

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

ACINETOBACTER BAUMANNII KLİNİK SUŞLARININ
FENOTİPİK VE GENOTİPİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Nezahat KOŞAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayşe Semra GÜRESER

ÇORUM 2021

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

ACINETOBACTER BAUMANNII KLİNİK SUŞLARININ
FENOTİPİK VE GENOTİPİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Nezahat KOŞAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ayşe Semra GÜRESER

ÇORUM 2021

Bu tez Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
TIP19001.19.004 No'lu proje ile desteklenmiştir.

I. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve birikimlerini paylaşan, mesleki gelişimimde tüm fırsatları sunan, öğrencileri olmaktan onur duyduğum, saygıdeğer hocalarımdan başta tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Ayşe Semra GÜRESER'e, yoluma ışık tutan sevgili hocam Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN'a, tez sürecimin tüm aşamalarında destek olan sevgili hocam Doç. Dr. Djursun KARASARTOVA'ya;

Tez sürecimde manevi desteğiyle yanımda olan Dr. Öğr. Üy. Gönül ARSLAN AKVERAN'a;

Tez sürecinde tanıştığım, desteklerinden ötürü Öğr. Gör. Büşra MORAN BOZER'e

Klinik bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan, eğitim sürecine katkıda bulunan tüm Uzman Doktorlarımıza;

Laboratuvarıda birlikte çalışmaktan keyif duyduğum, güzel anılar biriktirdiğim tüm teknisyen ekibime;

Desteklerini, yardımlarını her daim hissettiğim sevgili dostlarıma;

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan, maddi ve manevi desteğini hiçbir koşulda esirgemeyen kıymetli annem Güldane KOŞAR ve saygıdeğer babam İsmail KOŞAR'a;

Her zaman yanımda olan, güçlü hissettiren sevgili ablam Ezamet KOŞAR'a; tez sürecimde her anlamda beni destekleyen ve aynı zamanda ev arkadaşım olan sevgili kardeşim Ali KOŞAR'a;

sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Nezahat KOŞAR

Çorum 2021

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ÖZET	V
IV. ABSTRACT	VII
V. KISALTMALAR	IX
VI. TABLO LİSTESİ	XIII
VII. ŞEKİL LİSTESİ	XV
VIII. RESİM LİSTESİ	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe ve Taksonomi	4
2.2. <i>Acinetobacter</i> Türlerinin Genel Mikrobiyolojik Özellikleri	5
2.3. Epidemiyoloji	7
2.4. Virülans Faktörleri	8
2.4.1. Porinler	10
2.4.2. Lipopolisakkaritler	11
2.4.3. Kapsüler Polisakkaritler	11
2.4.4. Fosfolipazlar	11
2.4.5. Protein Sekresyon Sistemleri	12
2.4.6. Dış Membran Vezikülü [Outer Membrane Vesicles (OMVs)]	12
2.4.7. Demir Kazanım Mekanizmaları	12
2.4.8. Penisilin Bağlayıcı Protein 7/8 ve β -laktamaz	13
2.4.9. Pili	13
2.4.10. Biyofilm Oluşturma	14
2.4.11. Hemolitik Aktivite	16
2.5. Patogenez	17
2.6. Antibiyotik Duyarlılığı ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	17
2.6.1. β -laktam Antibiyotiklere Direnç	20
2.6.2. Aminoglikozit Direnci	22
2.6.3. Kinolon Direnci	23

2.6.4. Tetrasiklin ve Tigesiklin Direnci.....	23
2.6.5. Kolistin Direnci	23
2.7. <i>A. baumannii</i> Enfeksiyonları.....	24
2.8. <i>A. baumannii</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi.....	24
2.9. <i>A. baumannii</i> Enfeksiyonlarının Sürveyansı.....	26
2.9.1. Repetitive Extragenic Palindromic Element-PCR (REP-PCR).....	27
2.9.2. Plazmid Profili.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. İzolatların Toplanması ve Saklanması	29
3.2. Bakterilerin Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılık.....	29
3.3. Fenotipi Belirleyen Yöntemler	30
3.3.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	30
3.3.2. MBL Kombinasyon Disk Difüzyon Testi (KDDT).....	32
3.3.3. Hareket Testi	32
3.3.4. Biyofilm Oluşumu	33
3.3.5. Elektron Mikroskobu (SEM) ile Biyofilm Görüntülemesi.....	33
3.4. Genotipi Belirleyen Yöntemler	34
3.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	35
3.4.2. OXA Karbapenemazların Multiplex PCR Yöntemiyle Araştırılması	36
3.4.3. ISAbal/OXA-23 ve ISAbal/OXA-51 Gen Bölgelerinin Araştırılması	38
3.4.4. REP- PCR Yöntemi ile İzolatların Tiplendirilmesi.....	40
3.4.5. Uluslararası Klonların (IC) Multiplex PCR Yöntemiyle Araştırılması.....	41
3.4.6. Plazmid DNA Ekstraksiyonu ve Elektroforezi.....	45
3.5. İstatistiksel Analiz.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. İzolatların Genel Özellikleri.....	47
4.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları	48
4.3. İzolatların Koloni Tipi ve Hemoliz Türü Sonuçları.....	52
4.4. MBL Kombinasyon Disk Difüzyon Testi (KDDT) Sonuçları	53
4.5. Hareket Testi Sonuçları.....	53
4.6. Biyofilm Seviyesi Ölçüm Sonuçları.....	55
4.7. Elektron Mikroskobu (SEM) ile Biyofilm Görüntüleme Sonuçları.....	58
4.8. OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-58 Genlerinin PCR Sonuçları.....	62

4.9. ISAbal/OXA-23 ve ISAbal/OXA-51 Genleri PCR Sonuçları	63
4.10. REP-PCR Analiz Sonuçları.....	64
4.11. Uluslararası Klonların Belirlenmesinde Multiplex PCR Sonuçları	69
4.12. Biyofilm İlişkili Genlerin PCR Sonuçları	72
4.13. Plazmid Ekstraksiyon Sonuçları	74
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	102
7. KAYNAKLAR	105
8. EKLER.....	127
8.1. Ek.1 Etik Kurul Onayı.....	127



III. ÖZET

Amaç: *Acinetobacter baumannii* suşları, dünya üzerinde yaygın görülen nozokomiyal patojenlerdir. Bu çalışmada 2018-2019 yılları arasında Hitit Üniversitesi-Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* izolatlarının fenotipik ve genotipik testlerle virülans faktörlerinin test edilmesi (biyofilm oluşumu, hareket yeteneği, hemoliz oluşturma), direnç genlerinin araştırılması, uluslararası klon analizi yapılması, izolatlar arasındaki klonal yakınlığın belirlenmesi ve plazmid profilinin tanımlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 98 *A. baumannii* izolatının identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı Vitek 2 sistemiyle, kolistin antibiyotik duyarlılığı ise sıvı mikrodilüsyon metoduyla belirlendi. Karbapenem direnci ilişkili genler ve biyofilm ilişkili genler tarandı. İzolatlar moleküler yöntemlerle tiplendirildi, uluslararası klonları belirlendi ve alkali lizis yöntemiyle suşların plazmid profilleri çıkarıldı. İzolatların koloni tipi, hemoliz özelliği, motilitesi, biyofilm oluşumu ve metallobetalaktamaz üretimi fenotipik yöntemlerle test edildi. Biyofilm oluşumu seramik yüzey, plastik tüp, vasküler kateter ve foley kateter yüzeylerinde araştırıldı. Biyofilm seviyesi spektrofotometreyle ölçüldü, elektron mikroskopuyla görüntüldü.

Bulgular: *A. baumannii* izolatlarının imipenem-meropenem direnci %87 (85/98), kolistin direnci %8 (8/98) olarak bulunmuştur. İzolatların %42'si çoklu ilaca dirençli, %45'i aşırı ilaç dirençli, %13'ü ise tüm antibiyotiklere duyarlı saptanmıştır. Suşların %83,5 (71/98)'inde metallobetalaktamaz enzimi pozitif bulunmuştur. Karbapenem dirençli izolatların %98,8 (84/85)'inde blaOXA-51, blaOXA-23, ISab1/blaOXA-51, ISAb1/blaOXA-23 genleri pozitif saptanırken, blaOXA-24/40 ve blaOXA-58 genleri saptanmamıştır. Hastane salgın izolatı Genotip D, uluslararası klon II olarak belirlenmiştir. Genel olarak, duyarlı ve dirençli izolatların plazmid profilleri, genotipleri ve klonalitesi arasında benzerlik gözlenmemiştir. İzolatların %88'inde farklı seviyelerde biyofilm oluşumu ölçülmüştür ve çoğunda biyofilm genleri saptanmıştır. Biyofilm oluşumu en güçlü foley kateter yüzeyinde gözlenmiştir. Çalışmada hemolitik aktivite haricinde virülansla direnç arasında ilişki bulunmamıştır.

Sonuç: Dirençli *A. baumannii* suşlarının virölans özelliklerinin ve direnç mekanizmalarının belirlenmesi, suşların epidemiyolojik takibi *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı korunma ve tedavide fayda sağlayacak, olası komplikasyonları ve mortaliteyi azaltmada etkili olacak, gelecekte yeni tedavi yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *A. baumannii*, antibiyotik direnci, virölans, REP-PCR, plazmid



IV. ABSTRACT

Investigation of Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates

Background: In this study, we aimed to investigate the virulence factors (biofilm formation, movement ability, hemolysis) and resistance genes to determine international clones and clonal relationship, plasmid profile by phenotypic-genotypic tests in *A. baumannii* isolated from various clinical samples in Hitit University-Çorum Erol Olçok Training and Research Hospital between 2018-2019.

Materials and Methods: Identification and antibiotic susceptibility of 98 *A. baumannii* isolates were determined with the Vitek 2 system. Colistin antibiotic susceptibility was determined with the broth microdilution method. Carbapenem resistance genes and biofilm associated genes were investigated. Isolates were typed by molecular methods and international clones identified. The plasmid profiles of the strains were determined by the alkaline lysis method. Colony morphology, type of hemolysis, motility, biofilm formation and metalloβ-lactamase production were tested by phenotypic methods. Biofilm formation was investigated on ceramic surface, plastic tube, vascular catheter and foley catheter surfaces. Biofilm level was measured by spectrophotometer and visualized by electron microscope.

Results: The imipenem-meropenem resistance of *A. baumannii* isolates was 87% (85/98) and colistin resistance was 8% (8/98). 42% of the isolates were resistant to multiple drugs, 45% to extreme drugs, and 13% to all antibiotics. Metalloβ-lactamase production was found in 83,5% (71/98) of the strains. The genes of blaOXA-51, blaOXA-23, ISab1 / blaOXA-51, ISAb1 / blaOXA-23 were found in 98,8% (84/85) of carbapenem resistant isolates. The blaOXA-24/40 and blaOXA58 genes were not detected. Hospital epidemic isolate was Genotype D and it has been classified as clon II. Overall, no similarities were observed between susceptible and resistant isolates in terms of plasmid profiles, genotypes and clonality. Different biofilm levels were measured in 88% of the isolates, and biofilm associated genes were detected in most of them. Biofilm formation was most strongly observed on the foley catheter surface.

Except for hemolytic activity, no relationship was found between virulence and resistance in the study.

Conclusion: Determination of virulence factors and resistance mechanisms of strains and epidemiological follow-up will be beneficial in prevention and treatment of *A. baumannii* infections. It will also be effective in reducing possible complications and mortality and will help the development of new treatment methods in the future.

Keywords: *A. baumannii*, antibiotic resistance, virulence, REP-PCR, plasmid



V. KISALTMALAR

ABC	: <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex</i>
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADC	: <i>Acinetobacter</i> derived cephalosporinase
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AİD	: Aşırı İlacı Dirençli
AK	: Amikasin
ARDRA	: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
AT	Ototransportör
Ata	: <i>Acinetobacter</i> Trimeric Autotransporter
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
Bap	: Biyofilm-ilişkili Protein
BfmRS	: Biofilm Formation Regulator System
BH	: Büyük Hata
BHIB	: Brain Heart Infusion Broth
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CAESAR	: Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance
CAZ	: Seftazidim
ÇBH	: Çok Büyük Hata
CFU	: Coloni Forming Unit (Koloni oluşturan ünite)
CHLD	: Karbapenem-Hidrolize Edici Sınıf D-Laktamazlar
CIP	: Siprofloksasin
ÇİD	: Çoklu İlacı Dirençli
CN	: Gentamsin
CRAB	: Carbapeneme Resistance <i>Acinetobacter baumannii</i>
CsuA/BABCDE	: Chaperone–usher Pili Assembly System
CT	: Kolistin
CYB	: Cerrahi Yoğun Bakım
DAP	: 1,3-diaminopropan

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EARS-Net	: The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC	: Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
EDTA	: Etilendiamintetrasetik Asit
EMB	: Eozin Metilen Blue Agar
EPS	: Ekzopolimerik Madde
EU	: European Clone
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
G-BHIB	: Glikozlu Brain Heart Infusion Broth
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz
IC	: International Clone
IPM	: İmipenem
IS	: İnsersiyon Sekansı
KMHB	: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth
LB	: Luria Bertani
LPS	: Lipopolisakkarit
MALDI TOF-MS	: Matrix Assisted Laser Desorption İonization Time Of Flight Mass Spectrometry
MATE	: Multidrug and Toxic Compound Extrusion
MBL	: Metallobetalaktamaz
MEM	: Meropenem
MHA	: Mueller Hinton Agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLST	: Multilocus Sequence Typing
MYSTIC	: Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NCTC	: National Collection of Type Cultures
OD	: Optik Dansite
OMP	: Dış Membran Proteini

OmpA	: Outer Membrane Protein A
OXA	: Oksasilinaz
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PBS	: Phosphate Buffer Salin
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFGE	: Pulse Field Gel Elektroforezi
PL	: Fosfolipaz
PNAG	: Poli-beta-1-6-N-asetilglukozamin
QS	: Quorum Sensing
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
REP-PCR	: Repetitive Extragenic Palindromic - Polymerase Chain Reaction
RND	: Resistance-nodulation-division
SDS	: Sodyum Dodesil Sulfat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SMD	: Sıvı Mikrodilüsyon
SXT	: Trimetoprim-Sulfametaksazol
TAE	: Tris - Aestik Asit- EDTA
TGC	: Tigesiklin
TİD	: Tüm İlaçlara Dirençli
T1SS	: Tip 1 Sekresyon Sistemi
VİP	: Ventilatör İlişkili Pnömoni
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
Rpm	: Revolutions Per Minute
g	: Gravite
bp	: Base Pair
Kb	: Kilobaz
dk	: Dakika
sn	: Saniye
sa	: Saat
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre

µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
M	: Molarite
°C	: Santigrat Derece



VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. <i>A. baumannii</i> 'nin Başlıca Virülans Faktörleri	10
Tablo 2. <i>A. baumannii</i> 'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	19
Tablo 3. OXA Multiplex PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Primer Çiftleri	37
Tablo 4. OXA Multiplex PCR Reaksiyonu İçin Hazırlanan Master Mix Karışımı.	37
Tablo 5. OXA Gen Bölgeleri İçin PCR Programı.....	38
Tablo 6. ISAbal PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Primer Çiftleri	39
Tablo 7. ISAbal/OXA-23 ve ISAbal/OXA-51 Gen Bölgesi İçin Reaksiyon Karışımı	39
Tablo 8. ISAbal/OXA-23 ve ISAbal/OXA-51 Gen Bölgesi İçin PCR Programı	39
Tablo 9. REP-PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Primerler	40
Tablo 10. REP-PCR İçin Reaksiyon Karışımı	40
Tablo 11. REP-PCR Amplifikasyon Programı	41
Tablo 12. IC İdentifikasyonunda Kullanılan Grup 1 Multiplex PCR Primerleri	42
Tablo 13. IC İdentifikasyonunda Kullanılan Grup 2 Multiplex PCR Primerleri	42
Tablo 14. IC Grup 1 Multiplex PCR Reaksiyonu İçin Master Mix Karışımı.	43
Tablo 15. IC Grup 2 Multiplex PCR Reaksiyonu İçin Master Mix Karışımı.	43
Tablo 16. IC için PCR Programı	44
Tablo 17. <i>A. baumannii</i> Suşlarının İzole Edildiği Örneklerin Dağılımı	47
Tablo 18. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Kliniklere Göre Dağılımı	48
Tablo 19. İzolatların Örnek Türü, Örneğin Alındığı Birim ve Direnç Grubuna Göre Dağılımı	49
Tablo 20. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	50
Tablo 21. İzolatların SMD Yöntemi ve Vitek 2 Otomatize Sistemi ile Kolistin MİK Ölçüm Sonuçlarının Dağılımı.....	51
Tablo 22. SMD Yöntemi Referans Alınarak Vitek 2 Otomatize Sistemin Geçerlilik ve Güvenilirliğinin Test Edilmesi.....	51
Tablo 23. İzolatların Koloni Tipi ve Direnç Grupları ile İlişkisi	52
Tablo 24. İzolatların Hemoliz Türü ve Direnç Grupları ile İlişkisi	52
Tablo 25. İzolatların MBL Enzim Üretimi ve Direnç Grupları ile İlişkisi	53
Tablo 26. İzolatların Hareket Yeteneği ve Direnç Grupları ile İlişkisi.....	55
Tablo 27. İzolatların Örnek Alınan Birim ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi	56
Tablo 28. İzolatların Alınan Örnek ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi.....	56

Tablo 29. <i>A. baumannii</i> 'nin Direnç Grupları ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi	57
Tablo 30. <i>A. baumannii</i> 'nin Biyofilm Oluşturma Seviyesi ve Antibiyotik Direnci ile İlişkisi.....	58
Tablo 31. <i>A. baumannii</i> 'nin Twitching ve Swarming Hareketinin Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi	58
Tablo 32. blaOXA-23, blaOXA-24/40, blaOXA-51, blaOXA-58 Genlerinin Pozitifliği ve Direnç Grupları ile İlişkisi	62
Tablo 33. ISAbal/blaOXA-51 ve ISAbal/blaOXA-23 Genlerinin Pozitifliği ve Direnç Grupları ile İlişkisi	63
Tablo 34. İzolatların REP-PCR Analizine Göre Genotip-SuTip Sayısı ve Sıklığı	65
Tablo 35. İzolatların Genotipleri ve Direnç Grupları ile İlişkisi.....	68
Tablo 36. İzolatların Genotipleri ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi	68
Tablo 37. İzolatların Genotipleri ve OXA/ISAbal Genlerin Pozitiflik Sayısı ile İlişkisi	69
Tablo 38. İzolatların IC Analiz Sonuçları ve Direnç Grupları ile İlişkisi	70
Tablo 39. İzolatların IC Klon Grupları ve Genotip Türü ile İlişkisi	71
Tablo 40. OmpA ve csuE Genleri Pozitifliği ve Direnç Grupları ile İlişkisi	73
Tablo 41. OmpA ve csuE Genleri Pozitifliği ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi	74
Tablo 42. İzolatların Genotipleri ve OmpA, csuE Genleri Pozitifliği ile İlişkisi	74
Tablo 43. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Plazmid Karakterizasyonu, Antibiyotik Direnç Paterni, Klonalitesi ve Genotip Analiz Sonuçları	76

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. <i>Acinetobacter spp.</i> Taksonomisi	5
Şekil 2. <i>A. baumannii</i> Suşlarının Direnç Grubuna Göre Dağılımı ve Sıklığı.....	49
Şekil 3. <i>A. baumannii</i> Suşlarının Farklı Direnç Gruplarında Biyofilm Oluşturma Seviyeleri	57
Şekil 4. Genotiplerin Örnek Tőrőne Göre Dağılımı	67
Şekil 5. Genotiplerin Őrneğın Alındığı Birime Göre Dağılımı	67



VIII. RESİM LİSTESİ

Resim 1. <i>A. baumannii</i> Virülans Faktörleri.....	9
Resim 2. Biyofilm Oluşumunun Dört Aşaması.....	15
Resim 3. IC Değerlendirme Şeması	44
Resim 4. SMD Yöntemi ile Kolistin MİK Ölçümü.....	50
Resim 5. MBL Negatif İzolat, MBL Pozitif İzolat.....	53
Resim 6. Twitching Hareket Yeteneği Görüntüsü	54
Resim 7. Swarming Hareket Yeteneği Görüntüsü	54
Resim 8. İzolatların Spektrofotometre ile Biyofilm Ölçüm Analizi	55
Resim 9. Plastik Tüp Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü.....	59
Resim 10. Seramik Yüzey Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü	60
Resim 11. Vasküler Kateter Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü.....	60
Resim 12. Foley Kateter Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü	61
Resim 13. Foley Kateter Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü	61
Resim 14. Biyofilm Pozitif Kontrol SEM Görüntüsü	62
Resim 15. blaOXA-51 ve blaOXA-23 PCR Analizi Bant Profil Görüntüsü	63
Resim 16. ISAbal1/OXA-51 PCR Analizi Bant Profil Görüntüsü.....	64
Resim 17. ISAbal1/OXA-23 PCR Analizi Bant Profil Görüntüsü.....	64
Resim 18. REP-PCR Sonuçları Bant Profil Görüntüsü.....	66
Resim 19. Multiplex PCR Yöntemi ile IC Analizi Bant Profil Görüntüsü	70
Resim 20. OmpA, csuE Gen Bölgesi Bant Profil Görüntüsü.....	72
Resim 21. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Plazmid Ekstraksiyonu Jel Elektroforez Görüntüsü.....	75

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Acinetobacter baumannii suşları, hızla çoklu antibiyotik direnci geliştiren, insanda çeşitli klinik enfeksiyonlara neden olan non-fermentatif gram negatif kokobasillerdir (1). Çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşturma, kuruluğa ve dezenfektanlara dirençli olma özellikleri nedeniyle özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) ventilatörle ilişkili pnömoniye (VIP) sebep olan ve hastane salgınlarından sıklıkla izole edilen mortalitesi yüksek önemli bir nozokomiyal patojendir (2).

A. baumannii'nin β -laktam antibiyotiklere karşı direnç oluşumunda ürettiği genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL), metallo β -laktamazlar (MBL), oksasilinazlar (OXA) önemli rol oynamaktadır (3). Farklı ülkelerden yapılan sürveyans çalışmaları *A. baumannii* suşları arasında karbapenem direncinin kademeli yükseldiğini, son on yılda Avrupa, Kuzey Amerika ve Latin Amerika'da giderek arttığını göstermektedir (4). Karbapenem direncinden esas olarak bakterinin salgıladığı OXA tipi karbapenemazların ve MBL'lerin sorumlu olduğu bilinmektedir (3,5). Yine ISAbal1 insersiyon elementinin karbapenem direnci geliştiren OXA tipi genlerin ekspresyonunda ve transferinde büyük bir rol oynadığı tespit edilmiştir (6,7).

Kolistin dirinci düşük olmakla birlikte, yaygın kullanımına bağlı kolistin dirençli izolatlar da bildirilmeye başlamış, *A. baumannii* için tedavi seçenekleri oldukça kısıtlı hale gelmiştir (8,9). Mevcut durum gelecekte yaşanabilecek tedavi sıkıntısı nedeniyle çoklu ilaca dirençli (ÇİD) izolatların artmasını önlemede; uygun ve akılcı antibiyotik seçimi, temas izolasyonu önlemleri, el hijyeni, çevre temizliği eğitim faaliyetleri ve sürveyans çalışmaları gibi enfeksiyon kontrol müdahalelerinin gereğini açıkça göstermektedir (4).

Hastane içi salgınları önlemede ÇİD *A. baumannii* gibi önemli nozokomiyal patojenlerin, sürveyans programı dahilinde rutin ya da düzenli aralıklarla tiplendirilmesi önerilmektedir. Günümüzde çeşitli moleküler yöntemler epidemiyolojik tiplendirmede kullanılmaktadır. Rutin laboratuvarlarda hızlı, kısa sürede sonuç veren, ayırım gücü

yüksek amplifikasyon temelli yöntemlerden REP-PCR (repetitive extragenic palindromic - PCR) tiplendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır (10). Dirençli patojenlerin baskın soylarının küresel çapta epidemiyolojik takibi gerekli olup, özellikle Avrupa salgınlarından sonra *A. baumannii*'nin uluslararası soyları da (International Clones, IC) tanımlanmıştır. IC tiplendirmesinde Pulse Field Gel Elektroforezi (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST) ve Polymerase Chain Reaction (PCR) tabanlı moleküler yöntemler kullanılmaktadır (11). Literatürde ayrıca *A. baumannii*'nin taşıdığı plazmidlerin direnç genlerinin kazanımında rol oynadığına ve epidemiyolojik çalışmalarda belirteç olarak kullanıldığına dair çalışmalar da az sayıda mevcuttur (3).

Son yıllarda *A. baumannii* izolatlarıyla yapılan çalışmalar incelendiğinde bakterinin virülans faktörleriyle ilgili araştırmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir (12). Yapılan çalışmalarda virülans faktörleri arasında; dış membran proteini A (Omp A), penisilin bağlayan protein (PBP)-7/8, fosfolipazlar (PL), lipopolisakkarit (LPS), polisakkarit kapsül, tip-1 pili gösterilmiştir (13,14). Bu virülans faktörleri biyofilm oluşturma, hareket yeteneği, hemolitik aktivite, serum direnci, efluks pompası, demir kazanımı gibi kritik mekanizmalara etki ederek enfeksiyon patogeneğinde önemli rol oynamakta ve bakterinin olumsuz koşullarda hayatta kalmasını sağlamaktadır (13,14). *A. baumannii*, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturarak olumsuz koşullar altında uzun süre hayatta kalabilmektedir (15). Biyofilm oluşumunda bakteri yapısal bileşenleri (pili), bakteriyel yüzey bileşenleri (OmpA), makromoleküler sekresyonlar ve çevreyi algılama sistemi (QS) rol almaktadır (15).

Literatürde *A. baumannii*'de yapılan fenotipik ve genotipik testlerle bakteri virülans faktörleri, direnç genleri ve bunlar arasındaki ilişki araştırılmakla birlikte çalışmalar arasında farklılıklar olduğu görülmektedir (16).

