T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACİNETOBACTER BAUMANNİİ* İZOLATLARINDA SINIF D BETA LAKTAMAZ VARLIĞININ GENOTİPİK YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Dr. İclal AĞAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülkü ALTOPARLAK

ERZURUM-2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İLGİ: 09.01.2019 tarih ve 42190979-929-E.1900008072 sayılı yazınız.

TIPTA UZMANLIK TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi Arş.Gör.Dr.İclal AĞAN'ın "Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Sınıf D beta laktamaz Varlığının Genotipik Yöntemle Araştırılması" konulu tezini incelemek üzere oluşturulan tez jürisine üye olarak seçildiğimizin ilgi yazınızla bildirilmesi üzerine jüri üyeleri, 14.01.2019 tarihinde toplanmış ve ilgili öğrenci tez savunmasına alınmıştır.

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunmasının tamamlanması sonucunda adı geçenin tezi jüri üyelerince oy birliği ile kabul edilmiştir.

Bilgilerinize arz ederiz.

Prof.Dr.Selahattin ÇELEBİ
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Başkanı
Jüri Başkanı
14.01.2019

Prof.Dr.Ülkü ALTOPARLAK
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi
Jüri Üyesi
14.01.2019

Dr.Öğr. Üyesi Aytekin ÇIKMAN
Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi
Jüri Üyesi
14.01.2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **iv**
ÖZET ..... **v**
ABSTRACT ..... **vii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. *Acinetobacter* Cinsi Bakteriler 3
2.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma 3
2.1.2. Türlerin Tanımlanması 4
2.1.3. Epidemiyoloji 6
2.2. *Acinetobacter baumannii*; Mikrobiyolojik ve Klinik Özellikleri 8
2.2.1. Patogenez ve Virulans Faktörleri 8
2.2.2. Enfeksiyonları 13
2.2.3. Tedavi 15
2.2.4. İlaç Direnci 17
2.2.4.1. Karbapenemlere direnç 17
2.2.4.1.1. Enzimatik Olmayan Mekanizmalar 17
2.2.4.1.1.1. Penisilin Bağlayan Proteinler 18
2.2.4.1.1.2. Dışa Atım Pompaları 18
2.2.4.1.1.3. Dış Membran Proteinleri (OMP) 19
2.2.4.1.2. Beta Laktamazlar 19
2.2.4.1.2.1. Sınıf A Beta Laktamazlar 19
2.2.4.1.2.2. Sınıf B Beta Laktamazlar 20
2.2.4.1.2.3. Sınıf C Beta Laktamazlar 22
2.2.4.1.2.4. Sınıf D Beta Laktamazlar 22
2.3. Karbapenemaz Tespitinde Kullanılan Yöntemler 28
2.3.1. Fenotipik Yöntemler 28
2.3.2. Biyokimyasal Yöntemler 29
2.3.3. Genotipik Yöntemler 30

3. GEREÇ VE YÖNTEM 32
3.1. Gereçler 32
3.1.1. Besiyerleri 32
3.1.2. Kimyasallar ve Ayıraçlar 32
3.1.3. Kullanılan Kit ve Antibiyotik Diskleri 32
3.1.4. DNA İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Kit, Malzeme ve Cihazlar 33
3.2. Çalışma Grubu 33
3.3. İzolatların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri 34
3.4. İmipenem ve Meropenem Duyarlılığının Standart Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Belirlenmesi 35
3.5. OXA Karbapenemazların PCR Yöntemiyle Araştırılması 36
3.5.1. *Acinetobacter Baumannii* İzolatlarından DNA Ekstraksiyonu 37
3.5.2. PCR Yöntemi 37
3.5.2.1. OXA Tipi Karbapenemazların Tespitinde Kullanılan Primerler 37
3.5.2.2. PCR Reaksiyon Karışımı 38
3.5.2.3. Amplifikasyon 39
3.5.2.4. PCR Ürünlerinin Analizi 41
3.5.2.5. Sekans Analizi 42
4. BULGULAR 43
4.1. *A. baumannii* İzolatlarının İzole Edildiği Materyallerin Dağılımı 43
4.2. *A. baumannii* İzolatlarının Gönderildiği Servislerin Dağılımı 43
4.3. *A. baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları 44
4.3.1. Otomatize Sistemle Elde Edilen Antibiyotik Duyarlılıkları 44
4.3.2. Mikrodilüsyon Yöntemiyle Elde Edilen Antibiyotik Duyarlılıkları 45
4.4. Karbapenem Dirençli *A.baumannii* İzolatlarının PCR'de $bla_{\text{OXA-23}}$, $bla_{\text{OXA-24}}$, $bla_{\text{OXA-51}}$, $bla_{\text{OXA-58}}$, $bla_{\text{OXA-143}}$ Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu 46
4.4.1. Karbapenem Dirençli A.*baumannii* İzolatlarında PCR ile Saptanan Gen Bölgelerinin Dağılımı 48
5. TARTIŞMA 52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 60
7. KAYNAKLAR 61

EKLER7 ..... **77**
EK-1 ETİK KURUL ONAY FORMU **77**

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında ve eğitimim süresince bana destek olan sayın danışman hocam Prof. Dr. Ülkü ALTOPARLAK'a,

Tez hazırlık aşamasındaki desteklerinden dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ'ye ve hocalarım Prof. Dr. Osman AKTAŞ, Prof. Dr. Halil YAZGI, Prof. Dr. Hakan USLU, Prof. Dr. M. Hamidullah UYANIK, Dr. Öğr. Üyesi Özgür ÇELEBİ ve Dr. Öğr. Üyesi Erkan ÖZMEN'e, çalışmanın PCR aşamasında laboratuarlarını bizlere açan desteğini ve bilgisini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Hakan AYDIN'a, hayatım boyunca her zaman bana inanan, destek veren, saygıdeğer annem, babam ve canım kardeşimlerime tüm kalbimle teşekkür ederim.

Dr. İclal AĞAN

ÖZET

Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Genotipik Yöntemle Araştırılması

Amaç: *Acinetobacter baumannii* tüm dünyada hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Özellikle son yıllarda çoklu ilaç direncine sahip gram negatif bakterilerin tedavisinde son çare olarak kullanılan karbapenemlere giderek artan direnç, *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı enfeksiyonların tedavisini de oldukça zorlaştırmıştır. Bu tür enfeksiyonlarda altta yatan genetik direnç mekanizmalarının tespiti, özellikle yoğun bakım ünitesinde nozokomiyal enfeksiyonların kontrolü ve önlenmesi için uygun önlemlerin alınmasına yardımcı olabilir. Çalışmamızın amacı, *A. baumannii* karbapenem direncinden sorumlu OXA tipi karbapenemazları tespit edip hem hastanemiz hem de ilimiz için epidemiyolojik veri oluşturmak ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin planlanmasına katkı sağlamaktır.

Yöntem: Ocak 2018- Eylül 2018 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde çeşitli kliniklerde yatarak tedavi gören hastalardan izole edilen 78 *A. baumannii* izolatı konvansiyonel metodlar ve otomatize sistemle [BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ve Vitek-2 (bioMerieux, ABD)] tanımlandı. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları otomatize sistem, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve Broth mikrodilüsyon yöntemiyle çalışıldı. Her üç yöntemde de karbapeneme dirençli bulunan izolatlarda DNA ekstaksiyonu sonrası konvansiyonel PCR ile $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$, $bla_{\text{OXA51-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$ ve $bla_{\text{OXA-143-like}}$ gen bölgeleri araştırıldı. Pozitif bulunan gen bölgeleri çift yön sekanslama ile doğrulandı.

Bulgular: Çalışmaya dâhil edilen izolatların tamamı siprofloksasin, imipenem ve meropeneme dirençli bulunmuştur. İn-vitro en etkin antibiyotik kolistin ikinci sırada ise trimetoprim-sulfametoksazol olarak tespit edilmiştir. İzolatların %98.7'sinde (77) $bla_{\text{OXA-23-like}}$ ve %98.7'sinde (77) $bla_{\text{OXA-51-like}}$ gen bölgeleri pozitif bulunmuştur. İzolatların %97.4'ünde (76) hem $bla_{\text{OXA-23-like}}$ hem de $bla_{\text{OXA-51-like}}$ pozitif tespit edilmiştir.

Test edilen izolatların hiçbirinde $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$ $bla_{\text{OXA-143-like}}$ gen

bölgeleri tespit edilememiştir.

Sonuç: Karbapenem direncine neden olan gen bölgesinin aktarılabilir veya yapısal olduğunun tespit edilmesi ilerde olabilecek salgınların önüne geçmek için önemlidir. Bizim hastanemizde *A. baumannii* izolatlarında sınıf D beta-laktamazlardan plazmidle aktarılabilir bir gen bölgesi olan $bla_{\text{OXA-23-like}}$ baskın olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler*: Acinetobacter baumannii*, karbapenem direnci, sınıf D betalaktamaz

ABSTRACT

Investigation of Class-D Beta-lactamases in Carbapenem Resistance *Acinetobacter baumannii* Isolates by genotypic method

Aim: *Acinetobacter baumannii* is one of the most important agents of hospital-acquired infections worldwide. In recent years, increasing resistance to carbapenems, which have been used as a last resort in the treatment of gram-negative bacteria with multiple drug resistance, has made the treatment of *Acinetobacter baumannii* infections very difficult. Detection of underlying genetic resistance mechanisms in such infections may help to take appropriate measures to control and prevent nosocomial infections, especially in the intensive care unit. The purpose of that study, determine OXA type carbapenems which is responsible of the *Acinetobacter baumannii* resistance, also generate epidemiological data for our hospital and our city and to contribute to the planning of infection control measures.

Method: Seventy-eight *A. baumannii* isolates which were taken from hospitalized patients who are in different clinics of Atatürk University Medical Faculty Hospital, between January 2018-September 2018, were identified by conventional methods and automatize systems [BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ve Vitek-2 (bioMerieux, ABD)]. Isolates' antimicrobial sensitivity were investigated by automatize system, Kirby-Bauer disk diffusion and microdilution method. After the extraction of DNA, on the isolates which are resistance to carbapenems in all three methods, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$, $bla_{\text{OXA51-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$ and $bla_{\text{OXA-143-like}}$ gene regions were investigated. Gene regions which found out positive were confirmed by duplex sequence.

Findings: All of the isolates which were included study was resistant to ciprofloxacin, imipenem and meropenem. Study detected that, invitro is the most effective antibiotic colistin, trimethoprim-sulfamethoxazole is second effective one. Isolates' 98.7% (77) $bla_{\text{OXA-23-like}}$ and 98.7% (77) $bla_{\text{OXA-51-like}}$ gene regions were detected as positive. Isolates 97.4% (76) in terms of both $bla_{\text{OXA-23-like}}$and $bla_{\text{OXA-51-like}}$ were determined positive. Gene regions; $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$ $bla_{\text{OXA-143-like}}$ could not be detected none of the testified isolates.

Conclusions: It is important to determine whether the gene region that causes carbapenem resistance is transferable or structural, and to prevent future outbreaks. In our hospital, *A. baumannii* isolates were identified as class D carbapenemase OXA-23 which is a region of transferable gene in plasmid**.**

Keywords*: Acinetobacter baumannii,* carbapenem resistance, Class D beta-lactamase

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 2.1. *Acinetobacter* Cinsinin Taksonomisi 4
Tablo 2.2. *Acinetobacter* Türlerinin Biyokimyasal Reaksiyonları ve Üreme Özellikleri 7
Tablo 2.3. İnsersiyon Sekansları ve İlişkili Oldukları Direnç Genleri 23
Tablo 3.1. *Acinetobacter* İzolatları İçin EUCAST'ın Önerdiği Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Ve Zone Çapları 35
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri 38
Tablo 3.3. PCR Reaksiyonu İçin Hazırlanan Master Mix Karışımı 39
Tablo 3.4. *bla*$_{\text{OXA-23}}$ Gen Bölgesinin PCR Metodundaki Sıcaklık Döngüleri 40
Tablo 3.5. *bla*$_{\text{OXA-24}}$ Gen Bölgesinin PCR Metodundaki Sıcaklık Döngüleri 40
Tablo 3.6. *bla*$_{\text{OXA-51}}$ Gen Bölgesinin PCR Metodundaki Sıcaklık Döngüleri 40
Tablo 3.7. *bla*$_{\text{OXA-58}}$ Gen Bölgesinin PCR Metodundaki Sıcaklık Döngüleri 40
Tablo 3.8. *bla*$_{\text{OXA-143}}$ Gen Bölgesinin PCR Metodundaki Sıcaklık Döngüleri 41
Tablo 4.1. VİTEK-2 Sistemi İleTest Edilen A. *baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları 45
Tablo 4.2. PHOENİX Sistemi İle Test Edilen *A. baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları 45
Tablo 4.3. İmipenem ve Meropenem MİK Değerlerine Göre Suşların Dağılımı 46
Tablo 4.4. *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40,}}$ *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ Genlerinin Pozitiflik Oranları 48
Tablo 4.5. *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40}}$, *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ genlerinin Dağılımı 49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. MHA ve EMB Agar'da *A.baumannii* Kolonileri 5
Şekil 3.1. ABI Veriti Thermal Cycler 39
Şekil 3.2. Jel Elektroforez Düzeneği 42
Şekil 4.1. Hastalardan Gönderilen Materyallerin Dağılımı 43
Şekil 4.2. *A.baumannii* Suşlarının Servislere Göre Dağılımı. 44
Şekil 4.3. Meropenem Antibiyotiğinin Mikrodilüsyonla Çalışılması 46
Şekil 4.4. *bla*$_{\text{OXA-23}}$ Gen Bölgesinin PCR Sonrası Jel Görüntüsü 47
Şekil 4.5. *bla*$_{\text{OXA-23}}$ Gen Bölgesinin PCR Sonrası Jel Görüntüsü 47

KISALTMALAR

A. baumannii	:	*Acinetobacter baumannii*
ACB kompleks	:	*A.calcoaaceticus- A.baumanniii* kompleks
ADCs	:	*Acinetobacter*-Derived Cephalosporinases
BHI	:	Brain Heart Infüzyon
CDC	:	Centers For Disease Control And Prevention
CFU	:	Koloni Oluşturan Ünite
CHDL	:	Karbapenem Hidroliz Eden Sınıf D B-Laktamaz
CLSI	:	Clinical And Laboratory Standarts Institute
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DPS	:	Dipikolinik Asit
ECDC	:	European Centre For Disease Prevention and Control
EDTA	:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMB	:	Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose
FDA	:	Amerikan İlaç Ve Gıda Dairesi
FTIR	:	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
EMB	:	Eozin Metilen Blue Agar
EPS	:	Ekstrasellüler Polisakkaritler
EUCAST	:	European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing
GSBL	:	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
IS	:	İnsertional Sequence
IMP	:	İmipenem
MER	:	Meropenem
MDR	:	Multi Drug Resistant
KAMHB	:	Katyon Ayarlı Mueller-Hinton-Buyyon
KHO	:	Karbapenem Hidrolize Eden Oksasilinazlar
KIA	:	Kligler Iron Agar
LPS	:	Lipopolisakkaridler
MALDITOF-MS	:	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Kütle Spektrofotometrisi

µg	:	Mikrogram
MBL	:	Metallo Betalaktamazlar
MHB	:	Mueller Hinton Broth
MİK	:	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ORF	:	Open Reading Frame
OTK	:	OXA-Tipi Karbapenamazlar
OMP	:	Outer Membran Protein
OmpA	:	Outer Membrane Protein A
PBP	:	Penisilin Bağlayan Protein
PDR	:	Pandrug Resistant
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik Asit
THT	:	Triton Hodge Testi
TNF	:	Tumor Necrosis Factor
TLR	:	Tool Like Reseptor
TSI	:	Triptik Sugar Iron
UHESA	:	Ulusal Hastane Enfeksiyonları Surveyans Ağı
XDR	:	Extensively Drug Resistant
YBÜ	:	Yoğun Bakım Ünitesi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Acinetobacter türleri doğada yaygın olarak bulunan, cansız yüzeylerde uzun süre canlı kalabilen, fırsatçı Gram negatif kokobasillerdir. Toplum kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonları çok nadirdir ve bu suşların çoğu antibiyotiklere duyarlıdır. Hastane ortamında çeşitli yüzeylerde kolonize olabilme, kuruluğa ve dezenfektanlara dirençli olma özellikleri nedeniyle hastane kaynaklı infeksiyonlarda major patojenler arasında yer almaktadırlar. *Acinetobacter* türleri pnömoni (sıklıkla endotrakeal aspirat ve trakeostomiyle ilişkili), sepsis, yara yeri enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, menenjit, peritonit sporodik olarak da konjuktivit, sinovit gibi enfeksiyonlara neden olabilmektedir (1). Türkiye'de sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlarda, enfeksiyon türüne göre etken dağılımının bildirildiği Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı 2017 raporunda, *Acinetobacter* türlerinin %20.99 ile en sık etken olduğu belirtilmiştir (2). Çeşitli ülkelerden yapılan sürveyans çalışmaları *Acinetobacter baumannii* suşları arasında karbapenem direncinin düzenli bir şekilde yükseldiğini, son on yılda Avrupa, Kuzey Amerika ve Latin Amerika'da kademeli olarak arttığını göstermektedir (3). 25 Şubat 2017'de Dünya Sağlık Örgütü tarafından yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesine kılavuzluk etmek için antibiyotik dirençli bakteriler küresel öncelik listesi yayınlanmış ve karbapenem dirençli *Acinetobacter*ler en öncelikli "kritik" grupta yer almıştır (4). Günümüzde karbapenem dirençli *A. baumannii*, antibiyotik tedavisi için seçeneklerin sınırlı olması nedeniyle, önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir.

A. baumannii izolatlarının karbapenemlere direnç geliştirmesinde en yaygın mekanizma OXA-tip karbapenemazlar olarak da bilinen karbapenem-hidrolize edici sınıf D β-laktamazların ekspresyonu ile olmaktadır. Ancak sınıf A β-laktamazlar, sınıf B β-laktamazlar (Metallobetalaktamazlar) ve sınıf C β-laktamazlar da karbapenem direncine katkıda bulunmaktadır (5). *A. baumannii'*de altı farklı OXA tipi karbapenemaz ailesi tanımlanmıştır. Bunlar; intrinsik olarak bulunan OXA-51 ailesi ile kazanılmış OXA-23, OXA24/40, OXA58, OXA143 ve OXA235 aileleridir (6). OXA tipi karbapenamazları tespit eden duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek fenotipik bir test günümüze kadar geliştirilememiştir. Bu enzimler ancak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler kullanılarak

saptanabilmektedir (7). Karbapenem direncine neden olan genlerin tespiti ve aktarılabilir bir gen olup olmaması hastane enfeksiyonlarını önleme ve kontrol için önem taşımaktadır. Günümüze kadar hastanemiz *A. baumannii* izolatlarında karbapenemaz tiplerine yönelik kapsamlı bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasının amacı, hastanemizde yatan hastalardan izole edilen hastane enfeksiyonu olarak kabul edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında OXA tipi beta-laktamazların (*bla*$_{\text{OXA-23-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-24-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-58-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-143-like}}$) varlığının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter* cinsi bakteriler

2.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Acinetobacter'ler 1800'lü yılların sonunda bu bakterilerin morfolojik özelliklerine ilk kez dikkat çeken iki bilim adamının ismi gözönüne alınarak 'Morax-Axenfeld basilleri' olarak adlandırılmışlardır. Daha sonraları *Diplococcus mucosus, Micrococcus calcoaceticus, Alcaligenes haemolysans, Mima polymorpha, Moraxella lwoffi, Herellea vaginicola, Bacterium anitratum, Moraxella lwoffi var. glucidolytica, Neisseria winogradskyi, Achromobacter anitratus, Achromobacter mucosus* olarak farklı adlandırmalar yapılmıştır. 1954'de Brisou ve Pre'vot (3) morfolojik olarak benzer özelliklere sahip bu mikroorganizmalar arasından bazılarının hareketsiz olduğunu gözlemlemiş ve Yunanca hareketsiz anlamına gelen '*Akinetos*' sözcüğünden esinlenerek bu bakterilere '*Acinetobacter*' adını vermişlerdir. 1968 yılında Baumann ve arkadaşları (8) kapsamlı bir araştırma yayınlayarak yukarıda bahsedilen türlerin önerilen *Acinetobacter* sınıfı içerisinde yer aldığı sonucuna varmışlardır. Bouvet ve Grimont (9), 1986 yılında *Acinetobacter* cinsi içinde DNA-DNA hibridizasyonlarına ve besin ihtiyaçlarına göre 12 farklı grubu (genomotür) ayırt ederek yeni bir sınıflandırma oluşturmuşlardır. 1989'da Tjenberg ve Ursing (10), 13'den 15'e kadar kodladıkları üç ilave DNA grubu daha tanımlamışlardır. Yine aynı tarihlerde Bouvet ve Jeanjean (11) proteolitik *Acinetobacter* türleri içinde beş DNA grubunu tanımlamış ve 13'den 17'ye kadar numaralandırmışlardır. Ancak Tjenberg ve Ursing tarafından tanımlanan DNA gruplarından ikisi, Bouvet ve Jeanjean tarafından tanımlanan DNA gruplarından fenotipik olarak farklıdır, bu durum farklı türlere aynı numara verilmesine neden olmuştur. 1971'de bu bakteriler *Moraxellaceae* ailesi içinde *Acinetobacter* cinsi olarak sınıflandırmadaki yerlerini almışlardır (Tablo 2.1) (12).

Orijinal *Acinetobacter* genomotürlerinin çoğu isimlendirilmiş olup en son eklenen *Acinetobacter piscicola* ile beraber tanımlanmış 58 tür bulunmaktadır (13). *Acinetobacter baumannii* (genomotür 2), *Acinetobacter pittii* (*Acinetobacter genomotür 3*), *Acinetobacter nosocomialis* (*Acinetobacter genomotür 13TU*), *Acinetobacter calcoaceticus* (*Acinetobacter genomotür 1*) genotipik ve fenotipik

olarak birbirine benzedikleri için *Acinetobacter calcoaceticus-A.baumannii kompleks* olarak gruplandırılmışlardır (14, 15).

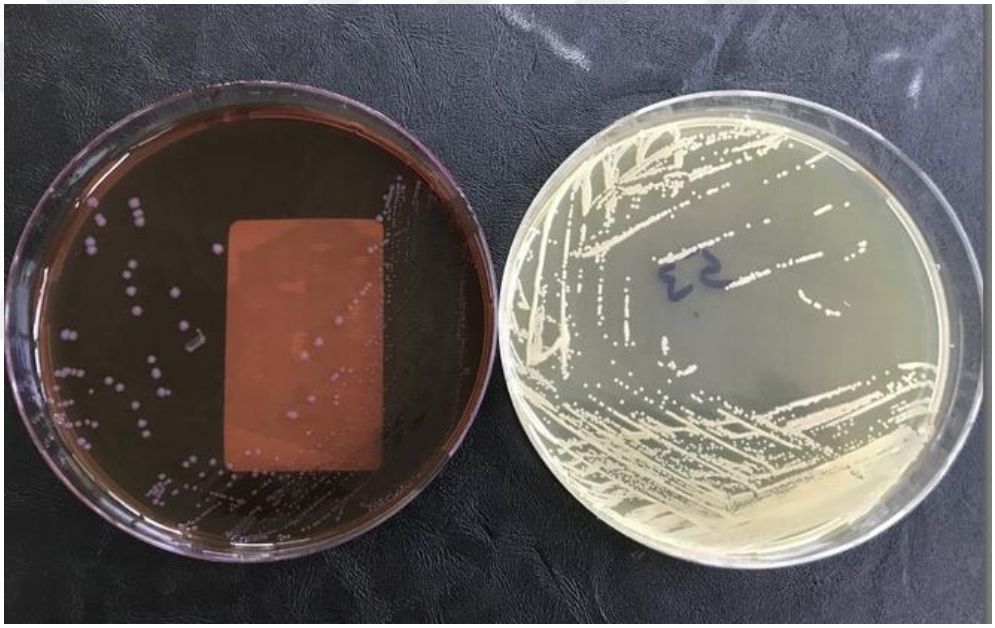
Tablo 2.1. *Acinetobacter* Cinsinin Taksonomisi.

