AB093, AB094, AB095, M, AB096, AB097, AB098, AB099, AB100, AB101, M.



PFGE ile tiplendirilmesi yapılan 72 izolatın kümeler arası benzerliği %83 olarak bulundu. Analizde %90-100 uyum gösteren suşlar aynı; %85-90 arası uyum gösterenler yakın ilişkili; %80-85 muhtemel ilişkili; %70'in altında uyum ise ilişkisiz olarak kabul edildi. İzolatlar ve EU klon I, II, III PFGE ile A (n=58), B (n=8), C (n=4), D (n=4) ve E (n=1) olmak üzere beş ana gruba ve bu gruplarda 10 altgruba (A1, A2, A4, A5, A6, A9, B1, B4, C3, D1) ayrıldı. Genotip A en büyük kümeyi oluşturdu ve suşlar arasında %85.2 ile yakın ilişki bulundu. Suşların yedisi ve EU klon III özgül (singleton) (A3, A7, A8, B2, B3, C1, C2, E1) PFGE profili gösterdi. Tiplendirmeye alınan suşlar 18 pulsotip olarak belirlendi.

#### **6.4.1. Kümeler İçindeki Suşların Epidemiyolojik İlişkileri**

**Birinci altküme (A1):** İki suş içermektedir. İlk suş Genel cerrahi servisi, ikinci suş Nöroşirurji yoğun bakım ünitesinden (YBÜ) izole edildi. Suşlar arasındaki benzerlik %91 bulundu.

**İkinci altküme (A2):** Üç suş içermektedir. İlk olarak Nöroloji YBÜ'den izole edilmiş ve bir ay sonra ikisi Nöroşirurji YBÜ'den 20 gün arayla izole edildi. Suşlar arasındaki benzerlik %92.5 bulundu.

**Özgül altküme (A3):** Göğüs hastalıları YBÜ'den izole edildi. A1 ve A2 altkümüsi ile benzerliği %87 bulundu.

**Üçüncü altküme (A4):** Yirmi dört suşla en büyük altkümeyi oluşturdu. Bu küme içinde yer alan klon, 12 ay boyunca hastane ortamında farklı servislerde varlığını sürdürdü ve ilk suş 2014 Ocak ayında Anestezi YBÜ'de yatan bir hastadan izole edildi. Yoğun bakım ünitesinden 19 ve servislerden beş hastanın aynı klon ile enfekte olduğu görüldü. Suşlar arasındaki benzerlik %90.6 bulundu.

**Dördüncü altküme (A5):** Yedi suş ve EU II'yi içermektedir. Bu gruptaki suşlar EU II klonuyla aynı klon olduğu için önemlidir. EU II klonu taşıyan suşların; ikisi Nöroşirurji YBÜ, ikisi Nöroloji YBÜ, ikisi Anestezi YBÜ ve biri Göğüs cerrahi servisten izole edildi. İlk suş 2014 Şubat ayında izole edildi. Suşlar arasındaki benzerlik %91.4 bulundu.

**Beşinci altküme (A6):** Altı suş içermektedir. Suşlardan dördü Anestezi YBÜ'den, biri Nöroloji YBÜ'den ve diğeri de Kardiyoloji servisten izole edildi.

Eylül 2014’de izole edilen bu klon Haziran 2015’de tekrar Anestezi YBÜ’de yatan hastalardan izole edildi. Suşlar arasındaki benzerlik %90 bulundu.

**Özgül altküne (A7 ve A8):** A7 tipindeki suş Nöroşirurji YBÜ’den izole edildi. A8 tipindeki suş Enfeksiyon hastalıkları servisinden izole edildi. İki özgül tipin benzerliği %89 bulundu.

**Altıncı altküne (A9):** En büyük ikinci altkümeyi oluşturmaktaydı ve 12 suş içermekteydi. Suşlardan onu yoğun bakım ünitelerinden, ikisi servislerden izole edildi. Tüm suşlar 2014 yılında izole edildi. Suşlar arasındaki benzerlik %90.5 bulundu.

**Yedinci altküne (B1):** Dört suş içermekteydi ve hepsi yoğun bakım ünitelerinden izole edildi. Mart ve Nisan 2015 tarihinde görülen bu klon Nöroşirurji ve Koroner YBÜ’de yatış tarihi aynı iki hastada görüldü. Suşlar arasındaki benzerlik %91.3 bulundu.

**Özgül altküne (B2 ve B3):** B2 tipindeki suş Nöroloji YBÜ’den izole edildi. B3 tipindeki suş Anestezi YBÜ’den izole edildi. İki özgül tipin B1 altkümüsi ile benzerliği %89 bulundu.

**Sekizinci altküne (B4):** İki suş içermekteydi. Suşlar Göğüs hastalıkları YBÜ ve İç hastalıkları YBÜ’den yirmi iki gün arayla izole edildi. Suşlar arasındaki benzerlik %93 bulundu.

**Özgül altküne (C1 ve C2):** C1 tipinde EU klon I yer almaktaydı. C2 tipindeki suş Anestezi YBÜ’den izole edildi. İki özgül tipin benzerliği %89 bulundu. C3 alttipi ile benzerliği %86 bulundu.

**Dokuzuncu altküne (C3):** İki suş içermekteydi. 2014 Ocak ayında İç hastalıkları ve Pediatri YBÜ’den izole edildi. Suşlar arasındaki benzerlik %95 bulundu.

**Onuncu altküne (D1):** Dört suş içermekteydi. Üçü YBÜ’den biri servisten izole edilmiş klon 2014 Ocak, Haziran ve Ekim aylarında yatan hastaları enfekte ettiği görüldü. Suşlar arasındaki benzerlik %90 bulundu.

**Özgül altküne (E1):** E1 tipinde EU klon III yer almaktaydı. Altkümele ile benzerliği %83.1 bulundu.

## 6.5. İzolatların MLST Analizi

İzolatlar arasından rastgele seçilen örneklerin; MLST analizi ile yedi ‘housekeeping’ geni taşıdığı amplikasyon yöntemiyle gösterildi. Çalışılan 20 izolatın; dizi analizi verileri ChromasPro programıyla düzenlendikten sonra PubMLST veritabanı ile allellerin doğruluğu saptandı. Test edilen suşlara ait gen dizisiyle oluşturulan allelik profiller ile sekans tipleri (ST) ve PFGE tipleri belirlendi (Tablo 15).

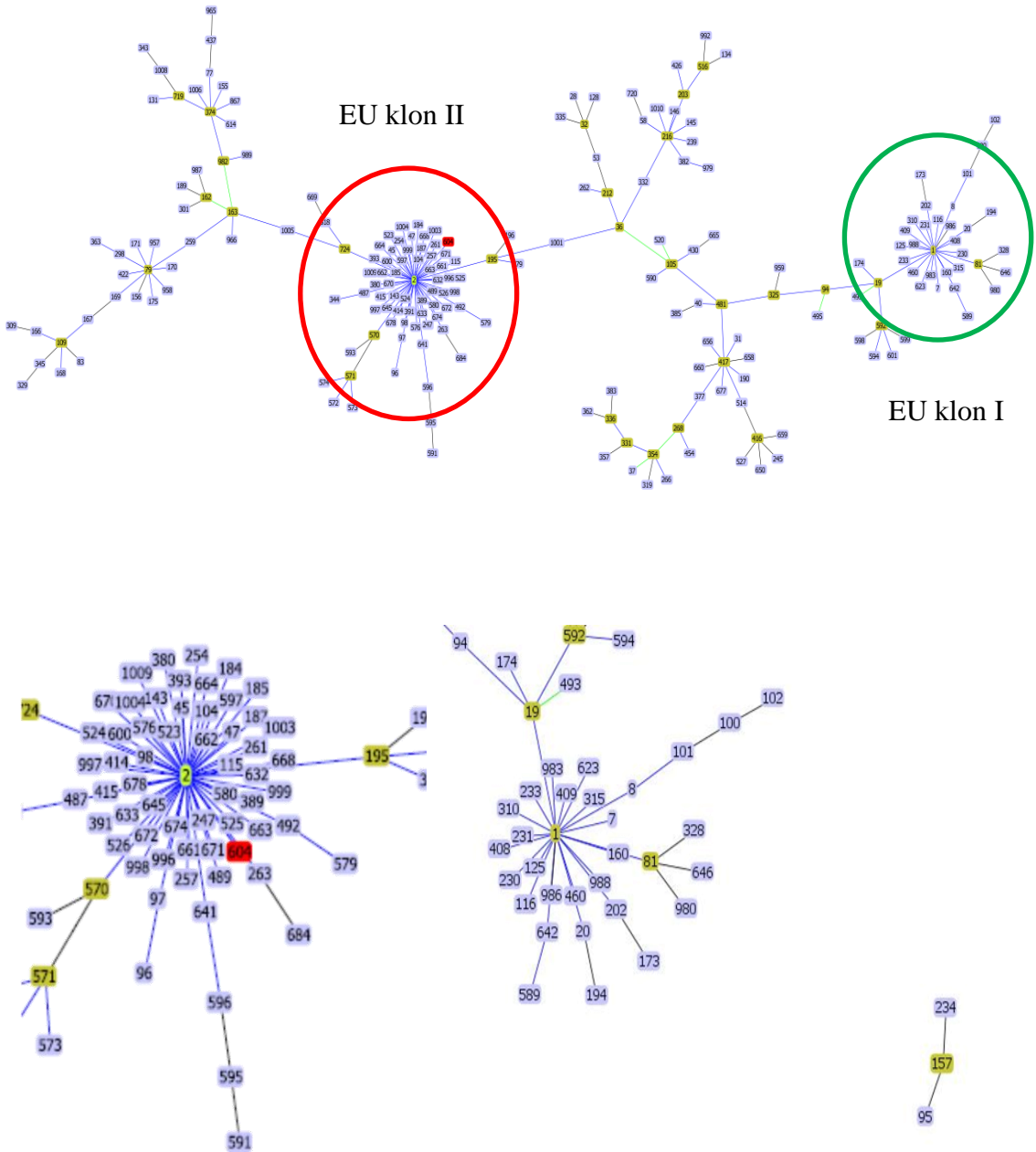
**Tablo 15.** Çalışılan izolatlara ait gen allelleri, sekans tipleri ve PFGE pulsotipleri

İzolat Kodu	cpn60	fusA	gltA	pyrG	recA	rplB	rpoB	ST	PFGE Pulsotip
AB076	1	1	1	1	5	1	1	1	C3
AB077	1	3	2	1	4	24	2	157	D1
AB101	2	2	2	2	2	2	2	2	A9
AB106	2	2	2	2	2	2	2	2	A2
AB108	2	2	2	2	2	2	2	2	A1
AB109	2	2	2	55	2	2	2	604	A6
AB114	1	3	2	1	4	24	2	157	D1
AB116	2	2	2	2	2	2	2	2	A9
AB118	2	2	2	2	2	2	2	2	A5
AB120	2	2	2	2	2	2	2	2	A7
AB125	2	2	2	55	2	2	2	604	A4
AB129	1	3	2	1	4	24	2	157	B4
AB130	2	2	2	55	2	2	2	604	B1
AB133	2	2	2	55	2	2	2	604	B2
AB134	1	3	2	1	4	24	2	157	B4
AB135	2	2	2	2	2	2	2	2	B3
AB137	2	2	2	2	2	2	2	2	A8
AB138	1	1	1	1	5	1	2	81	C2
AB139	2	2	2	55	2	2	2	604	A3
AB141	2	2	2	55	2	2	2	604	A4

Çalışılan *A. baumannii* izolatlarında ST1, ST2, ST81, ST157 ve ST604 olmak üzere beş farklı sekans tipi bulundu. İzolatlardan sekizi ST2, altısı ST604, dördü ST157, biri ST1 ve biri de ST81 sekans tipini gösterdi.

### 6.5.1. Sekans Tiplerinin PHYLOVİZ Analizi

MLST analizine göre *A. baumannii*'nin goeBURST algoritması kullanılarak oluşturulan ve sekans tipleri (ST'ler) arasındaki benzerliği gösteren PHYLOVİZ yazılımında görüntülenen diyagram görüntüsü Resim 4'de gösterildi. Analize göre ST604; European clone II (ST2)'nin baskın olduğu grupta yer aldı. European clone I'in olduğu grupta ise ST81 yer aldı. ST157 bu Avrupa klonlarından ayrı farklı iki ST ile ilişkiliydi.



**Resim 4.** *A. baumannii* izolatlarının goeBURST PHYLOVİZ diyagram görüntüsü



## 6.6. MALDI-TOF MS Bulguları

Suşların bakteriyel ekstraksiyon sonucu tanımlama skor tablosu; MALDI Biotyper 3 yazılımına göre (Bruker Daltonics, Almanya) Tablo 16'da gösterildi.

**Tablo 16.** Bakteriyel ekstraksiyon tanımlama sonuç ve skorları

İzolat Kodu	Tanımlanan organizma	Tanımlama Skoru
AB075	<i>A. baumannii</i>	2.131
AB076	<i>A. baumannii</i>	2.22
AB077	<i>A. baumannii</i>	2.256
AB078	<i>A. baumannii</i>	2.226
AB079	<i>A. baumannii</i>	2.291
AB080	<i>A. baumannii</i>	2.32
AB081	<i>A. baumannii</i>	2.341
AB082	<i>A. baumannii</i>	2.286
AB083	<i>A. baumannii</i>	2.28
AB084	<i>A. baumannii</i>	2.183
AB085	<i>A. baumannii</i>	2.232
AB086	<i>A. baumannii</i>	2.203
AB087	<i>A. baumannii</i>	2.3
AB088	<i>A. baumannii</i>	2.292
AB089	<i>A. baumannii</i>	2.221
AB090	<i>A. baumannii</i>	2.232
AB091	<i>A. baumannii</i>	2.139
AB092	<i>A. baumannii</i>	2.288
AB093	<i>A. baumannii</i>	2.173
AB094	<i>A. baumannii</i>	2.354
AB095	<i>A. baumannii</i>	2.344
AB096	<i>A. baumannii</i>	2.197
AB097	<i>A. baumannii</i>	2.214
AB098	<i>A. baumannii</i>	2.299
AB099	<i>A. baumannii</i>	2.362
AB100	<i>A. baumannii</i>	2.34
AB101	<i>A. baumannii</i>	2.337
AB102	<i>A. baumannii</i>	2.295
AB103	<i>A. baumannii</i>	2.383

**Tablo 16.** (Devam)

<b>İzolot Kodu</b>	<b>Tanımlanan organizma</b>	<b>Tanımlama Skoru</b>
AB104	<i>A. baumannii</i>	2.272
AB105	<i>A. baumannii</i>	2.309
AB106	<i>A. baumannii</i>	2.485
AB107	<i>A. baumannii</i>	2.268
AB108	<i>A. baumannii</i>	2.432
AB109	<i>A. baumannii</i>	2.3
AB110	<i>A. baumannii</i>	2.325
AB111	<i>A. baumannii</i>	2.348
AB112	<i>A. baumannii</i>	2.309
AB113	<i>A. baumannii</i>	2.395
AB114	<i>A. baumannii</i>	2.345
AB115	<i>A. baumannii</i>	2.219
AB116	<i>A. baumannii</i>	2.346
AB117	<i>A. baumannii</i>	2.278
AB118	<i>A. baumannii</i>	2.283
AB119	<i>A. baumannii</i>	2.31
AB120	<i>A. baumannii</i>	2.345
AB121	<i>A. baumannii</i>	2.389
AB122	<i>A. baumannii</i>	2.415
AB123	<i>A. baumannii</i>	2.345
AB124	<i>A. baumannii</i>	2.436
AB125	<i>A. baumannii</i>	2.384
AB126	<i>A. baumannii</i>	2.465
AB127	<i>A. baumannii</i>	2.393
AB128	<i>A. baumannii</i>	2.346
AB129	<i>A. baumannii</i>	2.282
AB130	<i>A. baumannii</i>	2.294
AB131	<i>A. baumannii</i>	2.337
AB132	<i>A. baumannii</i>	2.345
AB133	<i>A. baumannii</i>	2.35
AB134	<i>A. baumannii</i>	2.278
AB135	<i>A. baumannii</i>	2.212
AB136	<i>A. baumannii</i>	2.263