Çalışmamızda Çorum'da klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* izolatlarının fenotipik olarak antimikrobiyal direnç paterninin ve virülans özelliklerinin (biyofilm oluşturma, hareket yeteneği, hemolitik aktivite) belirlenmesini; genotipik olarak ise direnç ilişkili OXA-tipi genleri, ISAbal genleri ve biyofilm ilişkili genleri araştırmayı, suşların klonal yakınlığını ve hastanemizdeki uluslararası baskın klonun belirlenmesini, plazmid profilinin tanımlanmasını ve bunlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık. *A. baumannii* suşlarının güncel genotipik ve fenotipik özellikleriyle epidemiyolojik açıdan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen kapsamlı

veriler hastanemiz *A. baumannii* enfeksiyonlarına yönelik alınacak enfeksiyon kontrol önlemlerinin belirlenmesine, gelecekteki profilaktik ve terapötik seçeneklerin oluşturulmasına ve bir sonraki aşamada yapılacak olan ileri çalışmalara ışık tutacak olup, hem ulusal hem de uluslararası literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Taksonomi

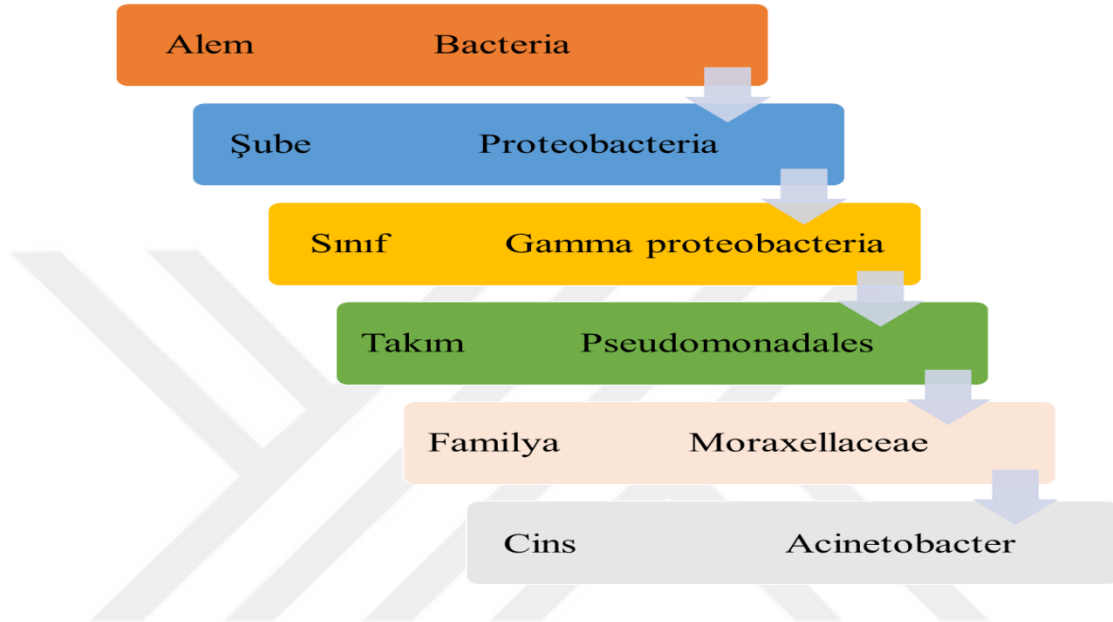
Acinetobacter spp. katalaz pozitif, oksidaz negatif, zorunlu aerob, non-fermentatif, hareketsiz, *Moraxellaceae* ailesinin üyesi gram negatif kokobasillerdir (17,18). İlk olarak 1911 yılında, Hollandalı mikrobiyolog Martinus Willem Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiştir (4). Zaman içinde bu tanımlamalar, sınıflandırmalar yetersiz kalmış yeni çalışmalarla benzer organizmalar olan *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratus* ve *Achromobacter mucosus* gibi farklı jenerik isimlerle birçok cins ve tür içinde yer almıştır (19,20).

Yunan dilinde ‘akinetos’ olarak geçen ‘hareketsiz’ anlamına gelen ‘*Acinetobacter*’ cins ismi uzun süre zarfında çeşitli çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. 1954 yılında Brisou ve Prevot (21) tarafından, *Achromobacter* cinsi bakterilerden ayırabilmek amacıyla türetilmiştir. Baumann ve ark. (22) 1968’de yaptığı araştırma sonucunda *Acinetobacter* cinsi olarak *Moraxellaceae* ailesi içinde 1971’de “*Moraxella* ve İlişkili Bakteriler Taksonomi Komitesi” tarafından resmi olarak onaylanmıştır (23).

Acinetobacter cinsine ait tür çalışması 1986 yılında Bouvet ve Grimont (24) tarafından yapılmış ve DNA-DNA hibridizasyon yöntemiyle *Acinetobacter* cinsi içinde 12 farklı genomik tür tanımlanmıştır. Bu türler arasında *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* ve *A. lwoffii* bulunmaktadır. 1989’da Tjenberg ve Ursing, ardından Bouvet ve Jeanjean’ın (25-27) yaptığı çalışmalarla tanımlanan genomik tür sayısı artmış, günümüzde bu sayı 82’ye ulaşmıştır.

1991’de Gerner-Smidt ve ark. (28) fenotipik olarak yüksek benzerlik gösteren *A. calcoaceticus* (genomik tür 1), *A. baumannii* (genomik tür 2), *A. pittii* (genomik tür 3), *A. nosocomialis* (genomik tür 13TU) türlerine ‘*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

complex' (ABC) adını vermişlerdir. Yapılan araştırmalarda üstün moleküler yöntemlerle genomik tür 13TU'ya ve aynı zamanda ABC üyelerine çok benzer yeni bir tür bulunmuş, *Acinetobacter seifertii* tür ismi verilerek ABC kompleks grubuna dahil edilmiştir (29). Sonuç olarak, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* ve *A. seifertii* bu komplekste yer alan türler olmuştur.



Şekil 1. *Acinetobacter* spp. Taksonomisi

2.2. *Acinetobacter* Türlerinin Genel Mikrobiyolojik Özellikleri

Acinetobacter türleri zorunlu aerob, hareketsiz, sporsuz, ince kapsül oluşturabilen 1-1,5 µm x 1,5-2,5 µm boyutlarında gram negatif bakterilerdir. Biyokimyasal olarak katalaz pozitif, oksidaz negatif, sitrat pozitif, deoksiribonükleaz negatif, indol negatif, şeker fermente etmeyen, asit oluşturmeyen, nitratı redükte etmeyen bir gruptur (17,18). Bakteriler antibiyotik içeren bazı besiyerlerinde ve logaritmik üreme fazında basil, Gram boyamada alkol ile dekolarizasyona direnç gösterip gram negatif kok, kokobasil, diplokok formunda görülebilmektedir (17,18).

Acinetobacter türleri koyun kanlı agar, triptik soy agar ve Mac Conkey/ Eozin - metilen blue (EMB) agar gibi rutin kullanılan standart besiyerlerinde kolay ürerler. Mac Conkey/ EMB agarda laktoz negatif renksiz ya da besiyerinin renginde koloniler oluştururlar. Koyun kanlı agarda 0,5-2 mm çapında şeffaf ya da grimsi-beyaz, zeminden kabarık sınırları düzgün, bazen mukoid koloniler oluştururlar (18). Klinikte bu

bakterilerin izolasyonu için kullanılabilen seçici ve ayırt edici besiyerleri de mevcuttur. Safra tuzları, şeker ve bromkrezol moru ile hazırlanmış Herellea agar, vankomisin, sefsulodin, sefradin gibi antibiyotikleri içeren Leeds *Acinetobacter* Medium Holton's agar bu amaçla kullanılmaktadır (30,31).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında geleneksel yöntemlerle tür ayırımında kullanılan üreme derecesi, hemoliz oluşturma, jelatin hidrolizi, glikozdan asit oluşturma ve farklı karbon kaynaklarının asimilasyonu gibi uygulanması zahmetli ve zaman alan metabolik testler kullanılabilmektedir (9). Klinikte en sık izole edilen *A. baumannii* hemoliz yapmadan, glukozu oksitleyerek ve 44°C sıcaklıkta üreyebilme yeteneği ile diğer *Acinetobacter* türlerinden ayırt edilebilir (17,30,32). *A. lwoffii* glukozu oksitlemeyen ve hemoliz yapmayan türdür. *A. haemolyticus* hemoliz yapan bir türdür. *A. johnsonii* ise 37°C'de üreyememesi ile diğer türlerden ayırt edilebilir (17).

Rutin tanı laboratuvarlarında *Acinetobacter* cinsi bakterileri tür düzeyinde tanımlayacak, diğer non-fermenter gram negatif bakterilerden ayırt etmeyi sağlayacak kesin bir metabolik test bulunmamaktadır. Bouvet ve Grimont (4,33) 12 genomik türün 11'ini tanımlayabilen 28 fenotipik test içeren bir *Acinetobacter* tanımlama şeması tasarlamıştır. Ancak yeni bulunan türlerin bu şemayla tanımlanması olanaksız olup, özellikle *A. baumannii* ile *Acinetobacter* genomik tür 13TU birbirinden ayırt edilememektedir.

Klinik mikrobiyoloji rutin laboratuvarlarında karbon kaynaklarının asimilasyonu temeline dayanan API 20NE, Vitek 2, Phoenix ve MicroScan WalkAway sistemleri gibi yarı otomatize ve gelişmiş otomatize tanımlama sistemleri kullanılmaktadır. Kısıtlı veri tabanı içeriği, genomik benzerlik nedeniyle bu sistemlerle ABC türleri tam olarak tanımlanamamaktadır. Bu anlamda, MALDITOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption İonization Time of Flight Mass Spectrometry) pahalı ekipman ve veri tabanı gerektirmesine rağmen ABC kompleksi de dâhil *Acinetobacter* türlerini basit, bir saatten az bir sürede doğru tanımlaması ile iyi bir teknik olarak görülmektedir (34,35).

Acinetobacter'leri tür düzeyinde tanımlamak için duyarlılığı ve güvenilirliği yüksek moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Protein profili, serotiplendirme, bakteriyosin ve faj tiplendirme, MLST, PFGE, rastgele amplifiye polimorfik DNA analizi (RAPD), amplifiye rRNA geni restriksiyon analizi (ANDRA), PCR, ribotipleme, gibi yöntemler bu alanda kullanılmaktadır (33,34). Moleküler yöntemlerin yüksek

düzyeyde duyarlly olmalarına rağmen maliyetli, uygulaması zor, çeşitli ekipman ve deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle *Acinetobacter* türlerinin identifikasyonunda rutin laboratuvarlarda kullanımları sınırlıdır.

2.3. Epidemiyoloji

Acinetobacter spp. genel olarak nemli toprak/çamur, sulak alanlar, göletler, su arıtma tesisleri, balık çiftlikleri, atık su ve hatta deniz suyu dahil olmak üzere ıslak ortamlarda saprofit olarak yaşayan bakterilerdir (36). Canlılığın devamı için besin ihtiyacı düşük olduğundan kuru ve cansız yüzeylerde ortalama beş ay kadar yaşayabilirler. Bu yaşam şekli ile insan rezervuarları ve hastane ortamlarında kolayca kolonize olur, hastane içi salgınlara neden olurlar (36,37).

Acinetobacter türleri sağlıklı kişilerin %25'inde deri ve mukoz membranlarında kolonize olabilirler (2). Mikroorganizmanın özellikle solunum yolları olmak üzere orofarenks, deri, üriner sistem ve gastrointestinal sistemde kolonizasyonları saptanmıştır (38). Kasıklar ve ayak parmakları araları gibi nemli alan kültürlerde sık üremektedir. Orofarengeal ve rektal taşıyıcılık oranları yoğun bakım üniteleri dışındaki hastalarda nadirdir (39). *Acinetobacter* türleri özellikle hastane çalışanlarının ellerinde uzun süre kalabilen bakterilerdir (40).

Hastane ortamında *Acinetobacter* türlerinin endotrakeal tüp, intravenöz kateter, periton diyaliz kateteri, ventrikülostomi tüpü ve üriner kateter gibi invaziv uygulamalarla oluşan zayıf noktalardan direk temas veya kontamine sıvılar vasıtasıyla enfeksiyona ya da kolonizasyona sebep olduğu görülmüştür. Temas izolasyonu, medikal aletlerin dekontaminasyonu, ünitelerde sıkı dezenfeksiyon uygulamaları ve el yıkama enfeksiyon ve salgınlardan korunmada etkili bulunmuştur (37).

Günümüzde *Acinetobacter* enfeksiyonları dünya çapında hastaneler arası çapraz yayılımla hızla artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı 2009-2010 sürveyans verileri, *Acinetobacter spp.*'nin sağlık ilişkili tüm enfeksiyonların %1,8'ini oluşturduğunu göstermiştir (41). Hastane ağlarından alınan sürveyans çalışmalarına göre, bu durum Avrupa ve Latin Amerika'daki YBÜ'lerde de benzer bulunmuştur (42,43). Bununla birlikte Çin, Tayvan ve Güney Amerika'daki bazı ülkelerde, *Acinetobacter*'in çok daha yüksek oranda nozokomiyal enfeksiyonlara neden olduğu görülmüş, Hindistan'da baskın bir nozokomiyal patojen haline gelmiştir (44).

Asya ve bazı Latin Amerika ülkelerinde *Acinetobacter*, bakteriyemi ve nozokomiyal pnömoninin en yaygın üç nedeninden biridir (45-47). ABD’de yılda tahmini 45.000 (41.400 - 83.000), dünya çapında 1 milyon (600.000 - 1.400.000) *Acinetobacter* enfeksiyonu vakası olduğu saptanmıştır (48). Türkiye’de 2001 yılında 22 merkezin katılımıyla yapılan bir çalışmada YBÜ’lerde gelişen enfeksiyonlarda *Acinetobacter* türleri %18,2 oranında etken olarak bulunmuştur (49).

Toplum kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonları Avustralya ve Asya’da bildirilmiştir (50,51). Toplum kaynaklı enfeksiyonlar, organizmanın faringeal taşınması, agresif pnömoni ve yüksek vaka ölüm oranları ile karakterize edilmiştir. Toplum kökenli kan dolaşımı enfeksiyonları da bildirilmiştir (52). Bazı coğrafi bölgelerde *Acinetobacter* enfeksiyonlarının daha yüksek prevalansının nedeni bilinmemektedir, ancak kısmen kolonize olan bakterileri etkileyen sıcaklık ve nem farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir (53).

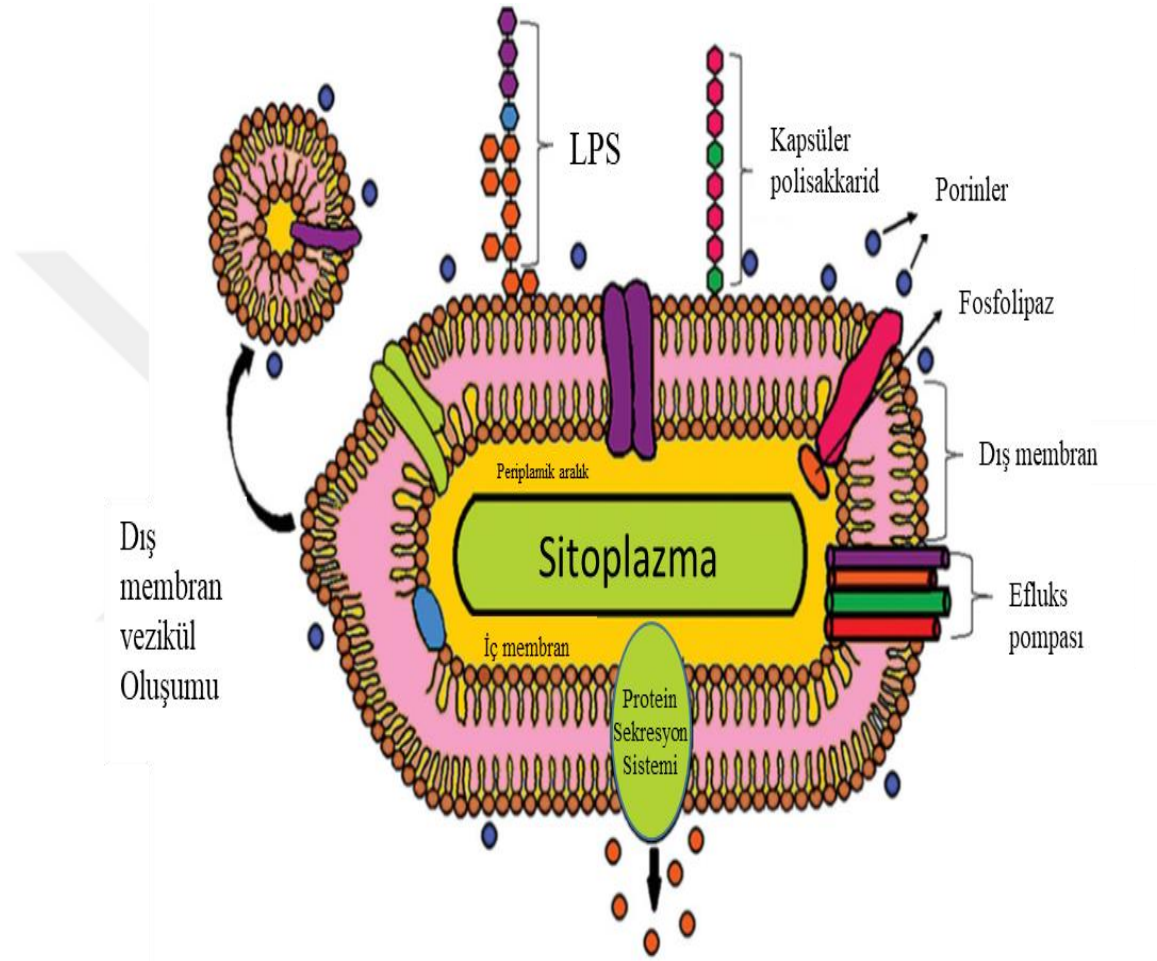
Savaşlar ve doğal afetlerde de *Acinetobacter* enfeksiyonlarının prevalansı yüksek bulunmuştur. *A. baumannii*’nin 2007-2008 yılları arasında Irak ve Afganistan’da bulunan ABD askerlerinin savaş yaralarından izole edilen bakterilerin %63’ünü oluşturduğu bildirilmiştir (54). 2004’te Güneydoğu Asya tsunamisinde yumuşak doku yaralanmaları ve fraktür gelişen kritik 17 hastanın %20’sinin yara örneklerinden, kan ve solunum sekresyonlarından ÇİD *Acinetobacter* izole edilmiştir (55). Türkiye’de bir YBÜ’de daha önce nadiren izole edilirken, 1999 Marmara depremini takiben *A. baumannii* en yaygın nozokomiyal patojen olarak saptanmıştır (56).

Acinetobacter türleri immün sistemi baskılayan bir ilaç ya da kronik hastalık olmağı sürece hastanede yatan hastalar için düşük virülanslı bir patojen olarak kabul edilmektedir. *A. baumannii* enfeksiyonlarının başlıca risk faktörleri ileri yaş, özellikle uzun süreli, hastanede veya yoğun bakımda yatış ve mekanik ventilasyon desteği, invaziv girişimler, hastane ortamında enfekte veya kolonize hastalara daha fazla temas süreci, ağır cerrahi ameliyatlar, kan transfüzyonu ve geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanların kullanılmasıdır (57).

2.4. Virülans Faktörleri

A. baumannii ile ilişkili birçok virülans faktörü tanımlanmıştır. Virülans faktörleri arasında porinler, LPS, kapsüler polisakkaritler, PL, protein sekresyon

sistemleri, iki bileşenli efluks pompaları, biyofilm, demir kazanım mekanizmaları, PBP7/8 ve pili bulunmaktadır (58). Bu virülans faktörleri enfeksiyon patogenezinde önemli rol oynamakta ve bakterinin olumsuz koşullarda hayatta kalmasını sağlamaktadır. *A. baumannii* ile ilgili başlıca virülans faktörleri Resim 1’de gösterilmektedir ve bu faktörlerin fonksiyonu Tablo 1’de özetlenmiştir (58,59).



Resim 1. *A. baumannii* Virülans Faktörleri.

(i) Porinler, hücre yüzeylerinde bulunur (ompA ve omp22 gibi) biyogenezin düzenlenmesine yardımcı olurlar. (ii) Dış membrandan oluşan LPS’ler, hayatta kalmada önemli bir rol oynar. (iii) Kapsüler polisakkaritler, antimikrobiyal dirençle ilişki dış membranda bulunur. (iv) Protein salgılama sistemleri, proteinleri periplazmik alandan hücre dışına taşır. (v) PL, membranın içine gömülü, fosfolipid metabolizmasında rol oynar. (vi) Dış membran vezikülleri (OMV), bakteriler ve konak hücre arasında vasıta görevi görür (58)

Tablo 1. *A. baumannii*'nin Başlıca Virülans Faktörleri

Virülans faktörü	Fonksiyonları	Referans
Porin (OmpA, Omp33-36)	Apoptoz, biyofilm oluşumu, olumsuz koşullarda devamlılık, biyogenezin düzenlenmesi	(60-63)
LPS	Tümör nekroz faktör salınması, serum direnci, konak immün yanıtından kaçma, doku enfeksiyonunda hayatta kalma	(64-65)
Kapsüler polisakkaritler	Biyofilm oluşumu, serumda büyüme, kapsüler polisakkarit üretimi, virülansı ve öldürülmeye karşı direnci artırma	(66-68)
PLC ve PLD	Sitotoksik etkilerin azaltılması, invazyon, serum direnci	(69-71)
Protein Sekresyon sistemleri ‘‘T1SS, T2SS, T5SS’’	ATP bağlayıcı membran transporter, in vivo hayatta kalma, bir ototransporter	(72-76)
Dış Membran Vezikülü (OMV)	Virülans faktörlerinin dağıtımı, antibiyotik direnç genlerinin yatay transferi	(77-79)
Demir Kazanım Mekanizmaları (acinetobactin and NfuA)	in vivo hayatta kalma, olumsuz koşullarda devamlılık, konak hücrenin ölümü	(80,81)
PBP7/8 ve β -laktamaz	Serum direnci, in vivo hayatta kalma, yapışma	(82,83)
Pili	Yapışma, biyofilm oluşumu	(84)

2.4.1. Porinler

Porinler, hücrel geçirgenliği sağlayan dış membran proteinleridir [Outer membrane proteins (Omps)]. Omps, hücre yüzeylerinden kaynaklanır ve dış membran veziküller (OMV'ler) ile birlikte salınır (59). OmpA, *A. baumannii*'de bulunan önceden tanımlanmış fonksiyonel özellikleri iyi bilinen bir virülans faktörüdür. OmpA, sitokrom C ve apoptozu indükleyen faktörler gibi moleküller üreterek hücre apoptozunu indükleyen ‘‘b-barrel’’ olarak adlandırılan fiçı şeklindeki bir porindir (59). OmpA, por geçirgenliğini 70 kat düşürebilir. Ayrıca, OmpA genini bozmak, birkaç antibiyotiğin (kloramfenikol, aztreonam ve nalidiksik asit) minimal inhibitör konsantrasyonlarını (MİK) önemli ölçüde azaltır (60). OmpA, OMV'lerin biyogenezinin düzenlenmesine yardımcı olur. OmpA ayrıca fibronektin ile etkileşime girerek epitel hücrelere yapışma ve invazyonda büyük bir rol oynar. OmpA, yüzey motilitesi ve biyofilm oluşumu

yoluyla *A. baumannii*'nin hayatta kalması üzerinde doğrudan etkiye sahiptir (59). Bakteri canlılığında önemli fonksiyonlara sahip olması nedeniyle antibakteriyel ilaç üretiminde hedef olarak görülmüştür (61). *A. baumannii*'de bulunan Omp 33-Omp 36 proteinleri, suyun geçişi için ortam görevi görür ve apoptozu indükleyerek patogeneizde önemli bir rol oynar (62,63).

2.4.2. Lipopolisakkaritler

LPS'ler *A. baumannii*'nin dış membran yapısında bulunan ana bileşenlerden biridir. Makrofajlardan tümör nekroz faktörü ve interlökin-8'in salınmasını indükleyen, bu sayede bakterinin patojenitesine katkıda bulunan immünoreaktif moleküllerdendir (64). LPS, bir endotoksik lipid A parçası, bir oligosakarit çekirdek ve tekrarlayan bir O-antijenden oluşur. LPS'deki modifikasyonlar, kolistin gibi antimikrobiyal ajanlara duyarlılığı azaltmaktadır (65).

2.4.3. Kapsüler Polisakkaritler

Kapsüler polisakkaritler, biyofilm oluşumunda, ökaryotik hücrelere yapışmada, insan serumuna dirençte ve antimikrobiyal dirençte önemli rol oynayan bir virülans faktörüdür (66). K-lokus gen kümesi tarafından kapsüler polisakkarid üretimi sağlanır (67). *A. baumannii*'nin ekzopolisakkarit üretimini antibiyotiklerin MİK değerlerinin altında arttırdığı ve bu aşırı üretimin geri dönüşümlü olduğu, mutasyonel olmadığı gösterilmiştir (66). Kapsül polimerizasyonu için gerekli olan "ptk" ve "epsA" genlerinin inaktive edilmesiyle yapılan bir çalışmada da kapsül yapısının bozulduğu ve yumuşak doku enfeksiyonlarının engellendiği görülmüştür (68).

2.4.4. Fosfolipazlar

PL, fosfolipid metabolizmasında rol oynayan, birçok bakteride virülans faktörü olan bir lipolitik enzimdir. Genel olarak PLA, PLC ve PLD olarak sınıflandırılır. Fosfolipitlerin bozunması, konak hücrenin membran stabilitesini etkiler ve konak immün yanıtında değişikliklere neden olabilir (69). PLC ve PLD enzimleri *A. baumannii*'de tanımlanmış virülans faktörleridir (70). *A. baumannii* ATCC 17978 ile yapılan bir çalışmada, bakterinin iki PLC geni (A1S-0043, A1S-2055) bulunmuş ve

A1S-0043 geninin inaktivasyonu ile epitel hücrelerinde sitotoksik etkinin azalığı gözlenmiştir (71).