Alem	*Bacteria*
Şube	*Proteobacteria*
Sınıf	*Gamma proteobacteria*
Takım	*Pseudomonadales*
Familya	*Moraxellaceae*
Cins	*Acinetobacter*

2.1.2. *Acinetobacter* Türlerinin Tanımlanması

Acinetobacter cinsi bakteriler; gram negatif, zorunlu aerobik, hareketsiz, nonfermentatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, indol negatif, nitratları redükte etmeyen, üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif besiyerinde asit oluşturmayan, 35-37˚C'de üremeyi seven ve DNA G+C içeriği %39-47 olan bakterilerdir. Flajellaları yoktur, fimbriaları vardır. Logaritmik üreme fazında 1-1.5 x 1.5-2.5 μm boyutlarında basil olarak görülürler. Diğer dönemlerde ise kok, kokobasil, ikişerli, küme halinde veya kısa zincir morfolojısinde gözlenebilirler. Bu benzer morfolojik özellikleri nedeniyle *Haemophylus* ve *Neisseria* türleri ile karıştırılabilirler. *Acinetobacter*'ler, bu sınıflardan oksidaz reaksiyonunun negatif olması ile ayrılırlar (16). *Acinetobacter* türlerinin glukozu fermente edememesi, nitratı indirgeyememesi ve anaerobik ortamda üreyememesi *Enterobacteriales*'den ayrılmasına olanak sağlar. *Acinetobacter* cinsi bakteriler rutin mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan Eozin Metilen Blue (EMB) agar, Kanlı agar, Mueller Hinton agar (Şekil 2.1) gibi pek çok besiyerinde üreyebilir. Gerek klinik örneklerden, gerekse çevreden *Acinetobacter* türlerini izole edebilmek amacıyla seçici ve ayırt edici besiyerleri geliştirilmiştir. Bu sebeple geliştirilen besiyerleri diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe eden Bromkrezol moru, safra tuzları, bazı şekerleri içeren Herellea agar, çeşitli antibiyotikleri içeren Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM) ve Holton's agar besiyerleridir. Besiyerlerindeki kolonileri çoğunlukla pürüzsüz, bazen mukoid, grimsi beyaz kolonilerdir. MacConkey agarda iyi ürer ve laktoz negatif koloniler yaparlar. Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve Kligler Iron Agar besiyerinde (KIA) dip kısımda üremezler. Fenotipik ve genotipik

olarak ilişkili beş tür olan *A. baumanniii, A. nosocomialis, A. pitti, A. calcoaaceticus, A. seifertii*'nin yanı sıra 1 ve 3 arasındaki genomotürler, *A. calcoaaceticus- A. baumanniii* kompleksi (ACB) kompleksi olarak adlandırılmışlardır. ACB kompleksine ait sakkarolilitik suşların fenotipik testlerle ayrımlarının zor olması nedeniyle çoğu laboratuvar *A. calcoaaceticus-A. baumanniii* kompleksi olarak bildirim yapar. *A. baumanniii* insan klinik örneklerinden en sık izole edilen türdür, onu *A.lwoffi, A.haemolyticus, A.johnsonii, A. pittii* ve *genomotür 6* takip eder. *A.baumanniii* sakkarolitiktir ve Oksidasyon/Fermentasyon (OF) besiyerlerinin çoğunu asitleştirir. Özellikle laktozdan (%1-%10 konsantrasyonlarda) hızlı asit oluşturmasıyla kesin tanısı yapılır (17).



Şekil 2.1. MHA (sağda), EMB Agar (solda) *A. baumannii* Kolonileri.

Sık görülen *Acinetobacter* türlerinin ayrımında kullanılan biyokimyasal özellikler Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tür tanımlamasını manuel ya da yarı otomatize olarak yapan *API20 NE, Vitek 2:0, Phoenix* ve *MicroScan WalkAway* sistemleri de *A. baumannii* tanımlanmasında kullanılmaktadır. Ülkemizde de yaygın olarak kullanılan ve özellikle karbon asimilasyon testlerine dayanan API 20 NE (BioMerieux) sisteminin veri tabanı sadece *A. baumannii, A. haemolyticus* ve *A. lwoffii, A. junii, A. calcoaceticus* ve *A. johnsonii'*yi içermekte ancak *A. radioresistens* ve diğer genomik tipleri kapsamamaktadır. Genomik tipler arasındaki farklılıkların birbirine çok yakın olması

nedeniyle bu sistem hassasiyet açısından problemlidir ve sonuçları gerçekçi değildir (18).

*Acinetobacter'*leri tür düzeyinde ayırmak için çeşitli genotipik testler uygulanmaktadır. En yaygın kullanılanlar PCR, amplifiye rRNA geni restriksiyon analizi (*ANDRA*), türe özgül DNA bölgelerinin (örn; oksasilinazlar) amplifikasyonu ve dizi analizi, 16S-23S rRNA ‘’intergenic spacer’’dizilerinin restriksiyon analizi, kısmi *rpoB* gen dizi analizi, *FTIR* (*Fourier transform infrared spectroscopy*) ve Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi – *matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (*MALDI-TOF MS*) yöntemleridir. Şu an için kullanılan yöntemler içinde *MALDI-TOF MS* rutin işleyişe dâhil edilebilecek en pratik yöntem olarak görülmektedir (12). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ACB kompleksi de dâhil *Acinetobacter* türlerini hızlı ve doğru tanımladığını göstermiştir (19).

2.1.3. Epidemiyoloji

Su ve toprakta yaygın olarak bulunan *Acinetobacter*’ler, son otuz yıl içinde patojen olup olmadığı sorgulanan bir bakteri olmaktan çıkıp tüm dünyada sık görülen ve kontrol altına alınması zor olan bir hastane enfeksiyonu etkeni haline gelmiştir. Cinsin farklı türleri genellikle farklı habitatlarla ilişkilidir (20). *A. pitti* su, toprak, sebzeler ve insan derisi; *A. johnsonii* ve *A. haemolyticus* su, atık su, toprak, insan derisi ve insan dışkısı; *A. lwoffii* ve *A. radioresistens* insan derisi; *A. guillouiae* su, toprak, sebzeler ve insan bağırsaklarında bulunur (21). *A. baumanniii*’nin hastane dışı kolonizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada su örneklerinde %6.9, inek sütü örneklerinde %2.7, inek eti örneklerinde %8, peynir örneklerinin %14.3 ve hayvan örneklerinin %7.7’sinde tespit edilmiştir (22). Nozokomiyal veya toplum kökenli *Acinetobacter* enfeksiyonlarının ortaya çıkması, olumsuz çevresel koşullara yüksek adaptasyonunun bir sonucudur. *Acinetobacter sp*. nemli ve kuru yüzeylerde hayatta kalabilmektedir. *A. lwoffii'*nin son izolatlarının 1970’li yıllarda alınan izolatlara kıyasla radyasyona karşı nispeten dirençli oldukları saptanmıştır (21, 23). Bu, *A. lwoffii'*nin özellikle yoğun bakım ünitelerinde (ICU) gama ışımasıyla sterilize edilen tıbbi cihazlarda kalıcılığı ile ilgili endişeleri ortaya çıkarmaktadır (21).

Tablo 2.2. *Acinetobacter* Türlerinin Biyokimyasal Reaksiyonları ve Üreme Özellikleri (18).

Organizma	**Genomik tür**	**37^{0}C'de üreme**	**44^{0}C'de üreme**	**Hemoliz**	**Jelatin hidrolizi**	**OF Dekstroz**	**Arginin**	**Malonat**
A. johnsonii	7	-	-	-	-	-	D (35)	D (13)
A. baumanniii	2	+	+	-	-	+	+	+
A. haemolyticus	4	+	-	+	+	D (52)	+	-
Acinetobacter sp.	6	+	-	+	+	D (66)	+	-
A. bereziniae	10	+	-	-	-	+	-	-
A. calcoaceticus	1	+	-	-	-	+	+	+
A. pittii	3	+	-	-	-	+	+	D
A. radioresistens	12	+	-	-	-	D (33)	+	+
A. junii	5	+	-	-	-	-	+	-
A. lwofii	8/9	+	-	-	-	-	+	-
A. guillouiae	11	+	-	-	-	-	-	-

+ ; Suşların %90 veya fazlası pozitif D; Değişken

- ; Suşların %90 veya fazlası negatif OF; oksidatif fermentatif test

Parantez içi sayılar pozitif reaksiyon veren suşların yüzdeleri

A. baumannii sıklıkla ventilatör boruları, arteriyel basınç izleme cihazları, nemlendiriciler, lavabolar, plastik pisuarlar ve respirometreler gibi yeniden kullanılabilir medikal ekipmanlardan izole edilir. Ayrıca sağlık personeli, minder, yastık ve her türlü ventilatör ekipmanı ve nemli ortamlardan da izole edilmiştir (21). Hastaneye yatırılmamış bireylerde taşıyıcılık oranı oldukça düşük olmakla birlikte hastanede izlenen hastalarda özellikle salgın dönemlerinde taşıyıcılık yükselmekte ve boğaz taşıyıcılığının %7-18'e kadar yükseldiği görülmektedir. Özellikle trakeostomili hastalardan alınan sürüntü örneklerinde bu oran %45'e kadar çıkmaktadır (24). *Acinetobacter sp.* hastane çalışanlarının özellikle ciltlerine kolonize olarak taşınan en yaygın gram negatif mikroorganizmadır. Sağlık çalışanlarının bulaşdaki rollerinin araştırıldığı bir çalışmada, doktorların ve hemşirelerin ellerinde %3-23 oranında *Acinetobacter sp.* kolonizasyonu tespit edilmiştir (25). *Acinetobacter* türleri arasında *A. baumannii*, düşük dereceli bir patojen olarak kabul edilmesine karşın dünya çapında hastane kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkili bulunmuş, deri, kan, idrar yolu ve diğer yumuşak dokuların fırsatçı enfeksiyonlarından izole edilmiştir. Irak ve Afganistan'da görev yapan yaralı askerler arasında birçok *A. baumannii* enfeksiyonu bildirildiği için CDC 2004 yılında *A. baumannii* yi "*Iraqibakter*" olarak adlandırmıştır. Çok ilaca dirençli (MDR) *A. baumannii*, savaş bölgelerinden ülkelerine dönen yaralı askerlerden sivil hastanelere yayılmıştır (26). Son yıllarda, özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlar yaparak dikkatleri üzerine çeken bu bakteri başta ülkemiz olmak üzere tüm dünyanın başına dert olmakta; 'multi-drug resistant'(MDR) ve hatta 'pan-drug resistant'(PDR) *A. baumannii* ile gelişen ağır enfeksiyon insidansı her geçen gün artmaktadır. Ülkemizin 2016 Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporu'nda sürveyansı yapılan etken mikroorganizmalar arasında karbapenem dirençli *A. baumannii* hem sayı hem de oran olarak (%72.38) ilk sırada bildirilmiştir (27, 28).

2.2. *Acinetobacter baumannii*; Mikrobiyolojik ve Klinik Özellikleri

2.2.1. Virulans Faktörleri ve Patogenez

Acinetobacter cinsi bakteriler genel olarak virulansı düşük patojenlerdir. Normal konak savunma mekanizmasına sahip olan bireylerde enfeksiyon oluşturmaları oldukça güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadırlar. Malignite, yanık, konağın savunma sistemini baskılayan

durumlar ve konağın yaşı enfeksiyon gelişimini kolaylaştıran bazı faktörlerdir. Ağır cerrahi girişim, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma, uzun süreli antibiyotik kullanımı, damar içi kateterizasyon, enteral beslenme, idrar sondası, endotrakeal tüp ve trakeostomi varlığı başlıca risk faktörleridir (29).

Bu organizmalar genellikle nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili olmasına rağmen nadiren toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak özellikle sıcak (yaz) ve nemli aylarda diyare salgınları ve pnömoni olgularından izole edilmiştir. *A. baumannii* dünya çapında önemli bir nozokomiyal patojen olup buna *A. lwoffii* ve *A. haemolyticus* bakterileri de eklenmiştir (23, 30). *Acinetobacter sp.* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar arasında bakteriyemi, ventilatör ilişkili pnömoni, menenjit, kolanjit, peritonit, üriner sistem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, ventrikülit, infektif endokardit yer almaktadır. Bakteri aynı zamanda deri ve solunum yollarında kolonize halde bulunabilir ve uzun süre hastanede kalmaya bağlı olarak kolonizasyon artmaktadır. Kolonizasyon enfeksiyon oluşumundan çok daha sık görülmektedir. Yapılan çalışmalar patojen suşların immun baskılanmış hayvanlarda %75-100 oranlarında ölümcül enfeksiyonlara neden olduğunu göstermiştir (31).

A. baumannii immunpatogenezinde çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Öncelikle *A. baumannii* sentinel reseptörlerce algılanır ve immun yanıt başlatılır. Bakteriyel patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP) konakçı hücreler üzerindeki doğal immün reseptörlere bağlanır ve hücre içi sinyal yollarının aktive olmasıyla inflamatuar mediyatörler salınır. Sitokin ve kemokin salgılanmasına yol açan çok sayıda enflamatuar sinyal kaskadı olduğu bilinmesine rağmen, *A. baumannii*'de bulunan PAMP'ların özellikle NF-κB ve MAPK yollarını aktive ettiği bilinmektedir. Bu yolların uyarımı ile makrofaj enflamatuar protein 2 (MIP-2), monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1) keratinosit türevi kemokin (KC)/IL-8 gibi birçok kemokin ve TNF-β, IL-1β ve IL-6 gibi birçok proinflamatuar sitokin salınır. Birçok Gram-negatif bakteride olduğu gibi, *A. baumannii'de* bulunan LPS'ler (lipopolisakkarid) de immün yanıtı tetikler. LPS'ler makrofajların TLR-4 ve ko-reseptörü CD-14 tarafından tanınır ve NF κ-B aktivasyonu, MIP-2 ve KC/IL-8 salgılanması ile ortama nötrofiller toplanmaya başlar. LPS'nin üç bileşeninden (lipid A, çekirdek polisakkarit ve O-antijen), lipit A molekülün bağışıklık aktive edici esas kısmıdır. *A. baumannii*'ye karşı

inflamatuar yanıt, sadece TLR-4'e bağlı görünmemektedir. Katkısı tam olarak açıklanmasa da TLR-2'nin de inflamatuar yanıtta etkisi vardır. TLR-2 eksikliği olan farelerde ortama nötrofil akışının daha iyi olduğu *A.baumannii'nin* daha iyi temizlendiği pro-inflamatuar yanıtın azaldığı görülmüştür. Bu verilerle *A.baumannii* enfeksiyonunda TLR-2 sinyalinin konakçı için zararlı olduğu sonucu çıkarılabilir. *A. baumannii* enfeksiyonuna karşı doğal immun yanıtta nötrofillerin rolü çok önemli olsa da, makrofajlar ve NK hücrelerinin de etkisi vardır. NK hücreleri, KC/IL-8 ekspresyonunu artırır. Lenfositler ve granülositler; defensinler, katelisidinler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) dâhil olmak üzere enfeksiyona yanıt olarak bir dizi antimikrobiyal faktör üretir. ROS ve ilişkili miyeloperoksidazlar β-defensin-2 ve RNS bakteriyi öldürme işleminde rolleri küçük olsa da etkilidir (32, 33).

Kompleman, serumda mikrobiyal yayılımı sınırlayan önemli bir bakterisid bileşendir. İnsan serumunda *A. baumannii*'nin öldürülmesinden alternatif kompleman yolu sorumludur. Bununla birlikte, klinik önemi olan bazı suşlar kompleman aktivitesine dirençli olabilir. *A. baumannii*'nin serum direncinin ardındaki mekanizma üzerinde önemli tartışmalar vardır. Bunlar; alternatif kompleman yolunda görev alan Faktör H'ın bakteriyel aracılı inaktivasyonu, *A. baumannii* tarafından LPS salınımı ve peptidoglikanın penisilin bağlayıcı proteinler tarafından (PBP-7/8) modifikasyonu şeklinde sıralanabilir (34).

Son zamanlarda genomik ve fenotipik analizlerle *A. baumannii*'nin patojenitesinden sorumlu birkaç virülans faktörünü tanımlamasına rağmen, diğer gram-negatif patojenlerdekine kıyasla daha az sayıdadır (35). Enfeksiyon sırasında bakterinin virülansını arttıran tanımlanmış virülans faktörleri şöyle sıralanabilir;

- Dış membran proteinleri
- Biyofilm oluşumu
- Kapsül ve lipopolisakkarid gibi yüzey yapıları
- Fosfolipaz D gibi enzimler
- Dış membran vezikülleri
- Demir kazanım mekanizmaları

Porinler hücre permabilitesiyle ilişkili dış membran proteinleridir. *OmpA, Omp 33-36, Omp 22, CarO* ve *Opr D benzeri* dış membran proteinleri *A. baumannii*'de

bulunan klinik önemi olan porinlerdir. Bunlar içinde en önemli porin olan *OmpA* nın virulans ve patogenezde birçok rolü vardır (26, 36). *OmpA* konak epitel hücrelerindeki mitokondriye ulaşır, sitokrom C ve apoptoz indükleyici faktörü serbestleştirerek apoptozu indükler (37). Fibronektinle etkileşerek adezyon ve invazyonda rol alır. İnsan serumundaki H faktöre bağlanarak bakterinin kompleman bağımlı öldürmeden kaçmasına yardımcı olur (38). Ayrıca *A.baumannii*'nin antibiyotik direncinde de rol oynar. Smani ve arkadaşlarının (39) yaptıkları bir çalışmada, *OmpA* proteini inaktive edilmiş ve sonuç olarak çeşitli antibiyotiklerin (kloramfenikol, aztreonam ve nalidiksik asit) minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. *OmpA*'nın biyofilm formasyonu ve dış membran veziküllerinin biyogenezini düzenlemede de rolleri vardır. Bu sonuçlar *OmpA* proteinini *A. baumannii* enfeksiyonunu önlemek veya yeni antibiyotik geliştirmek için önemli bir protein haline getirmiştir (40). *A. baumannii* sitotoksisitesinde diğer önemli bir protein *Omp 33-36* özellikle insan akciğer epitel hücrelerine adezyon ve invazyonda önemlidir. Son zamanlarda keşfedilen *Omp 22*'nin *A. baumannii* enfeksiyonundaki etkileri tam olarak anlaşılmasa da Huang ve arkadaşları (41) fareler üzerinde *A. baumannii* enfeksiyonunu önlemeye yönelik *Omp 22*'yi antijen olarak kullandıkları aşı çalışmasında yüksek titrelerde IgG düzeylerinin oluştuğunu, farelerin hayatta kalma oranlarının arttığını, serum inflamatuar sitokin seviyelerinin azaldığını gözlemlemişlerdir.

Patogenezdeki en önemli aşamalardan biri de biyofilm oluşumudur. Biyofilm, mikroorganizmaların kendilerinin ürettiği, bir yüzeye ve birbirlerine yapışmalarını sağlayan, organik polimerlerden oluşan bir yapıdır. Bu şekilde bakteriler, hem besinlere daha kolay ulaşmakta, hem de kuruluğa, bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere daha dirençli hale gelmektedirler. Biyofilm oluşturma özelliği bu türün hastane kökenli enfeksiyonlara yol açma yeteneği ve hastane ortamında canlılığını uzun süre sürdürebilmesi ile ilgilidir. *A. baumannii*'de biyofilm oluşumunun farklı aşamalarında yer alan çeşitli faktörler tanımlanmıştır. İlk olarak, hareket ve yeni yüzeylere yayılmayı sağlayan tip IV pili sistemi tanımlanmıştır. CsuA / BABCDE aracılı pili cansız yüzeylere yapışma için gereklidir. Yapışmayı takiben, biyofilm üretimi, polisakkaritpoli-β- (1,6) -N- asetilglukosamin (PNAG) sentezine bağlıdır. Dış zar proteini Bap, biyofilm olgunlaşması ve ökaryotik hücrelere adezyon için

gereklidir. Biyofilm oluşumu ve hareketliliğinin düzenlenmesi BfmSR ve N -açil - homo-serin lakton (AHL) sinyalleri rol alır (34).

Kapsüler polisakkarid ve lipopolisakkaridler *A. baumannii* için önemli virulans faktörüdür. *K locus* denilen özel bir gen kümesi kapsüler polisakkarid üretimini belirler (42). Kapsül polimerizayonu için gerekli olan *ptk* ve *epsA* genlerinin inaktive edilmesiyle yapılan bir çalışmada kapsül yapısının bozulduğu ve yumuşak doku enfeksiyonlarının engellendiği görülmüştür (43). Dış membranının lipopolisakkarit tabakası diğer gram negatif bakterilerdeki gibi *A.baumannii*'de de farelerde letal toksisiteye, tavşanlarda vücut ısının yükselmesine ve Limulus amoebocyte lysate testinin pozitif sonuçlanmasına neden olur. Lipopolisakkaritin mitojenik özellikleri ve TNF (Tumour Necrosis Factor) alfayı indükleme potansiyeli patojeniteye katkıda bulunmaktadır (44, 45).

Fosfolipaz, fosfolipid metabolizması için gerekli olan lipolitik bir enzimdir ve *Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes* ve *Clostridium perfringens* gibi birçok bakteride virülans faktörüdür. A, C ve D olmak üzere üç sınıf fosfolipaz vardır. *A. baumannii* virulansından sorumlu olan fosfolipaz D (PLD) dir. Şu an tam olarak fonksiyonu aydınlatılmamış olsa da yapılan çalışmalar fosfolipidlerin bozulmasının, konak hücre zarlarının stabilitesini etkilediğini, bunun da hücresel sinyal iletimini engelleyebileceği ve konakçı immün yanıtında değişikliklere yol açabileceği düşünülmektedir (46).

Dış membran vezikülleri (OMV) çeşitli gram negatif bakterilerin dış membranlarından sentezlenen sferik 20-200 nm boyutunda veziküllerdir. İçeriğinde LPS, dış membran ve periplazmik proteinler, fosfolipidler ve DNA ya da RNA bulunur. Patojen bakteri herhangi bir yakın bağlantı kurmadan dış membran vezikülü aracılığıyla virulans faktörlerini konakçı hücreye aktarabilir. *A. baumannii* suşları; *OmpA*, proteazlar, fosfolipazlar, süperoksit dismutaz ve katalaz dâhil olmak üzere çeşitli virülans faktörlerini içeren OMV'leri salgılar (47, 48).