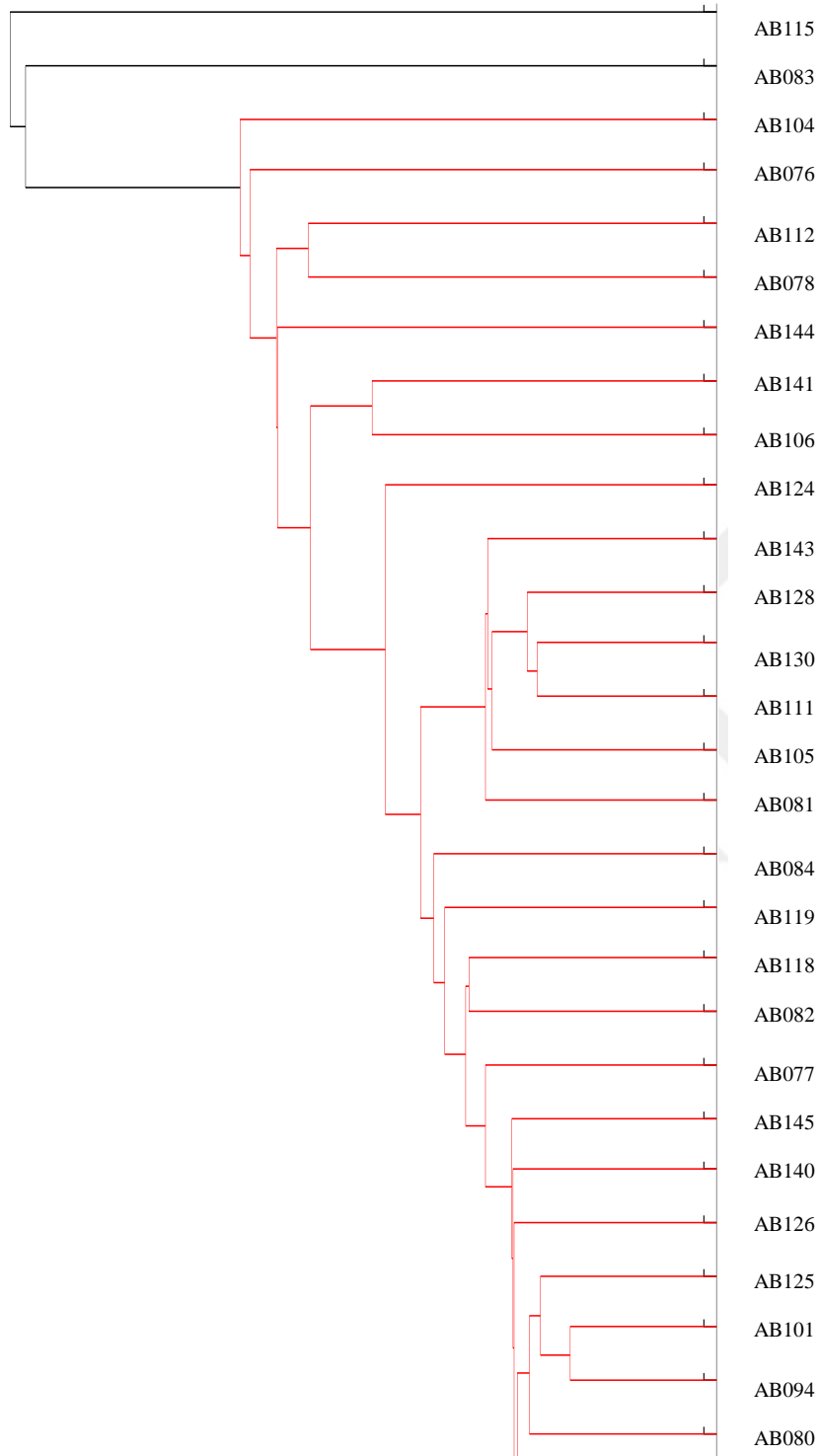
**Tablo 16.** (Devam)

İzolat Kodu	Tanımlanan organizma	Tanımlama Skoru
AB137	<i>A. baumannii</i>	2.221
AB138	<i>A. baumannii</i>	2.35
AB139	<i>A. baumannii</i>	2.162
AB140	<i>A. baumannii</i>	2.281
AB141	<i>A. baumannii</i>	2.094
AB142	<i>A. baumannii</i>	2.234
AB143	<i>A. baumannii</i>	2.284
AB144	<i>A. baumannii</i>	2.325
AB145	<i>A. baumannii</i>	2.276
AB146	<i>A. baumannii</i>	2.308
EU I	<i>A. baumannii</i>	2.422
EU II	<i>A. baumannii</i>	2.344
EU III	<i>A. baumannii</i>	2.43

İzolatların tümünün skor değerlendirmede cut off değeri  $>2$  ve tüm izolatlar *A. baumannii* olarak tanımlandı. Ekstraksiyon sonuçlarına göre örneklerin dendogram analizi yapıldı.

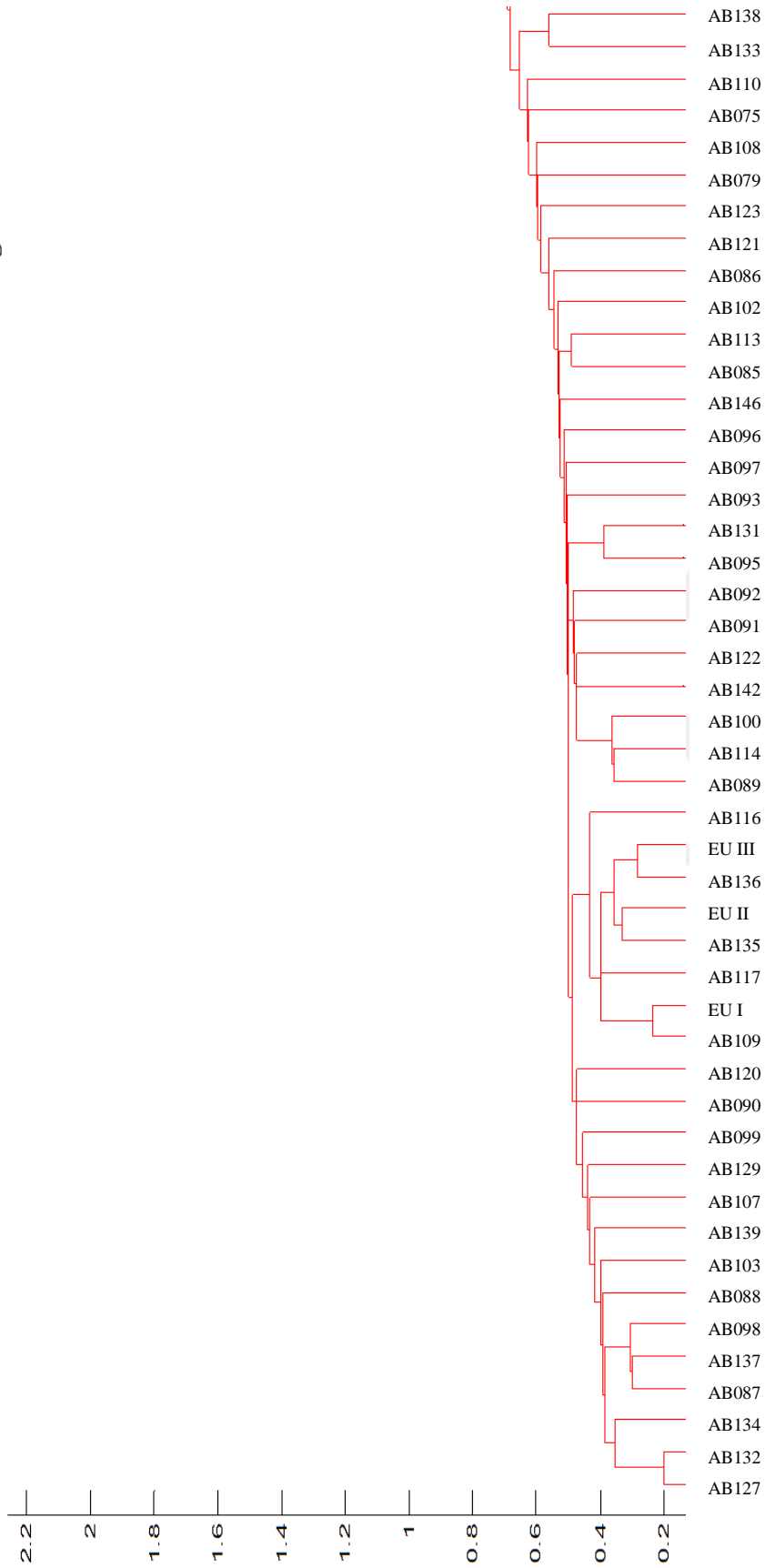
#### 6.6.1. MALDI-TOF MS PCA Dendogram Analizi

Bakteriyel ekstraksiyonla; 72 *A. baumannii* ve EU I, EU II ve EU III klonlarının cihazda oluşturulan spectra ölçümlerinin Principal Component Analysis (PCA) dendogram analizi yapıldı. Analizde, kümelendirme 1.5 distance level olarak hesaplandı. İzolatlar üç kümeye ayrıldı. En büyük küme EU klon I, II ve III olmak üzere 73 izolat ve diğer özgül iki kümede A083 ve AB0114 izolatlarını içermektedir. Dendogram görüntüsü Şekil 2'de verildi. Üç boyutlu PCA analiziyle de A083 ve AB0114 izolatlarının diğer izolatlardan ayrı sınıflandığı görüldü (Şekil 4).



**Şekil 4.** MALDI-TOF MS PCA dendrogram

PCA Dendrogram



Şekil 4. (Devam)

## 6.7. PFGE, MLST ve MALDI-TOF MS Yöntemlerinin İstatiksel Analiz Bulguları

Yöntemlerin istatiksel metodlarla ayırıcı özellikleri Simson's Diversity Index (SID) ile ve benzerlikleride Wallace katsayısıyla (AW) belirlendi. PFGE metodu ayırıcılık olarak en yüksek SID değerine sahiptir (SID=0,855). PFGE yöntemini MLST (SID=0,630) takip etmektedir. En kötü ayırıcılık özelliğine sahip yöntem ise SID=0,053 ile PCA yöntemidir. Simpson'ID 0 ile 1 arasında değer almaktadır. Değerinin büyük olması, ayırıcı özelliğinin fazla olduğunu göstermektedir.

Wallece katsayısı (AW) iki sınıflandırma metodunun birbirine ne kadar benzer olduğunu göstermektedir. AW PFGE → PCA = 0.157 ve AW PCA → PFGE = 0.001 değerlerine bakacak olursak: Eğer iki suş PFGE tarafından aynı sınıf içinde tanımlanmışsa bu iki suş %15 ihtimalle PCA'de de aynı sınıftadır. Ancak, PCA tarafından aynı sınıfta tanımlanan iki suşun PFGE de aynı sınıfta olma ihtimali %0.1'dir. AW PFGE → MLST = 1.000 ve AW MLST → PFGE = 0.290 değerlerine bakacak olursak: Eğer iki suş PFGE tarafından aynı sınıf içinde tanımlanmışsa bu iki suş MLST'de de aynı sınıftadır. Ancak, MLST tarafından aynı sınıfta tanımlanan iki suşun PFGE de aynı sınıfta olma ihtimali %29'dur. AW MLST → PCA = 0.025 ve AW PCA → MLST = 0.001 değerlerine bakacak olursak: Eğer iki suş MLST tarafından aynı sınıf içinde tanımlanmışsa bu iki suşun PCA'de de aynı sınıfta olma ihtimali %2.5'dir. Ancak, PCA tarafından aynı sınıfta tanımlanan iki suşun MLST'de aynı sınıfta olma ihtimali %0.1'dir.

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antibiyotiğe dirençli bakteriler günümüzde risk teşkil etmekte ve bu nedenle hastaları hastane ortamında tedavi ederken sorun oluşturmaktadır. Bu türlerin belirli suşlarının karakterizasyonu, tanısal testlerin ve önleyici prosedürlerin oluşturulması önem taşımaktadır. *A. baumannii*'nin, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar için sorun oluşturmaları zaman içinde artmıştır (141).

Çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* salgın suşlarının yayılımında; mekanik ventilasyona maruz kalma, özellikle uzun süreli hastanede veya yoğun bakım ünitesinde kalma, hastane ortamında enfekte veya kolonize olan hastalara daha fazla maruz kalma önemli risk faktörleridir. *A. baumannii* enfeksiyonlarının çoğu, YBÜ'deki kritik hastalarda görülür ve dünya çapında yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyonların %20'sini oluşturur (34, 87). *A. baumannii* YBÜ'de nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının önde gelen bir nedeni olarak kabul edilir. Bu kan dolaşımı enfeksiyonlarının klinik seyri iyi huylu bakteriyemiden fulminan septik şoka kadar değişmektedir ve mortalite oranları %52'ye kadar çıkmaktadır (142).

Çalışmamızda *A. baumannii* izolatları; KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında gelen kan kültürlerinden izole edilmiştir. İzolatların %88.3'ü Anestezi, Nöroloji, Nöroşirürji, Koroner, Pediatri, Göğüs Hastalıkları, İç Hastalıkları YBÜ'lerinden ve %16.7'si Genel Cerrahi, Enfeksiyon Hastalıkları, Dahiliye-Onkoloji, Göğüs Cerrahisi, Göğüs Hastalıkları, Kardiyoloji, Kardiyovasküler, Ortopedi servislerden gelen hastaların kan örneklerinden üretilmiştir. *Acinetobacter* enfeksiyon prevalansı; coğrafi lokalizasyona ve hastanın sosyo-ekonomik durumuna bağlı olarak değişmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde yapılan uluslararası bir çalışmada, *Acinetobacter* kaynaklı enfeksiyonların oranı Asya'da %19,2; Doğu Avrupa'da %17,1; Afrika'da %14.8; Orta ve Güney Amerika'da %13,8; Batı Avrupa'da %5,6; Okyanusya'da %4.4, Kuzey Amerika'da %3.7; Güney Afrika HIV-pozitif hastalarda %15 ve Kanada yanık bakım ünitelerinde %13'tür (143-146). Ülkemizden Sarı ve ark.'larının (147) yaptığı çalışmada 62 ÇİD *A. baumannii* izolatının %67.8'i YBÜ'lerinden, %32.3'si diğer servislerden izole edilmiştir. Çalışmamızda karbapenem dirençli *A. baumannii* kan izolatlarının en sık rapor edildiği birim Anestezi, Nöroloji ve Nöroşirürji YBÜ'dir. Akın ve ark.'larının

(148) çalışmasında; takip edilen 1374 hasta arasından %18'inde gelişen nozokomiyal enfeksiyonlarda en sık izole edilen mikroorganizmalardan biri *A. baumannii* bulunmuş ve özellikle karbapenem direncinin yıllar içinde arttığı gözlenmiştir. YBÜ enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların oranlarına ilişkin, aynı ülkede ya da farklı ülkelerde ve hatta yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon bölgeleri ve antimikrobiyal direnç profilleri arasında önemli farklılıklar tanımlanmaktadır. *A. baumannii*, YBÜ hastalarında nozokomiyal bir patojen olarak dünya çapında yaygın bir sorun olarak görülmektedir (149).