2.4.5. Protein Sekresyon Sistemleri

Çoğu gram negatif patojenlerde olduğu gibi *A. baumannii*, çevreye ve konağa adaptasyonu kolaylaştırmak için protein ürünlerini salgılar. Bunlardan tip 1 sekresyon sistemi (T1SS), dış membranda ATP bağlayıcı transporter işlevi görür. Aynı zamanda bir membran füzyon proteinidir. Birçok T1SS substratı tanımlanmış ve bunlar hastalık süreciyle ilişkili bulunmuştur (72). T2SS birçok bakteride tanımlanmış ilk sekresyon sistemi olarak tanımlanan, iç ve dış membrana yerleşik bir multiprotein kompleksidir (73,74). Genel sekresyon sistemleriyle hedef proteinleri periplazmik aralığa taşır ya da twin arjinin transport sistemiyle hedef proteinleri hücre dışına transfer eder (75). T5SS, bir ototransporter salgı sistemidir [*Acinetobacter* trimeric autotransporter (Ata)]. Yardımcı herhangi bir enerji formuna ihtiyaç duymadan salgılama yeteneğine sahiptir (72). *A. baumannii* suşlarının kolajen I, III, IV ve V gibi ekstraselüler matriks elemanlarına yapışmada önemli rol oynadığı bulunmuştur (76). Salgılanan proteinler, enfekte dokulardaki mikrobiyal çoğalmada ve konak savunmasını manipüle etmede önemli rolleri nedeniyle terapötik hedef olarak dikkat çekmektedir.

2.4.6. Dış Membran Vezikülü [Outer Membrane Vesicles (OMVs)]

Protein salgısının özel bir örneği olan OMV'ler, bakteri dış membranından balonlaşarak oluşur (77). *Acinetobacter*'deki OMV'ler üzerine yapılan birkaç çalışmada, yatay gen transferi, antibiyotik direnci ve virülans ilişkili birçok rolü olduğunu bulunmuştur. *Acinetobacter* türlerinde, virülans proteinleri, antibiyotik direnç genlerini içeren çeşitli OMV türleri tanımlanmıştır (78). OMV'ler, konakta bağışıklık yanıtını güçlü uyatabildikleri ve yapılan aşı uygulamalarında koruyucu etki oluşturabildikleri için yeni ilaçların ve aşıların geliştirilmesinde öne çıkmaktadır (79).

2.4.7. Demir Kazanım Mekanizmaları

A. baumannii kapsüler polisakkaritlerinin yanında, metabolik etkileri ile de hücresel savunma mekanizmalarında kaçarak enfeksiyonları kolaylaştırır. Bakteriler

çoğalmaları esnasında ihtiyaç duydukları demiri konak hücre ile yarışarak sağlayabilmeye çalışırlar. Fakat demir, insan vücudunda serbest taşınmaması nedeniyle bakteride siderofor adı verilen protein yapılar tarafından üretilir. Demiri bağlayarak hücre içine alımı sağlar, hücre dışı demiri azaltarak konak savunma mekanizmalarından kaçıp kolonize olmayı kolaylaştırır. Aynı zamanda enfekte konakta hücre hasarına da neden olan bir virülans faktörüdür (80). Bakterilerin oluşturduğu siderofora “aerobaktin” adı verilir. *Acinetobacter* sideroforu ”acinetobactin” adını alır. NfuA, Fe-S proteini de demir şelasyonuna katılan ve oksidatif strese hücre yanıtında rol oynayan, *A. baumannii* için bir virülans faktörü olarak tanımlanmıştır. NfuA mutanlı bakteriler, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen radikallerine daha duyarlıdır ve insan epitel hücrelerinde büyüme hızı önemli ölçüde azalmıştır (81).

2.4.8. Penisilin Bağlayıcı Protein 7/8 ve β -laktamaz

PBP’ler β -laktam antibiyotiklere dirençle ilgili olmalarına karşın, “pbpG” geni tarafından kodlanan PBP 7/8, *A. baumannii*’de bir virülans faktörü olarak bulunmuştur. PbpG mutant suşlarının PBP 7/8 kaybı ile peptidoglikan yapısının bozulduğu düşünülmüş ve bu suşların insan serumunda büyüme hızının azaldığı, sıçan yumuşak doku enfeksiyonu ve pnömoni modellerinde sağkalımın önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (82). İlginç bir şekilde, bir GSBL olan PER-1 geninin de *A. baumannii*’nin virülans faktörü olduğu ileri sürülmüş, mekanizması açıklanmamış olup hücre adezyonuyla ilişkilendirilmiştir (83).

2.4.9. Pili

A. baumannii’de tip IV pili sistemi ve Csu pili sistemleri tanımlanmıştır. Tip IV pili, bakterilerin motilitesini düzenleyen, Csu pili ise hücre adezyonu ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunan ipliksi ekstrasellüler yapılardır (84).

A. baumannii, flagellası bulunmadığı için hareketsiz olarak tanımlanmıştır. Yakın zamanda yapılan tüm genom dizi analizlerinde, *A. baumannii*’de flagellar genlerin bulunmadığı doğrulanmıştır. Bu sonuç bakteride flagella gerektiren "swimming" (yüzme) ve "swarming" (yayılma) hareketinin olmadığını düşündürmüştür (85). Çeşitli çalışmalar ise ABC kompleksine ait bakterilerin hareket yeteneğinin olduğunu göstermiştir (86). *A. baumannii* suşları, iki bağımsız hareket formuna sahiptir:

yüzeyle ilişkili hareketlilik (surface-associated motility) ve seğirme (twitching) hareketliliği. ‘Twitching’ hareketi birçok hareketli bakteride gösterilmiştir. *A. baumannii* twitching hareketi, tip IV pilinin bakteri hücrelerini tekrarlayan ileri-geri çekme hareketi ile agar yüzeyinde karışık dallanmalar oluşturması şeklindedir (87). Bu tip hareketin swarming hareketinin bir tipini temsil ettiği öne sürülmüş, fakat daha sonra yapılan çalışmalarda twitching hareketi olarak tanımlanmıştır (88). Bu hareket yeteneğinin organizmanın yarı katı ve bazı abiyotik yüzeylerde hızla yayılmasını sağladığı gösterilmiştir (89).

Twitching hareketi sağlayan Tip IV pili için gerekli genler (pilA-C, pilF, pilM-Q, pilW, pilZ, pilR-T) *A. baumannii* genomunda tespit edilmiştir. Tüm genom analizi yapılan *A. baumannii* suşlarında birden fazla Tip IV pili ilişkili gen varlığı da gösterilmiştir (85-87). Ayrıca, majör subunit PilA geni ile seğirme hareketliliği derecesi arasında pozitif bir korelasyon gösterilmiştir (89).

A. baumannii yüzey-ilişkili hareketliliği, görünüş olarak *Pseudomonas aeruginosa*’nın swarming hareketliliğine çok benzerdir, ancak swarming flagellaya bağlıdır ve *A. baumannii*’nin flagellası yoktur. Şimdiki çalışmalarda *A. baumannii* yüzeyle ilişkili hareketliliğin 1,3-diaminopropan (DAP) sentezine, QS ve lipooligosakkarit üretimine dayandığı gösterilmiştir (90-92).

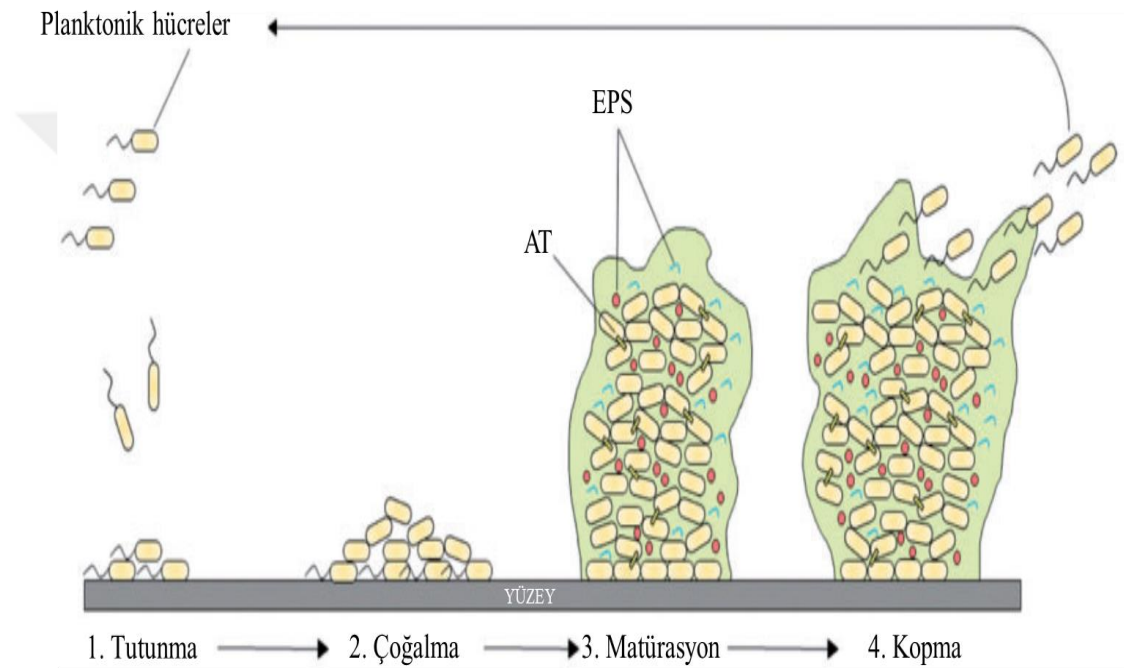
Bakterilerdeki hareketlilik, çoklu sinyal iletim yolları ile düzenlenir. Işık (özellikle mavi dalga boyunda), demir mevcudiyeti ve stres gibi çeşitli çevresel faktörlerin *A. baumannii*’deki hareketliliği etkilediği gösterilmiştir (92-94).

2.4.10. Biyofilm Oluşturma

Biyofilm, çeşitli yüzeylere yapışarak ekzopolimerik madde (EPS) içinde gömülü halde yaşayan ve birbirleriyle irtibat kuran bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir mikroorganizma topluluğudur (95). Biyofilmler, EPS içindeki kanallar yoluyla katı ve sıvı molekülleri pompalayan basit bir dolaşım sistemi gibi işlev görür (95). Bakteriler biyofilm sayesinde aside ve kuruluğa dirençli hale gelir, hastane ortamlarında sağ kalımı artar. Bakteriler kalp kapakçıkları, akciğerler ve diş minesini gibi canlı ve polistiren, cam gibi cansız yüzeylere kolonize olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar (96). Tıbbi cihazlarda biyofilm oluşumu, tedavisi zor olabilen nozokomiyal enfeksiyonların başlıca nedenlerinden biridir. Biyofilmler, hem bakteri ve konak hücre

etkileşimini sağlayıp hem de immün yanıt ve antimikrobiyal etkiden kaçışı kolaylaştırmaktadır (97).

Biyofilm oluşumu basamaklı bir süreç şeklinde yürütülmekte ve önemli moleküler düzenlenmeler ile kontrol edilmektedir. Yüzey hidrofobikliği, sıcaklık ve oksijen konsantrasyonu gibi ortam fiziksel ve kimyasal faktörlerinin etkilediği bildirilmiştir (98). Biyofilm oluşumu süreci aşağıda dört aşama ile Resim 2’de gösterilerek anlatılmaktadır (99). Bu süreç bir döngü halinde devam etmektedir.



Resim 2. Biyofilm Oluşumunun Dört Aşaması

Ototransportörler (AT), virülansta önemli olan çeşitli proteinler grubudur; fonksiyonel özellikler arasında yapışma, oto-agregasyon, kolonizasyon, enterotoksin aktivitesi ve proteoliz yer alır. EPS'ler arasında lipitler, nükleik asitler, polisakkaritler ve proteinler bulunur (99).

- 1. Tutunma:** Planktonik hücreler uygun yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunur.
- 2. Çoğalma:** Hücreler çoğalmaya başlar ve mikrokoloniler oluşturmak için yüzeye geri dönüşümsüz şekilde yapışır.
- 3. Matürasyon:** Hücreler, mikrokolonilerden çok katmanlı hücre kümelerine dönüşür ve matriksi oluşturan EPS'leri sentezlemeye başlar. Matriks EPS'leri arasında lipitler, nükleik asitler, polisakkaritler ve proteinler; biyofilmin yapısal

bütünlüğünün korunmasında, yüzeylere yapışmanın kolaylaştırılmasında ve biyofilm hücrelerinin sabit kalmasını sağlayan kohezif polimerler ağının oluşturulmasında rol oynarlar.

4. Kopma: Biyofilm içindeki bazı hücreler, diğer ortamlarda biyofilm odağı oluşturmak için planktonik hücreler olarak ayrılır ve dağılır.

Biyofilm başlangıcı ve gelişim süreci çok basamaklı süreç şeklinde yürütülmekte ve önemli moleküler düzenlenmeler ile kontrol edilmektedir. Biyofilm oluşumuna katkıda bulunan faktörler suşa bağlı gibi görünse de, bazı ortak faktörler tanımlanmıştır. Çoğu *A. baumannii* suşu, Csu pilisi taşır ve bu pililer csuA/BABCDE (Chaperone–usher Pili Assembly System) şaperonu öncülüğünde eksprese edilir (100). Bakterideki uç adezini kodlayan gen olan “csuE” geninin inaktivasyonu ile pili üretimi ve biyofilm oluşmasının sonlandığı görülmüştür (101). Biofilm Formation Regulator System (BfmRS) adı verilen iki bileşenli düzenleyici sistem tarafından düzenlenen Csu pilinin, polistiren de dahil olmak üzere abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda etkili olduğu, biyotik yüzeylerde gerekli olmadığı gösterilmiştir (102).

Birçok farklı protein, hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Bunlardan en sık görüleni dış membran proteini OmpA’dır. OmpA, *A. baumannii*’nin hem plastik yüzeylere hem de insan epitel hücrelerine tutunmasında rol oynamaktadır (103). Ayrıca *A. baumannii* *Staphylococcal* biyofilm ilişkili protein (Bap) homologu olan BapAb üretir (104,105). Spesifik olarak Bap polistiren ve titanyum gibi tıbbi açıdan ilgili malzemeler üzerinde biyofilm olumunda ön plana çıkmaktadır (104).

A. baumannii klinik izolatlarında biyofilm gelişimi ve olgunlaşması için PNAG (poli-beta-1–6-N-asetilglukozamin) salgılama kapasitesi de önemlidir. PNAG, dört gen kümesi tarafından (*pgaABCD*) kodlanır ve biyofilm EPS’nin ana bileşenidir. Bazı çalışmalarda PNAG’ye karşı gelişen antikorların *A. baumannii*’yi elimine etmesi, PNAG’ın potansiyel bir aşı hedefi olabileceğini düşündürmüştür (107,108).

Biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde kapsüler polisakkaritler, ototransporter sistemi ve QS katkıda bulunan diğer faktörlerdir (109).

2.4.11. Hemolitik Aktivite

A. baumannii genel olarak hemolitik olmayan bir tür olarak kabul edilmesine rağmen, tüm genom analizinde virülansta rol oynayan hemolizinleri / hemaglutininleri kodlayan genler tespit edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonu kanlı agar plaklarında ve sıvı vasatlarda da gösterilmiştir (24,88). Yapılan bir çalışmada özellikle *A. baumannii* suşlarının hemolitik aktivitesinin, sıvı ortamda agar plaklarından çok daha belirgin olduğu, ayrıca koyun eritrositleri değil de, at kanı kullanılarak tespit edilebilir olduğu gösterilmiştir. Bu farklılıktan dolayı *A. baumannii*'nin tarihsel olarak hemolitik olmayan bir bakteri olarak kabul edildiği belirtilmiştir (24,88).

2.5. Patogenez

Bağışıklığı baskılanmış hastalarda ağır bir kliniğe neden olmasına rağmen, *A. baumannii* patogenezini hakkında çok az şey bilinmektedir. Anahtar sorulardan biri, hastalığın ciddiyetinin, bakteriyel virülans mekanizmalarından mı kaynaklandığı, yoksa konağın predispozan yatkınlığı ile açıklanıp açıklanamayacağıdır (110). Konak predispozan faktörlerinin evrensel varlığı göz önüne alındığında, birçok bilim adamı hastalığın ciddiyetinin lokal (örneğin solunum yolu) ve sistemik immünolojik kusurların bir sonucu olduğuna inanmaktadır (110).

Şimdiye kadar araştırılan virülans özelliklerinden *A. baumannii*'de patogeneze tanımlanmış beş ana mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan birincisi, bakterinin çevresel yüzeylere kolonize olmasını sağlayan, tüm fiziksel ve kimyasal strese karşı bakteriyi koruyan, zor koşullar altında bakterinin uzun süre canlı kalmasını sağlayan biyofilm oluşumudur. Sağlam biyofilm oluşumunda öncelikle güçlü adezyon gereklidir. Yüzeylere tutunmayı sağlayan dış zar proteinleri ve pililer biyofilm oluşumunu destekleyen diğer sorumlu virülans faktörleridir. Ayrıca konak immün yanıtından kaçma ve serum direnci oluşturmada, kapsül üretimi ve demir kazanım mekanizmaları patogeneze önemli rol oynayan diğer faktörlerdir (58,100).

2.6. Antibiyotik Duyarlılığı ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

A. baumannii'nin tanımlandığı günden itibaren geliştirdiği ÇİD ile 1980'lerde klinik önemi artmıştır (111). 1970'lerden bu yana giderek artan antimikrobiyal direnç üzerine Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği en önemli nozokomiyal patojenlerden biri olarak tanımlamıştır (112).

A. baumannii, aminopenisilinler, birinci ve ikinci nesil sefalosporinler, aztreonam, ertapenem, fosfomisin, kloramfenikol ve trimetoprim gibi gram negatif patojenlere karşı etkili birçok antibiyotiğe doğal dirençlidir. Yapılan çalışmalarda geniş spektrumlu sefalosporinler (sefotaksim, seftazidim), karbapenemler (imipenem-meropenem), çoğu aminoglikozidler, kinolonlar, gibi antibiyotiklerin MİK değerlerinde zamanla artış meydana gelmiş, özellikle tedavide en güvenilir seçenek olan imipeneme direncin artışı endişe verici seviyeye gelmiştir (112). Karbapenemlere dirençli *A. baumannii* izolatları sıklıkla aminoglikozid ve florokinolonlara karşı da direnç mekanizması edinmiştir. Karbapenem dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kolistin kullanımının artması nedeniyle kolistine dirençli izolatlar da bildirilmeye başlamıştır (113). Hızlı direnç geliştirmede olağanüstü olan *A. baumannii*, β -laktamazlar, aminoglikozid modifiye edici enzimler, efluks pompaları, hücre zarı geçirgenlik defektleri ve hedef bölgelerin modifikasyonları gibi bir dizi direnç mekanizmasına sahiptir. Plazmid, transpozon ve integronların direnç genlerinin taşınmasında önemli katkısı bulunan faktörler olduğu gösterilmiştir (114).

Antimikrobiyal dirençli bakterilerde bulunan farklı direnç modellerini karakterize etmek için ÇİD, aşırı ilaca dirençli (AİD) ve tüm ilaçlara dirençli (TİD) bakterileri tanımlamak için standartlaştırılmış bir uluslararası terminoloji kullanılmaktadır. Her bakteri için epidemiyolojik olarak önemli antimikrobiyal kategoriler oluşturulmuştur. Antimikrobiyal duyarlılık testi için önerilen antimikrobiyal kategorilerin listeleri, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi'nden alınan belgeler ve sınır değerleri kullanılarak oluşturulmuştur. *Acinetobacter* türlerinde ortaya çıkan ÇİD, üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoride en az bir ajana karşı kazanılmış direnç olarak tanımlanmıştır. AİD, iki veya daha az antimikrobiyal kategorinin tamamında en fazla bir ajana duyarlı olma olarak tanımlanmış ve TİD, tüm antimikrobiyal kategorilerdeki tüm ajanlara dirençli olma olarak tanımlanmıştır (115).

A. baumannii'de çeşitli direnç mekanizmalarının birikmesi nedeniyle ÇİD patojenlerin antimikrobiyal direnç genlerini ve izolatlarla olan genetik ilişkisini belirlemek için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında moleküler analizlerin uygulanması önerilmektedir. *A. baumannii*'deki antimikrobiyal direncin altında yatan moleküler önemli mekanizmalar Tablo 2'de gözden geçirilmiş ve özetlenmiştir.

Tablo 2. *A. baumannii*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Antimikrobiyal Sınıf	Direnç Mekanizması	Sorumlu Genler / Protein	Referans
β -laktamlar	Sınıf A β -laktamaz	PER-1,-2; VEB-1,-2; GES-1; SHV-5,-12; TEM-92,-116; CTX-M-2,-3	(119-125)
	Sınıf B β -laktamaz	IMP, VIM, NDM, GIM, SIM	(4,126,127)
	Sınıf C β -laktamaz	ADC 1–7	(128,129)
	Sınıf D β -laktamaz	OXA-51; OXA-23 -24/40 -58 -143 -235	(130-137)
	PBP'lerin modifikasyonu	PBP2, PBP6b	(138)
	OMP'lerin değişimi	CarO	(139)
	Dışa atım pompası	AdeABC	(139)
Aminoglikozidler	Aminoglikozidleri modifiye edici enzimler	AAC; ANT; APH	(4,140)
	16s rDNA metiltransferaz	ArmA	(141)
	Dışa atım pompası	adeABC	(142)
		AdeIJK	(142)
Kinolonlar	Giraz subünite değişimi	GyrA	(144)
	Topoizomeraz IV subunit değişikliği	ParC	(144)
	Dışa atım pompası	adeABC	(23)
		abeM	
Tetrasiklin	Dışa atım pompası	TetA, TetB	(145,146)
		adeABC	(2)
	Ribozomal koruma sistemi	tetM	(147)
Glisilsiklinler (Tigesiklin)	Dışa atım pompası	adeABC	(2)
Polimiksinler (Kolistin)	Dış membran sentezi (LPS) yolaklarında mutasyonlar	PmrAB	(9,148-150)
		LpxA, LpxB, LpxD	(151)
	Dışa atım pompası	ErmAB	(152)

2.6.1. β -laktam Antibiyotiklere Direnç

A. baumannii'nin β -laktam antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu önemli mekanizmalardan biri kromozom veya plazmid kontrolünde β -laktamaz enzimlerinin üretilmesidir. Antibiyotiğe özgü dış membran porinlerinin kaybı ve PBP'lerdeki değişiklikler de *A. baumannii*'nin β -laktam direncinde rolü olduğu bilinen diğer mekanizmalardır (116).

β -laktamazların sınıflandırılmasında en yaygın olarak moleküler temelli Ambler sınıflaması kullanılmaktadır (117). β -laktamazlar; Ambler sınıf A, Ambler sınıf B (metallobetalaktamaz), Sınıf C β -laktamazlar ve Ambler sınıf D (oksasilinazlar) olmak üzere dört grupta toplanmıştır. Sınıf A, C ve D aktif bölgelerinde serin içerirken sınıf B kofaktör olarak divalan metal katyonlarını (çinko) kullanır, bu nedenle bu grup β -laktamazlara, metallobetalaktamaz da denir (117).

Ambler A sınıfına ait SHV-5,-12; TEM-92,-116 gibi farklı β -laktamazların sık görülmemesine rağmen, *A. baumannii*'de rapor edilmiştir (118-120). Bu enzimler dar spektrumlu penisilini hidrolize eder, ancak sefalosporinleri ve karbapenemleri hidrolize etmez ve ayrıca klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilir. PER-1, üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençte *A. baumannii*'de tanımlanan ilk GSBL olarak Belçika'da bildirilmiştir (121). Daha sonra PER-2,-3,-7 gibi birçok varyant ve diğer GSBL direncinde sorumlu VEB-1,-2; GES-1; CTX-M-2,-3 gibi enzimler dünyanın çeşitli ülkelerinden rapor edilmiştir (121-124). GES ve VEB β -laktamaz aktivitesi, seftazidimden ziyade sefepim ve sefpiromu hidrolize eden atipik bir GSBL olarak tanımlanmıştır.

Ambler B sınıfına ait β -laktamaz enzimleri aztreonam hariç karbapenemleri ve diğer β -laktamları hidrolize eder ve klavulanik asit ve tazobaktam gibi klasik β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilmezler (117). Metal şelatörler ve EDTA tarafından aktiviteleri inhibe edilebilir (125). Bugüne kadar IMP, VIM, NDM, GIM, SIM dahil olmak üzere birkaç grup tanımlanmıştır (4,118,126). Bunlardan ilk olarak IMP, 1990 yılında Japonya'da bir *P. aeruginosa* suşunda tanımlandı daha sonra bu enzimin dokuz varyantı *A. baumannii*'de olmak üzere diğer gram negatif basillerde küresel olarak rapor edilmiştir (127).

Ambler C sınıfında bulunan 'Acinetobacter derived cephalosporinase' (ADC) adıyla da bilinen AmpC enzimleri *A. baumannii* tarafından doğal olarak üretilmektedir

(128,129). Bu enzimlerin, aminopenisilinler ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize ettiği ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin etkinliğini azaltmadığı görülmüştür. Diğer gram negatif bakterilerde AmpC gen ekspresyonu indüklenebilirken *A. baumannii*'de genin üst kısmında "ISAbal" olarak bilinen insersiyon elementinin bulunması durumunda eksprese edilir, sefotaksim ve seftazidim gibi geniş spektrumlu sefalosporin direncine neden olan β -laktamaz üretimi gerçekleşir (130). Karbapenemler ve sefepim bu enzimden etkilenmemektedir.

Ambler sınıf D β -laktamazlar veya oksasilinazlar (OXA'lar), hem oksasilin hem de kloksasilinin yanı sıra benzilpenisilinleri hidrolize edebilir, ancak klavulanik asit veya diğer inhibitörler tarafından inhibe edilmezler (131). Oksasilini, benzilpenisilinden daha hızlı hidrolize ettikleri için OXA (oksasilinaz) olarak adlandırılmışlardır. 400'den fazla OXA tipi enzim tanımlanmıştır ve birçok varyantta karbapenemaz aktivitesi vardır (132).