Sideroforlar demire yüksek afinite gösteren düşük molekül ağırlıklı birleşiklerdir. *A. baumannii*'nin önemli bir sideroforu olan *asinetobaktin (acinetobactin*) ilk kez *A. baumannii* 19606 suşunda tanımlanmış ve bunun hemin kazanım sistemlerinin ekspresyonuna da katkı sağladığı bildirilmiştir. Sideroforlar üretildikten sonra çeşitli bakteriler için tanımlanan antibiyotik direncindeki atım

pompaları ile benzer mekanizma ile hücre dışına salınmaktadır. Yapılan moleküler çalışmalar, *A. baumannii* kromozomunda *asinetobaktin* ile ilişkili 18 açık okuma bölgesi (ORF) içeren bir bölge olduğunu göstermiştir. Bu bölgede yer alan *bauA* ve *basD*, sırasıyla *asinetobaktin* transportu ve biyosentezinden, *barA* ve *barB* ise siderofor salınımından sorumlu genlerdir. Klinik izolatların analizi, farklı türlerin farklı demir alım sistemi eksprese etme ve farklı biyofilm yapıları oluşturma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Nitekim siderofor biyosentezi ve salınımı ile ilgili gen delesyonları olan suşlarda hemin kazanım sistemlerinin devreye girdiğinin gösterilmesi, *A. baumannii*'nin demir ihtiyacını gidermede oldukça başarılı olduğunu vurgulamaktadır (49).

*A. baumannii'*nin, diğer bakterilerde de bulunabilen sıklıkla virülansla ilişkili tip IV ve tip VI salgılama sistemlerini kodladığını gözlenmiştir. Ayrıca *A.baumannii'*nin konakçıda yaşadığı DNA hasarı ve oksidatif strese yanıt olarak sentezlediği DNA onarım proteini *RecA* bakterinin sağkalımı için gereklidir (34, 50).

2.2.2. Enfeksiyonları

*A. baumannii'*nin cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve sekonder menenjiti içeren geniş bir aralıkta ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (6, 12, 36). Bununla birlikte, en yüksek mortalite oranlarına sahip en önemli enfeksiyonlar ventilatör ilişkili pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır (51). Enfeksiyonlar, altta yatan bir hastalığı olan veya büyük cerrahi operasyon geçirmiş hastalarda daha yaygındır ve özellikle uzun süreli hastanede yatış süresi ile ilişkilidir. *A. baumannii* açık yaralar, intravasküler kateterler ve mekanik ventilatörler yoluyla kolayca vücuda girebilir (3).

Hastane kökenli pnömoni, *A. baumannii* enfeksiyonlarının en yaygın klinik formudur. Mortalite oranlarının %40 ile %70 arasında olduğu bildirilen bu enfeksiyon, tipik olarak yoğun bakım ortamında mekanik ventilasyon alan hastalarda görülür (51). Hastane kökenli pnömoni etkenlerinin belirtildiği dokuz ülkenin katıldığı çalışmada en sık izole edilen mikroorganizmaların; İspanya, Fransa, Belçika ve İrlanda'da *Staphylococcus aureus*, İtalya ve Portekiz'de *P. aeruginosa*, Almanya'da *Escherichia coli*, Yunanistan ve ülkemizde *A. baumannii* olduğu görülmüştür (52).

A. baumannii yoğun bakım ortamında sık görülen bir sepsis nedenidir. Bu sepsisin en yaygın kaynakları alt solunum yolu enfeksiyonları ve intravasküler kateterlerdir. Ayrıca kaynak olarak yara ve idrar yolu enfeksiyonları da rapor edilmiştir. *A. baumannii* kan dolaşımı enfeksiyonları ile ilişkili risk faktörleri arasında immünosüpresyon, solunum yetmezliği ile ilişkili ventilatör kullanımı, önceki antibiyotik tedavisi, kolonizasyon ve invazif prosedürler bulunmaktadır (53).

Yanık bölgesinin enfeksiyonu ve kolonizasyonu arasında ayrım yapmak zor olsa da, yanık enfeksiyonlarının önemli bir sebebidir. Çoklu ilaç direncinin yüksek olması ve bazı antibiyotiklerin yanık bölgelerine zayıf bir şekilde nüfuz etmesi nedeniyle, bu enfeksiyonlar klinisyenler için son derece zorlayıcı olabilir. Yanık enfeksiyonu özellikle yara iyileşmesini geciktirebileceği, deri greftlerinin bozulmasına ve bakteriyemiye yol açabileceği için problem olabilir (54). *A. baumannii* yanık enfeksiyonundan kaynaklanabilecek potansiyel ciddi komplikasyonlara rağmen, enfekte yanık hastalarının klinik sonuçları ile ilgili veriler, bu hasta popülasyonunda patojene atfedilebilecek mortalitenin net bir resmini sağlamamaktadır. *A. baumannii* bakteriyemisi olan yanık hastalarının bir olgu-kontrol çalışması, enfekte hastaların %31, enfekte olmamış kontrollerin %14'lük bir mortaliteye sahip olduğunu göstermiştir. Tersine, bir retrospektif kohort çalışması, *A. baumannii*'nin yanık yeri enfeksiyonu için yaygın bir neden olmasına rağmen, mortalite için bağımsız bir risk faktörü olmadığını ortaya koymuştur (55, 56).

Yumuşak doku enfeksiyonları, Irak ve Afganistan'da savaş yaralanması bulunan askeri personelde önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Askeri tedavi tesislerinde enfeksiyon kaynağını belirlemek için hasta cilt örnekleri, toprak örnekleri ve tedavi alanları taranmıştır. Bu tarama sonrası, *A. baumannii* 160 hastanın sadece bir tanesinden (%0.6), 49 toprak örneğinden sadece birinden (%2) izole edilirken, tüm tedavi alanlarının bu mikroorganizma ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (57).

A. baumannii nöroşirürjik uygulamalar sonrası ortaya çıkan menenjitin giderek artan önemli bir sebebidir (58). *A. baumannii* menenjitiyle ilişkili mortalite oranlarının, yürütülen çalışmalarda yeterli sayıda hasta olmaması ve çalışma sayısının da sınırlı olması nedeniyle tahmin edilmesi güçtür. Retrospektif bir çalışma, 1990 ve 2004 yılları arasında, üçüncü basamak iki hastanede, cerrahi operasyon sonrası 51 *A. baumannii* menenjiti olgusunu tanımlamıştır. Olguların, bu kurumlardaki tüm

menenjit vakalarının %10.9'unu oluşturduğu ve %33'lük bir mortalite oranına sahip olduğu saptanmıştır (59).

Üriner sistemde, *Acinetobacter* kolonizasyonu kalıcı sondalı hastalar başta olmak üzere sıklıkla görülmekte ancak nadiren enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmektedir. Başka bir enfeksiyon kaynağı saptanamamış ve piyüri ile sistemik belirtiler mevcut ise enfeksiyon olarak kabul edilip tedavi başlanır. Toplum kaynaklı üriner enfeksiyonlarla nadiren karşılaşılmaktadır (30).

Nadiren penetran travma sonrası gözde korneal ülserler, endoftalmi, periorbital sellülit; mekanik ventilasyon varlığında nozokomiyal sinüzit; periton diyalizi olan hastalarda peritonit; intravasküler katateri olan hastalarda endokardit ve prostetik kapak enfeksiyonlarına neden olabilir (60).

2.2.3. Tedavi

A. baumannii, piyasada bulunan tüm antibiyotiklere dirençli olan suşların ortaya çıkmasına neden olan çeşitli mekanizmalarla direnç geliştirme yeteneğine sahiptir. 2011 yılında, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri'nin (ECDC ve CDC) ortak girişimi ile enfeksiyona neden olan birçok organizmada gelişen ilaç direncini ve direncin derecesini karakterize etmek için bazı tanımlamalar yapılmıştır (61). Ancak şu ana kadar standart bir tanımlama oluşturulamamıştır.

- **Multidrug-resistant (MDR)**: İzolatın üç veya daha fazla antibiyotik sınıfından en az bir antibiyotiğe direçli olması.
- **Extensively drug-resistant (XDR)**: İzolatın iki ya da daha az sayıda antibiyotik sınıfından en az bir antibiyotiğe dirençli olması.
- **Pandrug-resistant (PDR)**: İzolatın tüm antibiyotiklere dirençli olması.

MDR *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde sadece birkaç etkili antibiyotik seçeneği mevcuttur. MDR/PDR *A. baumannii* enfeksiyonunu tedavi etmek için kolistin/sulbaktam, kolistin/teikoplanin, kolistin/rifampisin, kolistin/tigesiklin, kolistin/sulbaktam, kolistin/teikoplanin ve imipenem-meropenem/sulbaktam gibi kombinasyon terapileri ve yeni geliştirilen ilaçlar hala araştırılmaktadır (26).

Duyarlı mikroorganizmalarda birinci seçenek olarak geniş spektrumlu sefalosporinler (seftazidim, sefepim), beta laktam/laktamaz inhibitörleri (özellikle sulbaktam içeren), karbapenemler kullanılabilmektedir (62).

Karbapenemler duyarlı *A. baumannii* suşlarında yüksek oranda bakterisidaldir. *A. baumannii*'ye bağlı ventilatör ilişkili pnömoni tedavisinde imipenemin etkinliği yapılan çalışmalarda %57-83 oranlarında bulunmuştur. Karbapenemler ayrıca kombinasyon terapisinde de etkilidir. Tigesiklin ve azitromisinle yapılan kombine tedavilerin invitro etkili olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (63).

Bir beta-laktamaz inhibitörü olan sulbaktam *A. baumannii'*nin penisilin bağlayan proteinlerine afinite gösterir ve beta-laktamaz inhibitörleri içinde en aktif olandır. Yapılan bazı çalışmalarda ampisilin-sulbaktam tedavisinin etkinliği imipeneme benzer bulunmuştur. Ampisilin/sulbaktam/karbapenem kombinasyon tedavisi MDR *A. baumannii* bakteriyemisi ve karbapenem dirençli *A. baumannii'*nin neden olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonunun tedavisinde etkilidir (26).

Alternatif tedavi seçenekleri polimiksinler, tigesiklin, minosiklin gibi antibiyotiklerdir. Günümüzdeki direnç oranları göz önüne alındığında alternatif tedavi seçenekleri temel tedavi haline gelmiştir (26, 64).

Minosiklin, tetrasiklin grubu geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. *A. baumannii*'nin minosikline olan duyarlılık oranı dünya çapında yaklaşık %80'dir. Kolistin ile kombine minosiklin tedavisi, minosikline dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde etkilidir. Bununla birlikte, minosiklinin kulanılmaya başlanmasından itibaren *A. baumannii* izolatlarının yaklaşık %20'si bu ilaca karşı direnç geliştirmiştir. Minosiklin direncinde en önemli mekanizma *TetB* efluks pompasıdır. Yapılan çalışmalarda rifampisin, kolistin veya imipenem ile kombine minosiklin tedavisinin, *tetB* geni olmayan izolatların çoğunda sinerjik bir etkiye sahip olduğu, ancak *tetB* genine sahip izolatlarda etkisinin olmadığı gözlenmiştir (26, 64).

Tigesiklin, glisilsiklin grubu antibiyotiklerin ilk üyesi olup minosiklin derivesidir ve 2005 yılında kullanıma girmiştir. 30S ribozomal alt birime bağlanarak bakteriyostatik aktivite gösterir. *A. baumannii*'nin oluşturmuş olduğu cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında, komplike intra-abdominal enfeksiyonlarda etkili bulunmuştur. Ancak dokulara hızlı geçmesi sebebiyle *A. baumannii*'ye bağlı bakteriyemi olgularında etkili bulunmamıştır (65). Tigesiklin, amikasin ve kolistin gibi

bazı antibiyotik sınıfları ile sinerjik bir etki gösterir. Bununla birlikte, tigesiklin kullanımının artması ile *A. baumannii'*de tigesikline ait MİK değerlerinde artış ve direnç rapor edilmiştir (26).

Polimiksinler 70 yıl önce keşfedilen ve çoğu gram negatif bakteriye karşı güçlü etkinlik gösteren bir grup polikatyonik peptit antibiyotiklerdir. Beş polimiksinden (A-E), sadece polimiksin B ve E (kolistin) klinik olarak kullanılır. Polimiksin E, piyasada daha çok kolistimetat sodyum (ön ilaç) şeklinde bulunmaktadır. Kolistin sülfat şeklinde de formüle edilmiştir. MDR *A. baumannii* izolatlarında kolistin direnci oranı (%10.4); rifampisin (%47.8) veya tigesiklin (%45.5) direncinden daha düşüktür (66). Kolistin, MDR *A. baumannii* enfeksiyonlarında kullanılan kombinasyon tedavilerinin önemli bir bileşenidir. Kolistin/rifampisin, kolistin/minosiklin, kolistin/karbapenem, kolistin/sulbaktam, kolistin/tigesiklin, kolistin/daptomisin, kolistin/fusidik asit ve kolistin/teikoplanin gibi birçok kolistin bazlı kombine tedavilerin *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı invivo veya invitro olarak sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir (26).

2.2.4. İlaç Direnci

2.2.4.1. Karbapenemlere Direnç

2.2.4.1.1. Enzimatik Olmayan Mekanizmalar

Karbapenemler (imipenem, meropenem, biapenem, ertapenem ve doripenem), en geniş spektrumlu β-laktam antibiyotiklerdir, Gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı büyük aktivite gösterirler ve "son tercih ilaçlar" olarak kabul edilirler. Karbapenemler gram negatif bakterilere porin olarak da bilinen dış memran proteinleri vasıtasıyla girer. Periplazmik aralığa geçtikten sonra hemen Penisilin Bağlayan Proteinlere (PBP) bağlanırlar. PBP'ler transglikolaz, transpeptidaz ve karboksi peptidaz gibi enzimlerdir. Bu enzimler bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan sentezinden sorumludur ve yapılarında değişikliğe yol açan mutasyonlar dirençle sonuçlanır. Ayrıca β-laktamaz üretimi ve dışa atım pompalarının aşırı çalışması da karbapenem direncine neden olur. Gram-pozitif koklarda ve gram negatif basiller arasında karbapenemlere direnç mekanizmaları açısından farklılık söz konusudur. Gram-pozitif koklarda karbapenem direnci tipik olarak PBP'lerin amino asit sekanslarındaki değişikler veya yeni karbapenem dirençli PBP'nin edinim /

üretiminin sonucudur. Gram negatiflerde ise porin kaybı ve PBP değişikleri yanı sıra β-laktamazlar ve dışa atım pompaları da önemlidir. Bunlar içinde en fazla üstünde durulanlar β-laktamazlardır (67).

2.2.4.1.1.1. Penisilin Bağlayan Proteinler

Peptidoglikan sentezinde görev alan PBP'ler yüksek ve düşük molekül ağırlıklı olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler bakterinin hayatta kalması için gerekli iken, düşük moleküler ağırlıklı olan PBP'lerdeki delesyon bakteri için ölümcül olmamaktadır (68). Düşük moleküler ağırlıklı PBP'ler hakkında çok az şey bilinmektedir. Ancak düşük moleküler ağırlıklı ve bir hidrolaz/endopeptidaz olan PBP-7/8'in hücre duvarının yeniden biçimlenmesinde rol oynadığını düşünülmektedir. PBP-8, PBP-7'nin *OmpT* aracılı bir degradasyon ürünüdür ve her iki PBP de çözünür litik transglikosilaz 70'i (in-vitro) stabilize eder ve geliştirir (69).

2.2.4.1.1.2. Dışa Atım Pompaları

Efluks pompaları genellikle üç parçalı bir sistem olup; hücre membranına yerleşmiş bir dışa atım pompa proteini, dış membrana yerleşmiş bir kanal proteini ve iki protein arasında kesintisiz bağlantı sağlayan periplazmik membran füzyon proteininden oluşur. Resistance-nodulation division (RND) efluks pompası *A. baumannii*'de gösterilmiştir. Aminoglikozid, kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim ve etidyum bromür direncinden sorumludur. Üç tip RND efluks pompası *A. baumannii* ile ilişkilendirilmiştir (AdeABC, AdeFGH ve AdeIJK). Bunlar içinde üstünde en fazla çalışılanı AdeABC'dir. Vahşi suşlarda nadiren, çoklu ilaç dirençli *A.baumannii* suşlarında sıklıkla görülmektedir. AdeABC üç bileşenli bir yapıya sahiptir: AdeB trans membran bileşenini, AdeA iç membran füzyon proteinini ve AdeC *OMP*'yi oluşturur. İki adımlı regülatör sistem (AdeR) ve sensör sistem (AdeS) AdeABC pompasının düzenlenmesinden sorumludur. AdeABC pompasının aşırı üretimi karbapenemlere yüksek düzeyde direnç oluşturur (70). Ayrıca bu pompa tigesiklin gibi *A. baumannii* tedavisinde önemli bir ilaca karşı direnç gelişmesiyle de ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalar AdeABC aşırı üretiminin tigesiklin MİK değerlerinde 10 kat artışa neden olduğunu göstermiştir. *A. baumannii*'de bulunan bir

başka dışa atım pompası olan AbeM'in aşırı üretimi ise imipenem dirençli izolatlarda gözlenmiştir (71, 72).

2.2.4.1.1.3. Dış Membran Proteinleri (OMP)

A. baumannii'nin dış membran proteinlerinin (OMP) antibiyotiklere dirence neden olmasıyla ilgili mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Ancak porinler membran geçirgenliğini etkilediklerinden, direnç mekanizmalarında önemli rol oynadıkları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. *CarO, Omp22-33, Omp33-36, Omp37, Omp43, Omp44* ve *Omp47 A. baumannii*'nin karbapenem direnci ile ilişkili bulunmuştur (26). OXA-51 benzeri veya OXA-23 benzeri karbapenemaz üreten *A. baumannii'de Omp29*'un kaybı, imipenem direncinin artmasına neden olur (73).

2.2.4.1.2. Beta laktamaz üretimi

Gram negatif bakterilerde 800'den fazla beta laktamaz tanımlanmıştır (74). Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en yaygın olarak moleküler temelli Ambler ve fonksiyonel Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmaları kullanılmaktadır (75).

Moleküler yapılarına göre beta laktamazlar 4 sınıfa ayrılır (A-D). Sınıf A, C ve D aktif bölgelerinde serin içerirken sınıf B kofaktör olarak divalan metal katyonlarını (çinko) kullanır, bu nedenle bu grup beta laktamazlara, metallobetalaktamaz da denir (76).

Karbapenemazlar; penisilinleri, çoğu zaman sefalosporinleri ve değişen derecelerde karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır. Bu enzimler Ambler sınıflamasında, beta-laktamazların dört moleküler sınıfından üçünde (A, B ve D) ve Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasında 2f, 2df, 3 alt gruplarında bulunur *Acinetobacter* türlerinde klinik olarak önemli 16 aileye ayrılmış 210 dan fazla β-laktamaz tanımlanmıştır (76).

2.2.4.1.2.1. Sınıf A Karbapenemazlar

Beta-laktamlar üzerinde geniş hidrolitik aktiviteye sahip olan sınıf A karbapenemazlar, serin karbapenemazlar grubuna aittirler ve karbapenemlere ek olarak aztreonamı, penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize edebilirler. Klavulanik asit ve tazobaktam ile kısmen inhibe olurlar (77). Sınıf A karbapenemazlar, kromozomal

olarak kodlanan (KOB, NmcA, SFC-1, BIC-1, PenA, FPH-1, SHV-38), plazmid tarafından kodlanan (KPC, GES, FRI-1) veya her ikisi tarafından kodlanan (IMI) enzimlerinden oluşur. Kromozomal olarak kodlanmış sınıf A karbapenemazlar, 20 yıl önce ilk keşiflerinden beri klinik ya da çevresel örneklerden nadiren izole edilmiştir. *Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, Serratia fonticola ve Pseudomonas fluorescens*'de tek izolatta veya küçük salgınlar şeklinde ve PenA *Burkholderia cepacia*'da ve FPH-1 *Fransiella philomiragia* da görülmüştür (78, 79). Diğer yandan plasmid tarafından kodlanan en iyi tanımlanmış enzim olan KPC-2 tüm dünyada ve klinik önemi olan enterobakterlerin çoğunda *P. aeruginosa ve A. baumannii* de tespit edilmiştir (80). *TEMoneira (*TEM*), sulfhydryl variable (*SHV*), cefotaxime hydrolyzing capabilities* (CTX-M)*, guiana extended-spectrum* (GES) *self-transferable plasmid from* E. coli, Pseudomonas *extended resistant* (PER)*, vietnam extended-spectrum β-lactamase* (VEB)*, carbenicillin hydrolyzing β-lactamase* (CARB) ve *K. pneumoniae carbapenemase* (KPC) *A. baumannii'*de tespit edilen sınıf A beta laktamazlardır. Bunlar karbapenem direncinde küçük bir role sahiptir (81). Bu enzimlerin bazıları dar spektrumlu (*örn*; TEM-*1*, SCO-1 ve CARB-4), bir kısmı ise genişlemiş spektrumlu (örn; PER-1, TEM-92, CARB-10, SHV-5, PER-2, CTX-M-2, CTX-M-15, VEB-1, GES-14 ve PER-7) beta laktamazlardır (26).

2.2.4.1.2.2. Sınıf B Karbapenemazlar

Sınıf B metallo-β-laktamazlar (MBL'ler) geniş bir substrat spektrumuna sahiptir ve monobaktamlar haricindeki hemen hemen tüm β-laktam grubu antibiyotikleri hidrolize edebilirler. Klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam gibi ticari kullanımdaki β-laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler (82). Ayrıca yapılan çalışmalarda A ve C sınıfı enzimlerin inhibitörü olan NXL-104 (*avibactam*) tarafından tam olarak inhibe edilmedikleri saptanmıştır. Serin bazlı enzimlerin aksine, MBL'ler EDTA gibi metal şelatörler ile inaktive edilir. Her ne kadar MBL'ler *A. baumannii*'de baskın karbapenemaz olmasa da, verona integron kodlanmış metalo-β-laktamaz (VIM), imipenemaz (IMP), Seul imipenemaz (SIM) enzimleri karbapenem direncine yüksek düzeyde katkıda bulunur (82, 83). İlk VIM enzimi, 2002 yılında Yum tarafından tarif edilmiştir (84). Daha sonra, VIM-1,VIM-3, VIM-4 ve VIM-11 dâhil olmak üzere birçok VIM varyantı tanımlanmıştır. VIM MBL'ler, IMP enzimleriyle

%40’ın üzerinde amino asit özdeşliği gösterirler ve benzer bir substrat profiline sahiptirler. Ancak VIM MBL'lerin karbapenemlere karşı daha yüksek bir afinitesi vardır (85). Geçtiğimiz on yıl boyunca başta Avrupa ve Asya ülkelerinde olmak üzere, *A. baumannii* izolatlarında çeşitli VIM varyantları (VIM-1, 2, 3, 4 ve 11) tanımlanmıştır. Ayrıca *A. baumannii* ile yakından ilişkili *A. nosocomialis* ve *A. pittii*'nin de çeşitli VIM varyantları tespit edilmiştir (86). IMP enzimleri de *A. baumannii* dâhil olmak üzere dünya çapında birçok gram negatif bakteride bildirilmiştir. IMP tipine ait enzimler geniş substrat spesifitesine sahip olup özellikle sefalosporinler ve karbapenemlere karşı aktiftir. *A. baumannii* de birçok IMP enzimi varyantı; IMP-1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 19 ve IMP-24 tanımlanmıştır. SIM-1 (Seoul imipenemase) Kore Seul’de bir *A. baumannii* izolatında tespit edilmiştir ve şimdiye kadar bu mikroorganizmada bildirilen tek SIM’dir. SIM-1, IMP enzimleri ile %64-69 oranında amino asit benzerliği sergiler ve IMP ile VIM gibi, penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin yanı sıra karbapenemleri de hidrolize edebilir (87).