*Acinetobacter baumannii*, modern sağlık sisteminde hastane kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumlu en önemli patojenlerden biridir. Özellikle karbapenem direncinin artmasıyla, dünya genelinde önemli ve hastanelerde giderek artan bir sağlık sorunu haline gelmiştir (33, 34, 94, 150). Liu ve ark.'ları (151) 2003-2006 yılları ve 2007-2010 yılları arasında çıkan *A. baumannii* klinik izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarını karşılaştırmışlar ve bu zaman dilimlerinde seftazidim, sefepim, amikasin ve levofloksasin için duyarlılıkların önemli ölçüde azalmadığını bildirmişlerdir. Farklı olarak, piperacillin/tazobaktam ve imipenem duyarlılık oranlarında anlamlı bir azalma görmüşlerdir. Yeni Zelanda'dan gelen izolatlardaki %100 duyarlılık ve Çin'de %39.1 daha az duyarlı izolatlarla imipenem duyarlılığındaki bu farklılıkların coğrafi konuma da bağımlı olduğunu belirtmişlerdir. Lob ve ark.'ları (152) yaptıkları çalışmada; 2011'den 2014 yılına kadar, 'Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)' surveyans çalışmasının bir parçası olarak 48 ülkede 453 hastane sahasında 2337 *A. baumannii* toplanmış ve altı küresel bölgeden izole edilen tüm aerobik ve fakültatif Gram-negatif basillerin %0.7-4.6'sını *A. baumannii* oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada; ÇİD *A. baumannii* oranları, Kuzey Amerika'da %47 ve Avrupa ve Orta Doğu'da >%93 bulunmuş ve bu oranların büyük çoğunluğu yoğun bakım ünitelerinden raporlanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık profilleri bölgeye göre değişiklik göstermiştir, her bölgede direnç yüksek bulunmuş ve hiçbir bölgede *A. baumannii* izolatının >%70'ine etkili antimikrobiyal bulunamamıştır. İmipeneme duyarlılık Kuzey Amerika'da %64 ile en yüksek, Avrupa ve Orta Doğu'da ise %11 ile en düşük bulunmuştur. Çalışmanın yapıldığı her yılda (2011-2014) Orta Doğu'daki ÇİD *A. baumannii* oranlarında artış ile Afrika, Avrupa ve Orta Doğu'daki antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığın azalması gözlenmiştir. Karlowsky ve ark.'ları



(153) 2013-2015 yıllarını kapsayan SMART çalışmasında, *A. baumannii*'ye karşı test edilen tüm ajanlara duyarlılık oranlarını (sefepim, seftazidim, seftriakson, ertapenem, levofloksasin, piperasilin/tazobaktam, amikasin ve imipenem) %43'ün altında bulmuşlardır ve bu durum nedeniyle *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi etmek için acilen yeni ajanlara ihtiyaç olduğunu savunmaktadırlar. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada 2000-2009 yılları arasında karbapenem dirençli 194 *A. baumannii* izolatının, imipenem ve meropenem MİK değerleri 32 µg/mL bulunmuştur. Ampisilin/sulbaktam dışında test edilen tüm florokinolonlara ve beta-laktamlara izolatların %5.2'sinin duyarlı olduğu saptanmıştır. Diğer antibiyotiklere duyarlılık oranları; gentamisin %9.4, amikasin %15.5, tobramisin %22.9, tetrasiklin %10.3, trimetoprim/sülfametaksazol %34.6, minosiklin %71.6 ve kolistine %72.7 bulunmuştur (154). Köksal ve ark.'larının (155) 2011-2012 yılları verilerini içeren SMART çalışmasında, Türkiye'deki altı hastaneden toplanan Gram-negatif patojenler arasında YBÜ'den en sık *A. baumannii* izole edilmiştir. Çalışmada *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*, genellikle YBÜ'de antibiyotiklere daha düşük duyarlılık göstermişlerdir. *A. baumannii*'nin imipenem %18.2 ve amikasine %22.3 duyarlılığı yoğun bakım ünitelerinde belirgin oranlarda düşük bulunmuştur. Direkel ve ark.'larının (156) çalışmasında, 79 *A. baumannii* izolatı; piperasilin/tazobaktam %2.5, siprofloksasin %3.8, imipenem %5.1, meropenem %5.1, sefoperazon/sulbaktam %6.4, trimetoprim/sulfametoksazol %8.9, seftazidim %11.4, levofloksasin %14, gentamisin %16.4, tetrasiklin %22.8, ampisilin/sulbaktam %30.4, amikasin %44.3, netilmisin %72.2 ve tigesikline %96.2 oranında duyarlı bulunmuştur.

Çalışmamızda *A. baumannii* izolatlarının 12 antimikrobialye karşı duyarlılıkları test edilmiştir. Duyarlılık oranları; amikasin %13.9, ampisilin/sulbaktam %5.6, sefepim %1.4, gentamisin %23.6, trimetoprim/sülfametaksazol %5.6 ve meropeneme %1.4 bulunmuştur. İzolatların tümü seftazidim, seftriakson, siprofloksasin, imipenem, levofloksasin ve piperasilin/tazobaktama dirençli bulunmuştur. Çalışmamızda antimikrobial duyarlılık sonuçları ülkemizdeki verilerle uyumlu olarak duyarlılığın azaldığı ve dünyadaki direnç oranlarının coğrafi bölgelere göre farklılık gösterdiğini destekler niteliktedir.

Çoklu ilaca dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyon ve salgınlarn yaygınlığı nedeniyle, bu patojenin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde birkaç antibiyotik etkilidir. Bunlardan karbapenem grubu antibiyotikler; uzun süre *A.*

*baumannii* enfeksiyonlarına karşı etkili bir antimikrobiyal olarak kabul edilirken, ortaya çıkan direnç ile dünya çapında bu nozokomiyal patojenin tedavisinde kısıtlamalara neden olmuştur (33, 34, 94). Karbapenem dirençli *A. baumannii*, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı antibiyotiğe dirençli bakterilerin küresel öncelikleri listesine giren son zamanlardaki en kritik patojen olarak kabul edilmiştir (150). *A. baumannii*'de karbapenemlere direnç, sınıf B (MBL) ve sıklıkla sınıf D (OXA) karbapenemaz enzim üretim mekanizmasıdır. Sınıf D karbapenemazlar *A. baumannii*'de doğal var olduğu gibi aktarılabılır de olabilmektedir. Bu gruptan; OXA-51 *A. baumannii*'de kromozomal aktarıldığı, diğer büyük gruplar OXA-23, OXA-24 ve OXA-58'in de aktarılabılır karbapenem direncinde sıkça görüldüğü bilinmektedir (9, 44, 90).

Castanheira ve ark.'larının (157) çalışmasında 2009-2011 yıllarında Avrupa ve Akdeniz ülkelerinden 27 hastaneden toplanan 697 *A. baumannii* complex izolatu arasında doripenem dirençli izolatlarda karbapenemaz genlerine moleküler yöntemlerle bakılmıştır. İzolatlardan 277'sinde *bla*<sub>OXA-23</sub>, 77'sinde *bla*<sub>OXA-58</sub> ve 29'unda *bla*<sub>OXA-24/OXA-40</sub> genleri bulunmuştur. Türkiye'den gelen izolatlardan on tanesinde ise *bla*<sub>GES-11/GES-22</sub> saptanmıştır. En çok tespit edilen OXA-23 karbapenemaz geni; Fransa (12 izolat), İsrail (12 izolat), İtalya (28, iki izolat aynı zamanda OXA-58 taşımakta), Polonya (altı izolat), Portekiz (79 izolat), İspanya (bir izolat), İsviçre (bir izolat) ve Türkiye (148 izolat)'nin aralarında bulunduğu sekiz ülkeden gelen izolatlarda tespit edilmiştir. Çalışmada, Türkiye'den gelen *A. baumannii* kompleks izolatlarında OXA-23 üretiminin 2011 yılında ortaya çıktığı, bunun başlıca nedeninin de izolatlarda doripenem direncinin (2009'da %70.8 iken 2011'de %96.4) artışından kaynaklandığı vurgulanmaktadır. Levy-Blitchtein ve ark.'larının (150) 2014-2016 yıllarında Peru'da iki hastaneden alınan izolatlarla yaptığı çalışmada, 80 *A. baumannii* izolatının %97.5'inin karbapenem dirençli olduğu ve tümünün *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni taşıdığını bildirmişlerdir. İzolatlarda MBL genlerine rastlanmazken, 65 izolatın *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, 11 izolatın *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve iki izolatın da *bla*<sub>OXA-143-like</sub> geni taşıdığı belirtilmiştir. Yunanistan, İspanya ve İtalya'dan alınan örneklerin dahil olduğu Nowak ve ark.'larının (158) çalışmasında; 65 *A. baumannii* izolatının %80'i OXA-23, %4.6'sı OXA-40, %1.5'i OXA-58 ve %1.5'inin OXA-23 ve OXA-58'i birlikte taşıdığı saptanmıştır. Bu izolatlardan 22'si XDR ve 20'si PDR olarak bildirilmiştir. Pournaras ve ark.'larının (154) çalışmasında, 188 *A. baumannii*'de *bla*<sub>OXA-23-like</sub> geni; üç izolatta *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve

*bla*<sub>OXA-58-like</sub> genlerinin birlikte bulunduğu; iki izolatta *bla*<sub>OXA-58-like</sub> ve bir izolatta *bla*<sub>OXA-40-like</sub> bulunduğu bildirilmiştir. Zowawi ve ark.'larının (159) Körfez ülkelerini (Suudi Arabistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Umman, Katar, Bahreyn ve Kuveyt) dahil ettiği çalışmada, 117 *A. baumannii* izolatının tümünün *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, 107 izolatın *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, beş izolatın *bla*<sub>OXA-24-like</sub> genini taşıdığı belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde *bla*<sub>OXA-58-like</sub> genine rastlanmamıştır. Lübnan'da 2018 yılında yapılan bir çalışmada, 100 *Acinetobacter* spp. izolatından %78'i imipeneme, %84'ü meropeneme dirençli bulunmuştur. Fenotipik olarak izolatların %23'ü genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), %15'i KPC ve %4'ü MBL üretirken, %5'inde de aşırı miktarda AmpC beta-laktamaz salınımı tespit edilmiştir. İzolatların %99'unda *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni, %93'ünde *bla*<sub>ADC</sub>, %77'de *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve %3'ünde *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> genleri saptanmıştır (160). Çin'de yapılan çalışmada 106 XDR *A. baumannii* izolatlarının tümünde *bla*<sub>OXA-23-like</sub> geni saptanmış, kolistin, tigesiklin ve sefoperazon-sulbaktam dışındaki ajanlara dirençli bulunmuşlardır (161). Türkiye'den Çakırlar ve ark.'larının (162) çalışmasında; kan kültürlerinden izole edilen 72 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatı tetrasikline %13.9, trimetoprim/sulfametoksazola %15.3, seftazidime %16.7, sefepime %18.1, siprofloksasine %18.1, amikasine %25.0, piperasilin/tazobaktama %25.0, sefotaksime %27.8 ve gentamisine %30.6 oranlarında duyarlı bulunmuştur. Tüm izolatlarda *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni pozitif bulunurken, 52 izolatta *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve iki izolatta *bla*<sub>OXA-58-like</sub> geni saptanmıştır. Direkel ve ark.'larının (156) ÇİD 79 *A. baumannii* izolatını dahil ettikleri çalışmada; izolatlarının tümünde *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni, 71'inde *bla*<sub>OXA-23-like</sub> geni saptanmış; izolatların hiçbirinde *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>OXA-58-like</sub> genleri tespit edilmemiştir. Ahmed ve ark.'larının (163) Türkiye'den ve Azerbaycan'dan 11 hastaneden alınan 112 *A. baumannii* izolatında OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 genleri varlığına bakılmış ve izolatların tümünde *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, 75'inde *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, 7'sinde *bla*<sub>OXA-58-like</sub> ve 5'inde *bla*<sub>OXA-24-like</sub> geni saptanmıştır. Çalışmamızda 72 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatında; *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-58-like</sub> genlerinin varlığına bakılmış ve tüm izolatlarda *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni saptanmıştır. İzolatlarında hiçbirinde *bla*<sub>OXA-24-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-58-like</sub> genleri tespit edilmemiştir. Dünyadaki ve ülkemizdeki verilerle uyumlu olarak *A. baumannii* izolatlarında OXA-23 prevelansının arttığını gözlemlemekteyiz.

Tsakris ve ark.'larının (164) 2006 yılında yaptığı çalışmada, Yunanistan'da YBÜ'nde yatan bir hastanın kan kültüründen izole edilmiş *A. baumannii* izolatında karbapenem MİK değerleri imipenem 64 mg/L ve meropenem 8 mg/L bulunmuştur. Çoklu ilaç dirençli olan izolatta *bla*<sub>OXA-51-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-58-like</sub> genleri tespit edilmiş fakat *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-24-like</sub> genlerine rastlanmamıştır. *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geninin amplikonunun DNA dizi analizi sonucu; *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geninin yeni bir varyantı olan *bla*<sub>OXA-92</sub> geni tanımlanmıştır. Zander ve ark.'larının (165) çalışmasında, 102 imipenem dirençli *A.baumannii* izolatında *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gen ve altgruplarının varlığı DNA dizi analizi ve EU klonlarıyla ilişkilerine DiversiLab sekans yöntemiyle araştırılmıştır. Yunanistan kökenli bir izolatta OXA-92 geni tanımlanmış ve EU I klonuyla ilişkili bulunmuştur . Hammerum ve ark.'larının (166) Danimarka'da Odense Üniversite Hastanesi'nden sekiz karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatında yaptığı çalışmada, PZR yöntemiyle OXA gen varlığı araştırılmış ve epidemiyolojik yöntemler ile tiplene yapılmıştır. İzolatlardan altısında *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-72</sub> geni birlikte bulunurken iki izolatta *bla*<sub>OXA-40-like</sub> geni bulunmuştur. Ayrıca tüm izolatların *bla*<sub>OXA-51-like</sub> taşıdığı ve bu genin alttiplerinden *bla*<sub>OXA-65</sub>, *bla*<sub>OXA-66</sub> ve *bla*<sub>OXA-92</sub> genlerinin sırasıyla bir, beş ve iki izolatta taşıdığı tanımlanmıştır. OXA-92 taşıyan izolatın EU I ile ilişkili olduğu da MLST Pasteur şemasına göre doğrulanmıştır. Çalışmada; *bla*<sub>OXA-92</sub> geninin nadir bulunduğu ve daha önce Yunanistan'da bir hastanın klinik örneğinden izole edildiği de vurgulanmıştır. Çalışmamızda; izolatlar arasından rastgele seçilen AB076, AB114, AB118 ve AB138 kodlu izolatlarda; *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genlerinin doğrulaması DNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. Seçilen örneklerin tümünde *bla*<sub>OXA-23-like</sub> geni bulunmuştur. *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni dizi analizi sonuçlarında; AB076 ve AB138 kodlu izolatlarda *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gen grubunun alt grubu olan OXA-92 geni Tsakris ve ark.'larının çalışmasında ilk kez tanımlanan OXA-92 geniyle %99 oranında eşleşmiştir. Dünyada yapılan (164-166) çalışmalarda OXA-92 geni *A. baumannii* izolatlarında bildirilmiş olup Türkiye'den bildirilen veri bulunmamaktadır. Bu verilerden yola çıkarak çalışmamız, Türkiye'den karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında OXA-92 geni ilk bildirilen çalışmadır.

Moleküler tiplene yöntemlerinden PFGE analizi, *A. baumannii* için standardize edilmiş ve yaygın olarak klonal salgınlar ve yerel epidemiyolojiyi incelemek için kullanılan altın standart olarak kabul gören bir yöntemdir (76, 115). PFGE tiplendirmesi

sonucunda hastanemizden izole edilen suşların farklı YBÜ'lerinden geldiği, pulsotiplerin kendi içinde aynı klonu taşıdıkları saptanmıştır. Yirmi dört suşla en büyük altkümedeki klon 12 ay boyunca hastanede varlığını korumuştur. PFGE alttıplerinin bazılarının da dünyada birçok ülkede salgınlardan sorumlu EU klonlarıyla ilişkisi, karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında yayılımın olduğu ve gerekli kontrol önlemlerinin alınması gerektiğini vurgulamaktadır. MLST yönteminde, bakterilerin 'housekeeping' gen bölgeleri birçok metabolik fonksiyondan sorumludur. Genlerdeki değişiklikler, allel yapılarındaki farklılıklar populasyon analizine yön vermektedir. MLST analiziyle IC klonlardan köken alma ve klonlarla benzerlikler dünya çapında farklı laboratuvarlarla, farklı zamanlarda kıyaslanabilmektedir. PFGE ve MLST; yoğun emek isteyen, deney düzeneği ve sonuçların tespiti zaman alıcı olan yöntemlerdir. İki yöntemle de dünyada özellikle salgınlarla ilişkili *A. baumannii* izolatlarının köken aldığı bilinen 'international clones (IC)' yada EU klonlarıyla (I, II, III) ilişkileri araştırılmaktadır.