Acinetobacter türlerinde OXA-51 grubu (OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80 ve -82) β -laktamazlar doğal olarak üretilmektedir (8). *A. baumannii* OXA-51 benzeri enzim analizleri, tüm izolatlarda blaOXA-51 benzeri gen bulunmasına rağmen sadece ISAbal ile komşu olan blaOXA-51 benzeri genleri taşıyan suşların karbapenem dirençli olduğunu göstermiştir (5).

OXA-51 doğal β -laktamazın yanı sıra, *A. baumannii*'de kazanılmış karbapenem-hidrolize edici sınıf D-laktamazlar (CHDL) da tanımlanmıştır. CHLD veya MBL'lerin varlığı *A. baumannii*'deki ana karbapenem direnç mekanizmalarıdır (132). OXA-tipi karbapenemazlar, MBL'ler ile karşılaştırıldıklarında karbapenemleri hidrolize etmede daha düşük aktiviteye sahiptirler (100-1.000 kat daha düşük). Fakat bu enzimlerin önemli karbapenemazlar olmalarını sağlayan ISAbal gibi IS (insersiyon sekansları) elemanlarını taşımalarıdır. *A. baumannii*'de tanımlanan IS (ISAbal, ISAbal2, ISAbal3 ve IS18)'ler artan ekspresyon ile ilişkili hibrit promotor sekanslar olarak işlev görmektedirler ve bu sayede bu enzim grubunun karbapenemlere karşı ciddi direnç oluşumunu sağlar ya da azalan duyarlılığına sebep olurlar. Bugüne kadar, beş temel CHDL grubu tanımlanmıştır: OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 ve OXA-235. Bunlardan dünya çapında *A. baumannii*'de en yaygın görülen OXA-23, %56 OXA-51 ile homoloji gösteren, İskoçya'dan bildirilen ilk enzimdir (133). Kromozomal veya plazmid genleri tarafından kodlanan OXA-23 benzeri enzim genleri ISAbal insersiyon elementi varlığı ile enzimin kopya sayısını artırarak önemli derecede antibiyotiklere

direnci artırır (5). *A. baumannii*'de tanımlanan ikinci edinilmiş CHDL grubu, OXA-24/40 benzeri enzimlerdir. Bu grup, OXA-24 dahil çeşitli varyantları içerir ve ilk kez İspanya'da izole edilen karbapeneme dirençli suşlarda tanımlanmıştır (134). Üçüncü CHDL grubu, ilk kez Fransa'da (135) tarif edilen ve daha sonra Avrupa YBÜ'lerinde ve Brezilya'da geniş çapta yayılmış olan OXA-58'e karşılık gelir. OXA-58, genellikle plazmid kökenli bir gen tarafından kodlanır ve IS elementleriyle (ISAb1, ISAb2, ISAb3 ve IS18) ilişkilidir. OXA-143 rapor edilen dördüncü CHDL grubudur. İlk olarak 2004 yılında Brezilya'da izole edilen imipeneme dirençli bir *A. baumannii* suşunda tanımlanmıştır (136). Oksasilinazların son grubu OXA-235 2013 yılında ABD ve Meksika'da izole edilen suşlardan karakterize edilmiştir (129). Bu grup *A. baumannii*'de (OXA-235, 236 ve 237) genleri kromozomda veya bir plazmid üzerinde bulunan üç varyantı içerir (137).

β -laktam direncine neden olan diğer önemli mekanizmalar; dış membran proteinlerindeki (OMP) değişiklikler, penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) modifikasyonu ve aktif dışa atım pompaları yer almaktadır (138). OMP'ler arasında protein CarO, azaltılmış ekspresyon hipotezini destekleyen ve en çok çalışılan porinlerdir (139). PBP2'nin azaltılmış ekspresyonu sülbaktam için direnç gelişimine neden olmaktadır (130). *A. baumannii* izolatlarında RND (Resistance-nodulation-division) ailesinden AdeABC isimli atım pompasının varlığı birçok β -laktam ve diğer antibiyotik sınıflarında dirence sebep olur (139).

2.6.2. Aminoglikozit Direnci

Aminoglikozitlere direnç, esas olarak aminoglikozit değiştirici enzimlerin üretiminden sorumlu olan plazmidlerin, integronların veya transpozonların edinilmesinden kaynaklanır. *A. baumannii*'de aminoglikozitleri inaktive eden üç tip enzim yani aminoglikozid asetiltransferazlar (AAC), aminoglikozid nükleotidiltransferazlar (ANT) ve aminoglikozit fosfotransferazlar (APH) tarif edilmiştir (4). Avrupa'da *A. baumannii* izolatlarının %84'ü, aminoglikozidlerin inaktivasyonu için en az iki enzim üretmektedir (140). Ayrıca, *A. baumannii* suşlarında streptomisin hariç tüm aminoglikozitleri inaktif hale getiren ArmA metilaz tarafından 16S rRNA'nın metilasyonu bildirilmiştir (141). Ek olarak, aminoglikozidlere direnç gelişiminde AdeABC dışarı atım pompasının aşırı ekspresyonu, gentamisin ve

kanamisinin atımını sağlayan MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) ailesinin bir üyesi olan AbeM pompasının aktivitesi rol oynamaktadır (142,143).

2.6.3. Kinolon Direnci

Kinolonlar direncinin ana mekanizması, *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlar sonucu DNA giraz veya topoizomera IV yapısında meydana gelen değişimlerdir (144). Öte yandan, eflüks pompalarının düzenleyici sistemlerindeki mutasyonlar, antibiyotik birikimini engeller ve kinolonlara karşı başka bir direnç mekanizması oluşturur. Bu nedenle, RND tipi (AdeABC, AdeIJK) ve MATE (AbeM) dışarı atım pompalarının aşırı ekspresyonu kinolon direncinin kazanılmasına katkıda bulunur (2).

2.6.4. Tetrasiklin ve Tigesiklin Direnci

Acinetobacter suşlarında tetrasiklin direnci genellikle aktif dışı atım pompa sistemi ve ribozomal koruma sistemi ile meydana gelmektedir (2). Tetrasiklin direnç genlerinin çoğu plazmidler veya transpozonlarda üzerinde bulunmuştur (145). MFS ailesinden TetA ve TetB isimleriyle tanımlanan aktif pompa sistemlerinden TetA sadece tetrasiklin, TetB ise hem tetrasiklin hem de minosiklin direncine sebep olmaktadır (146). Diğer bir mekanizma ise ribozomu tetrasiklin etkisinden koruyan *tetM* geni tarafından kodlanan ribozomal koruma proteinler ile tetrasiklin, doksisisiklin, minosiklinin ribozomdaki hedef bölgelerine bağlanmalarını engellenmektedir (147). Ayrıca RND-tipi eflüks sistemleri AdeABC pompa sistemi hem tetrasiklin hem de tigesiklini substrat olarak kullanmaktadır (2).

2.6.5. Kolistin Direnci

Kolistin esas olarak gram negatif bakterilerinin dışı membranına etki eder. Membrandaki LPS yapıya bağlanarak Ca^{+2} ve Mg^{+2} köprülerinde yer değişikliğine neden olur; sonuçta membran permeabilitesinde bozulma ve hücre ölümü meydana gelir (9). Kolistin ayrıca bakteri hücre membranındaki Lipid A yapısına bağlanarak bakterinin endotoksinini nötralize eder (148). Kolistin geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanılmasıyla ortaya çıkan dirençli enfeksiyonlar nedeniyle önemli yan etkileri olmasına rağmen yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Kolistin direncini oluşturan

ana mekanizma LPS biyosentez yollarındaki modifikasyonlardır. İki bileşenli düzenleyici sistem PmrAB'yi etkileyen çeşitli mutasyonlar LPS'nin bir bileşeni olan lipid A'yı bozar, sitoplazmik membranın negatif yükünü düşürür ve sonuçta kolistin bakteriyel yüzeyine afinitesi azalır (149,150). İkinci mekanizma LPS sentezinin sorumlu lpxA, lpxC ve lpxD genlerindeki mutasyonlar sonucunda, LPS üretimi bozulur ve kolistin hedef mebrana bağlanmaz (151). Bu mekanizmalar bakterinin kromozomal DNA'sı tarafından kodlanmıştır. Ayrıca EmrAB dışa atım pompasının *A. baumannii*'de kolistin direncinde rol oynayabileceği yakın zamanda bildirilmiştir (152).

2.7. *A. baumannii* Enfeksiyonları

Acinetobacter enfeksiyonunun en sık görülen klinik belirtileri ventilatörle ilişkili pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır. Ek olarak, insanlarda *Acinetobacter* cildi, yaraları, solunum ve gastrointestinal yolları kolonize edebilir. Özellikle kolonizasyon ortamında birçok enfeksiyon meydana geldiğinden, kolonizasyon ile gerçek enfeksiyon arasında ayırım yapmak zordur. Toplum kökenli *Acinetobacter* pnömonisi daha çok Güneydoğu Asya ve Avustralya'da yaygın görülmekte ve mortalitesi yüksek bir hastalık olarak bildirilmektedir. *Acinetobacter*, nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının %1,5 ila %2,4'ünü oluşturmaktadır. Bakteriyeminin en sık kaynağı vasküler kateterler ve solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Cerrahi ve travmatik yaraları kontamine ederek osteomyelite de ilerleyebilen şiddetli yumuşak doku enfeksiyonuna da yol açabilir. Sellülit ve folikülit gibi toplum kökenli veya hastaneden edinilen cilt enfeksiyonlarının yanı sıra cilt apseleri ve nekrotizan fasiit ile nadiren ilişkilendirilmiştir. Enfektif endokardit, nozokomiyal menenjit nadir görülen enfeksiyonlarıdır. Penetran travma sonrası oküler enfeksiyon, kornea ülserleri, endoftalmi, periorbital selülit görülebilir (4,30,38).

2.8. *A. baumannii* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Antibiyotiklere hızlı direnç geliştirmesi nedeniyle, *Acinetobacter* için mevcut tedavi stratejileri son derece sınırlıdır. Günümüzde *A. baumannii* tedavisi için karbapenemler, polimiksinler, tigesiklinler ve bunların birbirleriyle kombinasyonları kullanılmaktadır. β -Laktam antibiyotikler, duyarlı *A. baumannii* enfeksiyonları için ilk tercih edilen antibakteriyel ajanlardır. Fakat karbapenemler, artan direnç nedeniyle

tedavide giderek daha kritik bir seçenek haline gelmiştir. Karbapenemlerin etkinliği serum karbapenem konsantrasyonlarının MİK'in üzerinde kaldığı süre uzadıkça artmaktadır. Karbapenemlerin uzatılmış infüzyonu, MİK üzerindeki süreyi artırarak tedavi sonuçlarını, özellikle dirençli patojenler için optimize edebilmektedir (153). Karbapenem dirençli suşlar için ise optimal antimikrobiyal tedavi konusunda fikir birliği bulunmamaktadır.

ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi etmek için bir diğer seçenek tigesiklidir (154-156). Tigesikline bir alternatif olarak, *Acinetobacter* enfeksiyonlarını tedavi etmek için minosiklin kullanımına ilgi artmıştır. Minosiklin, çapraz direnç görülmesine rağmen diğer tetrasiklinlere (tigesiklin dahil) dirençli suşlara karşı bile antimikrobiyal aktiviteyi sağlayabilmiştir (157).

Tetrasiklinlere alternatif olarak, *Acinetobacter* enfeksiyonlarında sulbaktamın potansiyel terapötik rolü mevcuttur. Sulbaktam *Acinetobacter*'e karşı doğrudan antimikrobiyal etkiye sahiptir. Sulbaktamın önemli dezavantajı ampisilin ile kombinasyon halinde kullanılması ve kombine kullanımın da sulbaktam direnç oranlarını artırmasıdır (158).

Kinolonlar ve aminoglikozidler tedavide yer alır, ancak her ikisi de ampirik tedavi için tercih edilen seçenekler olarak düşünülmemelidir. Çünkü her iki sınıfa karşı direnç oranları yüksektir (140,144). Aminoglikozitler arasında amikasin ve tobramisin, *Acinetobacter* enfeksiyonlarında etkinliği yüksek iki ajandır (159). İlaç toksisitesi endişeleri nedeniyle aminoglikozitlerin uzun süreli kullanımından sıklıkla kaçınılmaktadır (159).

Polimiksinler ÇİD *Acinetobacter* için genellikle son tedavi seçeneğidir. Fakat polimiksinler yüksek oranlarda nefrotoksisite ve nörotoksisite yan etkilerine sahiptir. Terapötik pencereleri yoktur, etkili olan dozlar da toksiktir. Sistemik maruziyet ve toksisiteyi en aza indirmek için kullanılan nebülize polimiksinlerle bakteriyemik olmayan *Acinetobacter* pnömonisi hastalarında olumlu klinik sonuçlar alınmıştır (160). Yaygın olmamakla birlikte, polimiksinlere direnç bildirilmiştir ve artmaktadır (161). *A. baumannii*'nin tigesiklinlere ve polimiksinlere karşı artan direnç oranları önemli endişe kaynağıdır. Bu suşlar, alternatif antibiyotik tedavisi kalmadan pan-dirençli olma eğilimindedir.

ÇİD suşların tedavisinde kombinasyon tedavileri denenmekte ve bu tedavilerin etkinliğine dair net kanıt bulunmamaktadır. En sık kullanılan kombinasyonlar, düşük direnç oranları ve in-vitro sinerji göstermesinden dolayı karbapenem ile aminoglikozit kombinasyonlarıdır. Ancak, karbapenemlere dirençli izolatların artması ile *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde in vitro çalışmalarda kolistin-imipenem veya kolistin-rifampisin; kolistin-imipenem-rifampisin; sulbaktam-rifampisin veya sulbaktam-kinolon kombinasyonlarının artmış etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Rifampinin, santral sinir sistemi ve kemik eklem sistemi enfeksiyonlarında ve/veya protez materyallerinin enfeksiyonları için eklenmesi yararlı olabilir (162).

2.9. A. baumannii Enfeksiyonlarının Sürveyansı

Çevresel koşullara dayanıklılığı, tedaviyi sınırlandırıcı olan karbapenemlere hızla direnç geliştirmeleri ve hastane içi salgınlara sebep olması nedeniyle *A. baumannii*'nin için sürveyans izlemi yapılmalıdır. Hastalardan, sağlık çalışanlarından ve çevresel yüzeylerden belirli aralıklarla alınan kültürler, çıkabilecek salgınlara erken tanısında, bulaş kaynağının tespitinde, hızlı ve etkili kontrol önlemlerinin uygulanmasına yardımcı olabilir. Epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin, salgın izolatlarını tespit etmede, özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonların önlenmesinde sürveyans çalışmalarının bir parçası olarak kullanılmaları önerilir. Tiplendirme amacıyla çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemlerle kıyasla, moleküler yöntemlerin ayırma gücü daha yüksektir ve birçok mikroorganizma için uygulanabilme avantajı sağlamaktadır. *A. baumannii* epidemiyolojisi için plazmid profil analizi, “amplified ribosomal DNA restriction analysis” (ARDRA), PFGE, “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP), ribotiplendirme, REP-PCR, MLST yöntemleri kullanılan gelişmiş genotipik sürveyans yöntemlerdir (163,164). PFGE salgın izolatlarının tiplendirmesinde altın standart olan yöntemdir. Maliyeti yüksek, analizi zahmetli ve zaman alıcı olmasına rağmen ayırma gücü yüksek olan bir yöntemdir. Maliyeti daha az olan AFLP yöntemine ilave olarak destekleyici bir yöntem olarak PFGE kullanılmaktadır. ARDRA yöntemi sekans polimorfizmi temeline dayanmaktadır. Bazı bakteri türlerinde birden fazla profil ile karşılaşılabılır, bu nedenle tiplendirme için ek testlere ihtiyaç duyulabilir. Diğer genotipleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında MLST'nin en önemli avantajı ise verilerin internet veritabanlarında paylaşılabilmesidir. Rutin laboratuvarlarda

uygulaması kolay, kısa sürede sonuç veren, ayırım gücü standarta yakın, güvenilir yöntem olan REP-PCR da sıklıkla kullanılmaktadır (163,164).

A. baumannii'nin dünya çapında ÇİD birkaç soyunun hakim olması nedeniyle izolatların yerel, ulusal ve de uluslararası olmak üzere küresel epidemiyolojisini aydınlatma gereği duyulmuştur. Bu amaçla özellikle Avrupa salgınlarından sonra *Acinetobacter* türleri için IC başlığı altında ICI, IC II, IC III (EU I, EU II, EU III) uluslararası klonal soyları tanımlanmıştır. Baskın klonal soyların direnç ve virülans ilişkili genleri edinim kabiliyeti yüksektir. Özellikle, en sık görülen IC II ve IC I klonlarının blaOXA-23 ve blaOXA-24 karbapenemaz üretimi ile uluslararası hastanelerde artan yaygınlıkları birçok ülkeden bildirilmiştir (165). Salgınları takip edebilmek amacıyla uluslararası klonlar PFGE, MLST, PCR tabanlı gibi moleküler yöntemlerle analiz edilmektedir (11,165).

2.9.1. Repetitive Extragenic Palindromic Element-PCR (REP-PCR)

Genom boyunca tekrarlayan diziler, mikroorganizmaların DNA'sında fonksiyonları bilinmeyen kısa DNA (35-40 bp) dizileridir ve belirli bir aralıkla tekrarlanırlar. REP-PCR yönteminde bu spesifik tekrarlayan diziler amplifiye edilir. Çoğaltılan kopyalar boyut ve yük olarak ayrılabilirler. Jel elektroforezde boyut ve yüke göre ayrılan bantlar ile REP-PCR yönteminde parmak izi profili oluşturulur. Görüntülenen farklı bant profilleri klona spesifiktir ve mikroorganizmalar arasındaki ilişkileri göstermede kullanılabilir. REP-PCR yönteminin PFGE ve MLST'den daha hızlı performans gösterme ve kolay uygulanabilme avantajı olmasının yanında ayırım gücünün bu yöntemlere yakın olması nedeni ile akut salgın gelişmesi durumlarında klinik mikrobiyoloji rutin laboratuvarlarında kullanımı yaygındır (164).

2.9.2. Plazmid Profili

A. baumannii bakteriyel genomu kromozom ve plazmidlerden oluşmaktadır. Plazmidler geniş bir boyut aralığında değişir ve çoğu antibiyotik direnci ve virülans genlerinin edinilmesiyle ilişkilidir. Bazı plazmid soylarının insan patojen türleri de dahil olmak üzere birçok bakteri cinsinde çoğaldığı görülürken, bazılarının ise *A. baumannii* türüne özgül olduğu görülmüştür. *A. baumannii* plazmidleri epidemiyolojik olarak geniş bir dağılım göstermiştir. Bioinformatik bir analizde 21 plazmid soyunun 14'ünde %34,6 oranında antibiyotik direnç geni taşıdığı tespit edilmiştir (166). Plazmid klasifikasyonu

Rep (Replication initiator proteins) proteinlerinin homolojisine göre yapılmaktadır. *Acinetobacter* plazmid boyutları 1,3 Kb'dan 400 Kb'a kadar değişmektedir. Boyutlarına göre iki grupta (< 20 Kb ve > 20 Kb) incelenebilir. Genellikle, daha küçük plazmidler kendiliğinden bulaşmaz, ancak birçok büyük plazmid kendi kendine bulaşıcıdır ve virölans faktörlerini kodlayarak suşun patojenitesini kontrol edebilir. Buna rağmen birçok *A. baumannii* suşu konjugasyon veya mobilizasyon işlevlerinde yer alan genlerden yoksundur (167).

Plazmid profil analizi *A. baumannii* ve diğer *Acinetobacter* türlerinin epidemiyolojisini incelemek için de kullanılan tiplendirme yöntemlerinden biridir. Analiz sonuçları yorumlarken birçok plazmidin kolayca aktarılabileceği, kazanılabileceği veya kaybedilebileceği bilinmelidir. Yöntem kullanışlı olmasına rağmen, *Acinetobacter*'lerin epidemiyolojik tiplendirme çalışmalarında diğer moleküler yöntemlerin tercihi önerilmektedir (30).

Plazmid profil analizi çeşitli yöntemler ile yapılabilmektedir. En bilinen iki yöntemden biri Kado ve Liu'nin (168) yüksek sıcaklıklarda alkalın sodyum dodesil sülfat (SDS) (pH:12.6) kullanılarak kromozomal DNA'yı denatüre ederek plazmid DNA elde ettiği yöntemdir. Diğer bir yöntem ise Green and Sambrook'un (169) geliştirmiş olduğu SDS kullanarak alkali lizis ile plazmid DNA'sının hazırlanması olarak bilinen Miniprep yöntemidir. Bu protokole, plazmid DNA, küçük ölçekli (1-2 mL) bakteri kültürlerinden izole edilir. Miniprep DNA, birçok in vitro enzimatik reaksiyonda bir substrat veya şablon olarak kullanım için yeterince saftır. Bununla birlikte, dizileme reaksiyonlarında substrat olarak plazmid DNA kullanılıyorsa daha fazla saflaştırma gereklidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzolatların Toplanması ve Saklanması

Çalışmaya 01 Nisan 2018-30 Nisan 2019 tarihleri arasında Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı klinik birimlerden gönderilen, her hastanın sadece bir çeşit numunesinde üreyen 98 *A. baumannii* suşu dahil edildi.

Toplanan suşlar %15 gliserollü Luria Bertani (LB) broth içinde süspanse edilerek -20°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

3.2. Bakterilerin Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılık

Laboratuvara gelen klinik örnekler rutin olarak %5 koyun kanlı agar ve EMB agara ekildi ve 37°C'de, 18-24 sa inkübe edildi. Besiyerlerinde saf koloni şeklinde üreyen bakterilerin tür düzeyinde tanımlama ve antibiyotik duyarlılığı Vitek 2 Compact (Biomeriux, Fransa) otomatize sistemiyle yapıldı. Tür düzeyinde tanımlama GN kartı, antibiyotik duyarlılığı AST-N325 ve AST-N326 kartları ile üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. %5 koyun kanlı agarda üreyen izolatlardan 0,5-0,6 McFarland standart bulanıklığında tüplerde bakteri süspansiyonu hazırlandı, pipetlemesi yapıldıktan sonra kartlar ve süspansiyonlar cihaza yerleştirildi. Süspansiyonların kartlara inoküle edilmesi, okuma, değerlendirme ve raporlama cihaz tarafından otomatik olarak yapıldı. Duyarlılık testleri sonuçları The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standartlarına göre duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak kategorize edildi (170).

Kolistin duyarlılığı otomatize sistemin yanısıra referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle test edildi (170,171).

3.3. Fenotipi Belirleyen Yöntemler

3.3.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Çalışma gününe kadar -20°C 'de saklanan izolatlar oda sıcaklığında çözöldü ve LB agarda pasajlandı. Ekimi yapılan besiyerleri 37°C 'de 24 sa inkübe edildi. SMD yöntemi EUCAST önerileri doğrultusunda ISO standart 20776-1'e göre aşağıda belirtilen aşamalar tasarlandı (172).

SMD Yöntemi

Besiyeri Hazırlanması

Toz halinde bulunan katyon ayarlı Mueller Hinton besiyerinden (KAMHB) (BD, ABD) 17,6 g tartılarak 800 mL distile su bulunan erlen içinde süspanse edildi ve ardından otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Antibiyotik Hazırlanması

1. Çalışmada potensi 15.000 U/mg olan kolistin sülfat kullanıldı.
2. Kolistin sülfat (Carbosynth) 100 mg tartılarak $w=V \times C/P$ formölüne göre 2.560 $\mu\text{g/mL}$ stok hazırlandı. (V: Çözücü hacmi, w: Antibiyotik kütlesi, P:Potens, C: Antibiyotik konsantrasyonu)
3. 100 mg kolistin sülfat 39 ml suda çözölerek 2.560 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda stok elde edildi ve 1 mL'lik vida kapaklı tüplere alikotlar halinde dağıtıldı, sonraki kullanımlar için -20°C 'de saklandı.
4. Çalışma gününde son konsantrasyon 256 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde, bu alikotlardan bir tanesi oda sıcaklığında çözölerek steril bir tüpte 1/10 oranında dilüe edildi.

Bakteri İnokulum Hazırlanışı

1. 0,5 McFarland yoğunlukta bakteri süspansiyonu serum fizyolojik kullanılarak hazırlandı.
2. Ardından bakteri süspansiyonu serum fizyolojik (SF) içinde 1/20 oranında dilüe edildi.

Mikroplak Uygulaması

1. Hazırlanan KAMHB besiyerinden tüm kuyucuklara 100 µl dağıtıldı.
2. Hazırlanan 256 µg/mL yoğunluğundaki kolistin süspansiyonundan 100 µl alınıp, çalışılan satırdaki 2. kuyucuğa konuldu ve kuyucuktaki son antibiyotik konsantrasyonu 128 µg/mL oldu (Birinci sütun üreme kontrol kuyucuğu).
3. İkinci kuyucuktan 100 µl alınıp, 11. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapıldı. 11. kuyucuktaki konsantrasyon 0,25 µg/mL oldu (On ikinci sütun besiyeri sterilit kontrol kuyucuğu).
4. En son pipete çekilen 100 µl sıvı dışarı atıldı.
5. Bakteri inokulumundan 10 µl alınarak çalışılacak sıradaki 12. kuyucuk hariç tüm kuyucuklara dağıtıldı. Böylece son bakteri inokulumu EUCAST önerilerine uygun olarak yaklaşık 5×10^5 CFU/mL olarak elde edildi.
6. Mikroplak kapağı kapatıldı ve $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 18-20 sa inkubasyona bırakıldı.

Kalite Kontrol

EUCAST *Acinetobacter* spp. mikrodilüsyon deneyinde negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, pozitif kontrol olarak ise *E. coli* NCTC 13846 (mcr-1 pozitif) kullanılmasını önermektedir (170). Her çalışmada *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* NCTC 13846 standart suşları kullanıldı.