Son yıllarda keşfedilen bir metallo-β-laktamaz olan NDM *A. baumannii’*de artarak yaygınlaşan ve karbapenem direncine yol açan bir MBL’dir. NDM enzimlerinin yedi varyantı (NDM-1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7) olmasına karşın yapılan çalışmalarda *A. baumannii*’den izole edilen NDM-1, 2 ve 3 enzimleri içinde en sık görülen NDM-1’dir (77). NDM varlığı ilk olarak 2008 yılında Hindistan’dan İsviçre’ye gelen bir bir gezginin klinik örneklerinden izole edilen *Klebsiella pneumonia* ve *E. coli*’de tanımlanmıştır ve bu nedenle New Delhi metallo-β-lactamase olarak isimlendirilmiştir. Diğer MBL enzimlerine benzer şekilde, NDM-1 aztreonam dışındaki tüm β-laktamlara direnç sağlar. NDM-2 de spektrum olarak NDM-1’e benzer. $bla_{\text{NDM-1}}$ için tam olarak kesinleşmese de $bla_{\text{NDM-2}}$ geninin kromozomal aktarıldığı düşünülmektedir. Daha sonra Çin, Almanya ve İsrail’de yapılan çeşitli çalışmalarda *A. baumannii* izolatlarında NDM enzimleri saptanmıştır. Türkiye’de *A. baumannii* suşlarında NDM gen varlığı sporadik vakalarda görülmektedir. Yapılan bir çalışmada NDM-1 üreten *A. baumannii* ST85 suşu iki hastada tespit edilmiştir (88-91).

2.2.4.1.2.3. Sınıf C β-laktamazlar

Sınıf C β-laktamazlar, sefamisinler (sefoksitin ve sefotetan), penisilinler, sefalosporinler ve β-laktam-β-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına direnç oluşmasında etkilidir ve klinik kullanımda olan klavulanik asit gibi β-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez. Genellikle kromozomal aktarılır ancak plazmid aracılı sınıf C beta laktamazlar da çeşitli bakterilerde tanımlanmıştır. Kromozomal enzimlerle karşılaştırıldığında, plazmidle aktarılan Sınıf C β-laktamlar direnç yayılımında daha önemlidir. *Acinetobacter sp.* kromozomal AmpC genleri ADCs (*Acinetobacter-derived cephalosporinases*) olarak isimlendirilir. ADC'ler sefotaksim ve seftazidim gibi sefalosporinleri hidrolize edebilirler, fakat sefepim ve karbapenemleri etkileyemez. *A. baumannii*'de sekans benzerlikleri ve tercih edilen substratlara göre 56 farklı ADC ve 25'ten fazla varyant tanımlanmıştır (92). Diğer gram-negatif bakterilerde bla_{ampC} gen ekspresyonu indüklenebilirken *A. baumannii*'de genin üst bölgesinde ISAba1 elemanının bulunması durumunda eksprese olmaktadırlar (93).

2.2.4.1.2.3. Sınıf D β-laktamazlar

Sınıf D β-laktamazlar izoksazolil penisilin oksasilini, benzilpenisilin'den daha hızlı hidrolize ettikleri için OXA (oksasilinaz) olarak da adlandırılır (94). 400'den fazla OXA tipi enzim tanımlanmıştır ve birçok varyantta karbapenemaz aktivitesi vardır. OXA benzeri enzimler, substrat özelliklerine göre üç kategoriye ayrılırlar: OXA-1 veya OXA-10 gibi geniş spektrumlu enzimler, OXA-13 veya OXA-17 gibi genişlemiş spektrumlu β-laktamazlar (GSBL'ler) ve OXA-23 veya OXA-24/40 gibi karbapenem-hidrolize edici sınıf D-laktamazlar. Sadece bir alt grup oksasilinaz, karbapenemleri inaktive etme yeteneğine sahiptir ve karbapenem-hidrolize edici sınıf D-laktamazlar (CHDL'ler) olarak adlandırılır. CHLD veya MBL'lerin varlığı *A. baumannii'deki* ana karbapenem direnç mekanizmalarıdır (81). OXA-tipi karbapenemazlar, MBL'ler ile karşılaştırıldıklarında karbapenemleri hidrolize etmede daha düşük aktiviteye sahiptirler (100-1000 kat daha düşük). Fakat bu enzimlerin önemli karbapenemazlar olmalarını sağlayan sebep ekspresyonlarının ISAba1 gibi IS (insersiyon sekansları) elemanlarını, gen bölgesinin üst kısmında taşımaları durumunda yeniden düzenlenmesidir. *A. baumannii*'de tanımlanan insersiyon sekansları (ISAba1, ISAba2, ISAba3 ve IS18) artan ekspresyon ile ilişkili hibrit promotor sekanslar olarak işlev

görmektedirler ve bu enzim grubunun karbapenemlere karşı ciddi direnç oluşumunu sağlar ya da azalan duyarlılığa sebep olurlar. *A. baumannii'de* CHDL alt grupları, OXA-23 benzeri OXA-40/24-benzeri, OXA-58 benzeri, OXA-143 benzeri ve OXA-235 benzeri olmak üzere altı kümeye ayrılır (95). OXA-23 benzeri enzimler dünya çapında *A. baumannii'de* en yaygın olandır ve tüm kıtalarda tanımlanmıştır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. İnsersiyon Sekansları ve İlişkili Oldukları Direnç Genleri (96).

Mobil genetik unsur	**Direnç genleri ile ilişki**	**Direnç profili**	**Coğrafi bölge**
IS *Aba1*	*bla*$_{\text{OXA-23}}$ *bla*$_{\text{OXA-51}}$ *bla*$_{\text{OXA-58}}$ *bla*$_{\text{AmpC}}$	Karbapenemler dâhil tüm β-laktamlar	Dünya çapında yaygın
IS *Aba2*	*bla*$_{\text{OXA-58}}$ *bla*$_{\text{AmpC}}$	Karbapenemler Sefalosporinler	Fransa İtalya İspanya
IS *Aba3*	*bla*$_{\text{OXA-58}}$	Karbapenemler	Çin İtalya Tayvan Lübnan
IS *Aba4*	*bla*$_{\text{OXA-23}}$	Karbapenemler	Fransa Belçika
IS *Aba10*	*bla*$_{\text{OXA-23}}$	Karbapenemler	Kore
IS *Aba125*	*bla*$_{\text{NDM-1}}$ *bla*$_{\text{NDM-2}}$ *bla*$_{\text{AmpC}}$ *aphA6*	Karbapenemler Sefalosporiner Aminoglikozidler	Hindistan İsviçre Yunanistan Avustralya
IS *18*	*bla*$_{\text{OXA-58}}$	Karbapenemler	Lübnan Türkiye

OXA-23-benzeri enzimler

A. baumannii'de tanımlanan ilk OXA-tipi β-laktamaz grubu olan OXA-23 β-laktamaz önceden bilinen adıyla ARI-1 (*Acinetobacter* resistant to imipenem) 1985 yılında Edinburgh'da, imipenemin ilk kez kullanım için onaylandığı bir yıl içinde tanımlanmıştır. OXA-23 benzeri enzimler, günümüzde dünya çapında hem insan hem de hayvan izolatlarında bulunmaktadır.

Hem kromozomal yerleşimli olup hem de plazmidler tarafından aktarılabilir ve genomik adalar (AbaR4, AbaR25 ve AbaR26), transpozonlar (Tn2006, Tn2007, Tn2008, Tn2009 ve Tn6206) ve ekleme dizileri (IS'ler) gibi farklı genetik yapılar ile kodlanabilirler. Bu gen, *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter jonhsonii*, *Acinetobacter gandensis*, *Acinetobacter* genomik tür 14TU/13BJ, *Acinetobacter* genomik tür 15TU, *A. nosocomialis* ve *A. pittii* gibi diğer *Acinetobacter* türlerinde de tespit edilmiştir (97). Ayrıca *Enterobacteriales ailesinde E. coli* ve *Proteus mirabilis*'de de tespit edilmişlerdir. *E. coli*'deki OXA-23 benzeri enzimler penisilinler ve sefalotine karşı direnç, moksalaktam ve karbapenemlere karşı azalmış duyarlılığa yol açar. *A. baumannii*'de de benzer spektrum söz konusudur. Klavulanik asit ve tazobaktam varlığında elde edilen MİK'ler bu enzimler üzerinde beta laktam inhibitörlerinin etkinliğinin olduğunu göstermektedir. Enzim sefotaksimi, oksasilinler ve diğer penisilinler kadar etkili bir şekilde hidrolize ederken, aztreonam ve seftriaksonu daha az etkiler, seftazidimi ise hidrolize edemez (98, 99).

Şimdiye kadar OXA-23'e en az %95 sekans benzerliği taşıyan onyedi enzim tanımlanmıştır. İki amino asit değişikliğiyle türevi olan OXA-27, transfer edilemez bir plazmid içinde Singapur'da izole edilen bir *A. baumannii* suşunda tanımlanmıştır. OXA-27; penisilinler, karbapenemler ve sefalosporinleri çok daha düşük oranda hidrolize eder. Tazobaktam ve daha az miktarda klavulanik aside duyarlıdır. OXA-23'ün sırasıyla altı, üç ve üç amino asit değişikliğiyle türevi olan kromozomal kodlanmış OXA-102, OXA-103 ve OXA-105 türevlerinin varlığı ertapeneme karşı olan duyarlılığı düşürür ancak imipenem ve meropeneme karşı etkinlikleri tanımlanmamıştır. OXA-146, alanin 220'nin kopyalanmasıyla OXA-23'ten farklıdır. OXA-146 diğer β-laktamlar için benzer etki profilini korurken, OXA-23'ten farklı olarak etkili bir şekilde seftazidimi hidrolize eder. OXA-23 benzeri enzim genleri genellikle plazmidlerle ilişkilidir ancak kromozomda da bulunabilir. En önemli

genetik eleman ISAba1 insertion sekansı varlığı enzimin kopya sayısını artırarak antibiyotiklere direnci artırır (100). OXA-23 enzimine sahip izolatlar tüm dünyadan özellikle hastane enfeksiyonlarıyla ilişkili salgınlarda bildirilmektedir. Ülkemizden de ilk kez 2008 yılında bildirilmiştir (101).

OXA-24/40

OXA-24 (OXA-40), ilk olarak 1997'de İspanya'da hasta örneğinden izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* suşunun kromozomunda tanımlanmıştır. Daha sonra, OXA-24 için rapor edilen sekansın OXA-40'ınki ile aynı olduğu ortaya çıkmış ve bu enzim grubu "OXA-24/40" olarak adlandırılmıştır.

OXA-24/40 benzeri enzimler, Avrupa, Kuzey Amerika, Asya ve Güney Amerika dâhil olmak üzere dünya çapında bir dağılıma sahiptir. Ülkemizden ilk kez 2013 yılında bildirilmiştir. Bu enzim ailesi ağırlıklı olarak *A. baumannii* suşlarında bildirilmesine rağmen *A. haemolyticus, A. pittii, A. baylyi, P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'da da tanımlanmıştır (99). *A. baumannii'*de bildirilen $bla_{\text{OXA-40}}$ ve $bla_{\text{OXA-40 like}}$ genler, hem kromozomda hem de plazmidlerde bulunur *A. baumannii*'nin kalan genomu ile karşılaştırıldığında $bla_{OXA\text{-}24/40}$ geninin daha düşük G-C içeriği, bu genin kaynağının başka bir tür olduğunu düşündürmektedir (102). OXA-24/40 benzeri enzim grubunda en az %95 aminoasit benzerliği olan dört subgrup tanımlanmıştır. OXA-40/24, OXA-25 ve OXA-26 enzimleri üzerinde yapılan çalışmalarda; penisilinleri hidrolizleyebildikleri, karbapenemlere düşük olarak aktivite gösterdikleri ve de bazı sefalosporinlere karşı çok düşük aktivitede oldukları gösterilmiştir. Üç enzim de imipenem ve meropenemi daha iyi hidrolize ederken en iyi hidroliz yeteneğine sahip olan OXA-40/24 enzimidir (103).

A. baumannii kromozomunda veya farklı plazmidlerde bulunan $bla_{OXA\text{-}40}$ geni, IS'ler gibi DNA mobilizasyonunu sağlayan tipik yapılarla birlikte bulunmaz, bunun yerine XerC/XerD bağlanma bölgelerine homolog olan korunmuş ters çevrilmiş tekrarlar tarafından kuşatılır. Bu sahalar, bölgeye özgü rekombinasyon mekanizmalarında yer alan XerC ve XerD rekombinazlarının hedefleridir. $bla_{OXA\text{-}40}$ geninin *A. baumannii* izolatları içinde bu mekanizma ile harekete geçirilebileceği ve daha sonra yatay gen transferi ile yayılabileceği düşünülmektedir. Bu hipotez, aynı yapının farklı plazmidlerde ve kromozomda yer alması ve aynı bağlanma bölgelerinin

farklı yerlerde farklı DNA bölgelerine geçmesiyle desteklenmektedir. Ayrıca Rumbo ve arkadaşları (104) yaptıkları çalışmada OMV'lerin OXA-24/40 benzeri enzimleri *Acinetobacterler* arasında transfer edebildiklerini göstermiştir (105).

OXA-51-benzeri enzimler

Bugüne kadar tanımlanan OXA-tipi β-laktamazların en büyük grubu OXA-51-benzeri β-laktamazlardır. İlk olarak 1996 yılında Arjantin'de *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. Bu enzimler *A. baumannii*'ye özgüdür ve intrinsik olarak bu türün kromozomunda bulunurlar. OXA-51 benzeri enzimlerin sadece ikisinin kinetik özellikleri çalışılmıştır: OXA-51 ve OXA-69 enzimlerinin her ikisi de karbapenemlere karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterir. Bu zayıf aktiviteye rağmen çeşitli çalışmalarda bu gruptaki enzimlerin ekspresyonlarının, karbapenem MİK değerlerinde yükselmeye neden olduğu görülmüştür (106, 107). OXA-51-benzeri enzimler arasında belli epidemik kökenler (lineage) ile ilişkili alt gruplar ya da enzim kümeleri (cluster) bulunmaktadır. OXA-66 etrafında kümelenmiş olan geniş enzim grubu prevalan Avrupa klonu 2'yi içeren bir *A. baumannii* kökenine ait izolatlarda bulunmuştur. OXA-69 ezimi etrafında kümelenmiş olan enzimler ise Avrupa klonu 1'i çevreleyen diğer bir kökene ait izolatlarda bulunmuştur. OXA-71 enzimi ise Avrupa klonu 3 ile ilişkilidir En yaygın tanımlanan enzimler OXA-66 kümesindendir ve özellikle Güney Amerika ve Asya'dan bildirilmiştir. OXA-69 kümesinden olan enzimler de yaygındır ve daha çok Doğu Avrupa'dan bildirilmektedir (108, 109).

OXA-58 benzeri enzimler

İlk olarak Fransa'da izole edilen bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır. OXA-23 enzimi ile %48 ve OXA-24/40 enzimi ile %49 aminoasit benzerliği bulunan enzim, 30 kb'lık bir plazmid üzerinde bulunmuştur. OXA-58 enziminin şu ana kadar üç varyantı tanımlanmıştır; OXA-96, OXA-97 ve OXA 164. OXA-96 Singapur'da bir *A. baumannii* izolatında, OXA-97 Tunus'da *A. baumannii* izolatlarında, OXA-164 ise Almanya'da bir *A. baumannii* izolatında tespit edilmiştir (102). Saflaştırılmış OXA-58 enzimi penisilinlere ve imipeneme karşı zayıf aktivite, meropeneme karşı çok zayıf aktivite göstermekte, sefalotin ve sefpiromu bazen etkilemekte, seftazidim ve sefotaksime karşı ise aktivitesi bulunmamaktadır (110).

Yapılan çalışmalarda OXA-58, OXA-23 ve OXA-83'ün periplazmik alana geçişini sağlayan *Sec* sistemi tanımlanmıştır. *Sec A* inhibitörü olan rose bengal, bu karbapenemazların geçişini inhibe eder. İmipenem veya meropenemle kombine edilen rose bengalin karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarında sinerjistik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (111).

OXA-58 enziminin Fransa, İspanya, İtalya, Yunanistan ve Avusturya'da daha sık görüldüğü bildirilmektedir. Türkiye, Yunanistan ve İtalya'nın da aralarında bulunduğu Akdeniz ülkelerini içeren bir çalışmada, 1999-2009 yılları arasında karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatlarında en yaygın genin OXA-58 olduğu 2009 yılından itibaren ise OXA-23 geninin giderek artan bir şekilde OXA-58 geninin yerini almaya başladığı bildirilmiştir (109, 112).

OXA-143 benzeri enzimler

OXA-143, OXA-24/40'ın plazmid kaynaklı bir 31-amino asit mutantıdır. OXA-24/40 grubunun ikinci alt grubunu oluşturur. OXA-143 ilk olarak 2004 yılında Brezilya'da karbapenem dirençli bir *A. baumannii* suşunda tanımlanmıştır. OXA-143 β-laktamazlar penisilinler ve karbapenemleri hidrolize eder ancak geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı belirgin bir etkisi yoktur. İlginç bir şekilde $bla_{\text{OXA-143}}$ herhangi bir insertion sekansı veya integronla ilişkili bulunmamıştır. Tam olarak gen transferi aydınlatılmamış olsa da $bla_{\text{OXA-143}}$ geninin plazmidde lokalize olup iki aynı replikaz geni tarafından kuşatılmış olması gen aktarımının homolog rekombinasyon yoluyla olduğunu düşündürmektedir. Şu ana kadar Brezilya ve İran'dan bildirilmiştir (5, 113).

OXA-235 benzeri enzimler

2013 yılında Amerika ve Meksika'dan izole edilen *A. baumannii* izolatlarında tanımlanan OXA-235 enzimi OXA-23, 24, 58 ve 143 enzimleri ile %54-%57, OXA-51 enzimi ile ise %56 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. Bu sebeple yeni bir alt grup olarak tanımlanmıştır ve aynı çalışmada iki izolatta da tek aminoasit değişimi ile bu enzim ailesine ait olan OXA-236 ve OXA-237 enzimleri tanımlanmıştır. $bla_{OXA-235}$ geni hem kromozomda hem de plazmidlerde bulunmuştur. Tam olarak gen transferi aydınlatılmamış olsa da iki ISAba1 tarafından kuşatılmış bulunduğu için transpozisyonla hareket edebileceklerini düşünülmektedir (95).

2.3. Karbapenemaz Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Acinetobacter türlerinde tanımlanan karbapenemazların çoğu, diğer türlere transfer edilebilen mobil genetik elemanlar üzerinde yer almaktadır. Karbapenemaz yayılımını önlemek için dirençli bakterilerin hızlı, basit ve güvenilir şekilde tespitini zorunlu hale getirmiştir. Bugüne kadar farklı prensiple birçok metod bu amaçla kullanılmıştır (63).

2.3.1. Fenotipik yöntemler

Karbapenemaz tespitinde kullanılan fenotipik testler arasında özellikle enzim aktivitesini inhibisyon yoluyla tespit eden yöntemler öne çıkmaktadır. İnhibitör olarak Sodyum merkaptoasetik asit (SMA) veya etilendiamintetraasetik asit (EDTA) gibi inhibitörlerin kullanıldığı çift disk sinerji testi (DDST), 2,6-piridindikarboksilik asit (dipikolinik asit; DPA) kullanıldığı mikrodilüsyon testi ve EDTA'nın kullanıldığı E testi bu yöntemlere örnektir. Ayrıca KPC tespitinde inhibitör olarak boronik asidin kullanıldığı KPC kombine disk testi bir diğer örnektir (114).

Metallo-β-laktamaz Epsilometre testinde (E-test), bir tarafında imipenem diğer tarafında ise imipenem ve EDTA bulunan test stribi kullanılır. EDTA'nın olduğu taraftaki MİK değerinin imipenem MİK değerinden ≥ 8 olması MBL pozitifliği olarak değerlendirilir (115).

Kombine disk testi, inhibisyon zon çapı farkına bakılarak MBL varlığının araştırıldığı bir yöntemdir. Aynı plak yüzeyine iki imipenem diski yerleştirilerek bir tanesinin üzerine EDTA solüsyonu eklenir. EDTA'lı imipenem diskinin inhibisyon zon çapı tek başına imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm ise test pozitif kabul edilir (115).

IMP-EDTA çift disk sinerji testinde, imipenem diski ve EDTA eklenmiş boş disk kullanılır. İki disk arasındaki inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilir ve bu durumda test MBL pozitif olarak yorumlanır (115).

Modifiye Hodge testi penisilinaz üreten *Neisseria gonorrhoeae* tespitinde kullanılan Hodge testinin modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Hodge testinde kullanılan *S. aureus* (ATCC 25923) yerine *E. coli* (ATCC 25922) ve penisilin diski

yerine de imipenem diski kullanılarak yapılmaktadır. İmipeneme duyarlı *E. coli* suşu MBL üreten bir bakteri ile bir arada bulunduğunda imipeneme rağmen üreyebilir. Bu durumda test pozitif kabul edilir (115).

Triton Hodge testi (THT) Modifiye Hodge testinin NDM saptamada duyarlılığının düşük olması nedeniyle geliştirilmiş bir testtir. NDM diğer beta laktamazların aksine dış membran proteinine bağlı olduğu için membranları parçalamak için Triton-X-100 kullanılır. Diğer prensipler Modifiye Hodge testi gibidir (116).

Karbapenem inaktivasyon metodu ise yeni ve standardizasyon gerektiren fenotipik yöntemdir. Karbapenemaz üretimi test edilecek suşla birlikte inkübasyona bırakılan karbapenem diskinin, bakteriye ait enzimle inaktivasyonunun fenotipik olarak gösterilmesini esas alan ve temel laboratuvar ortamında ulaşılabilir, düşük maliyetli bir testtir (94). Suda hazırlanan şüpheli bakteri süspansiyonuna meropenem diski atılıp iki saat inkübasyona bırakılır. İki saatin sonunda süspansiyon içindeki disk alınır ve karbapenem duyarlı standart suşun (E. coli ATCC 25922) yayıldığı MHA agar plağına konur. Altı saatlik inkübasyon sonrasında normalde *E. coli* suşunun etrafında inhibisyon zonu oluşması beklenirken, test edilen bakteride karbapenemaz varlığında inaktive olan meropenem diski inhibisyon zonu oluşturamaz. Böylece test edilen bakteride, karbapenemaz üretiminden söz edilebilir (117).

2.3.2. Biyokimyasal yöntemler

Karbapenemaz üreten suşların, daha kısa sürede ve düşük maliyetle saptanması amacıyla geliştirilmekte olan yöntemlerdir.