Dessel ve ark.'larının (167) çalışmasında; Avrupa hastanelerinden 47 izolat ve Güney Afrikalı bir hastanın bir izolatının, EU klon I ve II (RUH 875 ve RUH 134) ile olan ilişkilerini PFGE ve AFLP metodlarıyla çalışmışlardır. Kuzeybatı Avrupa hastanelerindeki salgınlardan sorumlu EU klon I ve II AFLP analizi ile ribotip 1 ve 2 ile ilişkili bulunmuş ve ribotip 3 ise yeni bir klon olarak tanımlanmıştır. Bu yeni klon III'ün; Fransa, Hollanda, İtalya ve İspanya'da bulunduğu belirtilmiştir. EU klon I ve II'nin ise sadece Kuzeybatı Avrupa ülkeleri ile sınırlı kalmayıp EU klon I için İspanya, Güney Afrika, Polonya ve İtalya, EU klon II için İspanya, Portekiz, Güney Afrika, Fransa, Yunanistan ve Türkiye gibi ülkelerde var olduğunu da bildirmişlerdir. EU klon II ile 22D035 Ankara ve 14C003 Krakow izolatı %92.5 ilişkili bulunmuştur. EU klon I ile ilişkili suş bulunmamıştır. Nemec ve ark.'ları (168) 15 şehirde 20 hastanenin 56 YBÜ'den 150 *Acinetobacter* izolatını çalışmalarına dahil etmişlerdir. *A. baumannii* olarak 108 izolat tanımlanmış ve bu izolatlar AFLP, PFGE ve MLST gibi yöntemlerle tiplendirilmişlerdir. Karbapenem MİK değerleri 23 *A. baumannii* izolatında 8 mg/L olarak bulunmuştur, bunların 20'si EU klon II olarak belirlenmiştir. *A. baumannii* izolatları; EU klon I (n=5), EU klon II (n=66) veya diğer benzersiz genotiplere ayrılmıştır. EU klon II belirlenen izolatların üçte ikisi neredeyse aynı AFLP ve PFGE tiplerini göstermişlerdir. Higgins ve ark.'ları (169) Kuzey ve Latin Amerika, Avrupa,

Asya, Güney Afrika ve Avustralya'dan 492 imipenem dirençli *A. baumannii* izolatında karbapenemaz genlerini ve izolatların EU klonlarıyla ilişkilerini moleküler epidemiyolojik yöntemlerden Rep-PCR, sequence-type multiplex PZR ve PFGE ile araştırmışlardır. Bütün izolatların *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni taşıdığı ve 304 izolatın da *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub> ya da *bla*<sub>OXA-58-like</sub> genlerini taşıdığını bildirmişlerdir. İzolatlarda MBL gen varlığına rastlanmamıştır. İzolatlar PFGE ile, EU klonları I, II ve III dahil olmak üzere sekiz ayrı kümede gruplandırılmıştır. EU klonu II'nin en büyük (246 izolat) ve en yaygın olan grup olarak; ABD, pan-Avrupa, İsrail, Asya, Avustralya ve Güney Afrika ülkelerinden izole edildiği söylenmektedir. Bartual ve ark.'larının (170) çalışmasında, 1990 ve 2001 yıllarında İspanyol ve Alman hastanelerinde salgınlardan izole edilen 40 klinik *A. baumannii* izolatının yanı sıra diğer Avrupa hastanelerinden ve iki DSMZ referans suşundan elde edilen *A. baumannii* izolatları kullanılarak PFGE, AFLP ve MLST ile EU klonları arasındaki ilişki incelenmiştir. MLST ile 42 izolat 20 farklı MLST allelik profili göstermiştir. PFGE analizi ile 29 *A. baumannii* suşu 11 farklı PFGE paterni göstermiş ve 13 izolat PFGE ile karakterize edilememiştir. İzolatlar salgınlarla ilişkili olup PFGE kümeleri dendrogramı ve MLST verileri arasında yüksek uyum bulunmuştur. EU klon I, II ve III ile aynı allelik profili gösteren izolatlar MLST ile doğrulanmıştır.

Popolo ve ark.'larının (171) çalışmasında, 1999-2009 yıllarında Yunanistan, İtalya, Lübnan ve Türkiye'de 20 hastaneden toplam 484 hastadan izole edilen 28 salgını temsil eden 35 ÇİD *A. baumannii* suşu MLST ile analiz edilmiştir. MLST verileri PFGE ve üç lokus sekans tiplendirme (3LST) yöntemi ile kıyaslanmıştır. Sekans tipleri (ST) ST2, ST1, ST25, ST78 ve ST20 bulunmuştur. İzolatlarda *bla*<sub>OXA-58-like</sub> (n=27), *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (n=2) ve *bla*<sub>OXA-72</sub> (n=1) karbapenem direnç genleri bulunmuştur. PFGE ile 18 (A-R) tip ve üç alttip (F1, F2 ve P) oluşmuştur. PFGE profili A-C, D ve E, F-J ve L-N olanlar sırasıyla ST1, ST20, ST2 ve ST25; PFGE profili K, O, P, P1, Q ve R olanlar sırasıyla ST3, ST78, ST15, ST84, ST82 ve ST83 sekans tiplerini göstermişlerdir. Farklı olarak, PFGE profilleri 'A, B ve C'; 'F, G, H, I ve J' ve 'L, M ve N' arasında altı bant farkı bulunmuş ve heterojen genotipik farklılıklar göstermişler, bu profiller sırasıyla ST1, ST2, ST25 sekans tiplerini göstermişlerdir. Yunanistan, İtalya ve Lübnan'daki 11 hastaneden 12 suşta ST2'nin baskın olduğu belirtilmiştir. Verilerde Yunanistan, ST25, İtalya'da ST25 ve ST78; ve Türkiye'de ST15, ST25 ve ST84 sekans tipleri

bulunmuştur. Pournaras ve ark.'larının (154) Yunanistan'da 11 hastaneden toplanan izolatlarla yaptığı çalışmada, 194 *A. baumannii* izolatında karbapenem genlerinin varlığına bakılmış ve klonal ilişki MLST<sup>P</sup> ve PFGE ile araştırılmıştır. MLST ile ST2; 157 izolat, ST1; 36 izolat ve bir izolat ST78 ile ilişkili bulunmuştur. PFGE ile izolatlar yedi genotipe ayrılmışlardır. ST2 klon kökenli izolatların ST1'den daha dirençli olduğu ve OXA-23 karbapenemaz geni taşıdıkları belirtilmiştir. Yunanistan'da OXA-58 geni taşıyıcılığı izolatlar arasında daha yaygınken OXA-23 ile yer değiştirdiğini vurgulamışlardır. Pournaras ve ark.'larının (172) yaptığı başka bir çalışmada; Yunanistan, İtalya, Lübnan ve Türkiye'nin de dahil olduğu 21 hastaneden izole edilen 585 ÇİD *A. baumannii* izolatında *bla*<sub>OXA-51</sub> sekans bazlı tipleme (SBT), MLST ve 3-LST gibi sekans yöntemleriyle 12 farklı sekans tipi bulunmuştur. ST2 ve ST1 izolatlar arasında baskın bulunurken Türkiye'den dahil edilen izolatlarda sekans tipleri ST15 ve ST83 sekans tipleri saptanmıştır. Mezzatesta ve ark.'larının (173) çalışmasında; İtalya'da 22 hastaneden alınan 202 karbapenem dirençli *A. baumannii* (CRAB) izolatında PFGE ve MLST yöntemleri ile EU klon I (RUH 875) ve II (RUH 134) ile ilişkileri değerlendirilmiş ve oksasilinaz direnç genleri araştırılmıştır. *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub> genleri karbapenem direncine sebep olan genlerdir. PFGE ile dört genotip bulunurken MLST ile de dört farklı sekans tipi bulunmuştur. PFGE A (ST2) ve B (ST1) genotipi sırasıyla EU klon II ve I ile ilişkilendirilmiştir. Yazar, PFGE ve MLST yöntemlerinin tekrarlanabilirliğinin ve ayırım gücünün aynı; iki yöntemin de CRAB İtalyan klonlarını tanımlamak ve bunların iki pan-Avrupa klonu ile ilişkilendirmek için uyumlu olduğunu belirtmiştir. Ladavac ve ark.'larının (174) Hırvatistan'da yaptığı çalışmalarında, 59 *A. baumannii* izolatından 27 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatında PZR ve sekansla direnç genleri belirlenmiş ve EU klonlarıyla ilişkileri MLST ve PFGE yöntemleriyle araştırılmıştır. İzolatlardan 20'sinin *bla*<sub>OXA-40-like</sub> geni ve yedisinin *bla*<sub>OXA-23-like</sub> geni taşıdığı tespit edilmiştir. PFGE ile izolatlar üç ana gruba ayrılmışlardır ve sekans tipleri EU klonlarıyla ilişkili bulunmuştur. MLST ile altı izolatın; ST195, ST231, ST775, ST1095 gibi farklı sekans tiplerine sahip olduğu bulunmuştur. Bunlardan ST195 ST2 ile; ST231 VE ST775 ST1 ile ilişkili olduğu saptanmıştır. İzolatlardan 32'si ST1 ve 18'i ST2 sekans tiplerini göstermişlerdir. Ek olarak yazar, tüm imipenem duyarlı olup OXA-23 ve OXA-40 pozitif bulunan *A. baumannii* izolatlarının EU klon 1 sekans tipini göstermiş olmalarını vurgulamıştır. Hırvatistan'da 2009-2010 yıllarında yapılan başka

bir çalışmada ise EU klon I karbapenem duyarlı izolatlarla ilişkili iken; karbapenem dirençli izolatların tümünün OXA-51 taşıdığı, OXA-40 ve OXA-58 geni pozitif bulunan izolatların da EU klon II'ye ait olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, Hırvatistan'da yapılan çalışmalarda karbapenem direncinde izolatların OXA-51 taşımasının yanı sıra aktarılabilen OXA-40 ve OXA-23 genlerinde etkili olduğu ve direnç geni farklı olup aynı klona mensup olabileceğini belirtmişlerdir (174, 175). Lübnan'da yapılan bir çalışmada, 2009-2012 yıllarında farklı hastanelerden toplanan 42 *A. baumannii* izolatında PFGE, MLST Rep-PCR ve *bla*<sub>OXA-51</sub> SBT yöntemleri ile izolatların epidemiyolojisini ve karbapenem direnç mekanizmalarını anlamak için yöntem kıyaslaması yapmışlardır. İzolatlardan 28'i *bla*<sub>OXA-23</sub>; biri *bla*<sub>OXA-24</sub> ve ikisi *bla*<sub>OXA-58</sub> geni taşıdığı tespit edilmiştir. PFGE en ayırt edici teknik olup, 11 tip; Rep-PCR dokuz tip; *bla*<sub>OXA-51</sub> SBT sekiz tip ve MLST ile yedi tip belirlenmiştir. PFGE tip A, ST2 sekans tipi gösterip en büyük grup olarak belirlenmiştir. Metodlar arasında genel bir uyuma görülmüştür. Wallace katsayısı ile hesaplanan istatistik veriler: PFGE'nin MLST ile %100; PFGE'nin *bla*<sub>OXA-51</sub> SBT ile %100; *bla*<sub>OXA-51</sub> SBT'nin MLST ile %100; MLST'nin *bla*<sub>OXA-51</sub> SBT ile %84.7; Rep-PCR'ın MLST ile %81.5; PFGE ve Rep-PCR %69; ve Rep-PCR ve *bla*<sub>OXA-51</sub> SBT %67.2 gibi kombinasyonlarla eşleşme göstermiştir. PFGE ve MLST'nin, salgın araştırması ve popülasyon yapısı çalışmaları için altın standart yöntemler olduğu, bu iki tekniğin zaman ve maliyet açısından zor olduğu ve Rep-PCR için, salgınlara erişmek için hızlı bir araç olup sonuçların dikkatli bir şekilde yorumlanması gerektiğini belirtmişlerdir (176).

Kuveyt'te yapılan bir çalışmada, 100 *A. baumannii* izolatından 33 ÇİD izolatı PFGE yöntemi ve MLST analizi ile epidemiyolojik olarak değerlendirilmiştir. Otuz üç izolattan 28'inin *bla*<sub>OXA-23</sub> geni ve ikisinin *bla*<sub>OXA-24</sub> geni taşıdığı; *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>VEB</sub> gibi genlerin varlığına da rastlanmadığı belirtilmiştir. MLST analizi ile 20 farklı sekans tipi bulunmuştur. MLST<sup>P</sup> şeması ile ST607, ST608, ST609, ST610, ST611 ve ST612 gibi altı farklı tip belirlemişlerdir. Sırasıyla ST2, ST25 ve ST32 baskın olarak, ST78 ve ST158 daha az görülmüştür. PFGE analizi ile izolatlar beş ana kümeye ayrılmışlardır. Sadece üç izolat, aynı PFGE genotipi göstermiştir. PFGE dendogramından, aynı ST'ne ait tüm izolatların aynı PFGE genotipini paylaşmadığını, bununla birlikte aynı PFGE genotiplerinin hiçbirinin farklı ST'leri olmadığı belirtilmiştir. Ek olarak, *bla*<sub>OXA-23</sub>'ün izolatlarda taşınması veya taşınmaması,



PFGE genotipleri veya ST'leri ile ilişkili değildir. Fakat, çoğu durumda da Klonal Komplekslerin (CC) PFGE genotipleri ile ilişkili olduğunu da gözlemlemişlerdir (177). El-Shazly ve ark.'larının (178) ABD'de yaptıkları çalışmada, 21 ÇİD *A. baumannii* izolatında direnç genleri PZR yöntemi ile araştırılmış ve DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Klonal ilişki PFGE ve MLST yöntemleri ile belirlenmiştir. İzolatlardan 12'sinin OXA-23 ve OXA-51; 20'sinin GES-tipi karbapenemaz; yedisinin PER tipi genler taşıdığı belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde OXA-58, OXA-24 ve MBL genleri saptanmamıştır. MLST<sup>P</sup> şeması ile beş izolatta ST1 ve 16 izolatta ST2 sekans tipleri bulunmuştur. PFGE ile farklı pulstipte olan izolatlar aynı veya farklı sekans tipleri göstermişlerdir. İran'da 2014-2015 yıllarında yapılan bir çalışmada, 64 *A. baumannii* izolatının klonal ilişkileri PFGE, multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) ve MLST analizi ile değerlendirilmiştir. Karbapenem geni taşıyan izolatların varlığı araştırılmıştır. İzolatların %98'si XDR olup OXA-23 geni ve %48'inin de sınıf 1 integron taşıdığı tespit edilmiştir. PFGE ve MLST analizi ile üç ana genotip olduğunu ve tümünün CC92(ST2)'ye ait olduğunu belirtmişlerdir. MLVA, PFGE veya MLST yöntemleri arasındaki uyum çok düşük bulunmuş, Wallace katsayı değerinin <0.1 olduğu belirtilmiştir (179).

Villalon ve ark.'ları (180) 11 yılı kapsayan ve İspanya'da 19 hastaneden (özellikle YBÜ) 729 *A. baumannii* izolatında, PFGE, *rpoB* gen dizilemesi ve MLST yöntemleriyle klonal çeşitliliği araştırmışlardır. PFGE ile 58 tip bulunmuş ve %80 cut-off ile 16 klon içinde gruplandırılmıştır. *rpoB* gen dizilemesi ve MLST sonuçlarının, PFGE sonuçları ile uyumlu olarak bir klonal dağılımı yansıttığını belirtmişlerdir. MLST ile sırasıyla ST2 (%47.5), ST3 (%5.1), ST15 (%1.7), ST32 (%1.7), ST79 (%13.6), ST80 (%20.3) ve ST81 (%10.2) sekans tiplerini verilen oranlarda bulmuşlardır. Çalışmaya göre EU klon I, II, III'ün sırasıyla ST81, ST2, ve ST3 ile temsil edildiğini belirtmişlerdir. PFGE ve MLST'nin klonalite çalışmalarında tamamlayıcı araçlar olduğunu doğrulayan bir çalışma olduğunu bildirmişlerdir. Yöntemlerden PFGE'nin çoğu salgının monoklonal paternini, bakterilerin hastane içi ve dışı yolla bulaşmasını ve hastanenin bazı bölgelerinde endemik kalıcılığını gösterdiğini saptamışlardır. MLST'nin, İspanyol klonlarının zamansal gelişimini ve mekansal dağılımının izlenilmesine ve uluslararası karşılaştırmaların yapılmasına olanak verdiğini belirtmişlerdir. İspanya'da yine Villalon ve ark.'larının (181) yaptığı başka bir

çalışmada, 59 ÇİD *A. baumannii* izolatında PZR ile karbapenem direncine sebep olan direnç genlerini PFGE ve MLST yöntemleri ile genotiplerini araştırmışlardır. PZR ile izolatların tümünde *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni, %57.6'sında *bla*<sub>OXA-40-like</sub> geni, %20.3'ünde *bla*<sub>OXA-58-like</sub> geni bulunmuştur. MBL geni kodlayan izolat bulunmamıştır. *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geninin farklı alellik varyantları olarak; izolatların %45.8'inde en yaygın OXA-65/66/76/79 genleri bulunmuş ve ST2 (EU klon II) olarak tiplendirilmiştir. OXA-69/92/112 (%10.2'si) EU klon I'e dahil olan ST81 ile ilişkili bulunmuştur. OXA-71 taşıyan izolatlarda ST3 (EU klon III) sekans tipi gözlemlenmiştir. Avustralya'da yapılan bir çalışmada, *A. baumannii* D36 izolatı 2008 yılında North Shore Özel Hastanesinde bir askerden izole edilmiştir. İzolat birçok antibiyotik; imipenem ve meropenem, seftazidim, sefotaksim, florokinolonlar, sülfonamidler ve aminoglikozidlerden gentamisin, kanamisin, tobramisin ve neomisine karşı dirençli bulunmuştur. D36'nın genom dizisi ile izolatın tüm kıtalarda bulunan dirençli klonlardan biri olan EU klon I'in bir üyesi olduğunu doğrulamışlardır. İzolatın sekans tipi MLST<sup>P</sup> şemasında CC1 (ST81)'e aittir (182).