MİK Değerlerinin Belirlenmesi

İnkubasyon sonrası yapılan değerlendirmede, kuyucuklarda bulanıklık olup olmadığına bakıldı. Bulanıklık görülmeyen ilk kuyucuk o izolatın MİK değeri olarak kabul edildi. Plakları değerlendirme sırasında, besiyeri sterilit kontrol kuyucuğunda bakteri ürememesi, üreme kontrol kuyucuğunda üremenin görülmesi ve kalite kontrol izolatlarının MİK değerlerinin beklenen sınır değerlerde olması halinde testler geçerli kabul edilerek değerlendirildi. Üreme kontrol kuyucuğunda üreme gözlenmeyen plaklar ile besiyeri sterilit kontrol kuyucuğunda üreme saptanan plaklarda test tekrarına gidildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Duyarlılık kategorileri belirlenirken EUCAST sınır değerler tablosu versiyon v9.0 baz alındı (duyarlı ≤ 2 , dirençli > 2 $\mu\text{g/mL}$) (170). Uyum ve hata oranları hesaplanırken ISO tarafından önerilen 20776-2 nolu standart referans alındı. ISO standartları baz alınarak, SMD yönteminde duyarlı saptanan izolatların Vitek 2 otomatize sistemde dirençli saptanması büyük hata (BH), SMD yönteminde dirençli saptanan izolatın Vitek 2 otomatize sistemde duyarlı saptanması ise çok büyük hata (ÇBH) olarak değerlendirildi (172,173).

3.3.2. MBL Kombinasyon Disk Difüzyon Testi (KDDT)

Acinetobacter izolatlarının taze kültürlerinden 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı, steril eküvyon ile MHA'a yayıldı. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben aralarında 22 mm olacak şekilde iki imipenem diski (10 μg) besiyeri yüzeyine yerleştirildi. İmipenem disklerinden bir tanesinin üzerine 10 μl EDTA (0,5 M, pH: 8) eklendi. Plaklar 35°C'de 18 sa inkübe edildikten sonra değerlendirildi. EDTA solüsyonunun eklendiği imipenem/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm ise test pozitif kabul edildi (174).

3.3.3. Hareket Testi

İzolatların hareket özelliği Eijkelkamp ve ark.'nın (89) kullandığı metod modifiye edilerek araştırıldı. Çalışmamızda hareket testinde %0,25, %0,5, %0,75, %1 agar konsantrasyonları içeren LB ve Mueller Hinton besiyerlerinde ön deneme yapıp, en iyi sonuç veren swarming için %0,25'lik, twitching için %1'lik agar konsantrasyonunda hazırlanan LB besiyeri deneyde kullanılmıştır. İzolatlar 37°C'de 24 ve 48 sa'lik inkübasyon sonunda kontrol edilmiş, twitching ve swarming hareketleri açısından 24 ve 48 sa arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir.

LB (%1,5 agar) besiyerinde üretilen bakterilerden steril öze ile birer koloni alınarak twitching hareketi için %1 oranında agar içeren LB besiyerine; swarming hareketi için %0,25 oranında agar içeren LB besiyerine batırma şeklinde ekim yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 48 sa inkübe edildi. 24. ve 48. saatlerde değerlendirme yapıldı. Twitching hareketini değerlendirmek için besiyeri ışık altında plağın ters yüzünden incelendi. Halo şeklindeki zon çapı değerlendirilerek > 10 mm olanlar pozitif kabul

edildi. Swarming hareketi için besiyeri yüzeyinden ölçüm yapıldı. Zon çapı > 20 mm olanlar pozitif olarak kabul edildi. Hareket testi tüm izolatlarda iki defa tekrarlanmıştır.

3.3.4. Biyofilm Oluşumu

LB agarda üretilen *A. baumannii* taze kültürlerinden tek koloni alınıp %0,25'lik Glikozlu Brain-Heart Sıvı Besiyerine (G-BHIB) ekildi ve 37°C'de 24 sa inkübe edildi. Üremiş besiyeri 1/20 oranda G-BHIB ile sulandırıldı. Elde edilen süspansiyondan 96 kuyucuklu polistren plaklara her suş için yan yana üç kuyucuk olmak üzere 200 µl dağıtıldı. Mikroplaklar çalkalayıcı su banyosunda 37°C'de 48 sa inkübasyondan sonra çok kanallı pipet kullanılarak kuyucuklar Fosfat Buffer Salin (PBS) X1 ile yıkandı, oda sıcaklığında kurutuldu. %1'lik kristal viyole ile 15 dakika boyandı. Plaklar çok kanallı pipet yardımıyla PBS ile yıkandı, oda sıcaklığında 20 dk kurutuldu. Her kuyucuğa 200 µl etanol/aseton solüsyonu (80/20) uygulandı. Spektrofotometre cihazında 590 nm dalga boyutunda, optik yoğunluğu (OD) tespit edildi. Boş kuyucuk ölçümü ortalama sonuç değerinden çıkarıldı.

OD ölçümüne göre, biyofilm oluşumu aşağıdaki gibi değerlendirildi: OD < 1 negatif, 1 < OD < 2 düşük pozitif (+), 2 < OD < 3 orta pozitif (++) ve 3 < OD yüksek pozitif (+++) olarak değerlendirildi. Kalite kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı (175).

3.3.5. Elektron Mikroskobu (SEM) ile Biyofilm Görüntülemesi

1. Spektrofotometre OD sonucuna göre yüksek, orta, düşük ve negatif biyofilm oluşturan örnek gruplarından 5'er adet izolat seçildi.
2. Seçilen izolatlar ve pozitif kontrol *S. aureus* ATCC 25923 suşu önce LB sıvı besiyerine ekildi, 37°C'de 24 sa inkübasyondan sonra tek koloni şeklinde LB agara ekildi, ardından 37°C'de tekrar 24 sa inkübe edildi.
3. Üreme sonrası izolatlardan tek koloni öze ile alınıp G-BHİB besiyerine ekildi, 37°C'de 24 sa inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün üremiş besiyerleri 1/20 oranda steril G-BHİB besiyeri ile sulandırıldı.

4. Test edilecek izolatları, pozitif kontrol ve negatif kontrol için biyofilm yüzey örneklerinden (plastik tüp, seramik yüzey, vasküler kateter ve foley kateter) birer adet 50 ml'lik steril falkon tüplere konuldu.
5. Falkon tüplere alınan steril biyofilm yüzey örneklerinin üzeri geçene kadar tüplere G-BHİB besiyeri döküldü ve içine dilüe edilen bakteri süspansiyonlarından 10 µl eklendi.
6. Yapılan ekimler 37°C'de 48 sa çalkalayıcı su banyosunda inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra, falkon tüp içindeki biyofilm yüzey örnekleri temiz falkon tüplere alındı ve 3 kere PBS ile yıkandı, oda sıcaklığında 20 dk kurutuldu.
8. Kuruma sonrası biyofilm yüzeyleri fiksasyon işlemi için %2,5'lik glutaraldehid solüsyonu içinde 24 sa bekletildi.
9. Ertesi gün biyofilm yüzey örnekleri 0,1 M sodyum asetat solüsyonu içinde 15 dk bekletildi. İşlem üç kere tekrarlandı.
10. Yüzeyler hazırlanan %25, %33, %50, %75, %90 ve %100 etanol konsantrasyonunda sırasıyla 15 dk bekletildi.
11. Etonol sonrası biofim yüzey örnekleri oda sıcaklığında kurutuldu, plastik tüp ve kateter yüzeyleri altın ile kaplandı, 24 sa 37°C'de etüvde bekletildi (176).

Elektron Mikroskopu ile Biyofilm Değerlendirmesi

Elektron mikroskopu ile her örnekte yaklaşık 30 alan tarandı. Her alandaki bakteri adezyonu ve agregasyonu değerlendirildi. 10.000 x büyütmede alandaki bakteri sayısı alanın %80'i ise yüksek OD ile uyumlu, %50 ile %80 arasında ise orta OD ile uyumlu, %10 ile %50 arasında ise düşük OD ile uyumlu, %10'dan az ise negatif OD ile uyumlu olarak değerlendirildi.

3.4. Genotipi Belirleyen Yöntemler

3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada EURx Gene MATRIX Tissue & Bacterial DNA Purification Kiti kullanıldı.

DNA bağlayan spin-kolumn aktivasyonu

1,30 µl Buffer T DNA bağlayan spin-kolumnun tam ortasına membranın tamamını ıslatacak konuldu ve lizatın spin-kolumna tranferine kadar oda sıcaklığında bekletildi (iyi sonuç için en az 10 dk).

- Membran aktivasyonu izolasyon prosedürüne başlamadan önce yapıldı.

Bakteriler için örnek hazırlığı

1. 1,5 ml'lik ependorf tüp içine:
 - 24 sa etüvde inkübe edilen bakteri sıvı besiyerinden 1,5 ml tüp içine alındı. 11.000 x g'de 4 dk santrifüj edildi. Süpernatantın tamamı çıkarıldı. Tekrar 1,5 ml örnek alınarak aynı devirde santrifüj edildi. Elde edilen bakteri pelleti üzerine 300 µl Lizis solüsyonu eklendi ve pipetajla süspanse edildi.
2. 50 µl buffer solüsyonu ve 2 µl RNaz A eklendi, 3 sn vortekslendi.
3. 37°C'de 15 dk inkübe edildi.
4. 20 µl Proteinaz K eklendi ve 3 sn vortekslendi.
5. 70°C'de 30 dk inkübe edildi (10 dakikada bir vorteks yapıldı).
6. 350 µl buffer Solüsyon T eklendi ve iyice homojenize olması için güçlü bir şekilde çalkalandı.
7. 70°C'de 5 dk inkübe edildi.
8. Örnekler 15 sn vortekslendi.
9. DNA izolasyon protokolüne geçildi.

DNA izolasyonu

1. 11.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

2. 700 µl süpernatant DNA bağlayan spin-kolumn tüpüne aktarıldı.
3. DNA bağlayan spin-column tüpü 11.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
4. Spin-kolumn çıkarıldı.
5. 500 µl yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 11.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
6. DNA bağlayan spin-column çıkarıldı, tüpteki sıvı atıldı ve spin-kolomn tekrar tüpe konuldu.
7. 500 µl yıkama solüsyonu 2 eklendi ve 11.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
8. DNA bağlayan spin-column çıkarıldı, tüpteki sıvı atıldı ve spin-kolomn tekrar tüpe konuldu. Yıkama solüsyonu 2'nin iyice atılması için tekrardan 11.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
9. DNA bağlayan spin-column 1,5 ml'lik yeni tüpe konuldu ve 120 µl Elution buffer bağlı DNA'yı çözmek için eklendi.
 - DNA'yı membrandan en verimli şekilde ayırmak için, Elution buffer 80°C sıcaklıkta ısıtıldı.
10. DNA bağlayan spin-column tüpü 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. 11.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
12. Spin-column atıldı, tüpün kapağı kapatıldı. DNA'lar çalışma gününe kadar -20°C'de stoklandı.

3.4.2. OXA Karbapenemazların Multiplex PCR Yöntemiyle Araştırılması

Çalışmamızda iki farklı yayın referans alınarak blaOXA-23, blaOXA-24/40, blaOXA-51, blaOXA-58 gen bölgelerinin PCR ile çalışılması planlanmıştır (177,178). Hedeflenen gen bölgelerinin DNA dizilimleri gen bankası verileri yardımı ile tarama yapılarak bulunmuştur. Amplifikasyonları için dört farklı primer çifti kullanılmıştır. Kullanılan primer çiftleri ve moleküler büyüklükleri Tablo 3'te sunulmuştur. Liyofilize halde bulunan primerlerin (Makrogen) sulandırma işlemi üretici firma talimatları doğrultusunda stok primerden 1/10 oranında son hacim 100 µl olacak şekilde sulandırılmış, ependorflara ayrılıp -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3. OXA Multiplex PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Primer Çiftleri

Primer	Dizi (5' → 3')	Baz Çifti (bp)
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-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	

Multiplex PCR'de blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51, blaOXA-58 gen bölgelerinin amplifikasyonu için hazırlanan reaksiyon karışımı (master mix) Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4. OXA Multiplex 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)	0,3 µl
OXA-51-F	1 µl
OXA-51-R	1 µl
OXA-58-F	1 µl
OXA-58-R	1 µl
OXA-23-F	1 µl
OXA-23-R	1 µl
OXA-24-F	1 µl
OXA-24-R	1 µl
Kalıp DNA	1 µl
dH ₂ O	34,7 µl
Toplam	50 µl

Hazırlanan master mix 0,2 ml'lik PCR tüpünde Eppendorf Mastercycler® Nexus PCR Termal Cyler cihazına yüklendi ve blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51, blaOXA-58 bölgelerinin çoğaltılması için sırasıyla Tablo 5'teki programlar kullanıldı.

Tablo 5. OXA Gen Bölgeleri İçin PCR Programı.

94°C’de 5 dakika (ön denatürasyon)	1 Döngü
94°C’de 25 saniye (hedef DNA denatürasyonu)	30 Döngü
52°C’de 40 saniye (primer bağlanması)	
7 °C’de 50 saniye (primer uzaması)	
72°C’de 6 dakika (son uzama)	1 Döngü

Çoğaltılmış multipleks PCR ürünleri aşağıdaki uygulama sırasına göre jel elektroforeze yüklenip, UV transliminatör altında görüntülendi.

1. %2,2’lik jel hazırlamak için 2,2 gr agaroz 100 ml 1X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içerisinde çözüldü ve mikrodalga fırında ısıtılarak (4-6 dk) agaroz tamamen eritildi.
2. Jel ısısı düşürülüp katılaşma gerçekleşmeden içerisine 7 µl etidyum bromür eklendi.
3. Jel kalıbına agaroz jel sabit bir noktadan yavaşça döküldü ve soğumaya bırakıldı.
4. Katılaşan jel elektroforez tankına (BioRAD) yerleştirildikten sonra taraklar çıkarıldı 3 µl Loading buffer ile 10 µl PCR ürünleri karıştırılarak jel kuyucuklara yüklendi.
5. Her deneyde jele yüklenen örneklerin başına 10 µl olacak Marker (Hibrigen) yerleştirildi.
6. 117 V elektrik akımı altında 30 dk boyunca jelde yürütüldü, moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı.
7. PCR ürünü DNA’lar Major Science® UV transliminatör görüntüleme cihazı ile incelendi.
8. DNA bantları boyutları “Hibrigen 100 bp DNA Ladder Plus” belirteçleri ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.4.3. ISAb1/OXA-23 ve ISAb1/OXA-51 Gen Bölgelerinin Araştırılması

Çalışmamızda Bahador ve ark. (178) yaptığı çalışma referans alınarak izolatların ISAb1/OXA-23 ve ISAb1/OXA-51 gen bölgeleri araştırılmıştır. Amplifikasyonları için 2 primer çifti PCR testinde kullanılmıştır. Kullanılan primer çiftleri ve moleküler büyüklükleri Tablo 6’da sunulmuştur.

Tablo 6. ISAb1 PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Primer Çiftleri

Primer	Dizi (5'→ 3')	Baz Çifti (bp)
ISAb1F	5'-TGAGATGTGTCATAGTATTC-3'	321
OXA-23 R	5'-AGAGCATTACCATATAGATT-3'	
ISAb1F	5'-AAGCATGATGAGCGCAAAG-3'	227
OXA-51 R	5'-GGTGAGCAGGCTGAAATAAAA-3'	

PCR'de hedef gen bölgelerinin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı Tablo 7'de sunulmuştur.

Tablo 7. ISAb1/OXA-23 ve ISAb1/OXA-51 Gen Bölgesi İçin Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon içeriği	Volüm
10X PCR buffer + MgCL2	5 µl
10 mM dNTP karışımı	0,2 µl
Taq DNA polymerase (6U)	0,3 µl
ISAb1F	0,2 µl
OXA-23 R / OXA-51 R	0,2 µl
Kalıp DNA	1,5 µl
dH2O	42,6 µl
Toplam	50 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı 0,2 ml'lik PCR tüpünde PCR cihazına yüklendi ve hedef gen bölgeleri çoğaltılması için sırasıyla Tablo 8'deki PCR programı kullanıldı.

Tablo 8. ISAb1/OXA-23 ve ISAb1/OXA-51 Gen Bölgesi İçin PCR Programı

94°C'de 2 dakika	1 Döngü
94 °C'de 45 saniye	40 Döngü
51 °C'de 45 saniye	
72 °C'de 1 dakika	
72 °C'de 6 dakika	1 Döngü

PCR ürünü DNA'lar %2,2'lik agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 3 µl Loading buffer karıştırılarak yüklendi. 1 sa boyunca 117 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına ayrıştırıldı. DNA bantları “Hibriden 100 bp DNA Ladder Plus” belirteçleri ile karşılaştırılarak UV transliminatör cihazında incelendi.

3.4.4. REP- PCR Yöntemi ile İzolatların Tiplendirilmesi

Çalışmamızda Reboli ve ark. (179) yaptığı çalışma referans alınarak izolatların genotip ve subtiplerinin belirlenmesi planlanmıştır. Amplifikasyonları için 2 primer çifti PCR testinde kullanılmıştır. Kullanılan primer çiftleri ve moleküler büyüklükleri Tablo 9'da sunulmuştur.

Tablo 9. REP-PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Primerler

Primer	Dizi (5' → 3')
REP1R-I	5'- IIIICGICGICATCIGGC-3'
REP2-I	5'- ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

PCR'de hedef gen bölgelerinin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı Tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10. REP-PCR İçin Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon içeriği	Volüm
10X PCR buffer + MgCL2	5 µl
10 mM dNTP karışımı	2 µl
Taq DNA polymerase (6U)	1,25 µl
REP1R-I	2 µl
REP2-I	2 µl
Kalıp DNA	3 µl
dH2O	34,75 µl
Toplam	50 µl

Hazırlanan master mix 0,2 ml'lik PCR tüpünde PCR cihazına yüklendi ve hedef gen bölgeleri amplifikasyonu için sırasıyla Tablo 11'deki PCR programı kullanıldı.

Tablo 11. REP-PCR Amplifikasyon Programı

95°C’de 6 dakika	1 Döngü
90 °C’de 30 saniye	30 Döngü
40 °C’de 1 dakika	
65 °C’de 8 dakika	
65 °C’de 16 dakika	1 Döngü

PCR ürünü DNA’lar %1’lik agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 5 µl Loading buffer karıştırılarak yüklendi. 2 sa 40 dakika 100 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına ayrıştırıldı. DNA bantları “Hibrigen 100 bp DNA Ladder Plus” ve “Hibrigen 10.000 bp DNA Ladder Plus” belirteçleri ile karşılaştırılarak UV transliminatör cihazında incelendi.

Genotip ve Subtiplerin Belirlenmesi

UV transliminatör cihazı ile yapılan değerlendirme Zeighami ve ark.’nın (180) yaptığı çalışma referans alınarak yapılmıştır. İzolatların DNA bant sayıları ve bantların büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak genotip ve subtipleri tespit edildi.

3.4.5. Uluslararası Klonların (IC) Multiplex PCR Yöntemiyle Araştırılması

Çalışmamızda Turton ve ark.’nın (11) yaptığı çalışma referans alınarak izolatların IC’nin bulunması planlanmıştır. Amplifikasyonları için üç çift primer çifti iki ayrı multiplex PCR testinde kullanılmıştır. Kullanılan primer çiftleri ve moleküler büyüklükleri Tablo 12 ve Tablo 13’te gösterilmektedir.

Tablo 12. IC İdentifikasyonunda Kullanılan Grup 1 Multiplex PCR Primerleri

Primer	Dizi (5'→ 3')	Baz Çifti (bp)
Group1ompAF306	5'- GATGGCGTAAATCGTGGTA-3'	355
Group1and2ompAR660	5'- CAACTTTAGCGATTTCTGG-3'	
Group1csuEF	5'- CTTTAGCAAACATGACCTACC-3'	702
Group1csuER	5'-TACACCCGGGTTAATCGT-3'	
Gp1OXA66F89	5'-GCGCTTCAAAATCTGATGTA-3'	559
Gp1OXA66R647	5'-GCGTATATTTTGTTTCCATTTC-3'	

Tablo 13. IC İdentifikasyonunda Kullanılan Grup 2 Multiplex PCR Primerleri

Primer	Dizi (5'→ 3')	Baz Çifti (bp)
Group2ompAF378	5'-GACCTTTCTTATCACAACGA-3'	343
Group1and2ompAR660	5'-CAACTTTAGCGATTTCTGG -3'	
Group2csuEF	5'- GGCGAACATGACCTATTT-3'	580
Group2csuER	5'-CTTCATGGCTCGTTGGTT -3'	
Gp2OXA69F169	5'-CATCAAGGTCAAACCTCAA-3'	162
Gp2OXA69R330	5'-TAGCCTTTTTTCCCCATC -3'	

Multiplex PCR'de blaOXA-51-like, OmpA ve Csue gen bölgelerinin amplifikasyonu için hazırlanan Grup 1 Multiplex PCR reaksiyon karışımı Tablo 14'te, Grup 2 Multiplex PCR reaksiyon karışımı Tablo 15'te sunulmuştur.

Tablo 14. IC Grup 1 Multiplex PCR Reaksiyonu İçin Master Mix Karışımı.

Reaksiyon içeriği	Volüm
10X PCR buffer + MgCL2	5 µl
10 mM dNTP karışımı	1 µl
Taq DNA polymerase (6U)	0,3 µl
Group1ompAF306	1 µl
Group1and2ompAR660	1 µl
Group1csuEF	1 µl
Group1csuER	1 µl
Gp1OXA66F89	1 µl
Gp1OXA66R647	1 µl
Kalıp DNA	1 µl
dH2O	36,7 µl
Toplam	50 µl

Tablo 15. IC Grup 2 Multiplex PCR Reaksiyonu İçin Master Mix Karışımı.

Reaksiyon içeriği	Volüm
10X PCR buffer + MgCL2	5 µl
10 mM dNTP karışımı	1 µl
Taq DNA polymerase (6U)	0,3 µl
Group2ompAF378	1 µl
Group1and2ompAR660	1 µl
Group2csuEF	1 µl
Group2csuER	1 µl
Gp2OXA69F169	1 µl
Gp2OXA69R330	1 µl
Kalıp DNA	1 µl
dH2O	36,7 µl
Toplam	50 µl

Hazırlanan master mixler 0,2 ml’lik PCR tüpünde PCR cihazına yüklendi ve hedef gen bölgeleri çoğaltılması için sırasıyla Tablo 16’daki programlar kullanıldı.

Tablo 16. IC için PCR Programı

94°C’de 2 dakika	1 Döngü
94 °C’de 45 saniye	40 Döngü
57 °C’de 45 saniye	
72 °C’de 1 dakika	
72 °C’de 6 dakika	1 Döngü

PCR ürünü DNA’lar %2,2’lik agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 3 µl Loading buffer karıştırılarak yüklendi. 45 dk boyunca 117 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına ayrıştırıldı. DNA bantları “Hibrigen 100 bp DNA Ladder Plus” belirteçleri ile karşılaştırılarak UV transliminatör cihazında incelendi.

Klonalitenin Belirlenmesi

Her örneğin Grup 1 Multiplex ve Grup 2 Multiplex PCR analizi sonucunda moleküler büyüklüğü belirlenen bantlar referans yayından alınan aşağıdaki Resim 3’te gösterilen tablo üzerinden değerlendirildi ve IC grupları tespit edildi (181).

PCR-based groups of *A. baumannii* defined according to combinations of amplicons in two multiplex PCRs targeting the *ompA*, *csuE*, and *bla_{OXA-51-like}* genes.

PCR-based group (G)	Group 1 multiplex PCR			Group 2 multiplex PCR		
	<i>csuE</i> (702 bp)	<i>bla_{OXA-51-like}</i> (559 bp)	<i>ompA</i> (355 bp)	<i>csuE</i> (580 bp)	<i>ompA</i> (343 bp)	<i>bla_{OXA-51-like}</i> (162 bp)
G1 (international clone II)	+	+	+	-	-	-
G2 (international clone I)	-	-	-	+	+	+
G3 (international clone III)	+	+	-	-	+	-
G4	-	+	+	-	-	-
G5	-	-	+	-	-	-
G6	+	-	-	-	+	+
G7	-	-	+	+	-	-
G8	-	+	+	+	-	-
G9	-	-	+	+	-	+
G10	-	+	-	+	+	-
G11	-	-	-	-	+	+
G12	-	+	-	-	-	-
G13	+	-	+	-	-	-
G14	+	+	-	-	-	-

Resim 3. IC Değerlendirme Şeması

3.4.6. Plazmid DNA Ekstraksiyonu ve Elektroforezi

Çalışmamızda Sambrook ve ark. (182) alkali lizis, Minipreps plazmid DNA izolasyon metodu referans alınarak plazmid DNA ekstraksiyonu ve elektroforezi yapılmıştır.

A. *baumannii* izolatlarının plazmid analizi için üretilmesi

1. -20°C’de stokta saklanan *A. baumannii* izolatları 3 ml LB sıvı besiyeri içeren tüplere ekildi, 37°C’de 24 sa inkübe edildi.
2. Üreyen örnekler LB agar besiyerine öze kullanılarak tek koloni ekim yapıldı, ardından tekrar 37°C’de 24 sa inkübe edildi.
3. LB agarda tek düşen kolonilerden bir koloni seçilerek yeniden 5 ml LB sıvı besiyeri bulunan tüplere ekim yapıldı.
4. Tüpler 37°C’de 24 sa çalkalayıcı inkübatörde bekletildi.

Plazmid DNA Eldesi ve Elektroforezi

1. Çalkalayıcı inkübatörde 37°C’de 24 sa üremenin ardından LB sıvı besiyerinde üretilen bakteri kültüründen 1,5 ml eppendorf tüplere aktarıldı.
2. Eppendorf tüpleri 10.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası eppendorf tüpleri ters çevrilerek süpernatant döküldü.
4. Eppendorf tüpünün dip kısmında kalan çökelti(pellet) üzerine Alkali Lizis Solüsyon I’den (50 mM glikoz/ 25mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH:8,0, 1 ml solüsyona 13 µl RNAaz eklendi) 100 µl konuldu, hafifçe pipetaj yapıldı.
5. Üzerine taze hazırlanmış Alkali Lizis Solüsyon II’den (%1 SDS/ 0,2 M NaOH) 200 µl konuldu, nazikçe alt üst edildi.
6. Tüpler buza konuldu, 5 dk bekletildi.
7. Üzerine +4’te saklanan Alkali Lizis Solüsyon III’ten (5 M potasyum asetat/ Glisial asetik asit) 150 µl eklendi, nazikçe alt üst edildi.
8. Tüpler tekrar buzda 5 dk bekletildi.
9. Eppendorf tüpler 1.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
10. Süpernatantlar yeni eppendorflara alındı.