Carba NP testi karbapenemlerin β-laktam halkasının test edilecek bakteri izolatı tarafından hidrolizi esası üzerine kurulmuş, hızlı, duyarlı, özgül ve kullanışlı bir biyokimyasal testdir. Karbapenem hidrolizi sonucu pH değişimi olmaktadır ve böylece testte indikatör olarak kullanılan fenol kırmızısı solüsyonunun rengi kırmızıdan sarıya dönmekte ve bu durum pozitif sonuç olarak değerlendirilmektedir. *Enterobacteriales* ve *Pseudomonas* türlerinde karbapenemaz tespiti için dünya çapında yaygın bir şekilde onaylanmış olmasına rağmen, GES ve/veya OXA tipi karbapenemazları tespit edemediği için *Acinetobacter* türlerinde onaylanmamıştır. Bu amaçla aynı test kullanılan inokülüm miktarı iki katına çıkarılarak ve lizis tamponu 5M NaCl ile

değiştirilerek modifiye edilmiş ve CarbAcineto NP testi geliştirilmiştir. Bu güncelleme ile yapılan bir çalışmada karbapenemaz tespit etmede özgüllüğü ve duyarlılığı sırasıyla %100 ve %94.7 olarak bulunmuştur (118).

Blue-Carba testi, Gram negatif bakterilerde karbapenem direncini belirlemek için yapılan hızlı (< 2 saat) bir biyokimyasal testtir. Bakteri kolonilerinin imipenemi invitro hidrolize etmesi ile oluşan pH değişikliğinin indikatör olarak kullanılan bromtimol mavisindeki renk değişikliği (maviden yeşile/sarıya veya yeşilden sarıya) ile tespit edilmesi prensibine dayanır (119).

Karbapenemaz üretimi tespitinde yapılan bir başka yaklaşım da Ultraviole (UV) spektrofotometrisidir. Bu yöntemde gece boyu santrifüje edilmiş ve sonike edilmiş *A. baumannii* kolonileri spektrofometriye tabi tutulur (İmipenem dalga boyu 297 nm). Bu tekniğin, VIM, IMP ve SIM türü karbapenemaz enzimlerinin tespitinde etkin olduğu, CHDL ve NDM karbapenemazları saptayamadığı düşünülmektedir (120).

MALDI-TOF MS bakteride karbapenemaz varlığı durumunda karbapenemler substrat olarak kullanılarak hidrolitik ürünlerin analizi sayesinde kısa sürede karbapenemaz üretimini saptayabilmektedir. Kempf ve arkadaşları (121) 106 karbapenemaz dirençli *A.baumannii* izolatı kullanarak yaptıkları çalışmada duyarlılık ve özgüllüğün %100 olduğunu göstermişlerdir. Bu yöntem hızlı ve etkin bir şekilde karbapenemaz tespiti yapabilmektedir. Ancak pahalı ve deneyimli personel gerektirmesi en önemli dezavantajlarıdır.

2.3.3. Genotipik yöntemler

Karbapenemazların saptanmasında kullanılan teknikler arasında, nükleik asit temelli yöntemler özellikle dikkat çekmektedir. Bu yöntemler yüksek özgüllük ve duyarlılıkları nedeniyle ‘‘altın standart’’ yöntemler olarak kabul edilmektedir. Günümüzde, karbapenemazların saptanmasında kullanılan moleküler tekniklerin çoğu, polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayanmaktadır. Single end-point PCR hem epidemiyolojik hem de direnç çalışmalarında kullanılan ilk moleküler yöntemlerden biridir. Single end-point PCR sadece bir genin (reaksiyon başına) saptanmasına izin verirken, multipleks PCR tekniği tek bir reaksiyonda farklı hedef genlerin

tanımlanmasını mümkündür. Şimdiye kadar birçok *A. baumannii* suşunda karbapenemazları tespit eden multipleks PCR analizi tanımlanmıştır.

Woodford ve arkadaşları (122) *Acinetobacter* türleri arasında dört grup OXA karbapenemazın (OXA-23 benzeri OXA-40/24 benzeri OXA-58 benzeri ve OXA-51 benzeri) identifikasyon ve ayırt edilmesini sağlayan multipleks PCR tekniğini geliştirmişlerdir. Poirel ve arkadaşları (123) ise üç multipleks PCR reaksiyonunda 11 karbapenemaz kodlayan genin (*bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla* $_{NDM}$, *bla*$_{SPM}$, *bla*$_{AIM}$, *bla*$_{DIM}$, *bla*$_{GIM}$, *bla*$_{SIM}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{BIC}$ *ve bla*$_{OXA-48}$*)* belirlenmesini sağlayan tekniği tanımlamış ve değerlendirmişlerdir.

Bir diğer moleküler yöntem olan real-time PCR (gerçek zamanlı PCR) single end point PCR'dan farklı olarak jel elektroforezi gerektirmez, tanımlama ve amplifikasyon aşamalarını tek basamakta çözer. Bu uygulamada iki yaklaşım vardır; ya çift iplikli DNA'ya bağlanan boyalar kullanılır (örn; SYBR Green, Eva Green) ya da spesifik dizilerden oluşmuş problar kullanılır (örn; TaqMan®, Molecular Beacons, Scorpion). Ayrıca end-point PCR metodu kantitatif sonuç vermezken real-time PCR hem kısa sürede hem de kantitatif sonuç verir. *A. baumannii* izolatlarında karbapenemaz tespitinde gerçek zamanlı PCR uygulamasının bir örneği Pasanen ve arkadaşları (124) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, multipleks real-time PCR yöntemi ile SYBR gren kullanılarak sadece iki ayrı reaksiyonda KPC, VIM, IMP, GES-1/-10, OXA-48, NDM, GIM-1, SPM-1, IMI/NMC-A SME, CMY-10, SFC-1, SIM-1, OXA-23-benzeri, OXA-40/24-benzeri, OXA-58 ve ISAba1-OXA-51-benzeri genler tanımlanmıştır. Huang ve arkadaşları da (125) TaqMan probları kullanarak multipleks real-time PCR'la *bla*$_{OXA-23-like}$, *bla*$_{OXA-51-like}$, *bla*$_{OXA-24/40-like}$ ve *bla*$_{OXA-58-like}$ genlerini eş zamanlı olarak tanımlamışlardır. Bu testlerin yüksek spesifite göstermeleri ve hızlı bir şekilde karbapenem dirençli *A. baumannii* tespit etmesi nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanılabileceği öngörülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Besiyerleri

- %5 Koyun Kanlı Agar (Oxoid, İngiltere)
- Eozin Metilen Blue Agar (EMB) (Oxoid, İngiltere)
- Mueller Hinton Agar (Pronadisa, Spain)
- Triple Sugar Iron Agar (Üç Şekerli Demirli Besiyeri) (Oxoid, İngiltere)
- Kan Kültürü Vasatları (BD BactecFX) (Becton Dickinson company, ABD)

3.1.2. Kimyasallar ve Ayıraçlar

- Kovaks Ayıracı
- Katalaz Ayıracı
- N, N, N, N-Tetrametil-p-fenilendiamin hidroklorid (oksidaz)
- Nükleaz Free Su
- Steril Distile Su

3.1.3.Kullanılan Kit ve Antibiyotik Diskleri

- İmipenem 10 µg (Bioanalyse)
- Meropenem 10 µg (Bioanalyse)
- Ciprofloxacin 5 µg (Bioanalyse)
- Amikacin 30 µg (Bioanalyse)
- Gentamicin 10 µg (Bioanalyse)
- Trimethoprim/Sulfamethoxaole 1.25/23.75 µg (Bioanalyse)
- Ampicillin/Sulbactam 10/10 µg (Bioanalyse)
- BD Phoenix NMIC-400
- BD Phoenix NID

3.1.4. DNA İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Kit, Malzeme ve Cihazlar

- GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher)
- 1.5 ml Mikrosantrifüj Tüp (Biopointe)
- 2 ml Mikrosantrifüj Tüp (Biopointe)
- Steril 15 ml Tüp (Nest Scientific)
- Steril 50 ml Tüp (Nest Scientific)
- Taq DNA Polimeraz (GeneDireX)
- Ethanol Absolute (Merck)
- dNTP Set (GeneDireX)
- TAE 50X Solüsyon (SNP)
- TBE 10X Solüsyon (SNP)
- GeneRuler 50 bp DNA Ladder (ThermoFisher)
- Agaroz (Prona)
- Gel Loading Dye (Bromophenol blue)(SNP)
- Vorteks
- Sıcak Su Banyosu
- Santrifüj
- Elektrik Akımı Kaynağı
- Pipet Seti
- 10 µl Pipet Ucu
- 200 µl Pipet Ucu
- Jel Görüntüleme Cihazı

3.2. Çalışma Grubu

Ocak 2018-Eylül 2018 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli 80 *A. baumannii* izolatı çalışmaya dâhil edildi. Bir hastanın aynı dönemde farklı örneklerinde üreyen birden fazla bakteri olduğu durumlarda çalışmaya sadece bir örnekte üreyen *Acinetobacter sp.* alındı. Klinik örneklerinde *Acinetobacter sp.* üreyen bütün hastalar, hastanemiz İnfeksiyon Kontrol

Komitesi tarafından değerlendirilerek Amerika'daki Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) kriterlerine göre hastane infeksiyonu olup olmadıklarına karar verildi (126).

3.3. İzolatların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Laboratuvarımıza gelen idrar örnekleri %5 KKA ve EMB agar, diğer örnekler ise %5 KKA, EMB agar ve çikolata agara ekilerek uygun koşullarda inkübe edildi. Kan kültür vasatına inoküle edilmiş olarak gönderilen kan örnekleri ise otomatize kültür sistemine (BACTEC™ 9120 Blood Culture System) yerleştirildi. Üreme sinyali izlenildiğinde kan kültür vasatından alınan bir miktar örnek %5 KKA, EMB agar ve çikolata agara ekilerek ve 35±2˚C'de 16-24 saat inkübe edildi. Besiyerinde saf koloni şeklinde üreyen aerob, Gram negatif diplokok veya kokobasil morfolojisindeki bakterilere ait katalaz (+), oksidaz (-) kolonilerden TSİ besiyerine inokülasyon yapıldı. Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılığı Kirby–Bauer disk difüzyon tekniği ile EUCAST önerileri dikkate alınarak MHA'da yapıldı. Kalite kontrol kökeni olarak E. *coli ATCC 25922* kullanıldı. Steril, tek kullanımlık, 15 ve 9 cm çaplı petri plaklarına 4 mm yükseklikte olacak şekilde Mueller-Hinton agar (Pronadisa) döküldü ve kullanılıncaya kadar +4˚C'de bekletildi. Pasajlanan plaklarda saf koloni halinde üremiş olan bakteri kolonilerinden steril öze ile bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklık sağlanacak şekilde süspanse edildi. Steril eküvyon ile bu süspansiyondan MHA besiyeri üzerine yaygın ekim yapıldı ve üretici firmalardan sağlanan ampisilin/sulbaktam (SAM), gentamisin (GN), amikasin (AK), siprofloksasin (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MEM) ve trimetoprim/sulfametaksazol (SXT) antibiyotik diskleri kenardan 15 mm, birbirinden 25–30 mm uzaklıkta olacak şekilde plaklara yerleştirildi (127). Petri kutuları 35–37˚C'de, 18–24 saat inkübe edildikten sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü. Disk difüzyon yöntemiyle karbapenem dirençli olarak belirlenen *Acinetobacter* suşları tür düzeyinde tanımlama ve duyarlılık tespiti amacıyla otomotize sisteme yüklendi. Antibiyotik duyarlılık testleri için, CrystalSpec™ nefelometre kullanılarak ID buyyonu içerisinde yoğunluğu 0.5 McFarland standartına ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlandı. AST buyyon içerisine bir damla Phoenix™ AST indikatörü damlatıldı. $1x10^8$ CFU/ml olan bakteri süspansiyonundan, antimikrobiyal duyarlılık

test buyyon tüpüne 25 µL ilave edildi. Bu paneller 35˚C inkübasyon sıcaklığı sağlayan ve 20 dakikada bir analiz yapan Phoenix™ cihazına yerleştirildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları NMIC-400/NID panellerinin kullanıldığı BD Phoenix™ sistemi ile test edildi.

Elde edilen sonuçlar EUCAST kriterlerine göre Tablo 3.1'de belirtildiği şekilde duyarlı (S), orta duyarlı (I) veya dirençli (R) olarak yorumlandı. Ampicillin/ sulbactam duyarlılıkları EUCAST'da İE (yetersiz veri) ifadesi olduğu için CLSI kriterleriyle değerlendirilmiştir (127, 128).

Tablo 3.1. *Acinetobacter* İzolatları İçin EUCAST'ın Önerdiği Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve İnhibisyon Zon Çapları.

		Disk zon çapı (mm)		**MİK değerleri (µg/ml)**	
Antibiyotik	**Disk içeriği (µg)**	**S ≥ (Duyarlı)**	**R < (Dirençli)**	**S ≥ (Duyarlı)**	**R < (Dirençli)**
Ciprofloxacin	5	21	21	1	1
Levofloxacin	5	23	20	0.5	1
Amikacin	30	19	17	8	16
Gentamicin	10	17	17	4	4
Netilmicin	10	16	16	4	4
Tobramicin	10	17	17	4	4
Doripenem	10	24	21	1	2
İmipenem	10	23	17	2	8
Meropenem	10	21	15	2	8
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25-23.75	14	11	2	4
Ampicillin-sulbactam	10-10	15	11	8/4	32/16

3.4. İmipenem ve Meropenem Duyarlılığının Standart Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Belirlenmesi

Testte EUCAST ISO standardı 20776-1, 2006 önerileri doğrultusunda katyon ayarlı Mueller-Hinton-Buyyon (KAMHB), U tabanlı 96 kuyucuklu mikrodilüsyon

plakları ve kontrol suşu olarak da *E.coli* ATCC25922 kullanıldı. %10'luk gliserinli buyyon besiyeri içinde -80°C'de stoklanan bakteriler Mueller-Hinton agar besiyerine pasajlanarak etüvde 36°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Bu bakteri kültüründen 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde direkt koloni süspansiyonu yöntemiyle inokulum hazırlanıp mikrodilüsyon plağındaki son inokülum konsantrasyonu 5×10^6 CFU /ml olacak şekilde sulandırım yapıldı. Steril plaklara 100 µl Mueller Hinton sıvı besiyeri dağıtıldı. Birinci kuyucuklara, membran filtrasyon ile steril edilmiş 100 µl stok antibiyotik solüsyonu eklendi ve 12. kuyucuğa kadar seri dilüsyonlar yapılıp, 12. kuyucuktan 100 µl dışarı atıldı. Bakteri süspansiyonlarından tüm kuyucuklara 100 µl dağıtıldı. Bu şekilde antibiyotiğin kuyucuklardaki final konsantrasyonunun 256-0.125 µg/ml arasında olması sağlandı. Her plakta, besiyeri ve bakteri üreme kontrollerine yer verildi. Plaklar 35°C'de 16-20 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üreme görülmeyen ilk kuyucukda ki antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi (127).

3.5. OXA Karbapenemazların PCR Yöntemiyle Araştırılması

3.5.1 *Acinetobacter baumannii* İzolatlarından DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu yapılacak klinik ve pozitif kontrol suşları bir gün öncesinden saklama stoklarından MHA plaklarına pasajlandı. Üreyen saf kolonilerden Thermofisher GeneJET Genomic DNA Purification Kit'i kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde DNA ekstraksiyonu yapıldı:

1. 1.5 veya 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde hazırlanan ve $2x10^9$ (McFarland 7) bakteri içeren homojen süspansiyon 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
2. Çökelti, 180 µL Digestion Solüsyonu ile tekrar süspanse edildi. 20 µL Proteinaz K Solüsyonu eklendi ve homojen bir süspansiyon elde etmek için vorteksleyerek veya pipetleyerek iyice karıştırıldı.
3. Örnek, bakteriler tamamen eriyene kadar (yaklaşık 30 dakika) çalkalamalı su banyosu, sallanma hareketli çalkalayıcı veya termomikser kullanılarak 56°C'de inkübe edildi.
4. 20 µL RNaz A Solüsyonu eklendi, vortekslendi ve karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

5. Örneğe 200 µL Lizis Solüsyonu eklendi. Homojen bir karışım elde edilinceye kadar yaklaşık 15 saniye boyunca vortekslenerek iyice karıştırıldı.
6. %50'lik etanol'den 400 µL eklendi ve pipetle veya vorteksle karıştırıldı.
7. Hazırlanan lizat, bir toplama tüpüne yerleştirilmiş GeneJET Genomik DNA İzolasyon Kolonu'na aktarıldı. Kolon 6000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Kolon bu toplama tüpünden çıkarılarak 2 mL'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Her kullanımdan sonra GeneJET Genomik DNA Saflaştırma Kolonlarının bulunduğu poşeti ile sıkıca kapatıldı.
8. 500 µL Yıkama Tamponu I (etanol eklenmiştir) ilave edildi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvı kısım döküldü ve izolasyon kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
9. 500 µL Yıkama Tamponu II eklendi. Maksimum hızda 3 dakika santrifüjlendi (≥12000 x g). Sıvı içeren toplama tüpü atıldı ve kolon steril 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne (kit içerisinde yok) aktarıldı.
10. Genomik DNA'yı elde etmek için (kolondan uzaklaştırmak için) kolon zarının merkezine 200 µL Elüsyon Tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika boyunca inkübe edildi ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi.
11. İzolasyon kolonu atıldı. Kalan sıvı saflaştırılmış DNA içeriyordu. PCR işlemi uygulanacak güne kadar -20˚C'de saklandı.

3.5.2. PCR Yöntemi

Çalışmada Woodford ve arkadaşlarının (122) çalışması referans alınarak *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40}}$, *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ gen bölgelerinin PCR ile çalışılması planlanmıştır.

3.5.2.1. OXA Karbapenemazların PCR Yöntemiyle Araştırılmasında Kullanılan Primerler

PCR'de *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40}}$, *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ gen bölgelerinin çoğaltılması için gerekli primer çiftleri Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri (129).

Primer	Dizi (5'→ 3')	Baz Çifti (bp)
OXA-23-F	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501
OXA-23-R	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	
OXA-24-F	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246
OXA-24-R	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	
OXA-51-F	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353
OXA-51-R	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	
OXA-58-F	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599
OXA-58-R	5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	
OXA-143-F	5'-TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT	149
OXA-143-R	5'-TAA TCT TGA GGG GGC CAA CC	

Gen bölgelerinin amplifikasyonları için beş farklı primer seti kullanılmıştır. Hedeflenen DNA dizilimleri Gen bankası verileri yardımı ile tarama yapılarak bulunmuştur. Liyofilize halde bulunan primerlerin (Sentromer) sulandırma işlemi üretici firma talimatları doğrultusunda protokole uygun olarak yapılmış ve 100 pmol/µl konsantrasyonda stok primerler oluşturulmuştur. Çalışmamız için kullanılacak primerlerin konsantrasyonu 10 pmol/µl olarak belirlenmiştir. Bunun için 100 pmol/µl konsantrasyonda stok primerden 10 µl alınarak 90 µl distile su ile toplam hacim 100 µl olacak şekilde tekrar sulandırılmış, ependorflara ayrılıp -20˚C'de saklanmıştır.

3.5.2.2. PCR Reaksiyon Karışımı

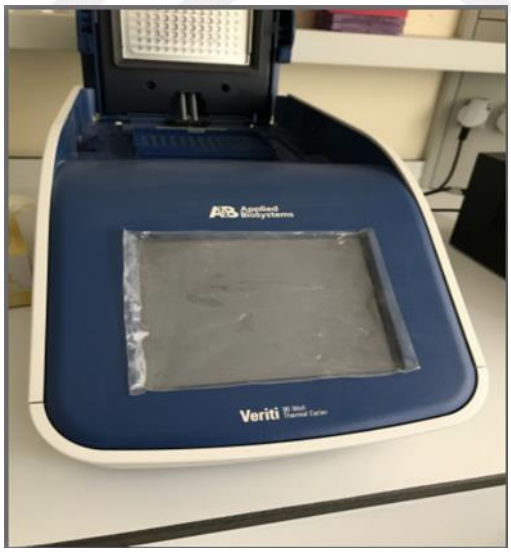
PCR'de *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24}}$, *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\textit{OXA-143}}$ gen bölgelerinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon karışımı (master mix) Tablo 3.3'de sunulmuştur.

Tablo 3.3. PCR Reaksiyonu İçin Hazırlanan Master Mix Karışımı.

Reaksiyon içeriği	**Volüm**
10X PCR buffer + $MgCL_2$	5 µl
10 mM dNTP karışımı	1 µl
Taq DNA polymerase (6U)	0.5 µl
Primer F (10 pmol/µl)	1 µl
Primer R (10 pmol/µl)	1 µl
Kalıp DNA	5 µl
dH2O	36.5 µl
Toplam	50 µl

3.5.2.3. Amplifikasyon

Hazırlanan reaksiyon karışımı ABI Veriti (Applied Biosystems) Şekil 3.1 cihazına yüklendi ve *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-24}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA-58}$ *ve bla*$_{OXA-143}$ gen bölgelerinin amplifikasyonu için sırasıyla Tablo 3.4-3.8'de ki programlar kullanıldı.



Şekil 3.1: ABI Veriti (Applied Biosystems) Thermal Cycler.

Tablo 3.4. *bla*$_{\text{OXA-23}}$ Gen Bölgesi İçin PCR Programı.

94ºC'de 5 dakika (ön denatürasyon)	1 Döngü
94 ºC'de 25 saniye (hedef DNA denatürasyonu) 55 ºC'de 40 saniye (primer bağlanması) 72 ºC'de 50 saniye (primer uzaması)	33 Döngü
72 ºC'de 6 dakika (son uzama)	1 Döngü

Tablo 3.5. *bla*$_{\text{OXA-24}}$ Gen Bölgesi İçin PCR Programı.

94ºC'de 5 dakika (ön denatürasyon)	1 Döngü
94 ºC'de 25 saniye (hedef DNA denatürasyonu) 57 ºC'de 40 saniye (primer bağlanması) 72 ºC'de 50 saniye (primer uzaması)	33 Döngü
72 ºC'de 6 dakika (son uzama)	1 Döngü

Tablo 3.6. *bla*$_{\text{OXA-51}}$ Gen Bölgesi İçin PCR Programı.

94ºC'de 5 dakika (ön denatürasyon)	1 Döngü
94 ºC'de 25 saniye (hedef DNA denatürasyonu) 52 ºC'de 40 saniye (primer bağlanması) 72 ºC'de 50 saniye (primer uzaması)	33 Döngü
72 ºC'de 6 dakika (son uzama)	1 Döngü

Tablo 3.7. *bla*$_{\text{OXA-58}}$ Gen Bölgesi İçin PCR Programı.

94ºC'de 5 dakika (ön denatürasyon)	1 Döngü
94 ºC'de 25 saniye (hedef DNA denatürasyonu) 55 ºC'de 40 saniye (primer bağlanması) 72 ºC'de 50 saniye (primer uzaması)	33 Döngü
72 ºC'de 6 dakika (son uzama)	1 Döngü

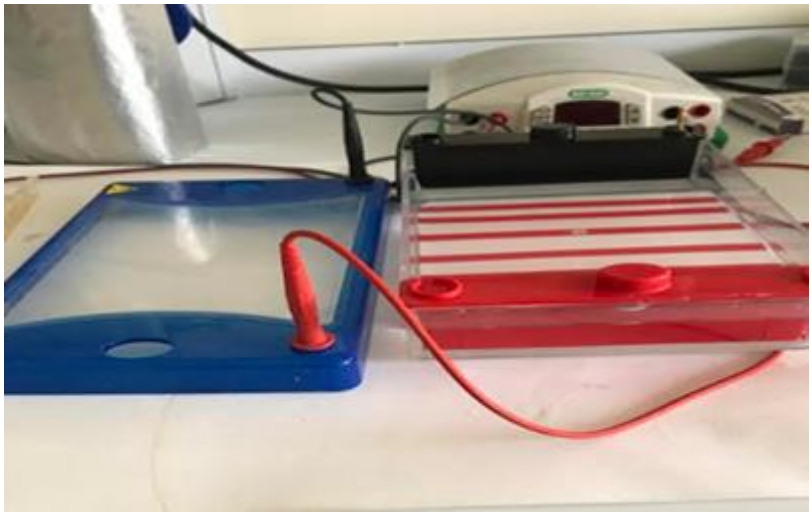
Tablo 3.8. *bla*$_{OXA-143}$ Gen Bölgesi İçin PCR Programı.