Mısır'da 2015 yılında yapılan bir çalışmada 150 *A. baumannii* izolatında karbapenem direnç genlerinden ilk kez *bla*<sub>NDM-1</sub> ve 16S rRNA methylase *armA* ile *bla*<sub>NDM-1</sub> ve *bla*<sub>OXA-23</sub>'ün birlikte bulunduğu bildirilmiştir. MLST ile 27 farklı sekans tipi bulunmuştur. MLST<sup>P</sup> şemasına göre bunlardan 11'i; ST602, ST603, ST604, ST605, ST613, ST614, ST615, ST616, ST617, ST618, ve ST619 ilk kez tanımlanmıştır. ST604 dört izolatta tanımlanmıştır ve üç izolatın aminoglikozit direnci ile birlikte *bla*<sub>OXA-23</sub> geni de taşıdığı belirtilmiştir. MLST verileriyle yapılan 'Neighbor-joining method' analizinde ST2 ile ST604 yakın ilişkili bulunmuştur (183).

Castanheira ve ark.'larının (157) 14 Avrupa ve Akdeniz ülkesinin katıldığı çalışmasında, doripenem dirençli 411 *A. baumannii* ve 92 *Enterobacteriaceae* üyesi izolatta karbapenem direnç genleri, PFGE ve MLST yöntemleriyle de klonal ilişki araştırılmıştır. MLST ve PFGE ile tanımlanan her pulstotipten bir temsili suş ile çalışılmıştır. MLST verileri ile *A. baumannii* kompleks (n=227) izolatlarının, EU klon II'ye karşılık gelen ST2 sekans tipi veya tek lokus varyantları (SLV) ST184 ve ST97'ye ait olduğu gösterilmiştir. Bu klonun (ST2); en az sekiz ülkede yaygın olduğu bulunmuş ve karbapenemaz üreten yüksek sayıda doripenem dirençli izolatta tespit edilmiştir. İsrail'de uluslararası klon III olarak da bilinen ST3'e ait yedi izolat tespit edilmiştir. İki

yeni; ST157 (Türkiye'den 27 suş) ve ST158 (Türkiye'den GES-11 üreten 8 suş) sekans tipi gözlenmiştir. Türkiye'den gelen 24 izolat, ST15 ve SLV varyantı ST84 sekans tipi göstermiştir. ST157, ST10 sekans tipinin SLV varyantı olarak tanımlanmıştır. Türkiye'den ST157 sekans tipine sahip izolatların ağırlıklı olarak OXA-23 ya da OXA-58 taşıdıkları belirtilmiştir. Tomascek ve ark.'ları (184) Almanya, Polonya, İsveç ve Türkiye'den salgınla ilişkili ve sporadik dağılımlı 99 *A. baumannii* izolatında PFGE yöntemini referans yöntem olarak kullanmışlardır. Rep-PCR yöntemini 'International clonal lineages (IC)' tanımlaması için kullanmışlardır. MLST Pasteur ve Oxford şemalarını karşılaştırmışlardır. Yirmi altı salgın suşu ve 21 sporadik suş tanımlamışlardır. Salgınlara sebep olan major izolatlar, EU klon II ile ilişkili olan OXA-23 geni taşıyan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları olarak belirlenmiştir. Sekans sonuçlarına göre ST 10 ve ST157'nin IC8 içinde olduğu tespit edilmiştir. Her iki MLST programının popülasyon temelli çalışmalar için değerli araçlar olduğunu ve Oxford şemasının PFGE yönteminden daha yüksek ayırım gücü olduğu çoğu zaman salgın analizine yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir.

Ülkemizden Kulah ve ark.'larının (185) 145 *A. baumannii* izolatında AFLP ile klonal ilişki araştırdığı çalışmada izolatlar EU klon I, II ve III referans klonlarıyla ilişkili bulunmamıştır. Çalışma 2009 öncesi dahil edilen izolatları kapsadığı için izolatlar arasında OXA-58 (%79) geni yüksek oranda bulunmuştur. Methan ve ark.'larının (186) çalışmasında, 98 *A. baumannii* izolatında AFLP ve MLST ile EU klonları arasındaki ilişki araştırılmıştır. AFLP ile sekiz küme ve üç özgül grup oluşmuş ve küme D ve E EU klon II ile, küme J EU klon I ile ilişkili bulunmuştur. Küme A, C, G ve L bu klonlarla ilişkili bulunmamıştır. Küme H 41 izolatla yeni bulunan sekans tipi ST84 (CC15) ile ilişkili saptanmıştır. Ahmed ve ark.'larının (187) çalışmasında; 205 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının EU klon I, II, III ile ilişkileri PFGE, RAPD-PCR ve Rep-PCR ile araştırılmıştır. İzolatlar arasında sırasıyla *bla*<sub>OXA-51</sub> (n=188), *bla*<sub>OXA-24</sub> (n=62), *bla*<sub>OXA-23</sub> (n=36) ve *bla*<sub>OXA-58</sub> (n=30) geni taşındığı belirtilmiştir. PFGE ile 13 küme ve 15 özgül tip, RAPD-PCR ile 11 küme ve 23 özgül tip, Rep-PCR ile sekiz küme belirlenmiştir. Benzerlik katsayısı %80 alınan çalışmada; 11 izolat EU klon I ile, beş izolat EU klon II ve üç izolat EU klon III ile benzerlik göstermiştir. Yöntemler arasında PFGE'nin yüksek ayırım gücünün ve RAPD-PCR yönteminin de maliyetinin ekonomik olduğu vurgulanmıştır. Ahmed ve ark.'larının

(163) çalışmasında Türkiye’den ve Azerbaycan’dan 11 hastaneden toplanan 112 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının EU klon I, II ve III ile ilişkileri PFGE ile araştırılmıştır. İzolatlarda *bla*<sub>OXA-51</sub> (n=112), *bla*<sub>OXA-23</sub> (n=75), *bla*<sub>OXA-24</sub> (n=5) ve *bla*<sub>OXA-58</sub> (n=7) genleri bulunmuştur. PFGE benzerlik katsayısı %90 alınmış, 15 klon ve sekiz özgül tip belirlenmiştir. EU klon I ile ilişkili izolatların Antalya, İstanbul ve Erzurum’dan, EU klon II ile ilişkili izolatlar Kayseri ve Diyarbakır’dan olduğu tespit edilmiştir. *bla*<sub>OXA-24</sub> geni taşıyan izolatın Azerbaycan’dan çalışmaya dahil edilen izolat olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda 72 *A. baumannii* izolatı PFGE ile beş ana pulsotipe ayrılmıştır. EU klon I, II, III PFGE dendogramda sırasıyla; C1, A5 alttipleri ve E özgül tipinde yer almışlardır. En büyük pulsotip A’nın alttipinde A1, A2, A5, A7, A8 ve A9’un ve B pulsotipinden B3’ün MLST ile sekans tipi ST2 bulunmuştur. ST2 MLST Pasteur şemasına göre EU klon II olarak tanımlanmaktadır. Bunun yanısıra yine A pulsotipinden A3, A4, A6, B pulsotipinden B1 ve B2 ST2 sekans tipinin ‘single locus variable (SLV)/tek lokus farklılığından ST604 bulunmuştur. goeBURST diyagramıyla da ST604’ün köken aldığı klonun ST2 olduğu gösterilmiştir. C pulsotipinden; C1, C3 ST1 ve C2 alttipi ST81 (ST1’in SLV) olarak MLST ile tanımlanmıştır. goeBURST diyagramıyla da ST81’in köken aldığı klonun ST1 olduğu gösterilmiştir. Farklı olarak, B pulsotipinde B4 alttipleri ve D pulsotipinin sekans tipi ST157 bulunmuştur. PFGE’de alttiplerin kendi içinde sekans tipleri aynı bulunmuştur. Türkiye’den çeşitli çalışmalara dahil edilen izolatlarla yapılan çalışmalarda ST1 ve ST2 hariç bulunan farklı sekans tipleri ST15, ST25, ST84, ST83, ST157 ve ST158’dir (157, 171, 172). Çalışmamızda dört izolatta ST157 bulunmuştur. ST81 sekans tipi bazı çalışmalarda (180-182) *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmış fakat Türkiye’de ST81 ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda ST81 sekans tipi AB138 kodlu izolatta bulunmuştur. Sadece Mısır’da yapılan çalışmada ST604 sekans tipi ilk kez tanımlanmıştır (183). Ülkemizde ilk kez ST604 sekans tipi çalışmamızda altı izolatta tanımlanmıştır.

Bakteriyel tipleme; bakteriyel patojenlerin yayılmasını önlemek için çok önemlidir, ancak mevcut yöntemler zaman alıcı ve maliyetlidir. MALDI-TOF MS kısa sürede hızlı ve düşük maliyetli olarak mikrobiyal türlerin tanımlanması için mikrobiyoloji laboratuvar iş akışına entegre edilmiştir. Bağımsız araştırma grupları; patojen türlerindeki alt grupları ayırt etmekte yöntemi başarıyla kullanabilmişlerdir.

Özdeş bakteri alt grupları bağımsız yöntemlerle ilişkisiz piklerle tanımlanabilmektedir. Birinci basamak epidemiyolojik bir araç olarak kullanım için MALDI-TOF MS temelli tiplendirme yöntemlerinin performansını artırabilecek çeşitli kılavuzlar önerilmektedir. Bakteriyel türlerin popülasyonu homojen olmaktan uzaktır. Bu nedenle, klinik öneme sahip bakteriyel türler, çeşitli patojenite veya yayılma özelliği olan gruplara ayrılır. Bakteriyel tiplemenin amacı, epidemik klonların arasından daha yüksek veya spesifik patojenite gösteren klonları tanımak ve bakteriyel alt grupların yayılmasını izlemek için klinik ve çevresel izolatları karşılaştırmaktır. Bakteriyel tipleme, araştırma laboratuvarlarında veya enfeksiyon kontrol önlemleri uygulayarak salgın klonlarının yayılmasını önlemek için hızlı sonuç almanın gerekli olduğu klinik laboratuvarların rutinlerinde epidemiyolojik çalışmalar için kullanılır. Moleküler tabanlı tipleme yöntemleri çoğunlukla DNA restriksiyon veya amplifikasyonuna (örneğin, sırasıyla PFGE veya MLST) dayanır. Bu teknikler yaygın olarak tanınmasına rağmen, zaman alıcı, maliyetli ve yoğun emek isteyen yöntemlerdir. Rutin bakteri tiplemesi için verilerin doğrudan analizi, hızlı, otomatik ve ucuz olması mikrobiyologlar için MALDI-TOF MS kullanım kolaylığını sağlamaktadır (188).

Novais ve ark.'ları (189) *E. coli* klonlarının klonal tiplemesi için etanol-formik asit bakteriyel ekstraksiyon metodu ile MALDI-TOF MS'in (Bruker Daltonics, Bremen, Germany); MLST ve PFGE ile elde edilen verilerle karşılaştırmışlardır ve bu alanda yapılan ilk çalışmadır. MALDI-TOF MS ve MLST verileri; fenotipik ve genotipik özellikler arasında iyi bir korelasyon olduğunu ve MLST ile belirlenen filogenetik ilişkilerinde doğrulandığını savunmuşlardır. Bununla birlikte, izolatların kümelenmesi PFGE ile daha önce elde edilen dendograma karşılık gelmemiştir. PFGE profillerinin, muhtemelen bakterinin protein/peptidlerin büyük bir kısmının ifadesine yansıtılmayan çok sayıda mutasyon ve yatay gen transfer olayının toplamından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Giacometti ve ark.'ları (190) 2018'de yaptığı çalışmada, ilk kez MALDI-TOF MS'in *Arcobacter butzleri* için tiplendirmede kullanımını değerlendirmişlerdir. İtalya'da bir mandıra fabrikasında farklı kaynaklardan izole edilen toplam 104 *A. butzleri* suşunu MALDI-TOF MS kullanarak tanımlamış ve tiplendirmişlerdir. Çalışma öncesinde izolatların MLST ve PFGE profilleri belirlenmiştir. MALDI-TOF MS sonuçları MLST ve PFGE verileri ile karşılaştırılmıştır. MALDI-TOF MS, tüm izolatları tür düzeyinde doğru bir şekilde

tanımlamıştır. MALDI-TOF MS verilerinde spektra yada datalardaki piklere dayalı oluşturulan dendrogramlar üzerinde açıkça belirlenmiş kümelenmeler ortaya çıkmamıştır. PFGE ve MLST ile yapılan karşılaştırmalı analizler, ayrımcı endeksin MALDI-TOF MS için daha düşük olduğunu, ancak dizi tipleri ve pulsotiplerle kabaca karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir. Egli ve ark.'ları (140) İsviçre'de üniversite hastanesindeki salgında altı *E. coli* izolatıyla yaptıkları çalışmada etanol-formik asit bakteriyel ekstraksiyon metodu ile MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) yöntemi ve PFGE yöntemi sonuçlarını karşılaştırmalı olarak değerlendirmiştir. Doğrudan karşılaştırmada PFGE ve MALDI-TOF MS tabanlı dendrogramların oldukça benzer olduğunu belirtmişlerdir. Fakat, çalışmanın kendi içinde bazı sınırlamalar içerdiğini eklemişlerdir. Çalışmanın, MALDI-TOF MS tabanlı yöntem kullanılarak tek bir mikroorganizmanın yaptığı küçük çapta salgın analizi olduğunu vurgulamışlardır. Bununla birlikte, MALDI-TOF MS'in daha fazla örnekle bile işlem süresinin PFGE'ye kıyasla önemli ölçüde kısa olduğunu, PFGE ve MALDI-TOF MS'i daha büyük örneklem verileri ile karşılaştıran daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır. Bilindiği üzere, MALDI-TOF MS (protein pik verileri) ve PFGE (DNA restriksiyon enzim paternleri) yazılım verileri arasında doğrudan karşılaştırmaya imkan verecek herhangi bir yazılım bulunmadığını da eklemişlerdir. Schlebusch ve ark.'larının (191) çalışmasında, vankomisin dirençli *Enterokok* (VRE) izolatlarının tanımlanması ve salgın ilişkilerini MALDI-TOF MS ve tüm genom dizileme (WGS) yöntemleriyle araştırmışlardır. Her iki yöntemde, dört hematoloji-onkoloji hastasının pozitif kan kültürlerinden VRE izolatının salgınında rol oynayan çoklu kümelerin gösterilmesine rağmen, bulgular arasındaki küçük kohort ve uyumsuzluk farklılıkları MALDI-TOF MS'nin kısıtlılıklarını ve dendrogramlarının dikkatli yorumlanması gerektiğini göstermiştir.