11. Üzerine elde edilen süpernatant hacminde fenol/kloroform eklendi, süt görünümü olana kadar iyice karıştırıldıktan sonra 14.000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.
12. Oluşan fazdan süpernatant yeni eppendorfa alındı.
13. Her tüpe 30 µl Na-asetat eklendi.
14. Çekilen hacmin üç katı hacimde -20°C’de %100 etanol eklendi. Presipitasyon için 24 sa -20°C’de bekletildi.
15. Ertesi gün 14.000 rpm’de 30 dk santrifüj edildi, süpernatant döküldü.
16. Üzerine 500 µl -20°C’de %75 etanol eklendi, ardından 14.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü.
17. Pellet oda sıcaklığında tamamen kurutulduktan sonra üzerine 80°C’de 30 µl elüsyon sıvısı eklendi ve pipetaj yapıldı.
18. Elde edile plazmid DNA’lardan %0,8’lik agaroz jel kuyucuklarına 30 µl loading buffer ile yüklendi ve plazmid DNA’lar 15 V elektrik akımında 1 sa, ardından 52 V elektrik akımında 6 sa boyunca yürütüldü.
19. Yürütme tamamlandıktan sonra jel, bir kapta 300 ml TAE ve 30 µl Etidium bromür ile hazırlanan solüsyon içinde 30 dk bekletildi, ardından UV transliminatör ile görüntülendi.
20. Plazmid büyüklükleri, plazmid taşıdığı bilinen *E.coli* ATCC 25922 suşunun plazmidleri ve Marker büyüklükleri ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Veriler, SPSS 20 paket programı ile değerlendirilmiştir. Tüm hastaların klinik parametrelerinin ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır. Gruplar arası farklılıkların tespitinde normal dağılım gösterenlerde iki grup için Student t-testi, ikiden fazla grup olduğunda ANOVA testi, göstermeyenlerde iki grup için Mann Whitney U, ikiden fazla grupta ise Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare testi ve Fisher kesin ki-kare testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak belirlenmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde düzenlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Genel Özellikleri

Bu çalışmaya 2018-2019 yılında Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Labotatuvarına çeşitli klinik birimlerden gelen ve her hastanın sadece bir çeşit numunesinde izole 98 *A. baumannii* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların 62'si erkek, 36'sı kadın hastalardan izole edilmiştir. Hastaların en küçüğü 5, en büyüğü 91 yaşında olup yaş ortalaması 67,25'tir.

Örneklerin izole edildiği örnek türüne göre dağılımı Tablo 17'de, kliniklere göre dağılımı Tablo 18'de gösterilmektedir.

Tablo 17. *A. baumannii* Suşlarının İzole Edildiği Örneklerin Dağılımı

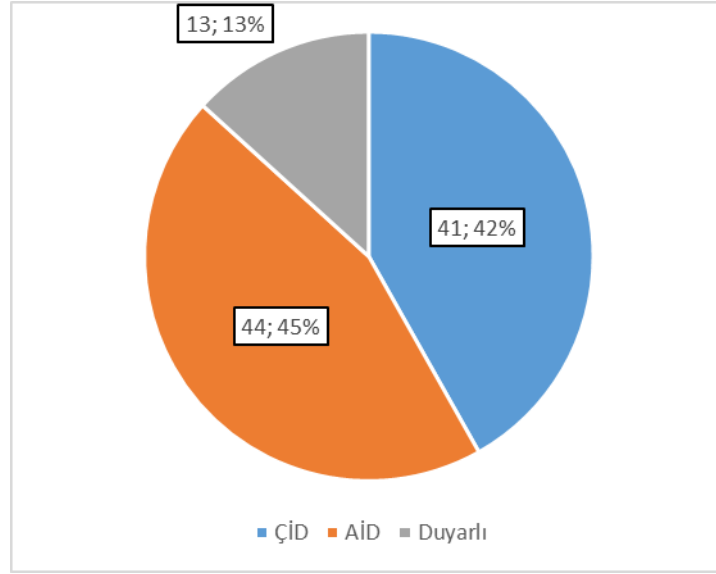
Örnek Türü	Örnek Sayısı	%
Derin trakeal aspirat (DTA)	31	32
Yara	20	21
Kan	17	17
Balgam	15	15
İdrar	9	9
Doku Biyopsi Kültürü	4	4
Plevral Sıvı Kültürü	1	1
Beyin omurilik sıvısı (BOS)	1	1
Toplam	98	100

Tablo 18. *A. baumannii* İzolatlarının Kliniklere Göre Dağılımı

Klinik	Hasta Sayısı	%
3. Basamak YBÜ	49	50
Göğüs Hastalıkları Servisi	12	12,3
Palyatif Bakım Servisi	8	8,2
2. Basamak YBÜ	7	7,2
Ortopedi Servisi	6	6,1
Genel Cerrahi Servisi	4	4,1
Diş Hastalıkları Servisi	2	2,1
Pediyatrik YBÜ	1	1
Beyin Cerrahisi Servisi	1	1
Dâhiliye Servisi	1	1
Kardiyoloji Servisi	1	1
Onkoloji Servisi	1	1
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi	1	1
Pediyatri Servisi	1	1
Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	1	1
Ortopedi Polikliniği	1	1
Evde Bakım	1	1
Toplam	98	100

4.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

Vitek 2 otomatize sistemi ile EUCAST önerileri doğrultusunda yapılan antibiyotik duyarlılık test profillerine göre tüm izolatlar üç gruba ayrılarak incelenmiştir. Birinci grup duyarlı (üç grup antibiyotikten daha azına dirençli olan) 13 adet izolattan, ikinci grup ÇİD (en az üç ve üzeri antibiyotik grubuna dirençli olan) 41 adet izolattan ve üçüncü grup AİD (iki veya daha az grup ilaca duyarlı olan) 44 adet izolattan oluşmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. *A. baumannii* Suşlarının Direnç Grubuna Göre Dağılımı ve Sıklığı

İzolatların örnek türü ve örneğin alındığı birim ve direnç gruplarına göre dağılımı Tablo 19’da gösterilmektedir.

Tablo 19. İzolatların Örnek Türü, Örneğin Alındığı Birim ve Direnç Grubuna Göre Dağılımı

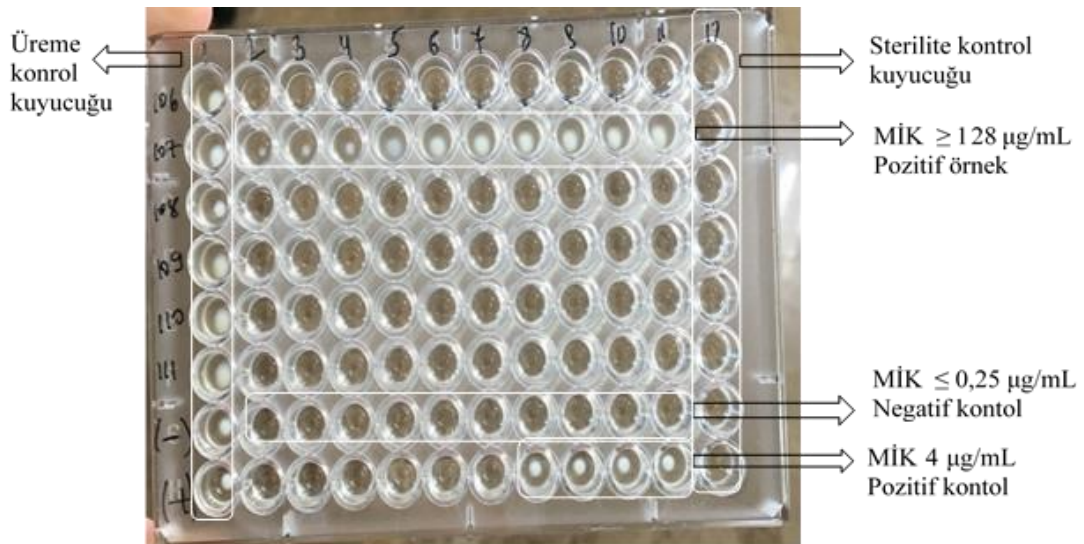
		DTA	Balgam	Yara	DBK	Kan	İdrar	PSK	BOS	(n)
ÇiD	YBÜ	13	2	2	-	7	1	-	-	25
	Servisler	1	3	4	3	1	2	1	-	15
	Poliklinikler	-	-	-	-	-	1	-	-	1
AiD	YBÜ	15	-	2		6	2	-	1	26
	Servisler	-	7	9	1	-	-	-	-	17
	Poliklinikler	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Duyarlı	YBÜ	2	2	-	-	2	-	-	-	6
	Servisler	-	1	1	-	1	3	-	-	6
	Poliklinikler	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Toplam(n)		31	15	20	4	17	9	1	1	98

Çalışmaya alınan 98 izolatın 85 (%87)’inde seftazidim, imipenem, meropenem ve siprofloksasin direnci birlikte saptanmıştır. İzolatların Seftazidim (CAZ) direnci %87, İmipenem-Meropenem (IPM-MEM) direnci %87, gentamisin (CN) direnci %74, Amikasin (AK) direnci %60, Trimetoprim/Sulfametoksazol (SXT) direnci %60,

Siprofloksasin (CIP) direnci %87, Tigesiklin direnci (TGC) %2, Kolistin (CT) direnci %8 olarak bulunmuştur. İzolatların antibiyotik direnç oranları tabloda sunulmuştur (Tablo 20). Kolistin MİK'ini saptamak için EUCAST önerileri doğrultusunda izolatlara ayrıca SMD yöntemi de uygulanmıştır (Resim 4).

Tablo 20. *A. baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Antimikrobiyal Grup	Antimikrobiyal Ajan	S % (n)	I % (n)
Sefalosporinler	CAZ	13 (13)	0
Aminoglikozidler	CN	26 (26)	0
	AK	40 (39)	
Karbapenemler	IPM	13 (13)	0
	MEM	13 (13)	
Folat yolu inhibitörleri	SXT	40 (39)	0
Kinolonlar	CIP	12 (12)	1 (1)
Glisilsiklin	TGC	78 (76)	20 (20)
Polimiksin	CT	92 (90)	-



Resim 4. SMD Yöntemi ile Kolistin MİK Ölçümü

Yukarıdan aşağı; 106, 107, 108, 109, 110, 111 nolu örnekler, *E. coli* ATCC 25922 negatif kontrol, *E. coli* NCTC 13846 pozitif kontrol. Soldan sağa; üreme kontrol kuyucuğu, 128-64-32-16-8-4-2-1-0,5-0,25 µg/mL MİK dilüsyonları, sterilite kontrol kuyucuğu.

İzolatların 8 (%10)'i SMD ile kolistine dirençli saptanmış, bu izolatların 6'sı Vitek 2 sistemi ile duyarlı bulunmuştur. Dirençli izolatların duyarlı bulunmasını ÇBH, duyarlı izolatların dirençli bulunmasını ise BH olarak tanımladığımızda; *A. baumannii* izolatlarında ÇBH oranı %75 olarak saptandı, BH ise gözlenmedi (Tablo 21).

Tablo 21. İzolatların SMD Yöntemi ve Vitek 2 Otomatize Sitemi ile Kolistin MİK Ölçüm Sonuçlarının Dağılımı.

		SMD MİK (µg/mL)										Toplam (n)
		< =0,25 n	0,5 n	1 n	2 n	4 n	8 n	16 n	32 n	64 n	> =128 n	
Vitek 2 MİK (µg/mL)	< =0,5	64	15	8	3	1	1	1		1	2	96
	1											
	2											
	4											
	8											
	> =16								1		1	2
Toplam (n)		64	15	8	3	1	1	1	1	1	3	98

Vitek 2 için kırmızı alan çok büyük hatayı, turuncu alan ise büyük hatayı göstermektedir.

Referans yöntem olan SMD ile karşılaştırıldığında Vitek 2 otomatize sisteminin duyarlı izolatları saptama yüzdesi %100 iken dirençli izolatları saptama oranı %25 olarak belirlendi (Tablo 22). Dirençli izolatları saptama konusunda testin pozitif prediktif değeri %25 ($2/8 \times 100$), negatif prediktif değeri ise %100 ($90/90 \times 100$) olarak saptandı.

Tablo 22. SMD Yöntemi Referans Alınarak Vitek 2 Otomatize Sistemin Geçerlilik ve Güvenilirliğinin Test Edilmesi

SMD \ Vitek 2	Duyarlı	Dirençli	Toplam(n)
Duyarlı	90	6	96
Dirençli	0	2	2
Toplam (n)	90	8	98

4.3. İzolatların Koloni Tipi ve Hemoliz Türü Sonuçları

Üreme sonrası değerlendirmeye alınan 98 izolatın 2 tanesinin M koloni, 96 tanesinin ise S koloni oluşturduğu gözlenmiştir. M tipi koloni oluşturan izolatları biri ÇİD olup, 3. Basamak YBÜ’de DTA örneğinden, diğer izolat ise AİD olup göğüs hastalıkları servisinde balgam örneğinden izole edilmiştir.

S tipi koloni oluşturan 96 izolatın, 40 tanesi ÇİD, 43 tanesi AİD, 13 tanesi de duyarlı grupta saptanmıştır. Koloni tipinin direnç grubu dağılımı değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($P= 1,000$). Koloni tipinin direnç grubuna göre dağılımı ve ilişkisi tabloda gösterilmiştir (Tablo 23).

Tablo 23. İzolatların Koloni Tipi ve Direnç Grupları ile İlişkisi

	ÇİD n(%)	AİD n(%)	Duyarlı n(%)	Toplam n(%)
S koloni	40 (42)	43 (45)	13 (13)	96 (98)
M koloni	1 (50)	1 (50)	0 (0)	2 (2)
$P= 1,000$				

Koyun kanlı agarda hemoliz aktivitesi yönünden değerlendirilen izolatların 63’ünde α -hemoliz, 2’sinde β -hemoliz, 33’ünde ise γ -hemoliz saptanmıştır. Gruplar arasında fark saptanmış olup, AİD grubunda hemoliz oranı anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($P < 0,001$). Hemoliz türünün direnç grubuna göre dağılım oranları Tablo 24’te sunulmuştur.

Tablo 24. İzolatların Hemoliz Türü ve Direnç Grupları ile İlişkisi

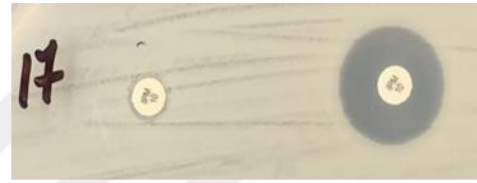
	ÇİD n(%)	AİD n(%)	Duyarlı n(%)	Toplam n(%)
Alfa Hemoliz	24 (38)	39 (62)	0 (0)	63 (64)
Beta Hemoliz	0 (0)	0 (0)	2 (100)	2 (2)
Gama Hemoliz	17 (52)	5 (15)	11 (33)	33 (34)
$P < 0,001$				

4.4. MBL Kombinasyon Disk Difüzyon Testi (KDDT) Sonuçları

MBL enzimi araştırılması deneyinde izolatların 71 (%72) tanesinde MBL enzimi pozitif, 27 (%28) tanesinde ise negatif saptanmıştır. MBL üreten izolatların hepsinde karbapenem direnci bulunmuştur. Karbapenem dirençli izolatların (ÇİD ve AİD grupları) 71 (%83,5)'inde MBL pozitif bulunup, karbapenem dirençli izolatlarda MBL pozitifliği anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($P < 0,001$). MBL negatif izolata ait sonuç ve MBL pozitif izolata ait sonuç Resim 5'te gösterilmektedir. MBL test sonuçlarının direnç grubuna göre dağılım oranları Tablo 25'te sunulmuştur.



Resim 5. MBL Negatif İzolat,



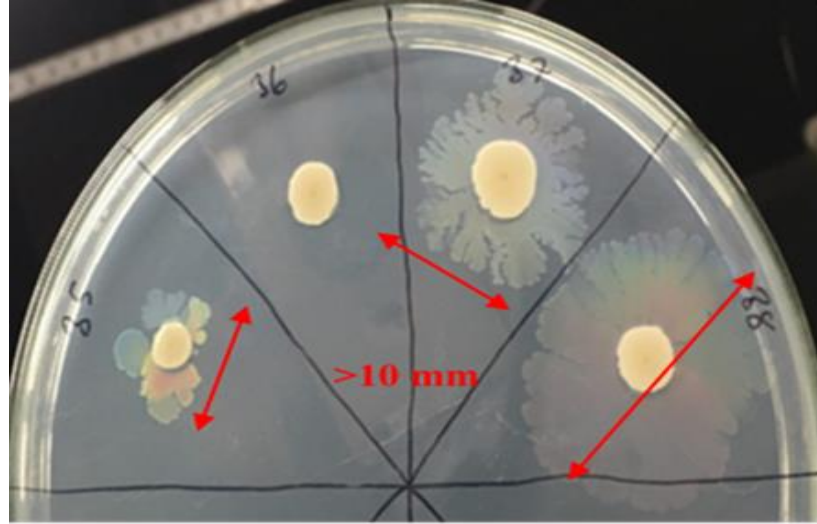
MBL Pozitif İzolat

Tablo 25. İzolatların MBL Enzim Üretimi ve Direnç Grupları ile İlişkisi

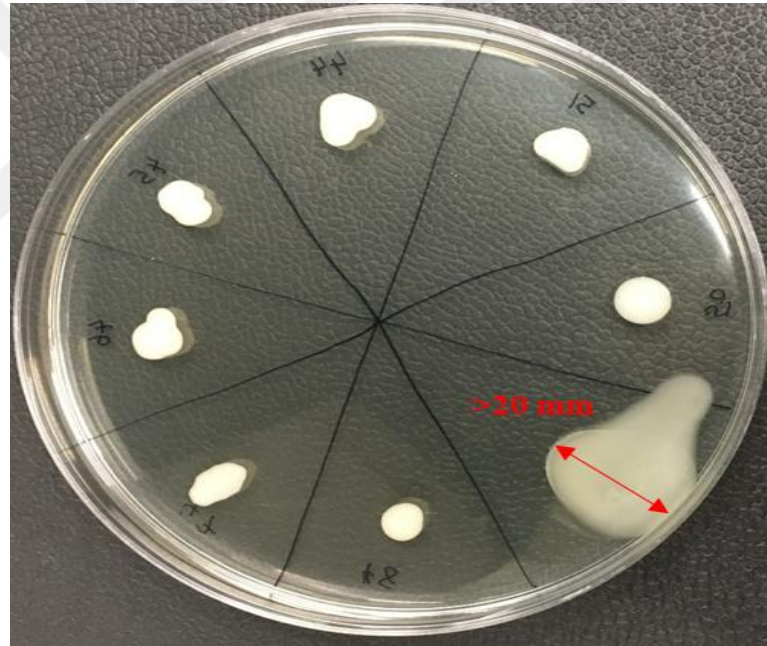
		ÇİD		AİD		Duyarlı		P
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
MBL	Pozitif	37	90	34	77	0	0	< 0,001
	Negatif	4	10	10	23	13	100	

4.5. Hareket Testi Sonuçları

Twitching hareket yeteneği test edilen direnç gruplarından AİD grubunda diğer gruplara oranla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P = 0,019$). Twitching hareket test sonucuna ait görsel Resim 6'da gösterilmiştir.



Resim 6. Twitching Hareket Yeteneği Görüntüsü
35, 37, 38 nolu örnekler pozitif, 36 nolu örnek negatif



Resim 7. Swarming Hareket Yeteneği Görüntüsü
44, 45, 46, 47, 48, 50 nolu örnekler negatif, 49 nolu örnek pozitif

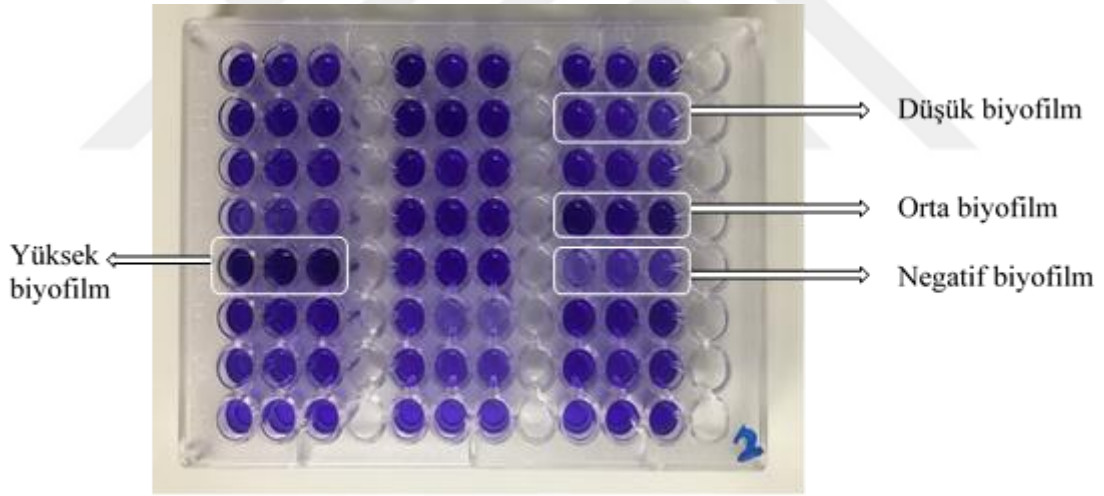
Swarming hareketinin ise sadece 2 suşta pozitif olduğu tespit edilmiştir (Resim 7). Swarming hareket yeteneği ile direnç grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P= 1,000$). İzolatların twitching ve swarming hareketi ve direnç grubu ile ilişkisi Tablo 26'da sunulmuştur.

Tablo 26. İzolatların Hareket Yeteneği ve Direnç Grupları ile İlişkisi

		ÇİD		AİD		Duyarlı		P
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Twitching	Pozitif	15	37	5	11	3	23	0,019
	Negatif	26	67	39	89	10	77	
Swarming	Pozitif	1	2	1	2	0	0	1,000
	Negatif	40	98	43	98	13	100	

4.6. Biyofilm Seviyesi Ölçüm Sonuçları

Biyofilm kapasitesi test edilen izolatların %20 (20/98)'sinin yüksek, %33 (32/98)'ünün orta, %35 (34/98)'inin düşük biyofilm oluşturduğu ve %12 (12/98)'sinin biyofilm oluşturmadığı saptandı (Resim 8).

**Resim 8.** İzolatların Spektrofotometre ile Biyofilm Ölçüm Analizi

Biyofilm oluşturma seviyesi ile örneklerin toplandığı birimler kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,344$) (Tablo 27).

Tablo 27. İzolatların Örnek Alınan Birim ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi

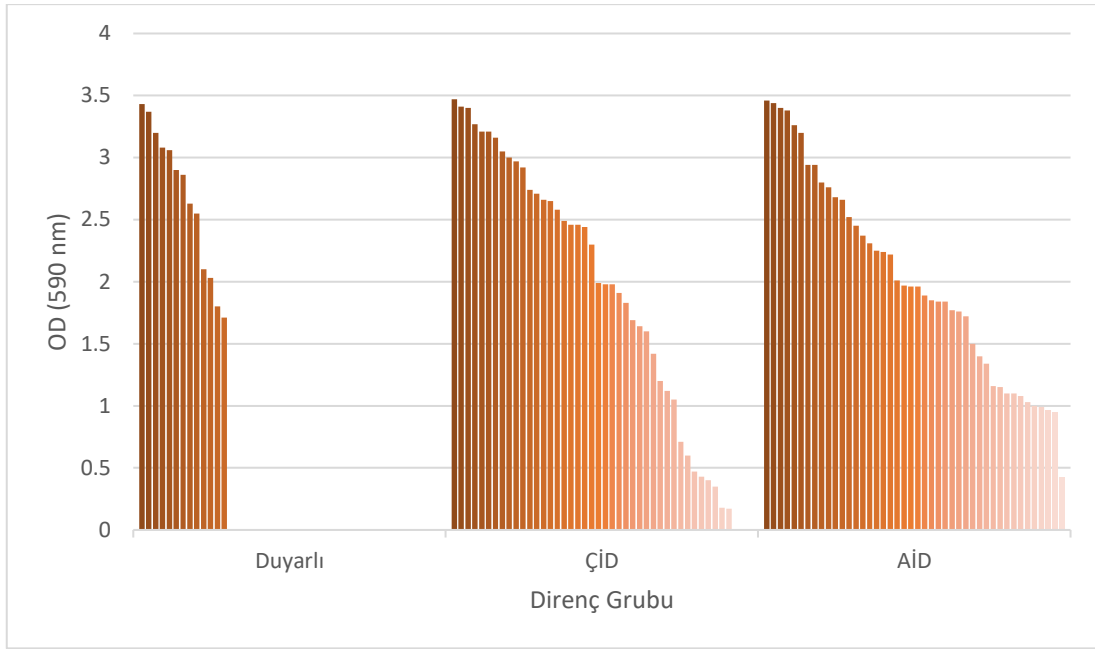
	Yüksek n(%)	Orta n(%)	Düşük n(%)	Negatif n(%)
YBÜ	14 (70)	19 (59)	16 (47)	8 (67)
Servisler	6 (30)	13 (41)	16 (47)	3 (25)
Poliklinikler	0 (0)	0 (0)	2 (6)	1 (8)
<i>P= 0,344</i>				

Solunum yolu örnekleri, yara ve doku örnekleri, diğer vücut sıvısı örneklerinden oluşan gruplar arasında biyofilm oluşturma seviyesi açısından anlamlı fark bulunmadı ($P= 0,607$). Mukozal örnekler (balgam, DTA, yara, doku biyopsi kültürü) ile vücut sıvıları (kan, idrar, plevral sıvı kültürü, BOS) grubu ayrı olarak ele alındığında gruplar arasında biyofilm oluşturma düzeyi bakımından fark gözlenmedi ($P= 0,604$). Örnek türü ve biyofilm oluşturma seviyesinin dağılımı ve ilişkisi Tablo 28’de sunulmuştur.