94ºC'de 4 dakika (ön denatürasyon)	1 Döngü
94 ºC'de 1 dakika (hedef DNA denatürasyonu) 55 º C'de 1 dakika (primer bağlanması) 72 º C'de 1 dakika (primer uzaması)	35 Döngü
72 º C'de 7 dakika (son uzama)	1 Döngü

3.5.2.4. PCR Ürünlerinin Analizi

Amplifiye edilmiş multipleks PCR ürünlerinin gözlenmesi için jel elektroforez yapıldı. Bu uygulamalar aşağıdaki sıralamayla yapılmıştır:

1. 1.5 gr agaroz 150 ml 0.5X TBE (Ph 8.3) tamponu içeren erlen içerisinde çözüldü ve mikrodalga fırında ısıtılarak (4-6 dk) agarozun tamamen erimesi sağlandı.
2. Jel ısısı düşünce katılaşma gerçekleşmeden içerisine 10 µl etidyum bromid (Sigma-Chemical Co.) katıldı.
3. Jel kalıbına uygun taraklar takılarak hazırlanan agaroz jel yavaşça döküldü ve oda ısısında katılaşması beklendi.
4. Katılaşan jel elektroforez tankına (Wealtec, Elite 300 Plus, USA) yerleştirildi. Taraklar çıkarıldı.
5. PCR ürününden 5 µl alınarak yükleme boyası (6X Loading Dye, SNP) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.
6. Jele yüklenen örneklerin başına ve sonuna 2'şer µl olacak şekilde merdivenler (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) yerleştirildi.
7. 120 V, 400 mA gücünde 30 dk boyunca jelde yürütüldü.
8. İşlem sonrası değerlendirme UV cihazı (Vilber- Lourmat) ile yapıldı. (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Jel elektroforez düzeneği.

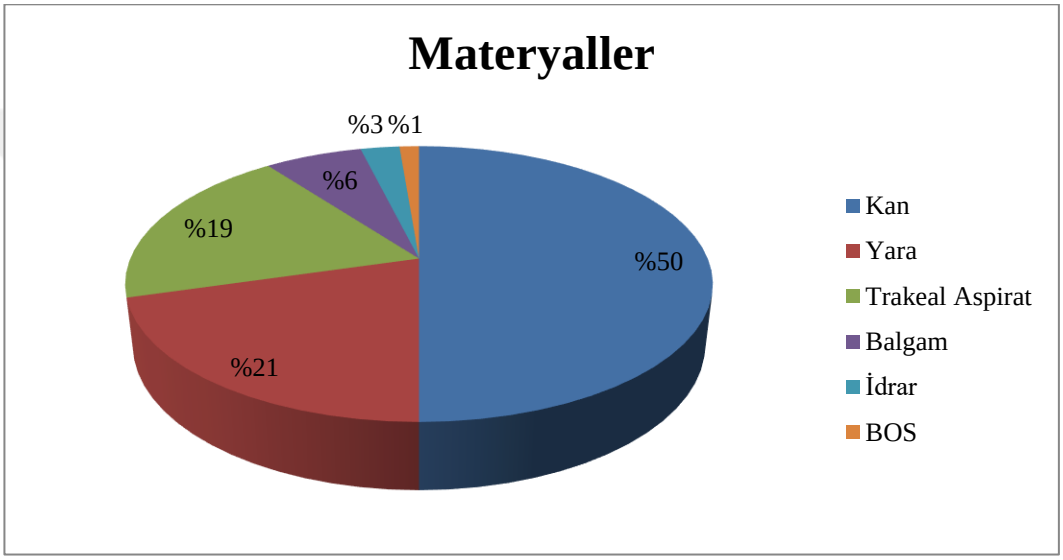
3.5.2.5. PCR Sekans Analizi

PCR ürünlerinde çift yönlü DNA dizi analizi yaptırıldı (MedSanTek). Elde edilen dizi analizi sonuçları FinchTv programına yüklendi. Elde edilen sonuçlar hem nükleotid hem de aminoasit düzeyinde, National Center for Biotechnology Information (NCBI) ve European Bioinformatics Institute (EBI)'nin web tabanlı servisleri kullanılarak referans dizilerle karşılaştırıldı. (*bla*$_{\text{OXA-23}}$, LC096086.1 ve *bla*$_{\text{OXA-51}}$, CP023029.1)

4. BULGULAR

4.1. *A. baumannii* İzolatlarının İzole Edildiği Materyallerin Dağılımı

Çalışmamıza aldığımız *A. baumannii* izolatlarından ikisi (20 ve 64 nolu örnekler) seri pasajlarda üremediği için çalışmadan çıkarılarak 78 suşla çalışıldı. Bu suşların 39'u kan (%50), 16'sı yara (%20.5), 15'i trakeal aspirat (%19.2), 5'i balgam (%6.4), 2 si idrar (%2.5) ve 1'i Beyin Omurilik Sıvısı (%1.2) idi. Laboratuvarımıza gönderilen materyallerin dağılımı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

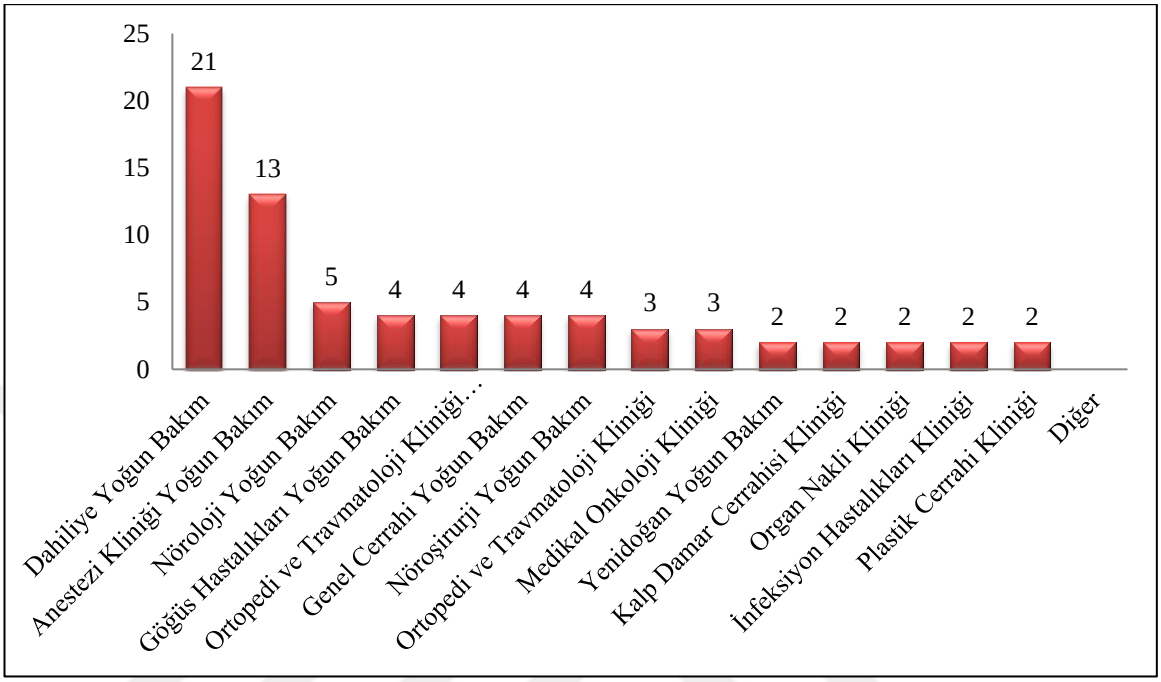


Şekil 4.1. Hastalardan Gönderilen Materyallerin Dağılımı.

4.2. *A. baumannii* İzolatlarının Gönderildiği Servislerin Dağılımı

Suşların izole edildiği örneklerin 21'i (%26.9) Dahiliye Yoğun Bakım, 13'ü (%16.6) Anestezi Kliniği Yoğun Bakım, 5'i (%6.4) Nöroloji Yoğun Bakım, 4'ü (%5.1) Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım, 4'ü (%5.1) Ortopedi ve Travmatoloji Yoğun Bakım, 4'ü (%5.1) Genel Cerrahi Yoğun Bakım, 4'ü (%5.1) Nöroşirurji Yoğun Bakım, 3'ü (%3.8) Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, 3'ü (%3.8) Medikal Onkoloji Kliniği, 2'si (%2.5) Yenidoğan Yoğun Bakım, 2'si (%2.5) Kalp Damar Cerrahi Kliniği, 2'si (%2.5) Organ Nakli Kliniği, 2'si (%2.5) İnfeksiyon Hastalıkları Kliniği, 2'si (%2.5) Plastik Cerrahi Kliniği, 1 er (%1.2) tanesi de Göğüs Cerrahi Kliniği, Nöroloji Kliniği, Beyin Cerrahi Kliniği, Yanık Ünitesi, Hepatobilier Cerrahi, Çocuk Hastalıkları Yoğun Bakım ve Dahiliye Gastroenteroloji Kliniğinde takip edilen

hastalara aitti. Buna göre 78 örnekten 55 tanesi (%70.5) yoğun bakımda yatan hastalardan izole edilmiştir. *A. baumannii* suşlarının servislere göre dağılımı Şekil 4.1'de özetlenmiştir.



*Diğer: Göğüs Cerrahi Kliniği, Nöroloji Kliniği, Beyin Cerrahi Kliniği, Yanık Ünitesi, Hepatobilier Cerrahi, Çocuk Hastalıkları Yoğun Bakım ve Dahiliye Gastroenteroloji Kliniği

Şekil 4.2. *A. baumannii* suşlarının servislere göre dağılımı.

4.3. *A. baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

4.3.1. Otomatize sistemle elde edilen antibiyotik duyarlılıkları

Çalışmanın Ocak–Şubat aylarında otomotize sistem olarak VITEK-2 sistemi (bioMerieux, ABD) kullanılırken daha sonra Phoenix (BD, ABD) otomatize sistemine geçilmiştir. İki sistem farklı antibiyotikler çalıştığı için farklı antibiyogram sonuçları ortaya çıkmıştır. Her ikisi için de antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. İki tabloda da görüldüğü gibi tüm izolatlar karbapenemlere ve siprofloksasine dirençli bulunmuştur. Tüm izolatlar MDR olarak saptanmış olup PDR izolat saptanmamıştır.

Yine çalışma sırasında CLSI ve EUCAST'ın ortak görüşü yapılan ''Otomatize sistemlerin altın standart olan Broth Mikrodilüsyonla yapılan karşılaştırma

çalışmalarında önemli derecede fark olduğu gözlenmiştir'' raporu nedeniye kolistin sensititre ve Broth Mikrodilüsyon testlerine geçilmiş otomatize sistem duyarlılığı bildirilmemiştir. Bu nedenle aşağıdaki tablolara kolistin duyarlılığı eklenmemiştir (130). Kolistin sensititre yöntemiyle (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) çalışılmış, tüm izolatlar duyarlı tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. VİTEK-2 Sistemi İle Test Edilen *A. baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.

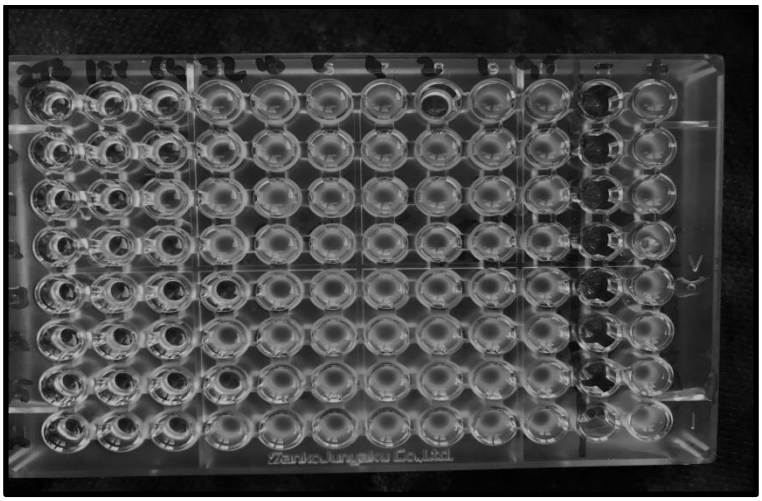
Antibiyotik	**Suş sayıları (n:16)**		
	Duyarlı	**Orta Duyarlı**	**Dirençli**
Amikacin	-	-	16
Gentamicin	4	1	11
Trimethoprim-sulfamethoxazole	12	-	4
Meropenem	-	-	16
Ciprofloxacin	-	-	16

Tablo 4.2. PHOENİX Sistemi İle Test Edilen *A. baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.

Antibiyotik	**Suş sayıları (n:62)**		
	Duyarlı	**Orta Duyarlı**	**Dirençli**
Amikacin	1	-	61
Gentamicin	6	-	56
Trimethoprim-sulfamethoxazole	19	13	30
Meropenem	-	-	62
İmipenem	-	-	62
Ciprofloxacin	-	-	62
Ampicillin-sulbactam	4	-	58

4.3.2. Mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen antibiyotik duyarlılıkları

Otomatize sistemler ve konvansiyonel yöntemlerle karbapeneme dirençli bulunmuş izolatlarda İmipenem ve Meropenem antibiyotiklerine karşı duyarlılık EUCAST önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemiyle çalışıldı.



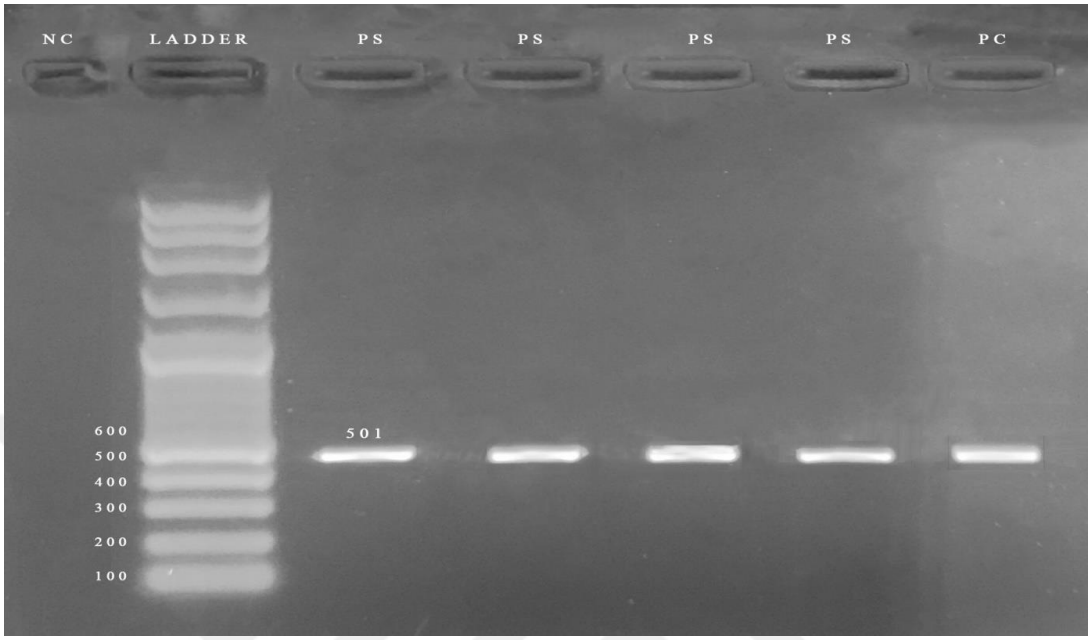
Şekil 4.3. Meropenem Antibiyotiğinin Mikrodilüsyon Yöntemiyle Çalışılması.

Tablo 4.3. İmipenem ve Meropenem MİK Değerlerine Göre Suşların Dağılımı.

MİK değerleri (µg/ml)	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**
İmipenem MİK değerine göre suşların sayıları	9	11	18	17	20	3
Meropenem MİK değerine göre suşların sayıları	13	39	4	7	12	3

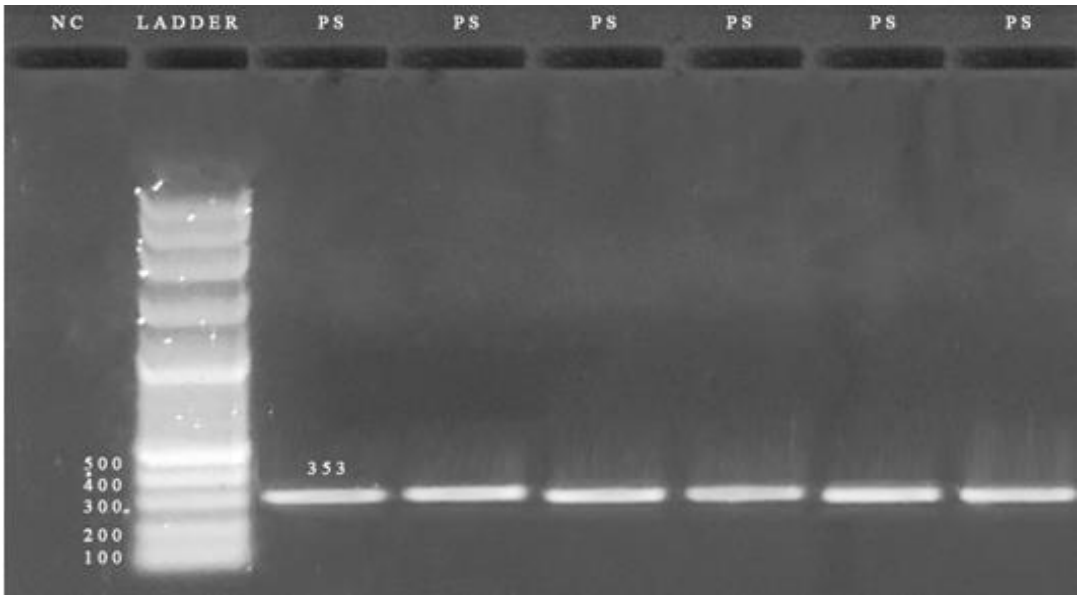
4.4. Karbapenem Dirençli *A. baumannii* İzolatlarının PCR'de *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40}}$, *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Yapılan çalışmada önce PCR şartlarını optimize etmek için *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ genleri pozitif kontrol suşlarda bant saptanmış daha sonra çalışmaya geçilmiştir. Her gen bölgesi ayrı ayrı çalışılmıştır. Tüm çalışmalarda ilk kuyuya negatif kontrol eklenmiş negatif kontrollerde çoğalma gözlenmemiştir. Çalışılan beş gen bölgesi içinden bizim izolatlarımızda sadece *bla*$_{\text{OXA-23}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-51}}$ gen bölgeleri saptanmıştır**.** Bu gen bölgelerine ait PCR görüntüleri Şekil 4.4 ve 4.5'de ki gibidir.



Şekil 4.4. *bla*$_{\text{OXA-23}}$ Gen Bölgesinin PCR Sonrası Jel Görüntüsü.

Ladder: GeneRuler 100 bp Plus DNA, PS 1-4: Pozitif Suş, PC: Pozitif Kontrol, NC: Negatif Kontrol



Şekil 4.5. *bla*$_{\text{OXA-51}}$ Gen Bölgesinin PCR Sonrası Jel Görüntüsü.

Ladder: Generuler 100 Bp Plus DNA, PS 1-6: Pozitif Suş, NC: Negatif Kontrol

4.4.1. Karbapenem Dirençli *A. baumannii* İzolatlarında PCR ile saptanan *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24}}$, *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ Gen Bölgelerinin Dağılımı

A.baumannii'ye özgü yapısal bir gen grubu olan *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ gen grubu, izolatların 77 (%98.7)'sinde saptandı. İzolatların 77 (%98.7)'sinde saptanan *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$ gen grubu, *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ gen grubuyla birlikte en sık rastlanan gen gruplarıydı. Suşların 75 (%97.4)'inde *bla*$_{\text{OXA-23}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-51}}$ birlikte saptandı. İzolatların hiçbirinde *bla*$_{\text{OXA-24/40}}$ *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ gen grubu pozitifliği saptanmadı. PCR ile saptanan, *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40,}}$ *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ genlerinin pozitiflik oranları ve dağılımı Tablo 4.4 ve 4.5'de sunulmuştur.

Tablo 4.4. *bla*$_{\text{OXA-23}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40,}}$ *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA-58}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ Genlerinin Pozitiflik Oranları.

Enzim	Sayı (%)
***bla*$_{\text{OXA-23}}$**	98.7
***bla*$_{\text{OXA-51}}$**	98.7
***bla*$_{\text{OXA-23}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-51}}$**	97.4
***bla*$_{\text{OXA-24/40}}$**	0
***bla*$_{\text{OXA-58}}$**	0
***bla*$_{\text{OXA-143}}$**	0

Tablo 4.5. *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-24/40}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA-58}$ ve *bla*$_{OXA-143}$ Genlerinin Dağılımı.

Suş No*	*bla*$_{OXA23}$	*bla*$_{OXA-24/40}$	*bla*$_{OXA-51}$	*bla*$_{OXA-58}$	*bla*$_{OXA-143}$
1	+	–	+	–	–
2	+	–	+	–	–
3	+	–	+	–	–
4	+	–	+	–	–
5	+	–	+	–	–
6	+	–	+	–	–
7	+	–	+	–	–
8	+	–	+	–	–
9	+	–	+	–	–
10	+	–	+	–	–
11	+	–	+	–	–
12	+	–	+	–	–
13	+	–	+	–	–
14	+	–	+	–	–
15	+	–	+	–	–
16	+	–	+	–	–
17	+	–	+	–	–
18	+	–	+	–	–
19	+	–	+	–	–
21	+	–	+	–	–
22	+	–	+	–	–
23	+	–	+	–	–
24	+	–	+	–	–
25	+	–	–	–	–
26	+	–	+	–	–
27	+	–	+	–	–
28	+	–	+	–	–
29	+	–	+	–	–

Suş No*	*bla*$_{OXA23}$	*bla*$_{OXA-24/40}$	*bla*$_{OXA-51}$	*bla*$_{OXA-58}$	*bla*$_{OXA-143}$
30	+	–	+	–	–
31	+	–	+	–	–
32	+	–	+	–	–
33	+	–	+	–	–
34	+	–	+	–	–
35	+	–	+	–	–
36	+	–	+	–	–
37	+	–	+	–	–
38	+	–	+	–	–
39	+	–	+	–	–
40	+	–	+	–	–
41	-	–	+	–	–
42	+	–	+	–	–
43	+	–	+	–	–
44	+	–	+	–	–
45	+	–	+	–	–
46	+	–	+	–	–
47	+	–	+	–	–
48	+	–	+	–	–
49	+	–	+	–	–
50	+	–	+	–	–
51	+	–	+	–	–
52	+	–	+	–	–
53	+	–	+	–	–
54	+	–	+	–	–
55	+	–	+	–	–
56	+	–	+	–	–
57	+	–	+	–	–
58	+	–	+	–	–

Suş No*	*bla*OXA23	*bla*OXA-24/40	*bla*OXA-51	*bla*OXA-58	*bla*OXA-143
59	+	–	+	–	–
60	+	–	+	–	–
61	+	–	+	–	–
62	+	–	+	–	–
63	+	–	+	–	–
65	+	–	+	–	–
66	+	–	+	–	–
67	+	–	+	–	–
68	+	–	+	–	–
69	+	–	+	–	–
70	+	–	+	–	–
71	+	–	+	–	–
72	+	–	+	–	–
73	+	–	+	–	–
74	+	–	+	–	–
75	+	–	+	–	–
76	+	–	+	–	–
77	+	–	+	–	–
78	+	–	+	–	–
79	+	–	+	–	–
80	+	–	+	–	–

41 örnek numarasıyla çalışılan *A. baumannii* izolatı dışındaki tüm izolatlarda *bla*$_{\text{oxa-23}}$ tespit edilmiştir. Bu örnek nöroloji kliniğinde yatan bir hastaya aittir.