Mencacci ve ark.'larının (15) çalışmasında, 35 ÇİD *A. baumannii* izolatında MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ve Rep-PCR DiversiLab sistemi ile karşılaştırılmış ve nozokomiyal salgınların tanımlanması için değerlendirilmiştir. Sonuçlar, MALDI-TOF MS'in, *Acinetobacter* salgınlarının gerçek zamanlı tespiti için, DNA bazlı sistemlerden alınan sonuçların elde edilmesinden önce kullanılabilirliğini göstermektedir. Tipleme metodları arasındaki uyum Wallace katsayıları kullanılarak analiz edilmiştir. Rep-PCR analizi ile izolatlar üç kümeye

ayrılmış ve her küme içinde izolatlar arası genomik benzerlik >%98.5 bulunmuştur. Üç kümenin birbirinden önemli ölçüde farklı olduğu, küme I ve II arasındaki benzerlik yüzdesinin yaklaşık %75, küme I ve III ile küme II ve III arasındaki benzerliğin de %55 olduğu görülmüştür. Tüm izolatlar, MALDI-TOF MS ile *A. baumannii* ve skorları 2.3 olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, MALDI-TOF MS PCA ve Rep-PCR dendogramında iki izolat farklı kümelerde sınıflandırılmıştır. Sonuç olarak bu izolatlar için elde edilen spektrumların kalitesi ve kültürlerin inkübasyon süresi gibi farklı teknik veya biyolojik nedenlerin MALDI-TOF MS sonuçlarını etkileyebileceği ve bakteriler, farklı ortamlarda depolandıklarında, işlendiklerinde veya kültürleri yapıldığında, proteinlerin veya diğer hücresel işlemlerin üretimini değiştirerek, çevresel değişikliklere hızla adapte olabileceğini vurgulamışlardır. Kütle spektrometresi ile bakteri tiplendirmeyi amaçlayan deneylerde yukarıda açıklanan tüm değişkenlerin dikkatlice kontrol edilmesi gerektiğinden bahsedilmiştir. Rim ve ark.'larının (16) çalışmasında, ÇİD *A. baumannii* izolatlarının MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ve PFGE dendogramları karşılaştırılmıştır. MALDI-TOF MS dendogramları için direk koloni ve protein ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Aynı PFGE paternine sahip izolatlar, MALDI-TOF MS dendrogramlarında farklı dallara ayrılmıştır. MALDI-TOF MS dendogramında çok yakın ilişkili izolatlar ile PFGE bant paternleri görsel olarak tamamen farklı görülmüştür. Çalışma sadece MALDI-TOF MS'in PFGE'ye göre dendogramın kıyaslandığı ilk araştırmadır. MALDI-TOF MS, türleri hızlı bir şekilde tanımlamak için iyi bir araç olmasına rağmen, çalışmanın sonuçları MALDI-TOF MS dendogramlarının ÇİD *A. baumannii* klonalite analizi için PFGE'nin yerini alamadığını göstermiştir. Sousa ve ark.'larının (10) çalışmasında, enfeksiyon kontrolü için MLST tipi ve PFGE pulsotipi bilinen değişik ülkelerden elde edilmiş 58 *A. baumannii* izolatının klonal ilişkileri etanol-formik asit bakteriyel ekstraksiyon metodu ile MALDI-TOF MS analizi ile değerlendirilmiştir. Çalışma MALDI-TOF MS, ST belirlenmesi %64.6 (2-20 kDa) ile zayıf bir ayırım derecesi olduğunu ortaya koymuştur. Tespit edilen moleküllerin (ribozomal peptitler ve/veya proteinler), *A. baumannii*'de klonal çeşitlendirme sırasında değişmeden kaldığı yönündedir. Çalışmada, farklı taksonomik düzeylerde bakteriyel tiplendirme için MALDI-TOF MS'in artan kullanımına rağmen, *A. baumannii* klonal ayırımı için bu metodolojinin uygunsuzluğunu vurgulamışlardır. Spinali ve ark.'larının (14) çalışmasında, *Streptococcus agalactiae*,

*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* türleri için MALDI-TOF MS tiplendirme ve PFGE arasında oldukça uyumlu ilişki olduğunu vurgulamışlar ve *A. baumannii* için suşlar arasında klonal ilişkiyi daha iyi tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunda belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, 72 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatu PFGE ve MLST yöntemleriyle epidemiyolojik olarak değerlendirildikten sonra MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlama ve tiplendirme yapılmıştır. MALDI-TOF MS için tanımlamadan önce izolatlar etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. İzolatların tümünün skor cut-off değeri  $>2$  bulunmuş ve tüm izolatlar *A. baumannii* olarak tanımlanmıştır. Örneklerin PCA dendogram analizi yapılmıştır. Dendogram analizi sonucunda, en büyük küme EU klon I, II ve III dahil olmak üzere 73 izolat içermektedir. Özgül olan izolat kodları A083 ve AB0114'tür. EU klon II ile ST2 sekans tipi bulunan AB135'in PCA dendogramda aynı klon olduğu görülmektedir. Fakat AB109 MLST ile ST604 sekans tipine sahipken MALDI-TOF MS ile EU klon I ile yakın ilişkili bulunmuştur. Bu durumda bahsedilen çalışmaların (16, 10, 140, 189, 191) büyük çoğunluğuyla çalışmamız örtüşmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda *A. baumannii* izolatları karbapenem direncine sebep olan OXA-tipi karbapenemaz genlerini taşımaktadırlar. Karbapenem direnciyle ilgili klon olarak bilinen EU klon II sekans tipi ST2 sekiz izolatta ve ST2'nin SLV'si ST604 altı izolatta görülmüştür. Çalışmamızda EU klon I sekans tipi ST1 ve SLV'si ST81 ise iki izolatta görülmüştür. Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak ST1 ve ST81 sekans tipine sahip izolatlarda OXA-92 geni saptanmıştır (165, 166, 181). Dünyada Türkiye'nin de katıldığı çalışmalarda görüldüğü üzere EU klon II ülkemizde daha yaygın olarak görülmektedir. Yöntemlerin ayırıcılık özellikleri için yapılan 'Simpson's Diversity Index' istatistik metodu ile PFGE metodu ayırıcılık olarak en yüksek SID değerine sahiptir (SID=0,855). PFGE yöntemini MLST (SID=0,630) takip etmektedir. En düşük ayırıcılık özelliğine sahip yöntem ise SID=0,053 ile PCA yöntemidir. Çalışmamızda; Wallece katsayısı (AW) iki sınıflandırma metodunun birbirine ne kadar benzer olduğunu göstermektedir. PFGE yöntemi ile MLST sonuçları; PFGE alttıplerinden rastgele seçilen izolatların sekans tipleri ait olduğu alttip ile uyum göstermektedir. MALDI-TOF MS yöntemiyle ise MLST ve PFGE verileri uyumlu sonuçlar vermemiştir. MALDI-TOF MS ile yapılan klonal ilişkilerin değerlendirildiği



çalışmalarda türe bağlı değişken sonuçlar verildiği görölmüştür. Epidemiyolojik araştırmalar için PFGE ve MLST yönteminin kullanılması, yapılan çalışmalarda ve çalışmamızda da daha uygun olduğu görölmektedir.

Epidemiyolojik yöntemlerin kıyaslandığı çalışmamızda PFGE'nin zaman alıcı olması, örnek hazırlama, elektroforez ve bantların belirlenmesi gibi basamaklar birkaç gün gerektirmektedir. Yüksek düzeyde bireysel beceri ve çok fazla deneyime sahip olmayı gerektirmektedir. MLST yönteminin ise filogenetik çalışmalar ve bakterilerin tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Yöntem, tüm bakteri kromozomunda '*housekeeping*' genler içerisindeki fragmanların PZR ve dizi analizine dayanmaktadır. Alellik paternler arasındaki fark, dizi tipi (ST) olarak tanımlanır. İzolatlar arasındaki genetik ilişki, ST'lerinin karşılaştırılmasıyla belirlenmektedir. Son çalışmalar MLST'nin özellikle salgınlar sırasında en sık görölen nozokomiyal patojenleri belirlemek için kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bakterinin izole edildiği konağı tanımlamak ve bakterinin spesifik bir klonu veya genotipi ile enfeksiyon veya kolonizasyona karşı konağın duyarlılığını belirlemek için dolaylı olarak kullanılabilir. Bir çok bakteri için güncel bilgiler sağlayan bir veritabanı (<http://pubmlst.org>) universal olarak takip edilebilmektedir. Farklı olarak PFGE yönteminde MLST'de kullanılan ulusal ve/veya uluslararası kıyaslanıp değerlendirmede kullanılabilen bir veri tabanı olmayıştır. MALDI-TOF MS yönteminde ise kolay ve hızlı bir yöntem olmasının yanısıra bazı parametrelerin (sağlamlık, çözünürlük ve ayırım gücü) optimizasyonunu gerektirmektedir. Bunlar arasında; büyüme koşullarının modifikasyonu, ekstraksiyon yönteminin kullanımı, spesifik bakteri ekstraktlarının kullanımı, çeşitli matrikslerin ve bir iç standardın kullanımı ve/veya kütle aralığında kütle spektrumlarının değişikliği ile optimize edilebilir. Fakat kütle spektrumlarının zaman içinde ve farklı cihazlarda pik yoğunluğu değişiklik gösterebilir. Bu durum da bağımsız veri sonuçlarının karşılaştırılmasını engelleyerek, cihazlardaki değişiklik ve/veya zamanla aşınma (lazer gücü, lazer ömrü, dedektör duyarlılığı) ile ilişkili olabilmektedir. Bu varyasyonları çözmek için, bakteri inkübasyonu, örnek hazırlama ve cihaz konfigürasyonu gibi teknik adımlar önem arz etmektedir. Klinik laboratuvarların rutin iş akışında MALDI-TOF MS tiplendirme yönteminin uygulanması, veri analizi için kullanıcı dostu bir yazılım gerektirmektedir. Tiplendirme yöntemlerini kıyaslamak için yazılım verileri arasında doğrudan

karşılaştırmaya imkan verecek herhangi bir yazılım bulunmaması da bu tür çalışmalarda ihtiyaç duyulan en büyük faktörlerden biridir. MALDI-TOF MS hızlı prospektif tiplemeyi sağlayan ilk basamak epidemiyolojik bir araç olarak değerlendirilebilir. Bu nedenle, MALDI-TOF MS ile epidemik alttürlerin tanımlanmasının, patojenlerin yayılmasını önleyecek enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasını hızlandırabileceği umulmaktadır.



## 8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ocak 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında; kan kültürlerinden izole edilen, 72 karbapenem dirençli ve orta duyarlı *A.baumannii* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. *A. baumannii* izolatlarında OXA gen varlığının PZR ile belirlenmesi ve farklı epidemiyolojik yöntemlerin karşılaştırılması amacıyla PFGE, MLST ve MALDI-TOF MS kullanılarak klonal ilişkilerinin incelenmesiyle yaptığımız çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. *A. baumannii* izolatlarının %88.3'ü YBÜ'lerinden; %16'si servislerden izole edildi.
2. Çalışmamızda *A. baumannii* izolatlarının 12 antibiyotik karşı duyarlılıkları test edildi. Duyarlılık oranları; amikasine %13.9, ampisilin/sulbaktama %5.6, sefepime %1.4, gentamisine %23.6, trimetoprim/sülfametaksazole %5.6 ve meropeneme %1.4 bulundu. İzolatların tümü seftazidim, seftriakson, siprofloksasin, imipenem, levofloksasin ve piperasilin/tazobaktama dirençli saptandı.
3. PZR ile tüm izolatlarda *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-51-like</sub> geni tespit edildi. İzolatların hiçbirinde *bla*<sub>OXA-24-like</sub> ve *bla*<sub>OXA-58-like</sub> genleri saptanmadı.
4. OXA-23 ve OXA-51 direnç geni saptanan izolatlardan rastgele seçilen AB076, AB114, AB118 ve AB138 kodlu izolatların bu okzasilinaz genlerini birlikte taşıdığı DNA dizi analizi ile doğrulandı. BLAST programında mevcut nükleotid dizileri ile eşleşme sonuçları tüm örnekler ve genler için %98 üzerinde bulundu. AB076 ve AB138 kodlu örneklerde; OXA-51-like gen grubunun alt grubu olan OXA-92 geniyle %99 oranında eşleşme tespit edildi. Çalışmamız OXA-92'nin ülkemizde bildirildiği ilk çalışmadır.
5. PFGE ile tiplendirilmesi yapılan 72 suşun kümeler arası benzerliği %83 olarak bulundu. Analizde %90-100 uyum gösteren suşlar aynı; %85-90 arası uyum gösterenler yakın ilişkili; %80-85 muhtemel ilişkili; %70'in altında uyum ise ilişkisiz olarak kabul edildi. Suşlar A (n=58), B (n=8), C (n=4), D (n=4) ve E (n=1) olmak üzere beş ana pulstotipe ve bu gruplarda 10 altgruba ayrılmaktaydı. Genotip A en büyük kümeyi oluşturdu ve suşlar arasında %85.2 ile yakın ilişki bulundu. Suşların yedisi özgül (singleton) PFGE profili gösterdi. Tiplendirmeye alınan suşlar 18 pulstotip olarak belirlendi.

6. *A. baumannii* izolatlarının European klonları (I, II, III) ile klonal ilişkileri PFGE dendogramında sırasıyla; C1, A5 alttipleri ve E özgül tipinde yer aldı. En büyük pulsotip A'nın alttipinde A1, A2, A5, A7, A8 ve A9'un ve B pulsotipinden B3'ün MLST ile sekans tipi ST2 bulundu. ST2 MLST Pasteur şemasına göre EU klon II olarak tanımlandı. Ek olarak; A pulsotipinden A3, A4, A6; B pulsotipinden B1 ve B2 ST2 sekans tipinin 'single locus variable (SLV)/tek lokus farklılığından ST604 bulundu. goeBURST diyagramıyla da ST604'ün köken aldığı klonun ST2 olduğu gösterildi. C pulsotipinden; C1, C3 ST1 ve C2 alttipi ST81 (ST1'in SLV) olarak MLST ile tanımlandı. goeBURST diyagramıyla da ST81'in köken aldığı klonun ST1 olduğu gösterildi. Farklı olarak; B pulsotipinde B4 alttipleri ve D pulsotipinin sekans tipi ST157 bulundu. PFGE'de alttipler kendi içinde sekans tipleri aynı saptandı.
7. MALDI-TOF MS yöntemiyle izolatların tümünün skor cut-off değeri  $>2$  bulundu ve tüm izolatlar *A. baumannii* olarak tanımlandı. PCA dendogram analizi sonucunda; en büyük küme EU klon I, II ve III dahil olmak üzere 73 izolat içermekteydi. Özgül olan izolat kodları A083 ve AB0114'tü. EU klon II ile ST2 sekans tipi bulunan AB135 PCA dendogramda aynı klon olduğu görüldü. Fakat AB109 MLST ile ST604 sekans tipine sahipken MALDI-TOF MS ile EU klon I ile yakın ilişkili bulundu.
8. MLST ve PFGE ile izolatlar arasında en fazla EU klon II ve SLV'si ST604 ile ilişki bulunmuştur. ST604 dünyada sadece Mısır'dan bildirildi. Ülkemizde ilk kez ST604 sekans tipi çalışmamızda altı izolatta tanımlandı.
9. Çalışmamız; ülkemizden *A. baumannii* izolatlarında ST81 sekans tipinin bildirildiği ilk çalışmadır.
10. Yöntemlerin ayırıcılığı yapılan 'Simpson's Diversity Index' istatistik metodu ile PFGE metodu ayırıcılık olarak en yüksek SID değerine sahip bulundu (SID=0.855). PFGE yöntemini MLST (SID=0.630) takip etmekteydi. En düşük ayırıcılık özelliğine sahip yöntem ise SID=0.053 ile PCA yöntemi olarak bulundu.
11. Wallece katsayısı (AW) iki sınıflandırma metodunun birbirine ne kadar benzer olduğunu göstermektedir. PFGE yöntemi ile MLST sonuçları; PFGE alttiplerinden rastgele seçilen izolatların sekans tipleri ait olduğu alttip ile uyum

göstermektedir. MALDI-TOF MS yöntemiyle ise MLST ve PFGE verileri uyumlu sonuçlar vermemiştir.

12. *A. baumannii* izolatlarında karbapenemaz tespit edilmesi ve moleküler yöntemlerle doğrulanması hastane içindeki dirençli izolatların yayılımının önlenmesine yönelik çalışmalarda ve doğru antimikrobiyal tedavinin seçilmesinde yönlendirici olacaktır. Epidemiyolojik yöntemlerin değerlendirildiği çalışmamızda PFGE ve MLST yöntemlerine ek olarak MALDI-TOF MS yöntemi hızlı prospektif tiplemeyi sağlayan ilk basamak bir araç olarak görülmektedir. Bu nedenle, MALDI-TOF MS ile epidemik alttürlerin tanımlanması, patojenlerin yayılmasını önleyecek enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasını hızlandırabilmesi için önerilebilir.
13. Tiplendirme yöntemlerini kıyaslamak için yazılım verileri arasında doğrudan karşılaştırmaya imkan verecek herhangi bir yazılım bulunmaması da bu tür çalışmalarda ihtiyaç duyulan en büyük faktörlerden biridir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Dijkshoorn L (2008). The diversity of the genus *Acinetobacter*. In: Gerischer, U. (Ed.), *Acinetobacter Molecular Biology*. Caister Academic Press, ISBN.
2. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ* 26: 101–112.
3. Munoz-Price LS, Weinstein RA (2008). *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med* 358: 1271–1281.
4. Jung J, Park W (2015). *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 2533–2548.
5. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Expert\\_Rules/Expert\\_rules\\_intrinsic\\_exceptional\\_V3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/Expert_rules_intrinsic_exceptional_V3.1.pdf). [Accessed 2 September 2018].
6. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 538–582.
7. Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP (2014). Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. *Biomed Res Int* 2014: 305784.
8. Woodford N, Turton JF, Livermore DM (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35(5): 736–755.
9. Kamolvit W, Sidjabat HE, Paterson DL (2015). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance of *Acinetobacter* spp. in Asia and Oceania. *Microb Drug Resist* 21: 424–434.
10. Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L (2015). Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. *Front Microbiol* 6: 481.

11. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijl JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, on behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM) (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 18(4): pii=20380.
12. Ahmed S, Alp E (2015). Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains. *J Infect Dev Ctries* 9: 347-354.
13. Castaño SV, Juanes FS, Ferreira L, Buitrago J, Bellido J (2016). Is MALDI-TOF mass spectrometry a valuable new tool for microorganisms epidemiology?. *J Proteomics Bioinform* 9(9): 232-237.
14. Spinali S, van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, Pincus DH, Arsac M, Durand G (2015). Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation?. *J Clin Microbiol* 53(3): 760-765.
15. Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, Cacioni M, Buzi S, Nardelli E, Bistoni F, Sanguinetti, Vecchiarelli A (2013). Typing of Nosocomial Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 51(2): 603–606.
16. Rim JH, Lee Y, Hong SK, Park Y, Kim M, D’Souza R, Park ES, Yong D, Lee K (2015). Insufficient discriminatory power of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry dendrograms to determine the clonality of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from an intensive care unit. *BioMed Res Int* ID: 535027.
17. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J (1991). Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 29: 277-82.
18. Kurcik-Trajkovska B (2009). *Acinetobacter* spp. – a serious enemy threatening hospitals worldwide. *Maced J Med Sci* 2: 157–162.

19. Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M, Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* 162: 393-404.
20. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 36(2): 380–407.
21. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 48: 1549-1554.
22. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* 7: 1127-38.
23. Gaddy JA, Actis LA (2009). Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 4: 273-8.
24. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, Kim JM, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* 301: 224-31.
25. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD (2012). *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3(3): 243-250.
26. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, Sayood K, Iwen PC, Skaar EP, Dunman P M (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun* 78(5): 1952-62.
27. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog* 6: e1000834.



28. Luke NR, Sauberan SL, Russo TA, Beanan JM, Olson R, Loehfelm TW, Cox AD, St Michael F, Vinogradov EV, Campagnari AA (2010). Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun* 78: 2017–2023.
29. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, Akira S, van der Poll T (2006). Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 122–129.
30. Kim CH, Jeong YJ, Lee J, Jeon SJ, Park SR, Kang MJ, Park JH, Park JH (2013). Essential role of toll-like receptor 4 in *Acinetobacter baumannii*-induced immune responses in immune cells. *Microb Patho* 54: 20–25.
31. Erridge C, Moncayo-Nieto OL, Morgan R, Young M, Poxton IR (2007). *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J Med Microbiol* 56: 165–171.
32. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, Schultz LW, Umland TC, Campagnari AA (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun* 78: 3993–4000.
33. Nowak P, Paluchowska P (2016). *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. *Folia Histochem Cytobiol* 54: 61–74.
34. Bergogne Berezin E, Towner KJ (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 9: 148-165.
35. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5: 939–951.
36. Luna CM, Aruj PK (2007). Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. *Respirology* 12: 787–791.
37. Chang WN, Lu CH, Huang CR, Chuang YC (2000). Community-acquired *Acinetobacter* meningitis in adults. *Infection* 28: 395–397.
38. Falagas ME, Rafailidis PI (2007). Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care* 11: 134.

39. Falagas ME, Vardakas KZ, Kapaskelis A, Triarides NA, Roussos NS (2015). Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Antimicrob Agents* 45(5): 455-6.
40. Dijkshoorn L, Ursing BM, Ursing JB (2000). Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med Microbiol* 49: 397–401.
41. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233–2239.
42. Orskov F, Orskov I (1983). From the national institutes of health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the Enterobacteriaceae and other bacteria. *J Infect Dis* 148: 346–357.
43. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen O (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat* 15: 237–247.
44. Towner KJ (2009) *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* 73: 355–363.
45. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B (2016). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev* 30(1): 409-447.
46. Villegas MV, Hartstein AI (2003). *Acinetobacter* outbreaks, 1977– 2000. *Infect Control* 24: 284–295.
47. Falagas ME, Kopterides P (2006). Risk factors for the isolation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect* 64: 7-15.
48. Karageorgopoulos DE, Falagas ME (2008). Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* 8: 751e762.
49. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K (2008). *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int J Antimicrob Agents* 32: 106-19.

50. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control* 38: 25-33.
51. Wang SH, Sheng WH, Chang YY, Wang LH, Lin HC, Chen ML, Pan HJ, Ko WJ, Chang SC, Lin FY (2003). Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *J Hosp Infect* 53: 97-102.
52. Bernards AT, Harinck HI, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, van den Broek PJ (2004). Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25: 1002-04.
53. Cefai C, Richards J, Gould FK, McPeake P (1990). An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *J Hosp Infect* 15: 177-82.
54. Pimentel JD, Low J, Styles K, Harris OC, Hughes A, Athan E (2005). Control of an outbreak of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit and a surgical ward. *J Hosp Infect* 59: 249-53.
55. Maragakis LL, Cosgrove SE, Song X, Kim D, Rosenbaum P, Ciesla N, Srinivasan A, Ross T, Carroll K, Perl TM (2004). An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. *JAMA* 292: 3006-11.
56. 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: 39-45.
57. Koeleman JG, Parlevliet GA, Dijkshoorn L, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM (1997). Nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. *J Hosp Infect* 37: 113-23.
58. del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro PL, Canle D, Molina F, Villanueva R, Cisneros JM, Bou G (2005). Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. *Clin Microbiol Infect* 11: 540-46.

59. Mah MW, Memish ZA, Cunningham G, Bannatyne RM (2001). Outbreak of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit associated with tracheostomy. *Am J Infect Control* 29: 284–88.
60. Ayats J, Corbella X, Ardanuy C, Domínguez MA, Ricart A, Ariza J, Martin R, Liñares J (1997). Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. *J Hosp Infect* 37: 287–95.
61. Saeed S, Fakih MG, Riederer K, Shah AR, Khatib R (2006). Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27: 981–83.
62. Fournier PE, Richet H, Weinstein RA (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 42: 692–699.
63. Available from: <http://pubmlst.org/abaumannii/> [Accessed 2 September 2018].
64. 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: e10034.
65. Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SG (2008). OXA-51-like beta lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 14: 268–275.
66. Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG (2010). Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes. *J Clin Microbiol* 48: 2476–2483.
67. Park YK, Lee GH, Baek JY, Chung DR, Peck KR, Song JH, Ko KS (2010). A single clone of *Acinetobacter baumannii*, ST22, is responsible for high antimicrobial resistance rates of *Acinetobacter* spp. isolates that cause bacteremia and urinary tract infections in Korea. *Microbial Drug Resistance* 16: 143–149.

68. Park YK, Peck KR, Cheong HS, Chung DR, Song JH, Ko KS (2009). Extreme drug resistance in *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units, South Korea. *Emerg Infect Dis* 15: 1325–1327.
69. Martinez JL, Baquero F (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15: 647–679.
70. Fu Y, Zhou J, Zhou H, Yang Q, Wei Z, Yu Y, Li L. (2010). Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China. *J Antimicrob Chemother* 65: 644–650.
71. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P (2010). Worldwide dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 16: 35–40.
72. Ho PL, Ho AY, Chow KH, Lai EL, Ching P, Seto WH (2010). Epidemiology and clonality of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from a healthcare region in Hong Kong. *J Hosp Infect* 74: 358–364.
73. Karah N, Haldorsen B, Hermansen NO, Tveten Y, Ragnhildstveit E, Skutlaberg DH, Tofteland S, Sundsfjord A, Samuelsen O (2011). Emergence of OXA-carbapenemase- and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. *J Med Microbiol* 60: 515–521.
74. Nemeč A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L (2004). Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 53: 1233–1240.
75. Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, Zarrilli R (2014). Single-locus-sequence-based typing of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. *J Clin Microbiol* 52(5): 1653–1657.
76. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 41: 11–19.

77. Grosso F, Quinteira S, Peixe L (2011). Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 17: 1275–1279.
78. Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin R A, Anais L, Merle JC, Poirel L (2013). Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France. *Euro Surveill* 18(31): 20547.
79. Heydari F, Mammina C, Koksal F (2015). NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* ST85 now in Turkey, including one isolate from a Syrian refugee. *J Med Microbiol* 64: 1027–1029.
80. Rafei R, Pailhoriès H, Hamze M, Eveillard M, Mallat H, Dabboussi F, Joly-Guillou ML, Kempf M (2015). Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Tripoli, Lebanon using *bla*<sub>OXA-51</sub>-like sequence based typing. *BMC Microbiol* 15: 103.
81. Doi Y, Murray GL, Peleg AY (2015). *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. *Semin Respir Crit Care Med* 36: 85-98.
82. Kempf M, Rolain JM (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 39: 105–114.
83. Kim Y, Bae IK, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K (2014). In vivo emergence of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79: 362–366.
84. 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: 1607–1615.
85. Poirel L, Bonnin R, Nordmann P (2011). Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Acinetobacter* Species. *IUBMB life* 63: 1061-7.

86. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18(3): 268-281.
87. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Lee SH (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 55.
88. Bush K, Jacoby GA (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 969-976.
89. Olsen I (2015). New promising beta-lactamase inhibitors for clinical use. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34: 1303–1308.
90. Dahiya S, Singla P, Chaudhary U, Singh U (2015). Carbapenemases: A Review. *Int J Adv Health Sci* 2(4): 11-17.
91. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P (2007). Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2: 501-512.
92. Queenan AM, Bush K (2007). Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20(3): 440–458.
93. Bush K, Fisher JF (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 65: 455–478.
94. Codjoe FS, Donkor ES (2018). Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci* 6(1): 1.
95. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 11: 355–362.
96. Antunes NT, Fisher JF (2014). Acquired Class D  $\beta$ -Lactamases. *Antibiotics* 3(3): 398-434.
97. Poirel L, Naas T, Nordmann P (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 24-38.

98. Poirel L, Nordmann P (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12(9): 826-836.
99. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H (2013). OXA-235, a Novel Class D  $\beta$ -Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(5): 2121–2126.
100. Evans BA, Amyes SGB (2014). OXA  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 27(2): 241–263.
101. Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG (1995). Transferable imipenem resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother* 36: 585–586.
102. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 583–588.
103. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P (2008). *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1252–1256.
104. Kaitany KC, Klinger NV, June CM, Ramey ME, Bonomo RA, Powers RA, Leonard DA (2013). Structures of the class D carbapenemases OXA-23 and OXA-146: Mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 4848–4855.
105. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P (2005). Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3198–3202.
106. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J (2000). OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1556–1561.
107. Walther-Rasmussen J, Høiby N (2006). OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57(3): 373–383.



108. Sarı AN, Biçmen M, Gülay Z (2013). The first report on the outbreak of OXA-24/40-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 66: 439-42.
109. Patel G, Bonomo RA (2013). “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology* 4: 48.
110. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D (2006). Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 756–758.
111. Bertini A, Poirel L, Bernabeu S, Fortini D, Villa L, Nordmann P, Carattoli A (2007). Multicopy *bla*<sub>OXA58</sub> gene as a source of high-level resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2324–2328.
112. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H (2009). OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5035– 5038.
113. Gerner-Smidt P (1992). Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 30: 2680–5.
114. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán 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: 635–43.
115. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L (2005). Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43: 4328–55.
116. Parizad EG, Parizad EG, Valizadeh A (2016). The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. *J Clin Diagn Res* 10(1): DE01-4.
117. Rafei R, Kempf M, Eveillard M, Dabboussi F, Hamze, M, Joly-Guillou ML (2014). Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol* 9: 1179–1194.

118. Güven Gökmen T, Kızılyıldırım S (2011). Hastane enfeksiyonlarının tanı ve tedavisinde moleküler biyolojik yöntemler: Pulsed Field Jel Elektforezi (PFGE). *HİDER* 15(1): 1-10.
119. Durmaz R (2013). Moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarında kullanımı. *Hastane Enfeksiyonları* (Ed: Doğanay, M., Ünal, Çetinkaya Şardan Y) Ankara; 2: 303-327.
120. Spratt BG (2004). Exploring the concept of clonality in bacteria. In: *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology*. Humana Press, NY, USA, 323–352.
121. Jolley KA, Feil EJ, Chan MS (2001). Maiden MCJ: Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17(12): 1230–1231.
122. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol* 186(5): 1518–1530.
123. Francisco AP, Bugalho MF, Ramirez M, Carrico JA (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinf* 10: 152.
124. Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carrio JA (2012). PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinf* 13: 87.
125. Tanaka K, Fenn JB (2002). Nobel Laureates in chemistry. Available at <http://www.nobelprize.org> [accessed 8 July 2018].
126. Holland RD, Wilkes JG, Ruffin F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO Jr (1996). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10: 1227-1232.
127. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 36(2): 380–407.
128. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 6: 791.

129. Siegrist TJ, Anderson PD, Huen WH, Kleinheinz GT, McDermott CM, Sandrin TR. (2007). Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF-MS). *J Microbiol Methods* 68: 554–562.
130. Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M (2011). MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int. J Med Microbiol* 301: 64–68.
131. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Disc Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement (2013). CLSI document M100-S23 . CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania USA 19087 -1898.
132. Ausubel FM, Brient R, Kingston RE (1995). *Short Protocols in Molecular Biology*. 2 nd. ed. New York: Willey and Sons.
133. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB, Livermore, DM (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 27: 351–353.
134. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy NC, Caliskan A (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* 625: 372-7.
135. CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems Instruction Manual and Applications Guide, Catalog Numbers 170-3690 through 170-3703, BIO-RAD, USA.
136. Available from: [https://pubmlst.org/abaumannii/info/primers\\_Pasteur.shtml](https://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Pasteur.shtml) [Accessed 2 September 2018].
137. Available from: [https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst\\_abaumannii\\_pasteur\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_abaumannii_pasteur_seqdef) [Accessed 2 September 2018].
138. Available from: <http://www.phyloviz.net/goeburst/> [Accessed 2 September 2018].

139. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I (2012). Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. Clin Microbiol Infect 18: 1097–1103.
140. Egli A, Tschudin-Sutter S, Oberle M, Goldenberger D, Frei R, Widmer AF (2015). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing *E. coli* – A Novel Tool for Real-Time Outbreak Investigation. PLoS One 10(4): e0120624.
141. Gonzalez-Villoria AM, Valverde-Garduno V (2016). Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. J Pathog 7318075.
142. Zhou H, Yuan Z, Du Y (2014). Prior use of four invasive procedures increases the risk of *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia among patients in intensive care units: A systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis 22: 25–30.
143. Ntusi NB, Badri M, Khalfey H, Whitelaw A, Oliver S, Piercy J, Raine R, Joubert I, Dheda K (2012). ICU-Associated *Acinetobacter baumannii* Colonisation/Infection in a High HIV Prevalence Resource-Poor Setting. PLoS One 7(12): e52452.
144. Simor AE, Lee M, Vearncombe M, Jones-Paul L, Barry C, Gomez M, Fish JS, Cartotto RC, Palmer R, Louie M (2002). An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in burn unit: Risk factors for acquisition and management. Infect Control Hosp Epidemiol 23(5): 261-267.
145. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. JAMA 302(21): 2323-2329.
146. Uwingabiye J, Frikh M, Lemnouer A, Bssaibis F, Belefquih B, Maleb A, Dahraoui S, Belyamani L, Bait A, Haimeur C, Louzi L, Ibrahim A, Elouennass M (2016). *Acinetobacter* infections prevalence and frequency of the antibiotics resistance: comparative study of intensive care units versus other hospital units. Pan Afr Med J 23: 191.