Tablo 28. İzolatların Alınan Örnek ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi

	Yüksek n(%)	Orta n(%)	Düşük n(%)	Negatif n(%)
Solunum yolu örnekleri	10 (50)	15 (47)	19 (56)	3 (25)
Yara ve doku	4 (20)	7 (22)	8 (23)	5 (42)
Kan	3 (15)	8 (25)	4 (12)	2 (16,5)
İdrar	2 (10)	2 (6)	3 (9)	2 (16,5)
Bos	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>P= 0,607</i>				

Direnç gruplarına göre izolatların spektrofotometrik biyofilm sonuçları Şekil 3’teki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3. *A. baumannii* Suşlarının Farklı Direnç Gruplarında Biyofilm Oluşturma Seviyeleri

Direnç grubu ve spektrofotometrik biyofilm sonuçları incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($P= 0,024$) (Tablo 29). ÇİD ve AİD grupları arasında biyofilm aktivitesi açısından fark görülmedi ($P= 1,00$). ÇİD ve duyarlı izolat grubu arasında; AİD ve duyarlı izolat grupları arasında biyofilm aktivitesi açısından anlamlı fark görüldü (sırasıyla; $P= 0,047$, $P= 0,023$). Duyarlı izolatlar grubunda biyofilm oluşturma seviyesinin anlamlı olarak yüksek bulunduğu tespit edilmiştir.

Tablo 29. *A. baumannii*'nin Direnç Grupları ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi

	N	OD* Medyan(25p-75p)	P
ÇİD	41	2,3(1,16-294)	0,024
AİD	44	1,96(1,20-2,67)	
Duyarlı Suşlar	13	2,86(2,06-3,14)	

*OD590, 590 nm de Optik dansite

Biyofilm oluşturma seviyesi ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki incelendiğinde; CAZ, IPM, MEM SXT, CIP duyarlı olanlarda, bu antibiyotiklere dirençli olanlara göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu saptanmıştır (sırasıyla; $P= 0,007$,

$P= 0,007$, $P= 0,007$, $P < 0,001$, $P= 0,012$). Diğer antibiyotiklerin duyarlılık ve biyofilm oluşturma seviyesi bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 30).

Tablo 30. *A. baumannii*'nin Biyofilm Oluşturma Seviyesi ve Antibiyotik Direnci ile İlişkisi

Biyofilm OD			
	Dirençli Medyan(25p-75p)	Duyarlı Medyan(25p-75p)	P
CAZ	1,98(1,18-2,75)	2,86(2,06-3,14)	0,007
CN	1,98(1,35-2,70)	2,64(1,77-3,22)	0,059
AK	2,01(1,4-2,8)	2,3(1,42-2,92)	0,689
IPM	1,98(1,18-2,75)	2,86(2,06-3,14)	0,007
MEM	1,98(1,18-2,75)	2,86(2,06-3,14)	0,007
SXT	1,85(1,12-2,46)	2,86(1,98-3,27)	< 0,001
CIP	1,98(1,18-2,75)	2,0088(2,04-3,17)	0,012
TGC	2,17(0,95-)	2(2,82-1,35)	0,973
CT	2,61(1,51-3,43)	2,16(1,4-2,81)	0,695

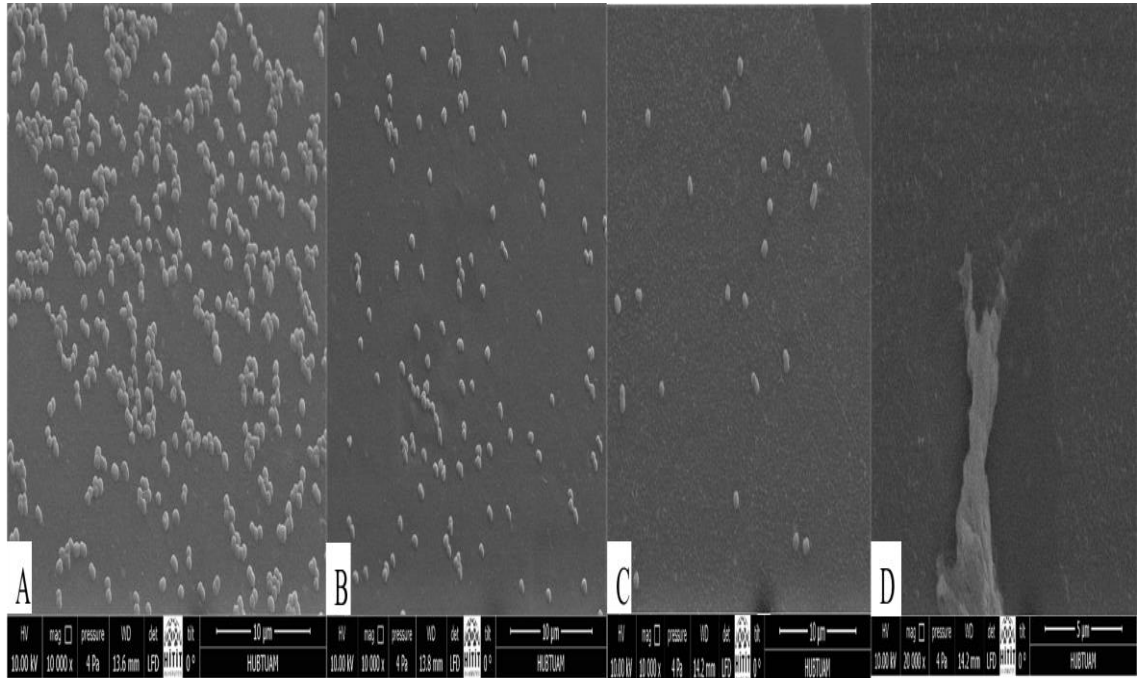
İzolatların twitching ve swarming hareket yeteneği ile biyofilm oluşturma seviyesi arasındaki ilişki ele alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla; $P= 0,751$, $P= 0,493$) (Tablo 31).

Tablo 31. *A. baumannii*'nin Twitching ve Swarming Hareketinin Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi

		Yüksek		Orta		Düşük		Negatif		P
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Twitching	Pozitif	5	25	6	19	8	23	4	33	0,751
	Negatif	15	75	26	81	26	77	8	67	
Swarming	Pozitif	0	0	0	0	2	6	0	0	0,493
	Negatif	20	100	32	100	32	94	12	100	

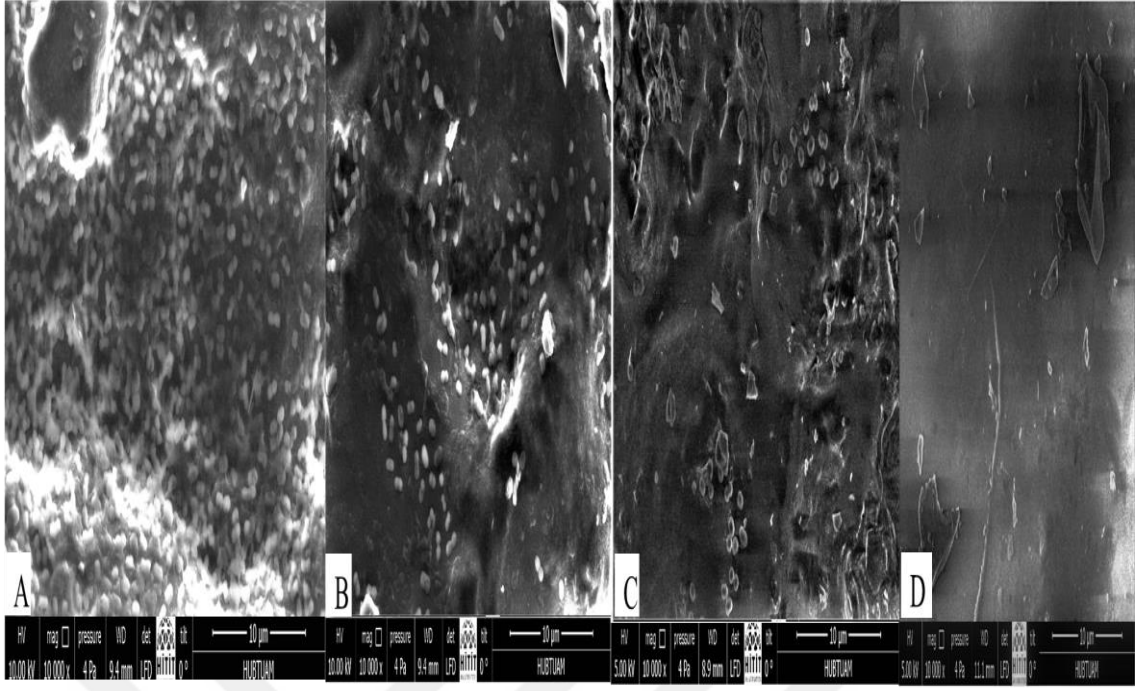
4.7. Elektron Mikroskopu (SEM) ile Biyofilm Görüntüleme Sonuçları

Test edilen tüm yüzeylerde biyofilm oluşumu görüldü. Biyofilm seviyeleri spektrofotometre ile uyumlu olarak elektron mikroskopunda görüntülendi. Foley kateter üzerinde oluşan biyofilm tabakası diğer yüzeylere kıyasla daha yoğun izlendi. Düşük ve negatif biyofilm oluşturan izolatlar foley kateter yüzeyinde diğer yüzeylerde oluşturduğu biyofilm seviyesine oranla daha yüksek düzeyde biyofilm oluşumu gösterdi. Çalışılan yüzeylerde biyofilm oluşumunun SEM ile görüntülenmesine ait görseller Resim 9-13'te gösterilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 standart suşunun seramik yüzeyde biyofilm oluşumu Resim 14'teki görselde gösterilmiştir.

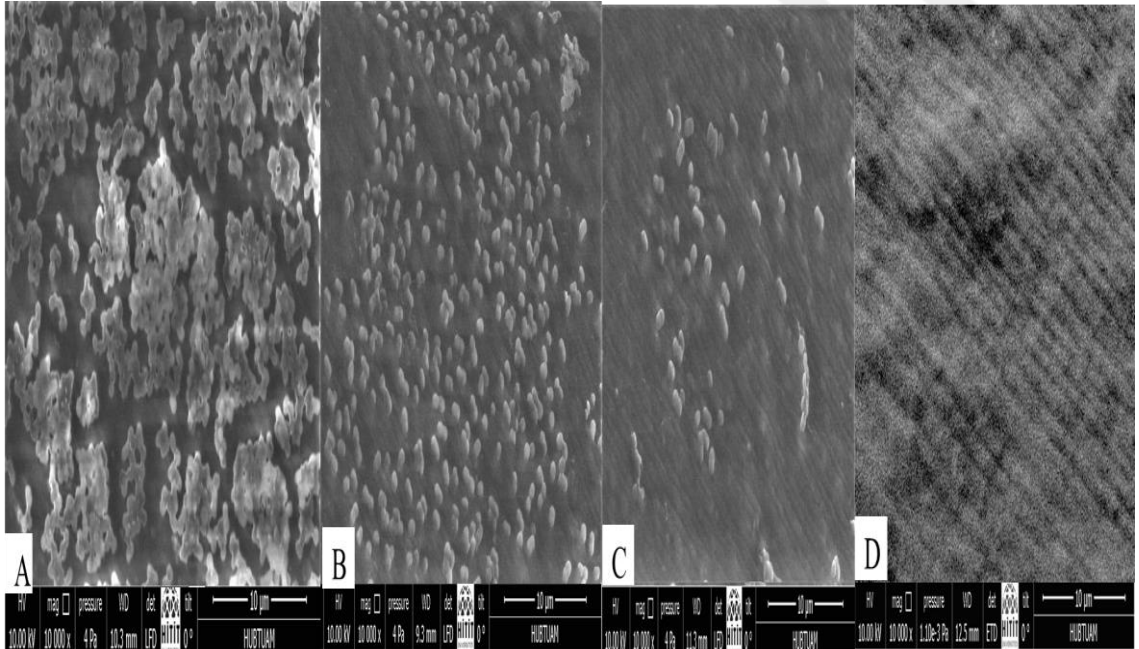


Resim 9. Plastik Tüp Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü

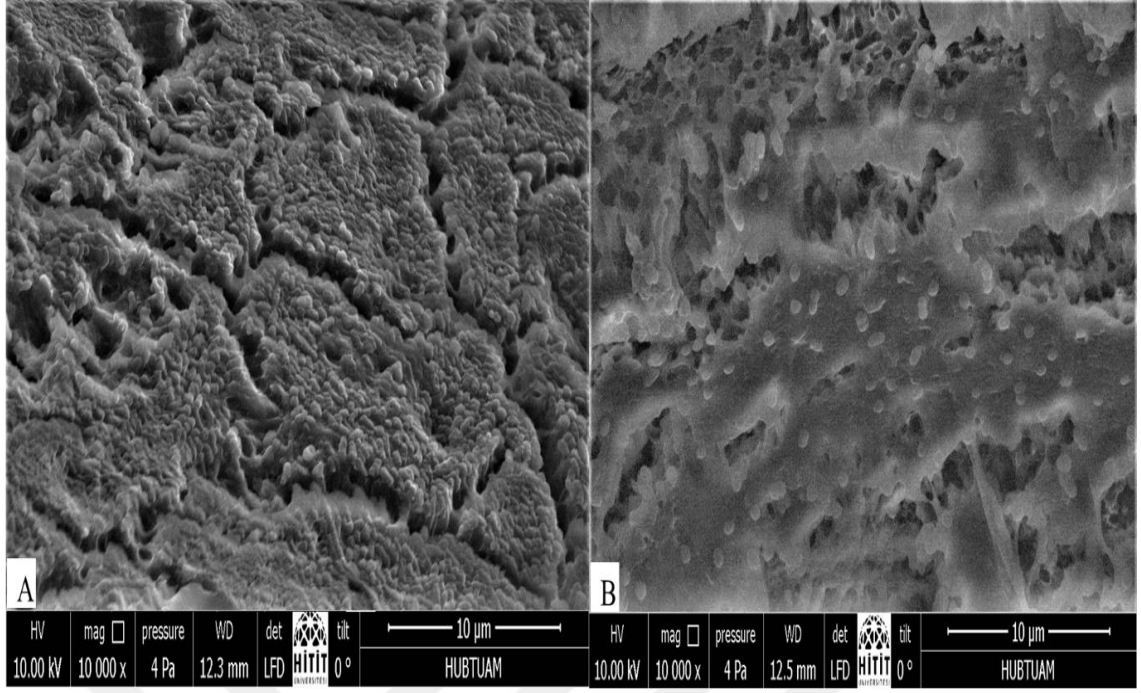
A. Yüksek düzeyde biyofilm oluşumu, **B.** Orta düzeyde biyofilm oluşumu, **C.** Düşük düzeyde biyofilm oluşumu, **D.** Negatif biyofilm oluşumu



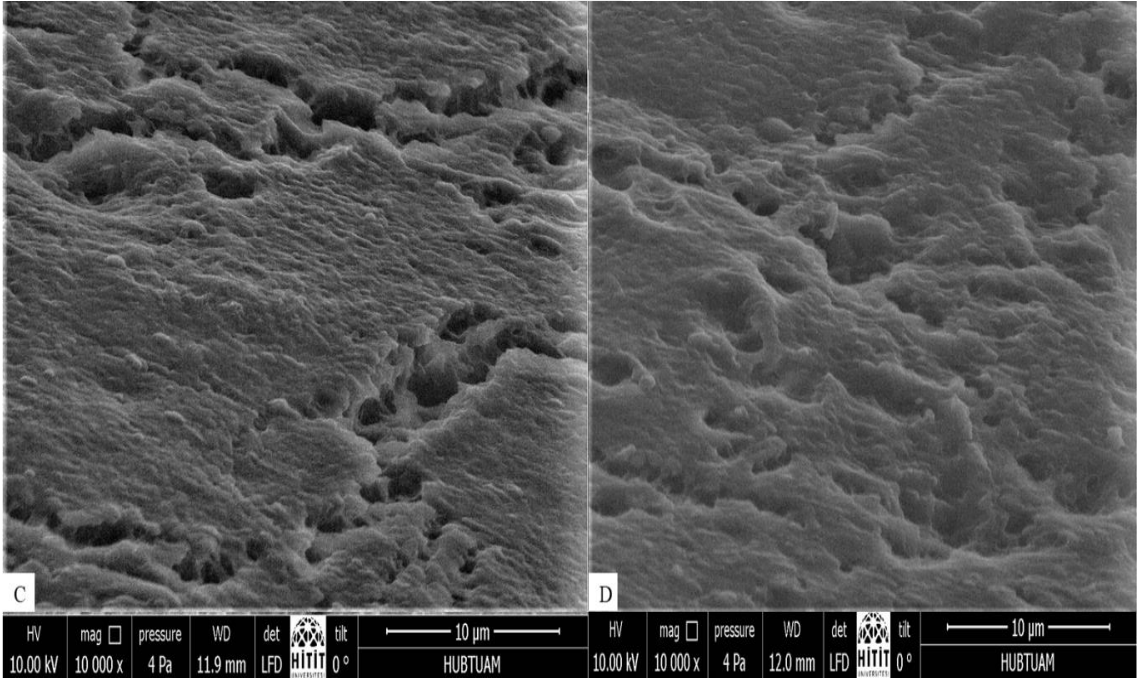
Resim 10. Seramik Yüzey Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü
A. Yüksek düzeyde biyofilm oluşumu, **B.** Orta düzeyde biyofilm oluşumu, **C.** Düşük düzeyde biyofilm oluşumu, **D.** Negatif biyofilm oluşumu



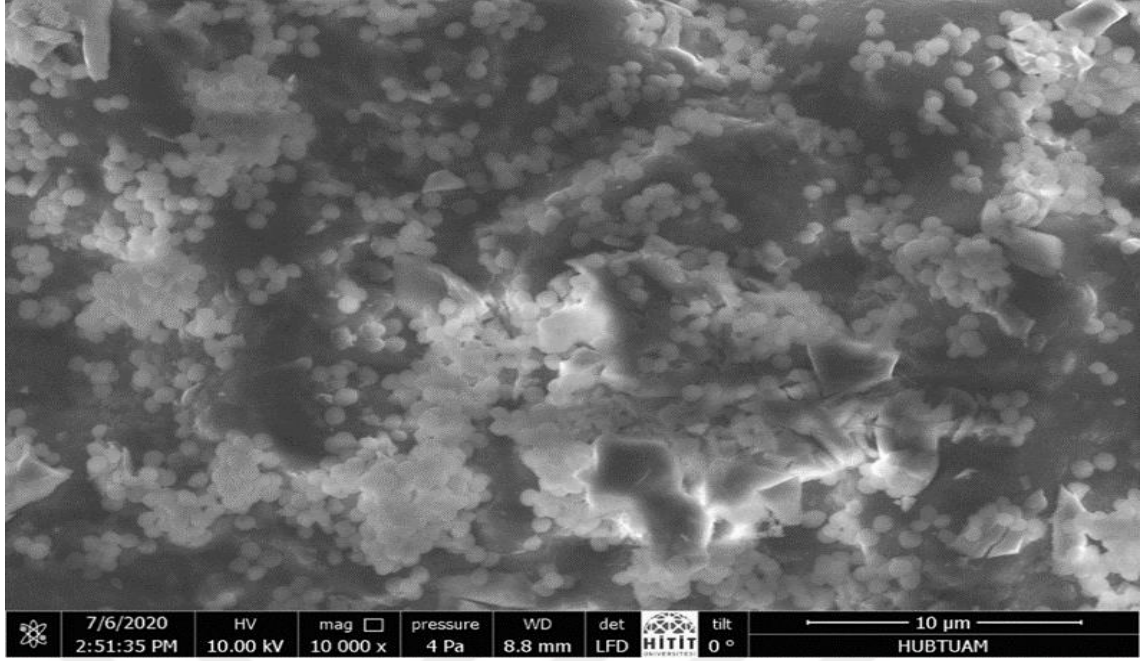
Resim 11. Vasküler Kateter Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü
A. Yüksek düzeyde biyofilm oluşumu, **B.** Orta düzeyde biyofilm oluşumu, **C.** Düşük düzeyde biyofilm oluşumu, **D.** Negatif biyofilm oluşumu



Resim 12. Foley Kateter Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü
A. Yüksek düzeyde biyofilm oluşumu, **B.** Orta düzeyde biyofilm oluşumu



Resim 13. Foley Kateter Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntüsü
C. Düşük düzeyde biyofilm oluşumu, **D.** Negatif biyofilm oluşumu



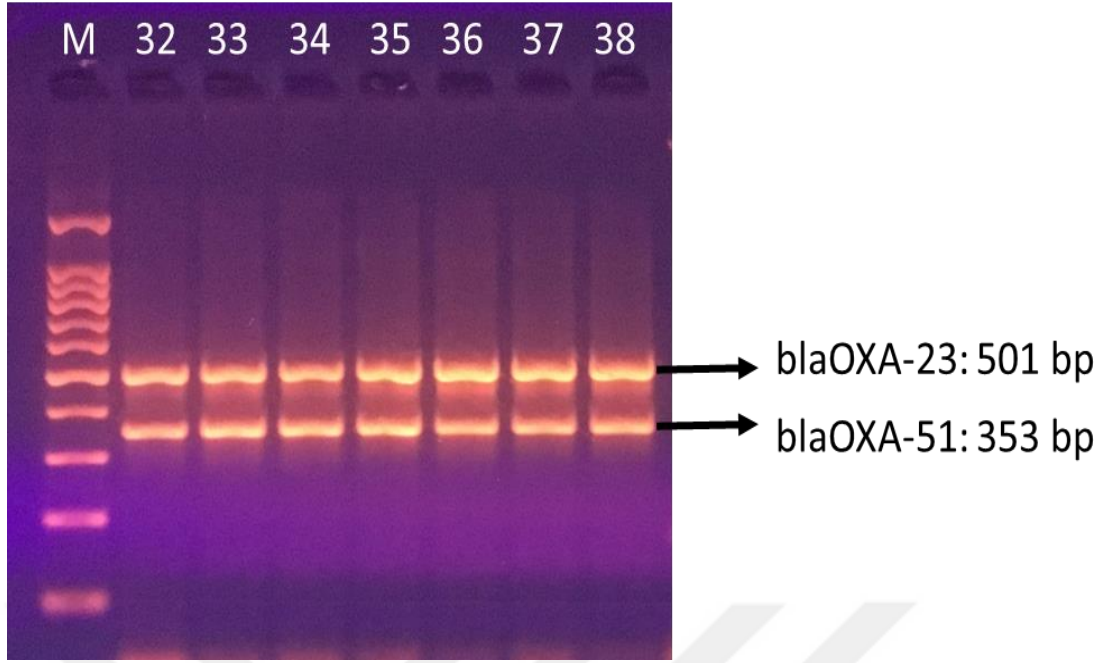
Resim 14. Biyofilm Pozitif Kontrol SEM Görüntüsü
S. aureus ATCC 25923 suşunun seramik yüzeyde biyofilm oluşumunun SEM ile görüntüsü

4.8. OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-58 Genlerinin PCR Sonuçları

Karbapenem dirençli izolatlarda blaOXA-51 ve blaOXA-23 genleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $P < 0,0001$, $P < 0,001$). PCR ile saptanan blaOXA-23, blaOXA-24/40, blaOXA-51, blaOXA-58 genlerinin pozitiflik dağılımı ve direnç gruplarıyla ilişkisi Tablo 32’de sunulmuştur. Genlere ait jel elektroforez görüntüsü Resim 15’teki görselde gösterilmiştir.

Tablo 32. blaOXA-23, blaOXA-24/40, blaOXA-51, blaOXA-58 Genlerinin Pozitifliği ve Direnç Grupları ile İlişkisi

Çalışılan genler	Toplam n(%)	ÇİD n(%)	AİD n(%)	Duyarlı n(%)	P
blaOXA-51	93 (95)	41 (44)	43 (46)	9 (10)	< 0,001
blaOXA-23	84 (86)	41 (49)	43 (51)	0 (0)	< 0,001
blaOXA-24/40	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
blaOXA-58	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-



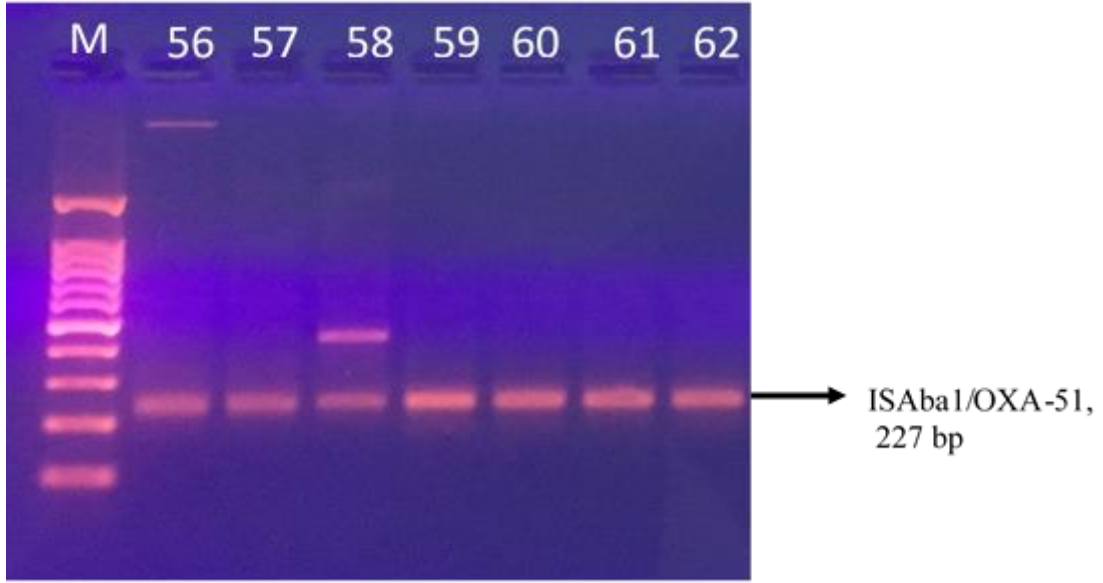
Resim 15. blaOXA-51 ve blaOXA-23 PCR Analizi Bant Profil Görüntüsü
Soldan; M (marker 100 bp), 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 nolu izolatlar

4.9. ISAbal/OXA-23 ve ISAbal/OXA-51 Genleri PCR Sonuçları

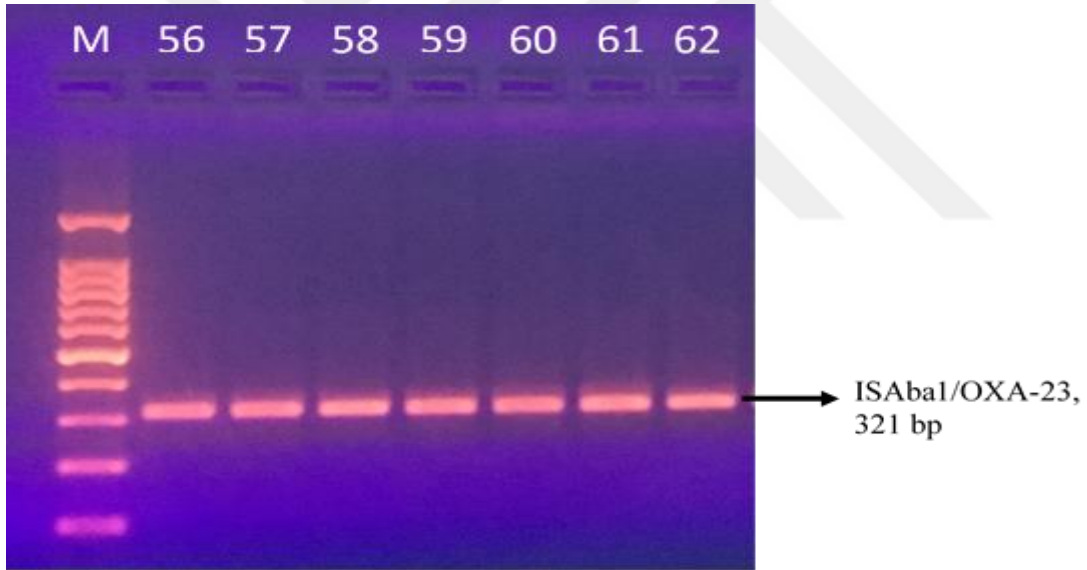
ISAbal/blaOXA-51 ve ISAbal/blaOXA-23 genleri karbapenem dirençli gruplarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla P ; $< 0,001$, $< 0,001$). PCR ile saptanan, ISAbal/blaOXA-51 ve ISAbal/blaOXA-23 genlerinin pozitiflik sayısı ve direnç grubu ilişkisi Tablo 33'te sunulmuştur. Gen bölgelerine ait jel elektroforez görüntüsü Resim 16 ve Resim 17'deki görselde gösterilmiştir.