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada karbapenemlere karşı artan direnç oranları, çoklu ilaç direnci gösteren gram negatif bakterilerin etken olduğu infeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotiklerin son seçenek olarak kullanılması nedeniyle *Acinetobacter baumannii* üzerindeki çalışmaların da artmasına neden olmuştur. *A. baumannii'*de direnç artışından sorumlu mekanizmalar arasında en yaygın olan enzimatik direnç mekanizmalarından biri OXA tipi karbapenemazlardır. Bu enzimler için bölgemiz ve hastanemizde kapsamlı epidemiyolojik veri bulunmadığından bu tez çalışması seçilmiştir. Çalışmamızda, karbapenemlere dirençli *A. baumannii* izolatlarında OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-58 VE OXA-143 enzimlerinin varlığı araştırılmış ve OXA karbapenemazı üreten izolatlar incelenmiştir.

Acinetobacter enfeksiyonları, dünya genelinde hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biridir. Bu mikroorganizma karbapenemler de dâhil olmak üzere birçok antibiyotiğe giderek artan oranda direnç geliştirmektedir. Sürveyans çalışmaları, karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının son on yılda Avrupa, Kuzey Amerika ve Latin Amerika'da kademeli olarak arttığını göstermektedir. Kuzey Avrupa, İspanya, Portekiz, Fransa, Birleşik Krallık (UK), Hollanda, Çek Cumhuriyeti, Polonya, Güney Avrupa ve Ortadoğu'dan, Bulgaristan, Yunanistan, İtalya, Lübnan, İsrail, İran, Irak ve Birleşik Arap Emirlikleri gibi birçok ülkeden karbapenem dirençli *A. baumannii* salgını bildirilmiştir (131). Ülkemizde ise 2016 yılında yayınlanan Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporuna göre hastane enfeksiyonu etkenleri içinde en sık görüleni karbapenem dirençli *A. baumannii*'dir. Ayrıca *A. baumannii'*nin yapmış olduğu hastane enfeksiyonları içinde özellikle ventilator ilişkili pnömoni (VAP) ve kan dolaşımı enfeksiyonları ön plana çıkmakta ve en çok yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan rapor edilmektedir. Bu nedenle izolatların elde edildiği klinik örnekler de kan ve trakeal aspirat olmaktadır (2).

A. baumannii suşlarının izole edildiği örneklerin dağılımı çeşitli çalışmalarda farklılıklar göstermektedir. Savcı ve arkadaşlarının (132) yaptığı çalışmada *A. baumannii* en sık (%39) ile solunum yolu örnekleri, ikinci sırada kan örnekleri (%23), sonra sırasıyla yara (%21), idrar (%14), kateter (%1) ve beyin omurilik sıvısından (%1)

izole edilmiştir. Gözütok ve arkadaşlarının (133) çalışmasında 63'ü (%39) kan, 48'i (%30) endotrakeal aspirat, 27'si (%17) idrar, 21'i (%13) yara, ikisi balgam örneklerinde üremiştir. Balcı ve arkadaşlarının (134) yaptığı çalışmada ise suşların %43'ü solunum sistemi, %24'ü yara yeri, %14'ü idrar, %11'i kan, %6'sı beyin omurilik sıvısı ve %1'i kateter örneğinden izole edilmiştir. Çalışmamızda ise suşların %50'si kan, %25'i solunum yolu, %20'si yara, %2'si idrar ve %1'i beyin omurilik sıvısından elde edilmiştir. Kan kültüründe üreme olan hastaların eş zamanlı olarak %20'sinin aspirat örneğinde de *A. baumannii* üremesi olmuştur. Çalışma örnekleri seçilirken bir hastanın aynı dönemde farklı örneklerinde üreyen birden fazla bakteri olduğu durumlarda çalışmaya sadece bir örnekte üreyen *Acinetobacter sp.* alındığı için kan kültürü en fazla üreme saptanan örnek olmuştur.

A. baumannii izolatlarının servislere göre dağılımı incelendiğinde, Keyik ve arkadaşlarının (7) yapmış olduğu çalışmada en sık (%46.7) Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ) ikinci sıklıkta ise (%18.1) Göğüs Hastalıkları YBÜ'sinden izole edilmiştir. Şahin ve arkadaşları (135) en sık Anestezi YBÜ'sinden izole etmişlerdir. Çalışmamızda 78 *A. baumannii* izolatının %69'u yoğun bakım üniteleri ve bunların içinde de en fazla Dahiliye Yoğun Bakım Kliniği'nde (%26) tedavi görmekte olan hastalardan gönderilen klinik örneklerden izole edilmiştir. Çalışmamızın *A. baumannii* izolatlarının en sık izole edildiği servisin YBÜ'ler olduğu bulgusu bu alanda yapılmış bir çok çalışma ve literatür bilgisi ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, bazı *A. baumannii* çevre izolatlarının, musluk, normal salin ve distile suda uzun süre boyunca çok çeşitli pH ve sıcaklıkta yaşayabildiğini göstermiştir Ayrıca biyofilm oluşturma yeteneği sayesinde ventilator boruları, kataterlerde kolaylıkla kolonizasyon oluşturabildiği gösterilmiştir. Yoğun Bakım Ünitelerinde *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların daha sık görülmesi, kritik hastaların bu ünitede takip edilmesi ve bu hastalara mekanik ventilasyon, trakeostomi, entübasyon, santral kateterizasyon ve üriner kateter gibi invaziv girişimlerin daha sık uygulanması ile açıklanabilir (135).

Karbapenemler *A. baumannii* tedavisinde uzun yıllardır kullanılmakta olan ajanlardır. İmipenem duyarlılığı 1980'lerin sonu 1990'ların başında yapılan çalışmalarda yüksek iken giderek azalmış günümüzde farklı bölgelerde farklı sonuçlar alınsa da direnç oldukça yüksek boyutlara ulaşmıştır. İran'da Pourhajibagher ve

arkadaşlarının (136), yapmış oldukları çalışmada 2001-2007 yıllarında MDR *A. baumannii* sıklığının %50'den %74'e çıktığını raporlamışlardır. 2016 yılında European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)'in yayınlamış olduğu raporda; Avrupa'da yıllara gore (2012-2015) *Acinetobacter* suşlarının direnç profili değişimi değerlendirilmiş, dirençli izolat sayılarının Macaristan'da %41.6'dan %51.7'ye, Kıbrıs'da %48.7'den 72.9'a, Bulgaristan'da %32.8'den %66.1'e, Yunanistan'da %74.5'den %82.2'ye yükseldiği görülmüştür (137). Bizim ülkemizde de benzer sonuçlar söz konusudur. Özdem ve arkadaşları (138) 2007-2010 yılları arası bu mikroorganizmaya ait antibiyotik duyarlılık profillerini araştırdıkları çalışmalarında, imipenem direncinin 2007 ile 2010 yılları arasında iki kat arttığını görmüşlerdir. Şafak ve arkadaşları (139) *Acinetobacter* suşları için imipenem duyarlılığını 2010 yılında %39.2, 2016'da %3.8, meropenem duyarlılığını ise 2010'da %21.5, 2016 yılında %3.8 olarak raporlamıştır. Yine Eroğlu ve arkadaşlarının (140) 2006-2011 yılları arasında *Acinetobacter* türlerinin antibiyotik duyarlılığını inceledikleri çalışmada, 2006 yılında imipenem ve meropenem direnci sırasıyla %27.2 ve %4.5 iken, 2011 yılında %77.2 ve %77 olarak bulunmuştur. Bizim hastanemizde 2002 yılında yapılan *Acinetobacter* izolatlarında antibiyotik direncinin araştırıldığı çalışmada imipenem duyarlılığı %56 oranında tespit edilmiştir (141). Şimdi ise hastanemizdeki suşlar %98 oranında imipeneme direnç göstemektedir. Yıllar içinde karbapenemlere duyarlılığın azalmasının başlıca nedeni yoğun ve uygunsuz antibiyotik kullanımı olarak belirtilmektedir. *Acinetobacter* türleri yıllar içinde sadece karbapenemlere değil birçok antibiyotik grubuna direnç geliştirmiştir. Şu an için *A. baumannii* izolatlarının çoğu MDR, PDR ve XDR olarak tanımlamaktadır.

Çalışmamıza dâhil edilen karbapenem dirençli izolatların tamamı siproflokasasine dirençli bulunmuştur. Trimetoprim-sulfametaksazol duyarlılığı %39.7 (31 izolat), gentamisin duyarlılığı %12.8 (10 izolat), ampisilin-sulbaktam duyarlılığı %5.1 (4 izolat), amikasin duyarlılığı %1.2 (1 izolat) olarak saptanmıştır. CDC'nin yapmış olduğu 5 yıllık karbapenem dirençli *A. baumannii* duyarlılık çalışmasında amikasin duyarlılığı %61.1, gentamisin duyarlılığı %30.7, siprofloksasin %1.9, trimetoprim-sulfametaksazol duyarlılığı %17.2, kolistin duyarlılığı %93.4 olarak raporlanmıştır (142). Ülkemizde yapılan bir çalışmada levofloksasin, aztreonam ve sefepim tüm suşlarda dirençli olarak bulunmuş amikasin direnci %70.9,

gentamisin direnci 77.2, siprofloksasin direnci %99.6, trimetoprim direnci %84 oranında tespit edilmiştir (143). Erzurum ilinde yapılan bir başka çalışmaya göre amikasin %77.4, gentamisin %74.4, siprofloksasin %98.7, ampisilin sulbaktam %96.7, trimetoprim %66.5, kolistin %1.46 oranında dirençli bulunmuştur. Bu da genel anlamda bizim hastanemiz suşlarıyla uyumludur. Karbapenem dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında giderek artan oranda kolistine daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Kolistin, MDR *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan kombinasyon terapilerin önemli bir bileşenidir. Kolistinin kombinasyon terapisi halinde uygulanmasında ki neden hem diğer antibiyotiğin sinerjistik etkisini kullanmak hem de kolistine dirençli suşların ortaya çıkmasının önüne geçmektir (130). Bu amaçla birçok çalışma yapılmaktadır. 84 MDR *A. baumannii* izolatı üzerinde dama tahtası ve zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemiyle çeşitli kombinasyonların etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, sinerjistik etkinin en fazla kolistin-rifampin arasında olduğu görülmüştür (144). Yine bizim hastanemizde yapılan bir çalışmada kolistinin sulbaktam ile kombinasyonun %2 oranında sinerjistik aktivite gösterdiği raporlanmıştır (145).

A. baumannii, aminoglikozid modifiye edici enzimler, efluks pompaları, dış membran geçirgenliğinin değişikliği, hedef alanların modifikasyonları, plazmid veya kromozomal kaynaklı β-laktamazlar gibi bir dizi antibiyotik direnç mekanizmasına sahiptir (26). Bu direnç mekanizmalarının çoğu, farklı sınıflardaki antibiyotikleri hedef alabilir. Bununla birlikte, tek bir antibiyotik sınıfına karşı dirence katkıda bulunmak için birkaç farklı mekanizma birlikte çalışabilir. Karbapenemlere karşı dirençte en önemli mekanizma karbapenem hidrolize edici beta laktamaz üretimidir, ancak CarO gibi porinler, penisilin bağlayan proteinlerde ki değişiklikler karbapenem direncine katkıda bulunur. *A. baumanii*'de şimdiye kadar birçok karbapenem hidrolize eden beta laktamaz tespit edilmiştir (81). Ambler sınıflamasına göre dört gruba ayrılan (A, B, C, D) beta laktamazların her sınıfından direnç genleri *A. baumannii*'de tanımlanmıştır. Sınıf A Beta laktamazlar'dan TEM, SHV, CTX-M, GES, SCO, PER, VEB, CARB, KPC çeşitli çalışmalarda *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. Ancak genellikle bunların karbapenem direncinde minör rolleri vardır. Sınıf B Beta laktamazlar geniş spektrumları, güçlü karbapenemaz aktiviteleri, inibitörlere direnç göstermeleri sayesinde beta laktam antibiyotiklere dirençte önemli rolleri vardır. VIM,

IMP, SIM metallobetalaktamazlar *A. baumannii*'de baskın karbapenemaz grubu olmasa da yüksek düzeyde karbapenem direncine katkıda bulunurlar. Sınıf C Beta laktamazlardan AmpC kromozomal olarak kodlanır ve sefalosporinlere karşı dirençte önemli iken karbapenemaz direncinde minör rol oynar. Tezimizin konusu olan Sınıf D Beta laktamazlar karbapenem direncinin büyük kısmından sorumludur. Sınıf D betalaktamazlara Oksasilinaz (OXA) da denmektedir. Şu anda OXA-tipi beta-laktamazların beş ana grubu *A. baumannii'de* tanımlanmıştır: *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-58-like}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-143-like}}$ (113). *A. baumannii* izolatlarındaki oksasilinaz tiplerinin dağılımı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Bizim ülkemizde şehirler arasında da değişiklik göstermektedir.

Acinetobacter türlerinde kazanılmış karbapenem hidrolize eden oksasilinazlar ilk olarak 1985'te Edinburg Üniversitesi'nde izole edilen bir suşta gösterilmiş ve enzim ARI-1 olarak bildirilmiştir. 2000 yılında enzimin genetik ve biyokimyasal incelenmesi ile OXA-23 olarak adlandırılmıştır (146). O zamandan beri tüm dünyadan salgınlar bildirilmektedir. OXA-23-pozitif *A. baumannii* suşlarının varlığı Fransa, Bulgaristan, İran, Birleşik Arap Emirlikleri, Tunus, Brezilya ve Avustralya gibi birçok ülkeden bildirilmiştir. Ayrıca Fransız Polinezyası, Kolombiya, Birleşik Krallık, Çin ve Kore'de hastane salgınlarında etken olarak izole edilmiştir (147). Bizim ülkemizde de 2008 yılında Meriç ve arkadaşları (148) OXA-23 üreten *A. baumannii* salgını bildirmişlerdir. Gür ve arkadaşları (101) Ankara ve İstanbul'dan topladıkları izolatlarla yaptıkları çalışmada OXA-23'ü 26 izolatta tanımlamış ve bu izolatların birbiriyle ilişkili olduklarını tespit etmişlerdir. 2014 yılında İtalya'da birçok şehirden toplanan izolatlarla yapılan analizlerde %81.7 ile OXA-23'ün en yaygın karbapenemaz haline geldiği ve İtalya'da endemik olduğu gösterilmiştir (149). Yine Katar'da 2016 yılında yapılan bir çalışmada 48 izolat çalışmaya alınmış tüm izolatlarda *bla*$_{\text{OXA-23}}$ geni pozitif olarak bulunmuştur. Bu izolatlar ileri çalışmalarla salgın kökeni olarak tespit edilmiştir (150). 2018 yılında Güney Afrikadan yapılan bir diğer çalışmada iki hastaneden toplanan 72 *A. baumannii* izolatıyla çalışılmış, bir hastanede suşların %96'sının OXA-23 pozitif, diğer OXA türevi enzimler açısından negatif olduğu saptanmıştır. Diğer hastanede ise %91 oranında OXA-23, %4 oranında OXA-58 pozitifliği saptanmıştır (151). 2015 yılında Sarı ve arkadaşlarının (152) 62 MDR *A. baumannii* suşuyla yaptıkları çalışmada da OXA-23 tüm izolatlarda saptanırken OXA-24 ve OXA-58 tespit edilememiştir. Telli ve arkadaşlarının (153), 2017 yılında, karbapenem direncine neden olan oksasilinaz

genlerinden OXA-23 grup, OXA-24 grup, OXA-51 grup, OXA-58 grup ve metallo-betalaktamaz genleri IPM, VIM, GIM, SPM, SIM, NDM-1 ile ISAba1 integronlarının varlığını araştırdıkları bir çalışmada, suşların 18'inde (%78) OXA-23 grup, 5'inde (%12) OXA-58 grup direnç geni pozitif bulunurken, OXA-24 grup direnç geni saptanmamıştır. Yirmi üç (%54) suşta yalnızca OXA-51 grup pozitif bulunmuştur. Dört suşta, OXA-23 ve OXA-58 direnç geni beraber bulunurken IMP, VIM, GIM, SPM, SIM genleri tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızda izolatların %98.7'sinde (77 suş) OXA-23 pozitif bulunmuştur. Bu bulgu, OXA-23'ün hastanemiz *A. baumannii* izolatlarında yaygın kazanılmış OXA-tipi enzim olduğunu desteklemektedir ve literatürle uyumlu olarak Sınıf D Beta Laktamazlar içinde OXA-23 ün baskın hale geldiğini göstermektedir. OXA-23 pozitif bir izolatta ise OXA-51 negatif bulunmuştur. Bu izolatın $bla_{\text{OXA-23}}$ gen grubu bulundurabilen diğer *Acinetobacterlerden* biri (*A. radioresistens, A. johnsonii, A. junii, A. nosocomialis, A. pittii*) olduğu düşünülmüştür.

OXA tipi karbapenemazların bir diğer grubu olan OXA-24/40 ilk olarak İspanya'da karbapenem dirençli bir *A. baumannii* izolatının kromozomundan izole edilmiştir. OXA-24 CHDL grubu OXA-25, OXA-26, OXA-40 ve OXA-72'den oluşur (orjinal sekanslama hata olduğu için OXA-24 şu an OXA-40 olarak bilinmektedir). OXA-25, OXA-26 ve OXA-27 İspanya, Belçika ve Singapur'dan, OXA-72 Hırvatistan, Tayvan ve Çin'den bildirilmiştir (102). Türkiye'den ilk OXA-24/40 salgını Sarı ve arkadaşlarının (154) yaptıkları çalışmada tespit edilmiştir. Çalışmada 23 OXA24/40 benzeri gen bölgesine sahip olan *A. baumannii* izolatı tespit edilmiş ve yapılan sekans analizi sonucu OXA-72 varlığı saptanmıştır. 2014-2015 yılları arasında Türkiye ve Azerbaycan'dan 11 hastanenin katıldığı bir çalışmada OXA-24 varlığını Erzurum'da %10, İzmir'de %10 ve Azerbaycan'da %30 oranlarında tespit edilmiştir (155). Bizim çalışmamızda $bla_{\text{OXA-24}}$ varlığı saptanmadı. Ülkemizde son yıllarda yapılan benzer çalışmalarda da $bla_{\text{OXA-24}}$ varlığı saptanmamıştır (153, 156).

Bugüne kadar tanımlanan OXA-tipi β-laktamazların en büyük grubu OXA-51-benzeri β-laktamazlardır. Grubun kurucu üyesi OXA-51, ilk olarak 1996 yılında Arjantin'de *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. Bu enzimler *A. baumannii'ye* özgüdür ve doğal olarak bu türün kromozomunda bulunurlar. OXA-51 benzeri enzimlerden yalnızca OXA-51 ve OXA-69'un kinetik çalışmaları yapılmıştır. Bu enzimlerin imipenem ve meropeneme afiniteleri farklı olsa da her ikisi de

karbapenemlere zayıf hidrolitik aktivite gösterir (102). Bizim çalışmamızda bir izolat hariç tüm izolatlarda (%98.7) OXA-51 pozitif bulunmuştur. PCR uygulaması sonucunda *A. baumannii*'ye özgü OXA-51-benzeri enzimleri kodlayan gen bölgesi saptanan, ancak bu enzim dışında diğer OXA-tipi karbapenemaz genleri belirlenemeyen izolatın imipenem ve meropenem için MİK değerleri sırasıyla 16 ve 8 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu izolatta karbapenem direncine sebep olabilecek diğer enzimlerin varlığı nedeniyle (örneğin; metallo-beta-laktamazlar, Sınıf A Beta laktamazlar, yeni bilinmeyen enzimler vb.) veya IS'nın (IS*Aba*I) OXA-51 enziminin üst kısmına (upstream) gelmesiyle enzimin artmış ekspresyonu sonucu IS*Aba*I-OXA-51 birlikteliği karbapenem direncine neden olabilir.

OXA-58 ilk olarak Fransa'da bir MDR-AB izolatından tanımlanmıştır. Avrupa, Arjantin, Kuveyt, İngiltere, Avustralya, Amerika, Tayvan ve Çin'den rapor edilmiştir. Hastane salgınları şimdiye kadar Fransa, Belçika, İtalya, Yunanistan ve Tunus'ta belgelenmiştir (157). Ülkemize ait *A. baumannii* izolatlarında OXA-tipi enzimlerin bildirildiği çalışmalara baktığımızda, 2006 yılında Vahaboğlu ve arkadaşları (158) 72 seftazidime dirençli *Acinetobacter* suşunda OXA-51 ve OXA-58'i araştırmış, 56 izolatta OXA-51, 10 izolatta OXA-58 tespit etmişlerdir. 2014 yılında yapılan çalışmada *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-58-like}}$ genleri izolatların sırasıyla %46.6 ve %53.3'ünde saptanmıştır (7). Ocak 2014-Ağustos 2016 arasında yapılan bir diğer çalışmada 142 izolatın 137'sinde (%96.5) OXA-51 pozitif bulunmuştur. Toplam 134 (%94.4) izolatta OXA-23, 11 (%7.7) izolatta NDM ve bir (%0.7) izolatta OXA-58 pozitifligi tespit edilmiştir (159). Yine 2016 yılında Direkel ve arkadaşlarının (160) yaptıkları çalışmada, *A. baumannii* izolatlarının 71'i (%89.9) *bla*$_{\text{OXA-23}}$ pozitif bulunurken, hiçbirinde *bla*$_{\text{OXA-58}}$, *bla*$_{\text{OXA-48}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-24}}$ saptanmamıştır. Yıllar içindeki bu değişim Türkiye, Yunanistan ve İtalya'nın aralarında bulunduğu Akdeniz ülkelerinde, 1999-2009 yılları arasında karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatlarında *bla*$_{\text{OXA-58}}$ geninin baskın olarak saptandığı; ancak 2009 yılından itibaren bu ülkelerde *bla*$_{\text{OXA-23}}$'ün giderek artan bir şekilde *bla*$_{\text{OXA-58}}$'in yerini almaya başladığı ifade edilmektedir. İleri sürülen hipoteze göre; *bla*$_{\text{OXA-23}}$ pozitif suşlar karbapenemleri daha yüksek konsantrasyonlarda inhibe ettikleri için seçici avantaja sahip olduklarından *bla*$_{\text{OXA-58}}$ pozitif suşların yerini almışlardır (152). Bizim çalışmamızda

bla$_{\text{OXA-58}}$ geni hiçbir izolatta saptanamamıştır. Bu da son yıllardaki yapılan çalışmalardaki bu sonuçlarla uyumludur.