147. Sarı B, Baran I, Alaçam S, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Aksu N (2015). Nozokomiyal Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Oksasilinaz Genlerinin Multipleks PCR ile Araştırılması ve Klonal İlişkilerinin Rep-PCR ile Değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 49(2): 249-258.
148. Akın A, Esmaoğlu Çoruh A, Alp E, Günay Canpolat D (2011). Anestezi yoğun bakım ünitesinde beş yıl içerisinde gelişen nozokomiyal enfeksiyonlar ve antibiyotik direncinin değerlendirilmesi. Erciyes Tıp Derg 33(1): 7-16.
149. Katsaragakis S, Markogiannakis H, Toutouzias KG, Drimousis P, Larentzakis A, Theodoraki EM, Theodorou D (2008). *Acinetobacter baumannii* infections in a surgical intensive care unit: predictors of multi-drug resistance. World J Surg 32(6): 1194-1202.
150. Levy-Blitchtein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, Moreno-Morales J, Pons MJ, Del Valle-Mendoza J, Vila J (2018). Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. Emerg Microbes Infect 7: 119.
151. Liu YM, Chen YS, Toh HS, Huang CC, Lee Y-L (2012). In vitro susceptibilities of non-Enterobacteriaceae isolates from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region from 2003 to 2010: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Int J Antimicrob Agents 40: S11–S17.
152. Lob SH, Hoban DJ, Sahm DF, Badal RE (2016). Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 47: 317–323.
153. Karlowsky J, Hoban D, Hackel M, Lob S, Sahm D (2017). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013–2015. J Med Microbiol 66(1): 61-69.

154. Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E, Poulou A, Zarrilli R, Tsakris A, on behalf of the Greek Study Group on Acinetobacter Antimicrobial Resistance (2017). Predominance of international clone 2 OXA-23-producing-*Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents* 49: 749–53.
155. Koksall I, Yilmaz G, Unal S, Zarokolu P, Korten V, Mulazimoglu L, Tabak F, Mete B, Oguz VA, Gulay Z, Alp A, Badal R, Lob S (2017). Epidemiology and susceptibility of pathogens from SMART 2011-12 Turkey: Evaluation of hospital-acquired versus community-acquired urinary tract infections and ICU-versus non-ICU-associated intra-abdominal infections. *J Antimicrob Chemother* 72: 1364-1372.
156. Direkel S, Copur Cicek A, Karagoz A, Aydogan Ejder N, Oktay E, Delialioglu N, Ozgumus OB, Durmaz R (2016). Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in an university hospital. *Mikrobiyol Bul* 50: 522–34.
157. Castanheira M, Costello SE, Woosley LN, Deshpande LM, Davies TA, Jones RN (2014). Evaluation of Clonality and Carbapenem Resistance Mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* Complex and Enterobacteriaceae Isolates Collected in European and Mediterranean Countries and Detection of Two Novel  $\beta$ -Lactamases, GES-22 and VIM-35. *Antimicrob Agents Chemother* 58(12): 7358–7366.
158. Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins PG, Roca I, Vila J, McConnell MJ, Cisneros JM, Seifert H, MagicBullet Working Group WP4 (2017). High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother* 72(12); 3277–3282.
159. Zowawi HM, Sartor AL, Sidjabat HE, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM, AlJindan RY, Alfaresi M, Ibrahim E, Al-Jardani A, Al Salman J, Dashti AA, Johani K, Peterson DL (2015). Molecular epidemiology of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in the gulf cooperation council states. Dominance of OXA-23-type producers. *J Clin Microbiol* 53: 896–903.

160. Hajjar Soudeiha M, Dahdouh E, Daoud Z, Sarkis DK (2018). Phenotypic and genotypic detection of  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter* spp. isolates recovered from Lebanese patients over a 1-year period. *J Glob Antimicrob Resist* 12: 107–112.
161. Li Y, Guo Q, Wang P, Zhu D, Ye X, Wu S, Wang M (2015). Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23  $\beta$ -lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China. *J Microbiol Immunol Infect* 48: 101–108.
162. Cakirlar FK, Ciftci IH, Gonullu N (2015). OXA-type carbapenemases and susceptibility of colistin and tigecycline among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from patients with bacteremia in Turkey. *Clin Lab* 61: 741-747.
163. Ahmed SS, Alp E, Ulu-Kilic A, Dinc G, Aktas Z, Ada B, Bagirova F, Baran I, Ersoy Y, Esen S, Guven TG, Hopman J, Hosoglu S, Koksall F, Parlak E (2016). Spread of carbapenem-resistant international clones of *Acinetobacter baumannii* in Turkey and Azerbaijan: a collaborative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35(9): 1463-1468.
164. Tsakris A, Ikonomidis A, Spanakis N, Pournaras S, Bethimouti K (2007). Identification of a novel blaOXA-51 variant, blaOXA-92, from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 13: 348–9.
165. Zander E, Nemeč A, Seifert H, Higgins PG (2012). Association between beta-lactamase-encoding blaOXA-51 variants and DiversiLab rep-PCRbased typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Clin Microbiol* 50: 1900–1904.
166. Hammerum AM, Hansen F, Skov MN, Stegger M, Andersen PS, Holm A, Jakobsen L, Justesen US (2015). Investigation of a possible outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Odense, Denmark using PFGE, MLST and whole-genome-based SNPs. *J Antimicrob Chemother* 70: 1965-1968.
167. van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, Verhoef J, Brisse S (2004). Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 155: 105–112.

168. Nemeč A, Krizove L, Maixnerova M, Diancourt L, van der Reijden TJK, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L (2008). Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother* 62: 484–9.
169. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H (2010) Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemoth* 65: 233–238.
170. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F (2005). Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43: 4382-4390.
171. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R (2011). Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 17: 197-201.
172. Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, Zarrilli R (2014). Single locus sequence-based typing of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene for rapid classification of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clones. *J Clin Microbiol* 52: 1653–1657.
173. Mezzatesta ML, D’Andrea MM, Migliavacca R, Giani T, Gona F, Nucleo E, Fugazza G, Pagani L, Rossolini GM, Stefani S (2012). Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Clin Microbiol Infect* 18: 160-166.
174. Ladavac R, Bedenic B, Vranic-Ladvac M, Barisic N, Karcic N, Pompe K, Ferencic A, Stojanovic A, Seifert H, Katic S, Higgins PG (2017). Emergence of different *Acinetobacter baumannii* clones in a Croatian hospital and correlation with antibiotic susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist* 10: 213–218.
175. Vranic-Ladvac M, Bedenic B, Minandri F, Ištók M, Francula-Zaninovic S, Ladavac, et al (2014). Carbapenem-resistance and acquired class D carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009-2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33: 471–8.



176. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Gaultier MP, Mallat H, Moghnieh R, Husni-Samaha R, Joly-Guillou ML, Kempf M (2014). Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods. PLoS One 9: e115969.
177. Vali L, Dashti K, Opazo-Capurro AF, Dashti AA, Al Obaid K, Evans BA (2015). Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait. Front Microbiol 6: 743.
178. El-Shazly S, Dashti A, Vali L, Bolaris M, Ibrahim AS (2015). Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Int J Infect Dis 41: 42–9.
179. Saffari F, Monsen T, Karmostaji A, Azimabad FB, Winderström M (2017). Significant spread of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes of clonal complex 92 among intensive care unit patients in a university hospital in Southern Iran. J Med Microbiol 66: 1656–1662.
180. Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA (2011). Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. J Clin Microbiol 49: 875–82.
181. Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA (2013). Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. J Antimicrob Chemother 68: 550-553.
182. Hamidian M, Hawkey J, Holt KE, Hall RM (2015). Genome sequence of *Acinetobacter baumannii* strain D36, an antibiotic resistant isolate from lineage 2 of global clone 1. Genome Announc 3: e01478–e01e15.
183. El-Sayed-Ahmed MA EG, Amin MA, Tawakol WM, Loucif L, Bakour S, Rolain JM (2015). High Prevalence of *bla*<sub>NDM-1</sub> Carbapenemase-Encoding Gene and 16S rRNA *armA* Methyltransferase Gene among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in Egypt. Antimicrob Agents Chemother 59(6): 3602–3605.

184. Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H (2016). Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. PLoS One 11: e0153014.
185. Kulah C, Mooij MJ, Comert F, Aktas E, Celebi G, Ozlu N, Rijnsburger MC, Savelkoul PH (2010). Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. Int J Antimicrob Agents 36: 114–118.
186. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B, Reijden TV, Dijkshoorn L (2013). Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. Infect Genet Evol 14: 92-97.
187. Ahmed S, Dinc G, Baldan R, Alp E, Ulu-Kılıç A, Melchers WJG, Hopman J, Voss A (2016). Molecular characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* and investigation of genetic diversity between local and international clones. J Pure Appl Microbiol 10: 1675-1682.
188. Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D (2017). Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria?. Trends Microbiol 25: 447–55.
189. Novais A, Sousa C, de Dios Caballero J, Fernandez-Olmos A, Lopes J, Ramos H, Coque TM, Canton R, Peixe L (2014). MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 33: 1391–1399.
190. Giacometti F, Piva S, Vranckx K, De Bruyne K, Drigo I, Lucchi A, Manfreda G, Serraino A (2018). Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types. Int J Food Microbiol 277: 50–57.
191. Schlebusch S, Price GR, Gallagher RL, Horton-Szar V, Elbourne LDH, Griffin P, Venter DJ, Jensen SO, Van Hal SJ (2017) MALDI-TOF MS meets WGS in a VRE outbreak investigation. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 36: 495–499.

## 10. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ  
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL  
ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ  
TECHNICAL UNIVERSITY  
FACULTY OF MEDICINE  
ETHIC COUNCIL

Sayı: 24237859- 725  
Konu: Onay Belgesi

Tarih:22/12/2015

Sayın; Doç.Dr.Gülçin BAYRAMOĞLU  
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

“Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojisinin Araştırılmasında Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması” başlıklı etik kurul 2015/142 no.lu tez çalışması raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Faruk AYDIN  
Etik Kurul Başkanı

Eki : 1 onay belgesi

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSSEL ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU KARAR FORMU**




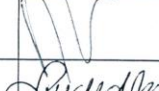
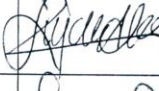


<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Karbapenem Dirençli <i>Acinetobacter baumannii</i> Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojisinin Araştırılmasında Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması”		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2015/142		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Gülçin BAYRAMOĞLU		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji		
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, UNVANI/ADI/SOYADI	Arş.Gör.Gülşen ULUÇAM, Prof.Dr.İlknur TOSUN		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	TEZ <input checked="" type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU KARAR FORMU**

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Karar No:</b> 6	<b>Tarih:</b> 14/12/2015
	Doç.Dr.Gülçin BAYRAMOĞLU'nun sorumluluğunda yürütülmesi planlanan Arş.Gör.Gülşen ULUÇAM'a ait "Karbapenem Dirençli <i>Acinetobacter baumannii</i> Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojisinin Araştırılmasında Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması" başlıklı 2015/142 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
<b>BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:</b>	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Evrim Ö. KARAGÜZEL Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\* :Araştırma ile İlişki  
\*\* :Toplantıda Bulunma

## 11. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

<b>Soyadı, Adı</b>	: ULUÇAM ATAY, Gülşen
<b>Uyruğu</b>	: T.C
<b>Doğum tarihi ve yeri</b>	: 29.04.1985, Ankara
<b>Medeni hali</b>	: Evli
<b>E-posta</b>	: gulucam@ktu.edu.tr
<b>Tlf</b>	: +90 462 377 7786

### EĞİTİM BİLGİLERİ

<b>Derece</b>	<b>Mezun Olduğu Kurum Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	KTÜ, SABE, Tıbbi Mikrobiyoloji AD	2018
<b>Yüksek Lisans</b>	KTÜ, SABE, Tıbbi Mikrobiyoloji AD	2012
<b>Lisans</b>	Abant İzzet Baysal Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (İng)	2009
<b>Lise</b>	Eryaman Lisesi	2003

### AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre</b>
Araştırma Görevlisi	KTÜ, SABE, Tıbbi Mikrobiyoloji AD	2009-2018

### YABANCI DİL

İngilizce

### YAYINLAR

1. Ekinci B, Edgunlu T, Bayramoglu G, **Uluçam Atay G** (2018). Molecular investigation of staphylococcal cassette chromosome mec types and genotypic relations of methicillin-resistant staphylococci isolated from before and after hospital exposed students. Indian J Med Microbiol 36(2): 257-264.

2. Bayramoğlu G, **Uluçam G**, Gençoğlu Özgür Ç (2016). Evaluation of carbapenem inactivation method for the identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* strains. Bulletin of Microbiology 50: 505-7.
3. Bayramoğlu G, **Uluçam G**, Gençoğlu Özgür Ç, Kılıç AO, Aydın F (2016). Comparison of the modified Hodge test and the Carba NP test for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates. Bulletin of Microbiology 50: 1-10.

## BİLDİRİLER

1. **Uluçam Atay G**, Bayramoğlu G, Tosun İ. *bla*<sub>OXA-23-like</sub> Geni Taşıyan *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının European Clones I-II-III ile İlişkilerinin PFGE ve MLST Yöntemleri ile Araştırılması, Uluslararası 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, SS-218, 4-8 Kasım 2018, Antalya, Türkiye.
2. Durukan İ, **Uluçam Atay G**, Cora M, Sağlam Ertunga N, Kılıç AO. Mağaralardan İzole Edilmiş ve Antibiyotik Direnç Geni Taşıyan Gram-Negatif Bakterilerin MALDI-TOF MS ve 16s rRNA Dizi Analizi ile Tanımlanması, Uluslararası 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, SS-048, 4-8 Kasım 2018, Antalya, Türkiye.
3. **Uluçam Atay G**, Bayramoğlu G, Tosun İ. Investigation Of Oxacilinase Resistance Genes in Clinical Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates, 10th Balkan Congress of Microbiology, November 16th-18th, 2017, Sofia, Bulgaria.
4. **Uluçam Atay G**, Cora M, Durukan I, Sağlam Ertunga N, Kılıç AO. Screening of Antibiotic Resistance Genes in Gram Negative Bacteria Isolated From Caves, 10th Balkan Congress of Microbiology, November 16th-18th, 2017, Sofia, Bulgaria.
5. Cora M, Durukan İ, **Uluçam G**, Khorshitalab M, Nas SS, Kılıç AO. Atık Sulardan İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Tartışmalı poster, 16-22 Kasım 2016, Antalya, Türkiye.

6. Bayramoğlu G, **Uluçam G**, Gençoğlu Özgür Ç. Karbapenemaz Üreten Enterobacteriaceae Suşlarının Tanımlanmasında Karbapenem İnaktivasyon Yönteminin Değerlendirilmesi, 31. Ankem Akılcı Antibiyotik Kullanım Kongresi, 04-08 Mayıs 2016, Bodrum, Türkiye.
7. Bayramoğlu G, **Uluçam G**, Gençoğlu Özgür Ç, Kiliç AO, Aydın F. Enterobacteriaceae İzolatlarında Karbapenemazların Saptanmasında Modifiye Hodge Testi ve Carba NP Testlerinin Karşılaştırılması, 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, SS-09,18-22 Kasım 2015, Antalya, Türkiye.
8. Bauer KJ, Vranckx K, Ruffing U, **Uluçam G**, Kaase M, Herrmann M, von Müller L. Ready-to-use analysis of carbapenemase activity using MALDI-ToF in combination with an automated interpretation software, ECCMID, P0153, 25-28 April 2015, Copenhagen, Denmark.
9. Bauer KJ, Ruffing U, **Uluçam G**, Velten D, Kaase M, Vranckx K, Herrmann M, von Müller L. Fast and standardized detection of carbapenemase activity using MALDI-TOF in combination with an optimized workflow using ready-to-use reagents and an automated interpretation software, 66. Jahrestagung der DGHM, 05.–08. Oktober 2014, Dresden, Germany.
10. **Uluçam G**, Bayramoğlu G, Tosun İ, Kaklıkkaya N, AYDIN F. *Acinetobacter baumannii* complex Klinik İzolatlarında Karbapenem Direncinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması, 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2012, Aydın, Türkiye.

## PROJELER

1. Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojisinin Araştırılmasında Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması, BAP06, TDK-2016-5654, Araştırmacı.
2. Mağaralardan İzole Edilmiş Gram Negatif Bakterilerde Antibiyotik Direnç Genlerinin Fonksiyonel ve Genetik Karakterizasyonu, BAP Hızlı Destek, THD-2017-6712, Araştırmacı.

## ÖDÜLLER/TEŞVİKLER/BURSLAR

1. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Konaklama Bursu, 4-8 Kasım 2018.



2. 10th. Balkan Congress of Microbiology, Young Scientist Grant, 16-18 Kasım 2017.
3. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Konaklama Bursu, 18-22 Kasım 2015.