Brezilya'da 2004 yılında, karbapenemler de dahil olmak üzere hemen hemen tüm β-laktam antibiyotiklere dirençli üç *A. baumannii* izolatı saptanmış, bilinen tüm Sınıf D Beta Laktamazlar ile yapılan PCR'ın negatif sonuçlanması üzerine daha fazla araştırma yapılıp, OXA-143 adında yeni bir enzim tanımlanmıştır (102). Bu enzim penisilinler ve karbapenemleri hidrolize eder ancak sefalosporinlere diğer CHLD'ler kadar etkisi yoktur. Bugüne kadar, bu enzim grubu, Brezilya, Güney Kore ve İran'dan bildirilmiştir. Brezilya bu enzimle ilgili en fazla bildirim yapan ülkedir. 2016 yılında Brezilya'da yapılan *A. baumannii* izolatlarında direnç genlerinin moleküler tiplendirilmesinde *bla*$_{\text{OXA-51}}$ geni, incelenen bütün suşlarda, *bla*$_{\text{OXA-23}}$ yirmi iki (%51.2) ve *bla*$_{\text{OXA-143}}$ sekiz (%18.6) izolatta tespit edilmiştir. Bu izolatların 17'si imipeneme duyarlı bulunmuş duyarlı bulunan suşlardan ikisinde OXA-23 pozitif, birinde ise OXA-143 pozitif olarak raporlanmıştır (35). 2017 yılında İran'da yapılan çalışmada ise %100 *bla*$_{\text{OXA-51}}$, %82.47 *bla*$_{\text{OXA-23}}$, %55.67 *bla*$_{\text{OXA-58}}$, %22.68 *bla*$_{\text{OXA-24/40}}$ ve %14.43 *bla*$_{\text{OXA-143}}$ pozitiflikleri saptanmıştır (161). Yakın komşumuz İran'da bu gen bölgesinin tespit edilmesi ve o bölgeden hastaların bizim hastanemize transferi olduğu için izolatlarımızda *bla*$_{\text{OXA-143}}$ çalışılmış ancak hiçbir izolatta bu gen bölgesi tespit edilememiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Ocak 2018 - Eylül 2018 tarihleri arasında çeşitli kültürlerden izole edilmiş karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarıyla yaptığımız çalışmamız sonucunda hastanemiz izolatlarında $bla_{\text{OXA-23}}$ gen grubunun en yaygın bulunan oksasilinaz geni olduğu ortaya çıkmıştır. *A. baumannii'de* intrinsik olarak bulunan $bla_{\text{OXA-51}}$ geni bir izolatta saptanmamıştır. Bu izolatta $bla_{\text{OXA-23}}$ gen grubu tespit edilmiştir. Bu izolatın $bla_{\text{OXA-23}}$ gen grubu bulundurabilen diğer *Acinetobacterler*den biri (*A. radioresistens, A. johnsonii, A. junii, A. nosocomialis, A. pittii*) olduğu düşünülmüştür. Bu izolatın tespitine yönelik ileri biyokimyasal incelemelere gerek vardır. Bir izolatta ise $bla_{\text{OXA-51}}$ geni saptanmış diğer gen bölgeleri saptanmamıştır. Bu izolatta karbapenem direncine neden olacak diğer karbapenemazların araştırılması gereklidir.

Bizim çalışmamızda en yaygın olan karbapenemaz genleri bakılmış olsa da hem şehrimiz, hem de ülkemiz için epidemiyolojik veri oluşturmak amacıyla *A. baumannii'*de bulunduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olan diğer karbapenemaz grupları (A grubu ve C grubu betalaktamazlar ve metallobetalaktamazlar) da araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. Curr Opin Infect Dis 2010; 23(4): 332-9.
2. Hekimoğlu CH, Batır E. Ulusal Sağlık Hizmeti ile İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Etken Dağılımı ve Antibiyotik Direnç Raporu 2017. Temmuz, 2018, ANKARA.
3. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21(3): 538-82.
4. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research d, and development of new antibiotics. WHO [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 16]; Available from: http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/ 2018.
5. Sarikhani Z, Nazari R, Nateghi Rostami M. First report of OXA-143-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in Qom, Iran. Iran J Basic Med Sci 2017; 20(11): 1282-6.
6. Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. Front Microbiol 2012; 3: 148.
7. Keyik Ş, Arslan U, Dağı HT. ve ark. Karbapenemlere Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA Tipi Beta-Laktamazların Araştırılması ve PFGE ile Genotiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2014; 48(4): 556-65.
8. Baumann P., Doudoroff M., Stanier R.Y. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol 1968; 95: 1520-41.
9. Bouvet, P.J., Grimont P.A. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int. J Syst Bacteriol 1986; 36: 228-40
10. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS 1989; 97(7): 595-605.

11. Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res Microbiol 1989; 140(4-5): 291-9.
12. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9(2): 148-65.
13. List of prokaryotic names with standing in nomenclature http://www.bacterio.net/*Acinetobacter*.html. 04.08.2018.
14. Liu Y, Tu J, Zhang J, et al. *Acinetobacter piscicola* sp. nov., isolated from diseased farmed Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68: 905-10.
15. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, et al. 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 2011; 162(4): 393-404.
16. Bahar İH, Eser N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller içinde. AW Topçu, G Söyletir, M Doğanay (editörler). Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi 3.baskı İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2008: 2195-2201.
17. Holton J. A note on the preparation and use of a selective differential medium for the isolation of *Acinetobacter* spp. from clinical sources. J Appl Bacteriol 1983; 54(1): 141-142.
18. Procop GW CD, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Gram negatif non-fermentatif basiller. İçinde : Us AD, Başustaoğlu AC (editörler). Koneman Renkli Atlas ve Tanisal Mikrobiyoloji Kitabi. 1. Baskı. Ankara, Hipokrat Kitabevi, 2017: 385-400.
19. Wang J, Ruan Z, Feng Y, et al. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. PLoS One 2014; 9(8): e104882.
20. Azap Ö. MDR *Acinetobacter* İnfeksiyonlarında Epidemiyolojik Anlamda Güncel Durum. ANKEM Derg 2012; 26: 283-286.

21. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J Biol Sci 2018; 25(3): 586-96.
22. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. Microbes Environ 2011; 26(2): 101-12.
23. Rathinavelu S, Zavros Y, Merchant JL. *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis. Microbes Infect 2003; 5(7): 651-7.
24. Mulin B, Talon D, Viel JF, et al. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14(7): 569-76.
25. Bayuga S, Zeana C, Sahni J, et al. Prevalence and antimicrobial patterns of *Acinetobacter baumannii* on hands and nares of hospital personnel and patients: the iceberg phenomenon again. Heart Lung 2002; 31(5): 382-90.
26. Lee CR, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 55.
27. Şardan YÇ, Hekimoğlu CH, Oku FC, Batır E. Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporu-2016. Ankara; 2017.
28. Aslan H. *Acinetobacter* moleküler epidemiyolojisi. ANKEM Derg 2014; 28(Ek;2): 71-2.
29. Villar M, Cano ME, Gato E, et al. Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: a reappraisal. Medicine 2014; 93(5): 202-210.
30. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005; 41(6): 848-54.
31. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, et al. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev 2017; 30(1): 409-47.
32. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, et al. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173(1): 122-9.

33. March C, Regueiro V, Llobet E, et al. Dissection of host cell signal transduction during *Acinetobacter baumannii*-triggered inflammatory response. PLoS One 2010; 5(4): e10033.
34. Mortensen BL, Skaar EP. Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. Cell Microbiol 2012; 14(9): 1336-44.
35. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachon J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. Vaccine 2011; 29(34): 5705-5710.
36. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 2013; 37(2): 130-55.
37. Lee JS, Choi CH, Kim JW, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. J Microbiol 2010; 48(3): 387-92.
38. Wang N, Ozer EA, Mandel MJ, Hauser AR. Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. mBio 2014; 5(3): e01163-14.
39. Smani Y, Fàbrega A, Roca I, et al. Role of *OmpA* in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(3): 1806-8.
40. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachon J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. J Infect Dis 2013; 208(10): 1561-70.
41. Huang W, Yao Y, Wang S, et al. Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Sci Rep 2016; 6: 20724-.
42. Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Pathog 2015; 11(2): e1004691.
43. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. Infect Immun 2010; 78(9): 3993-4000.

44. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, et al. Inhibition of LpxC protects mice from resistant *Acinetobacter baumannii* by modulating inflammation and enhancing phagocytosis. mBio 2012; 3(5).
45. Garcia-Patino MG, Garcia-Contreras R, Licona-Limon P. The Immune Response against *Acinetobacter baumannii*, an Emerging Pathogen in Nosocomial Infections. Front Immunol 2017; 8: 441.
46. Flores-Díaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, et al. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. Microbiol Mol Biol Rev 2016; 80(3): 597-628.
47. Kwon SO, Gho YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. FEMS Microbiol Lett 2009; 297(2): 150-6.
48. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. Microbiol Mol Biol Rev 2010; 74(1): 81-94.
49. Aşık G. *Acinetobacter baumannii* Virülansının Açıklanmasında Güncel Yaklaşımlar. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 371-80.
50. Aranda J, Bardina C, Beceiro A, et al. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. J Bacteriol 2011; 193(15): 3740-7.
51. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 2007; 5(12): 939-51.
52. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017; 36(11): 1999-2006.
53. Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. Medicine 1995; 74(6): 340-349.
54. Trottier V, Segura PG, Namias N, et al. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. J Burn Care Res 2007; 28(2): 248-254.

55. Wisplinghoff H, Perbix W, Seifert H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. Clin Infect Dis 1 1999; 28(1): 59-66.
56. Albrecht MC, Griffith ME, Murray CK, et al. Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. J Am Coll Surg 2006; 203(4): 546-550.
57. Scott P, Deye G, Srinivasan A, et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin Infect Dis 2007; 44(12): 1577-84.
58. Cascio A, Conti A, Sinardi L, et al. Post-neurosurgical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intrathecal colistin. A new case and a systematic review of the literature. Int J Infect Dis 2010; 14(7): 572-9.
59. Rodriguez Guardado A, Blanco A, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* meningitis in neurosurgical patients with intraventricular catheters: assessment of different treatments. J Antimicrob Chemother 2008; 61(4): 908-13.
60. Kanafani ZA, Kanj SS. *Acinetobacter* infection: Treatment and prevention. UpToDate 2018. https://www.uptodate.com/contents/acinetobacter-infection-treatment-and-prevention.
61. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18(3): 268-81.
62. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. Clin Infect Dis 2010; 51(1): 79-84.
63. Nowak P, Paluchowska P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. Folia Histochem Cytobiol 2016; 54(2): 61-74.
64. Yang Y-S, Lee Y, Tseng K-C, et al. In Vivo and In Vitro Efficacy of Minocycline-Based Combination Therapy for Minocycline-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60(7): 4047-54.

65. Kim UJ, Kim HK, An JH, et al. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. Chonnam Med J 2014; 50(2): 37-44.
66. Chang KC, Lin MF, Lin NT, et al. Clonal spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in eastern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2012; 45(1): 37-42.
67. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(11): 4943-60.
68. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiol Rev 2008; 32(2): 234-58.
69. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, et al. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. J Infect Dis 2009; 199(4): 513-21.
70. Nowak J, Seifert H, Higgins PG. Prevalence of eight resistance-nodulation-division efflux pump genes in epidemiologically characterized *Acinetobacter baumannii* of worldwide origin. J Med Microbiol 2015; 64(6): 630-5.
71. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(12): 3375-80.
72. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(3): 947-53.
73. Fonseca EL, Scheidegger E, Freitas FS, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of carO alleles expression and $bla_{OXA\text{-}23}$ gene. BMC Microbiol 2013; 13: 245.
74. Zhao WH, Hu ZQ. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Rev Microbiol 2010; 36(3): 245-58.
75. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3): 969-76.
76. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980; 289 (1036): 321-31.

77. Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo-β-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(4): 2184-6.
78. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. J Antimicrob Chemother 2007; 60(3): 470-82.
79. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20(3): 440-58.
80. Naas T, Dortet L, Iorga BI. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. Curr Drug Targets 2016; 17(9): 1006-28.
81. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. World J Clin Cases 2014; 2(12): 787-814.
82. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev 2010; 23(1): 160-201.
83. Stachyra T, Pechereau MC, Bruneau JM, et al. Mechanistic studies of the inactivation of TEM-1 and P99 by NXL104, a novel non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(12): 5132-8.
84. Yum JH, Yi K, Lee H, et al. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla* (VIM-2) gene cassettes. J Antimicrob Chemother 2002; 49(5): 837-40.
85. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, et al. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2003; 51(2): 257-66.
86. Espinal P, Roca I, Vila J. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in *non-baumannii Acinetobacter*. Future microbiol 2011; 6(5): 495-511.
87. Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla* (SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(11): 4485-91.
88. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla* (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on

a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(12): 5046-54.

89. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. J Antimicrob Chemother 2011; 66(6): 1255-9.
90. Espinal P, Fugazza G, Lopez Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, et al. Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(11): 5396-8.
91. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, et al. Molecular characterization of $bla_{\text{NDM-1}}$ in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. J Antimicrob Chemother 2011; 66(9): 1998-2001.
92. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(7): 2941-8.
93. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2005; 12(2): 123-130.
94. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. Int J Mol Sci 2015; 16(5): 9654-92.
95. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, et al. OXA-235, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(5): 2121-6.
96. Pagano M, Martins AF, Barth AL. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Braz J Microbiol 2016; 47(4): 785-92.
97. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, et al. *Acinetobacter radioresistens* as a Silent Source of Carbapenem Resistance for *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(4): 1252-6.
98. Vallenet D, Nordmann P, Poirel L SoMangenot. et al. Comparative Analysis of *Acinetobacter*s: Three Genomes for Three Lifestyles. PLoSOne. 2008;3:e1805. 10.1371/journal.pone.0001805

99. Antunes NT, Fisher JF. Acquired Class D β-Lactamases. Antibiotics (Basel) 2014; 3(3): 398-434.
100. Kaitany KC, Klinger NV, June CM, et al. 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 2013; 57(10): 4848-55.
101. Gur D, Korten V, Unal S, et al. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. J Med Microbiol 2008; 57(12): 1529-32.
102. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2014; 27(2): 241-63.
103. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. 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 2001; 45(2): 583-8.
104. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(7): 3084-90.
105. Merino M, Acosta J, Poza M et al. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(6): 2724-7.
106. Smith CA, Antunes NT, Stewart NK et al. Structural Basis for Enhancement of Carbapenemase Activity in the OXA-51 Family of Class D β-Lactamases. ACS chemical biology 2015; 10(8): 1791-6.
107. Chen TL, Lee YT, Kuo SC et al. Emergence and Distribution of Plasmids Bearing the $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ gene with an upstream ISAba1 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(11): 4575-81.

108. Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SG. OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2008; 14(3): 268-75.
109. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12(9): 826-36.
110. Poirel L, Marque S, Heritier C et al. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(1): 202-208.
111. Chiu CH, Liu YH, Wang YC et al. In vitro activity of SecA inhibitors in combination with carbapenems against carbapenem-hydrolysing class D β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2016; 71(12): 3441-8.
112. Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, et al. Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. Euro Surveill 2012; 15; 17(11).
113. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, et al. OXA-143, a Novel Carbapenem-Hydrolyzing Class D β-Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(12): 5035-8.
114. Hattori T, Kawamura K, Arakawa Y. Comparison of test methods for detecting metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria. Jpn J Infect Dis 2013; 66(6): 512-8.
115. Lee K, Chong Y, Shin HB, et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7(2): 88-91.
116. Pasteran F, Gonzalez LJ, Albornoz E, et al. Triton Hodge Test: IMProved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. J Clin Microbiol 2016; 54(3): 640-9.
117. Zwaluw KVD, Haan AD, Pluister GN. et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a SIMPle and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One. 2015; 10(3): e0123690.

118. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2014; 52(7): 2359-64.
119. Pires J, Novais Â, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. J Clin Microbiol 2013; 51(12): 4281-3.
120. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo-β-lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2012; 50(4): 1419-21.
121. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C. et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. PLoS One. 2016;7:e31676.journal.pone.0031676
122. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(4): 351-3.
123. Poirel L, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(1): 119-23.
124. Pasanen T, Mero S, Tarkka E, et al. Rapid molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and UuSIMaa. PLoS One 2014; 21(9).
125. Huang XZ, Cash DM, Chahine MA, Nikolich MP, Craft DW. Development and validation of a multiplex TaqMan real-time PCR for rapid detection of genes encoding four types of class D carbapenemase in *Acinetobacter baumannii*.. J Med Microbiol 2012; 61(Pt 11): 1532-7.
126. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG. et al. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control 1988; 16(3): 128-40.
127. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. valid from 2018-05-15.

128. BD Phenix NMIC/ID-400 kullanım klavuzu http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=32470. 10.08.2019
129. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(3): 305.
130. Matuschek E, Ahman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect 2018; 24(8): 865-70.
131. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F. et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries 2009; 3(5): 335-41.
132. Savcı Ü, Özveren G, Yenişehirli G. ve ark. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının in-vitro duyarlılık durumları. Turkısh Journal of Clinics and Laboratory 2015; 6 (1): 24-29.
133. Gözütok F, Sarıgüzel FM, Çelik İ. ve ark. Hastane İnfeksiyonu etkeni *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması. ANKEM Derg 2013; 27(1): 7-12.
134. Balcı M, Bitirgen M, Kandemir B. ve ark. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı. ANKEM Derg 2010; 24: 28-33.
135. Şahin H, Önde U, Adiloğlu AK. ve ark. Ankara'daki Çeşitli Hastanelerden Elde Edilen *Acinetobacter baumannii* İzolatları Arasındaki Klonal İlişkinin Gösterilmesi ve Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg 2016; 73(3): 199-210.
136. Pourhajibagher M, Hashemi FB, Pourakbari B. et al. Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* to Imipenem in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. Open Microbiol J 2016; 10: 32-42.
137. European Centre for Disease Prevention and Control. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Stockholm:. 2016; ECDC

138. Özdem B, Gürelik FÇ, Çelikbilek N. ve ark. Çeşitli Klinik Örneklerden 2007-2010 Yıllarında İzole Edilen *Acinetobacter* Türlerinin Antibiyotik Direnç Profilleri. Mikrobiyol Bul 2011; 43(3): 526-34.
139. Şafak B, Kılınç O, Tunç N. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Oranlarının İncelenmesi (2010-2016). Flora Derg 2016; 21(2): 77-81.
140. Eroğlu C, Ünal N, Karadağ A. ve ark. Çeşitli klinik örneklerden 2006-2011 yılları arasında izole edilen *Acinetobacter* türleri ve antibiyotik duyarlılıkları. Turk Hij Den Biyol Derg 2016; 73(1): 25-32.
141. Erol S, Yazgı H, Aktaş O, Özkurt Z. Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarında Antibiyotik Direnci. Hastane İnfeksiyonları Derg 2002; 6(1): 19-23.
142. Bulens SN, Yi SH, Walters MS. et al. Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii*, 8 US Metropolitan Areas. 2012–2015. Emerging Infectious Diseases. 2018; Vol. 24, No. 4:727-34.
143. Coşkun USŞ. Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Antibiyotik Direncinin Araştırılması. ANKEM Derg 2018; 32(2): 37-44.
144. Büyük A, Yılmaz FF, Yurtsever SG, Limoncu MH. Antibiotic Resistance Profile, Tigecycline-Colistin In Combinations With Various Antibiotics And Molecular Typing Of Hospital Acquired *Acinetobacter Baumannii* Isolates. Turk J Pharm Sci 2017; 14(1): 13-18.
145. Alada DM, Altoparlak Ü, Coşkun MV. Çeşitli Antibiyotik Kombinasyonlarının *Acinetobacter* Suşlari Üzerine İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması. ANKEM Derg 2017; 31(1): 23-31.
146. Paton R, Miles RS, Hood J. et al. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 1993; 2(2): 81-87.
147. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β-Lactamases Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(1): 24-38.
148. Meric M, Kasap M, Gacar G et al. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey. FEMS Microbiol Lett 2008; 28(2): 214–8.

149. Principe L, Piazza A, Giani T. et al. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. J Clin Microbiol 2014; 52(8): 3004-10.
150. Rolain JM, Loucif L, Al-Maslamani M. et al. Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 Carbapenemase in Qatar. New Microbes New Infect 2016; 11: 47-51.
151. Michelle L, M. EM, Farzana I. et al. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiological and Beta-Lactamase Data From Two Tertiary Academic Hospitals in Tshwane, South Africa. Front Microbiol 2018; 9:1280.
152. Sarı B, Baran I, Alaçam S. ve ark. Nozokomiyal Çok İlaca Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Oksasilinaz Genlerinin Multipleks PCR ile Araştırılması ve Klonal İlişkilerinin Rep-PCR ile Değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2015; 49(2): 249-258.
153. Telli M, Eyigör M, Korkmazgil B. ve ark. *Acinetobacter* spp. Klinik İzolatlarında Karbapenem Direncinin Moleküler Epidemiyolojisi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2017; 47(4): 190-196.
154. Sarı AN, Biçmen M, Gülay Z. The First Report on the Outbreak of OXA-24/40-Like Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. Jpn J Infect Dis 2013; 66: 439-42.
155. Ahmed SS, Alp E, Kılıç AU. et al. Spread of carbapenem-resistant international clones of *Acinetobacter baumannii* in Turkey and Azerbaijan: a collaborative study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35(9): 1463-1468.
156. Vural DG, Durupınar B. Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2016; 46(4): 181-7
157. Pierre B, Thierry N, Ingrid W. et al. Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. J Clin Microbiol 2006; 44(11): 4189-92.
158. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M. et al. High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter*

spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. J Antimicrob Chemother 2006; 58(3): 537-42.

159. Bölükbaşı H, Adiloğlu AK, Önde U. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan Karbapenem Dirençli *A. calcoaceticus-A. baumannii* Kompleks İzolatlarındaki Yaygın Karbapenemaz Genlerinin Fenotipik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 2017; Antalya: PS157.
160. Direkel Ş, Çiçek AÇ, Karagöz A. Bir Üniversite Hastanesinde İzole Edilen Çok İlaca Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılığı ve Moleküler Karakterizasyonu. Mikrobiyol Bul 2016; 50(4): 522-34.
161. Neves FC, Clemente WT, Lincopan N. et al. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. Braz J Infect Dis 2016; 20(6): 556-63.

EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAY FORMU

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		**Arş.Gör.Dr.İclal AĞAN**
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		**Karbapenem Dirençli Acinetobacter Baumannii Klinik İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Genotipik Yöntemle Araştırılması**
KARAR BİLGİLERİ	**Toplantı Sayısı: 06 Karar No: 04**	**Tarih:** 19.09.2018
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin **Kendisi tarafından** karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. **Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.** Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Mustafa GÜL
Üye

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Prof.Dr.M.Hamidullah UYANIK
Üye

Doç.Dr.Ayşenur AKSOY
Üye

Doç.Dr.Atilla ÇAYIR
Üye

Dr.Öğr.Üy.Binali FIRINCI
Üye

Dr.Öğr.Üy.İbrahim KARABULUT
Üye

Emrah MELETLİOĞLU
Üye