Tablo 33. ISAbal/blaOXA-51 ve ISAbal/blaOXA-23 Genlerinin Pozitifliği ve Direnç Grupları ile İlişkisi

Pozitif Saptanan Genler	Toplam n(%)	ÇİD n(%)	AİD n(%)	Duyarlı n(%)	P
ISAbal/blaOXA-51	89 (91)	41 (46)	43 (48)	5 (6)	$< 0,001$
ISAbal/blaOXA-23	84 (86)	41 (49)	43 (51)	0 (0)	$< 0,001$



Resim 16. ISAbal/OXA-51 PCR Analizi Bant Profil Görüntüsü
Soldan M (marker 100 bp), 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 nolu izolatlar



Resim 17. ISAbal/OXA-23 PCR Analizi Bant Profil Görüntüsü
Soldan; M (marker 100 bp), 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 nolu izolatlar

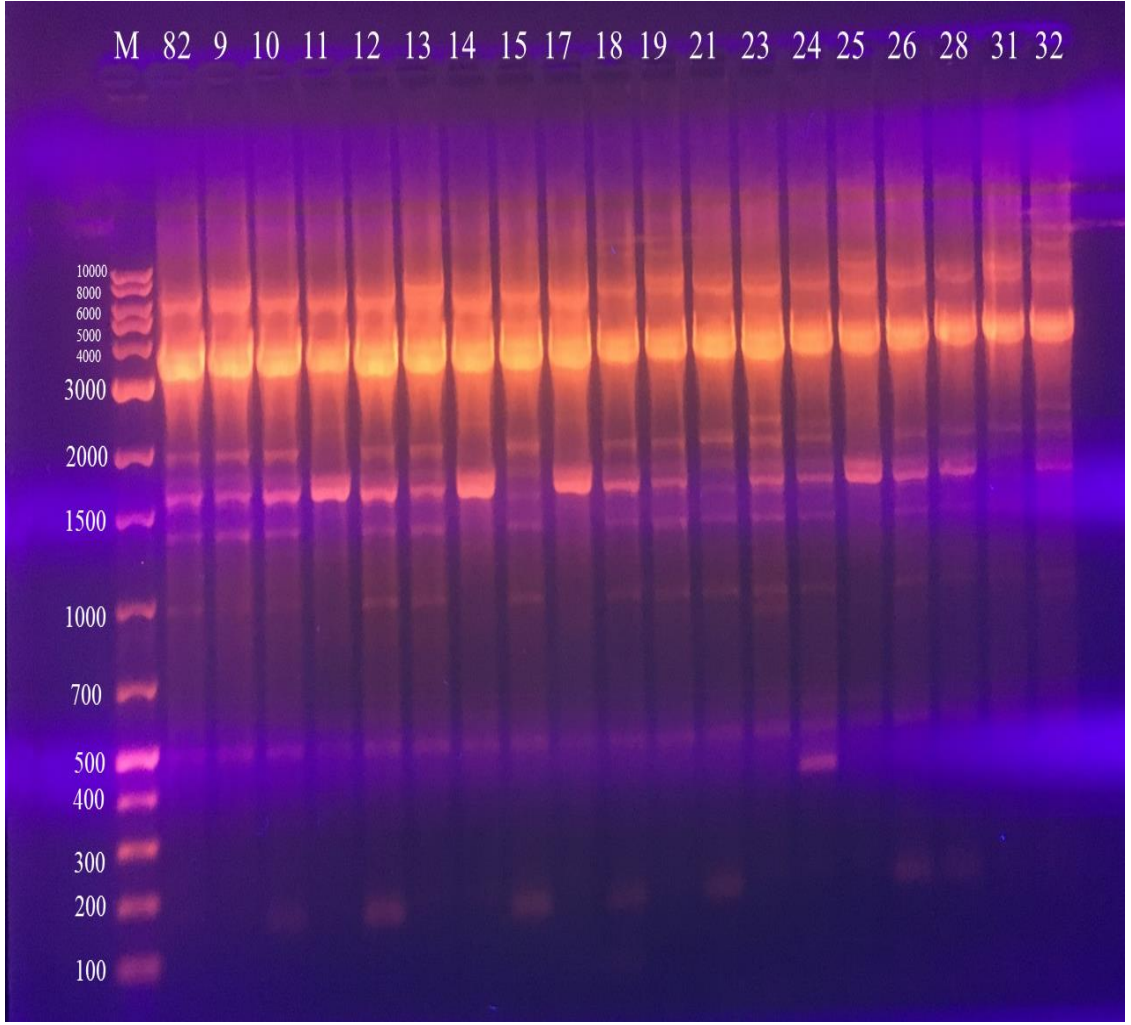
4.10. REP-PCR Analiz Sonuçları

Çalışmaya alınan izolatların REP-PCR ile analizinde 7 genotip, 21 subtip saptanmıştır. 21 subtip arasında, 8 farklı kümelenme gözlenirken, 13 izolat diğer izolatlarla benzerlik göstermeyerek tek patern olarak belirlenmiştir. İzolatların 52 (%53)'ünde genotip D saptanmış ve hastanemizin endemik suşu olarak belirlenmiştir. Genotip D'nin 49 (%94)'ünü ise D1 subtip oluşturmaktadır. Tespit edilen diğer

genotipler sayıca az görüldüğünden sporadik olarak değerlendirilmiştir. İzolatların REP-PCR genotip ve subtipi analiz sonuçları Tablo 34'te sunulmuştur. Endemik genotip ve bazı sporadik genotiplere ait örnek jel elektroforez görüntüsü Resim 18'de gösterilmiştir.

Tablo 34. İzolatların REP-PCR Analizine Göre Genotip-Suptip Sayısı ve Sıklığı

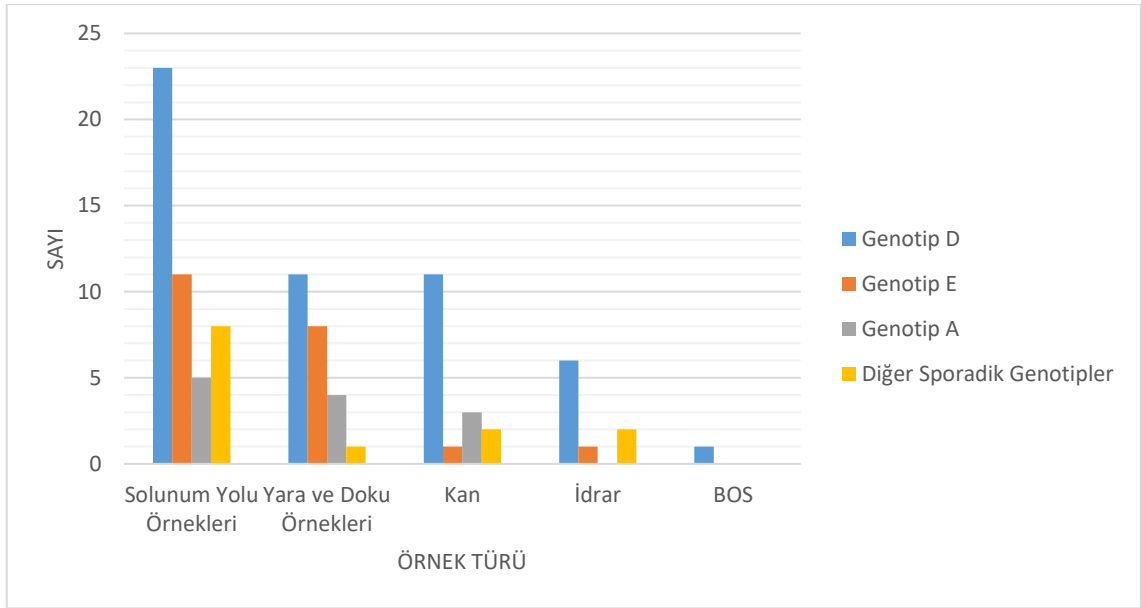
REP-PCR Genotip (%)	Subtip	REP-PCR ürünlerin band büyüklüğü	Toplam izolat n(%)
A(5 band) (12)	A1	500,1600,3500,6000,7000	8 (8,2)
	A2	500,1600,3500,6000,8000	4 (4,1)
B (6 band) (5)	B1	1000,1400,1700,2300,3500,6000	1 (1)
	B2	500,1600,2400,3500,6000,7000	1 (1)
	B3	700,850,1600,2000,3500,6000	1 (1)
	B4	500,700,1600,3500,6000,7000	1 (1)
	B5	1000,1400,1600,2500,3500,6000	1 (1)
C (7 band) (2)	C1	500,1400,1600,2500,3300,3500,6000	2 (2,1)
D(8 band) (53)	D1	500,1000,1400,1600,2000,3500,6000,7000	49 (50)
	D2	350,450,550,700,1000,1400,1900,2500	1 (1)
	D3	200,300,1400,1600,1800,2500,3300,7000	1 (1)
	D4	500,700,1700,2300,2500,3500,6000,7000	1 (1)
E(9 band) (22)	E1	500,1000,1400,1500,1800,2000,3500,6000,7000	10 (10,3)
	E2	400,500,1000,1400,1600,2000,2100,3500,6000	5 (5,1)
	E3	500,900,1000,1400,1600,2000,2200,3500,6000	4 (4,1)
	E4	200,1500,1600,1800,2000,3400,5000,6000,7000	1 (1)
	E5	200,350,600,750,800,950,1000,2100,4000	1 (1)
F(10band) (4)	F1	400,500,1000,1400,1500,1800,2000,2100,3500,6000	3 (3,1)
	F2	200,350,600,800,900,950,1000,2100,3000,4000	1 (1)
G(11band) (2)	G1	200,400,500,650,1000,1350,1400,1600,3500,2000,6000	1 (1)
	G2	200,350,600,800,900,950,1000,2000,2500,3500,5000	1 (1)



Resim 18. REP-PCR Sonuçları Bant Profil Görüntüsü

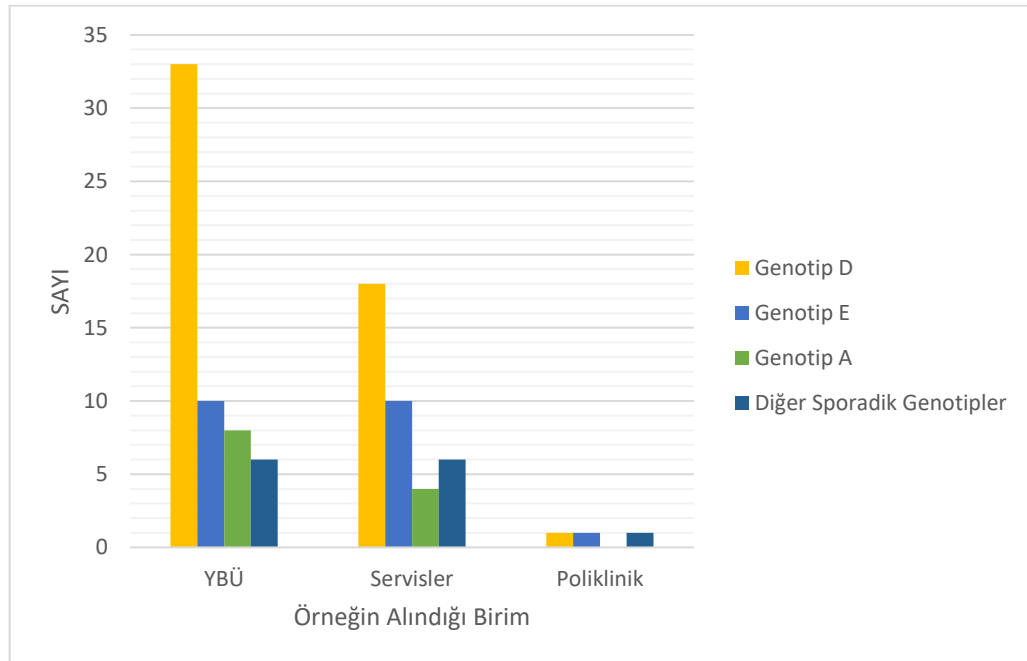
Soldan; Marker (1 Kb), 82, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 31, 32 nolu izolatlar

Endemik ve sporadik genotiplerin örnek türüne göre dağılımı değerlendirildiğinde tüm örnek gruplarında hastane baskın genotip D yüksek olarak bulunmuştur. Solunum yolu izolatlarının %49'unu, yara ve doku örneklerinin %46'sını, kan örneklerinin %65'ini, idrar örneklerinin %67'sini Genotip D oluşturmaktadır. İzolatların 1 tanesi BOS örneği olup Genotip D olarak tespit edilmiştir (Şekil 4). Genotip ile örnek türleri arasında dağılım incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P= 0,482$).



Şekil 4. Genotiplerin Örnek Türüne Göre Dağılımı

Test edilen genotiplerin örneklerin alındığı birimlere göre dağılımı değerlendirildiğinde Genotip D YBÜ, servisler ve poliklinikler olmak üzere tüm birimlerden izole edilmiştir. Özellikle YBÜ’lerin %59 ‘unu Genotip D oluşturmaktadır (Şekil 5). Örnek alınan birim ile Genotip gruplarının dağılımı incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P= 0,581$).



Şekil 5. Genotiplerin Örneğin Alındığı Birime Göre Dağılımı

Çalışılan izolatların direnç gruplarına göre genotipleri araştırıldığında Genotip D AİD grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0,001$). İzolatların Genotip ve direnç grubu dağılımı Tablo 35'te sunulmuştur.

Tablo 35. İzolatların Genotipleri ve Direnç Grupları ile İlişkisi

	ÇİD n(%)	AİD n(%)	Duyarlı n(%)
Genotip D	20 (49)	30 (68)	2 (15)
Genotip E	8 (19)	11 (25)	2 (15)
Genotip A	11 (27)	1 (2)	0 (0)
Diğer sporadik genotipler	2 (5)	2 (5)	9 (70)
$P < 0,001$			

MBL pozitif suşların %56'sı Genotip D, %26'sı Genotip E, % 14'ü Genotip A, %4'ü ise diğer sporadik genotiplere ait izolatlardan oluşmaktadır. Gruplar arasında fark bulunmuş olup, MBL pozitifliği Genotip D'de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0,001$).

Genotip ve biyofilm oluşumu grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P = 0,067$) (Tablo 36).

Tablo 36. İzolatların Genotipleri ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi

	Yüksek n(%)	Orta n(%)	Düşük n(%)	Negatif n(%)
Genotip D	8 (40)	20 (62)	20 (59)	4 (33)
Genotip E	6 (30)	5 (16)	7 (20)	3 (25)
Genotip A	2 (10)	1 (3)	4 (12)	5 (42)
Diğer sporadik genotipler	4 (20)	6 (19)	3 (9)	0 (0)
$P = 0,067$				

Yapılan testlerde *A. baumannii*'ye özgü yapısal bir gen grubu olan blaOXA-51 gen grubunun %55'ini Genotip D, %21'ini Genotip E, %13'ünü Genotip A, %11'ini diğer sporadik genotip izolatlarının taşıdığı saptanmıştır. blaOXA-23 gen grubu pozitifliğini %58 Genotip D, %23 Genotip E, %14 Genotip A, %5 diğer sporadik

genotipler oluşturmaktadır. Karbapenem ilişkili OXA-23 geni ve bu genin ekspresyonunu artıran ISAbal/OXA-23 genotip D, Genotip E ve Genotip A’da yüksek oranlarda bulunurken, bu iki genin %5’i diğer sporadik genotiplerde pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 37). Genotip B ve Genotip C’nin tümünün duyarlı izolatlardan oluştuğu ve OXA-23 ve ISAbal/OXA-23 genleri taşımadığı saptanmıştır. OXA-51, OXA-23, ISAbal/OXA-51, ISAbal/OXA-23 genlerinin pozitiflikleri ile Genotip D grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Tablo 37. İzolatların Genotipleri ve OXA/ISAbal Genlerin Pozitiflik Sayısı ile İlişkisi

	OXA-51	OXA-23	ISAbal/ OXA-51	ISAbal/ OXA-23
	n(%)	n(%)	n(%)	n %)
Genotip D	51 (55)	49 (58)	50 (56)	49 (58)
Genotip E	20 (21)	19 (23)	19 (21)	19 (23)
Genotip A	12 (13)	12 (14)	12 (14)	12 (14)
Diğer sporadik genotipler	10 (11)	4 (5)	8 (9)	4 (5)
P	0,047	< 0,001	0,004	< 0,001

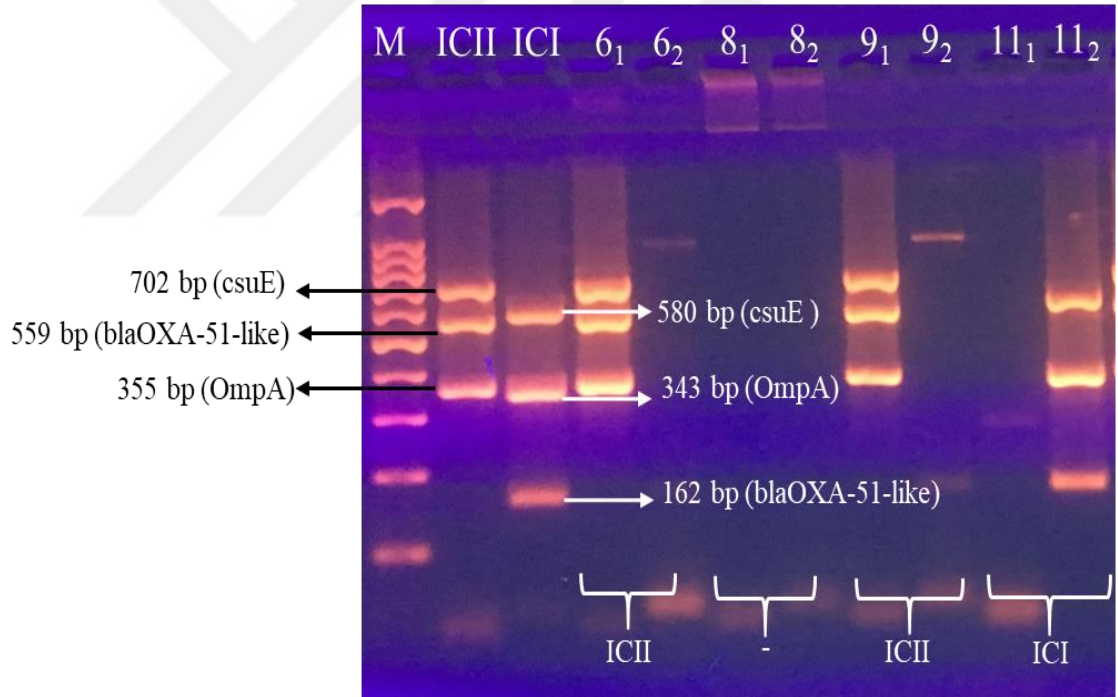
4.11. Uluslararası Klonların Belirlenmesinde Multiplex PCR Sonuçları

Çalışmaya alınan izolatların multiplex PCR ile elde edilen sonuçlarına göre 7 farklı klon grubu tespit edildi. 5 (%5) izolatta ise IC tayini yapılamadı. Hastanemizde baskın IC grubunun IC II olduğu saptandı. Multiplex PCR analiz sonuçları Tablo 38’de sunulmuştur. Gruplar arası fark incelendiğinde IC II’nin AİD grubunda yüksekliği anlamlı bulunmuştur. İzolatların ayrımını belirleyen bant profilleri Resim 19’daki örnek görselde gösterilmiştir.

Tablo 38. İzolatların IC Analiz Sonuçları ve Direnç Grupları ile İlişkisi

PCR Tabanlı Grup	Toplam n(%)	ÇİD n(%)	AİD n(%)	Duyarlı n(%)
G1 (IC II)	71((73)	29(41)	42(59)	0(0)
G2 (IC I)	12(12)	11(92)	1(8)	0(0)
G4	2(2)	1(50)	0(0)	1(50)
G5	4(4)	0(0)	0(0)	4(100)
G6	1(1)	0(0)	0(0)	1(100)
G8	1(1)	0(0)	0(0)	1(100)
G13	2(2)	0(0)	0(0)	2(100)
-	5(5)	0(0)	1(20)	4(80)

$P < 0,001$

**Resim 19.** Multiplex PCR Yöntemi ile IC Analizi Bant Profil Görüntüsü

M: Marker (100 bp)

IC II: Pozitif Kontrol, Grup 1 Multiplex PCR'ye göre csuE(+), blaOXA-51(+), OmpA (+)

IC I: Pozitif Kontrol, Grup 2 Multiplex PCR'ye göre csuE(+), OmpA (+), blaOXA-51(+)

6₁: 6 nolu Örnek, Grup 1 Multiplex PCR'ye göre csuE(+), blaOXA-51(+), OmpA (+)

6₂: 6 nolu Örnek, Grup 2 Multiplex PCR'ye göre csuE(-), OmpA(-), blaOXA-51(-)

8₁: 8 nolu örnek, Grup 1 Multiplex PCR'ye göre csuE(-), blaOXA-51(-), OmpA (-)

8₂: 8 nolu örnek, Grup 2 Multiplex PCR'ye göre csuE(-), OmpA(-), blaOXA-51(-)

9₁: 9 nolu Örnek, Grup 1 Multiplex PCR'ye göre csuE(+), blaOXA-51(+), OmpA (+)

9₂: 9 nolu Örnek, Grup2 Multiplex PCR'ye göre csuE(-), OmpA(-), blaOXA-51(-)

11₁: 11 nolu örnek, Grup 1 Multiplex PCR'ye göre csuE(-), blaOXA-51(-), OmpA (-)

11₂: 11 nolu örnek, Grup 2 Multiplex PCR'ye göre csuE(+), OmpA (+), blaOXA-51(+)

Gruplar arasındaki ilişki değerlendirildiğinde Genotip D ve IC II klon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0,001$). Diğer klon gruplarının genotip türüne dağılımı Tablo 39'da sunulmuştur.

Tablo 39. İzolatların IC Klon Grupları ve Genotip Türü ile İlişkisi

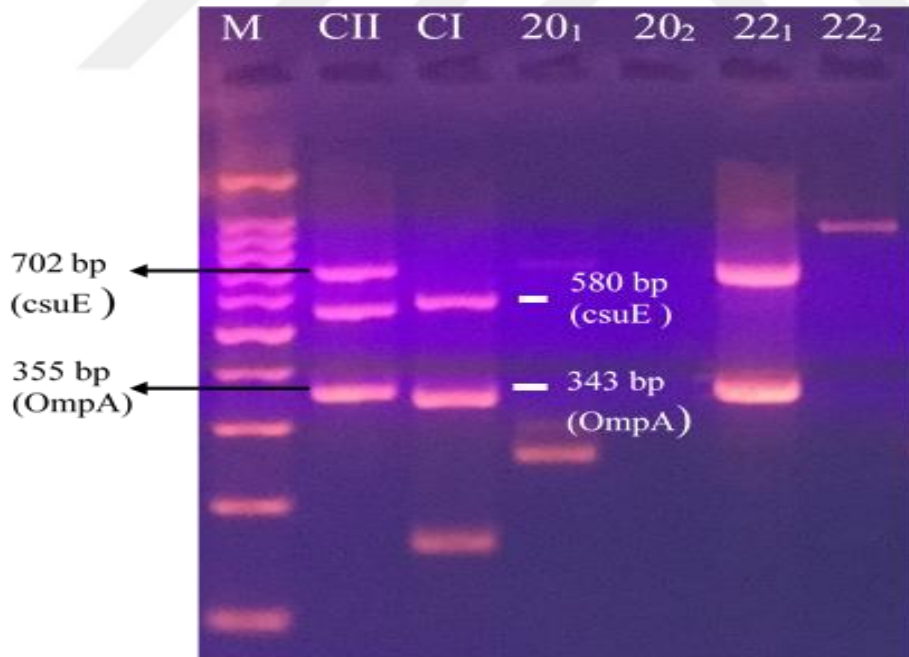
	Genotip D	Genotip E	Genotip A	Diğer sporadik genotipler
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
G1 (IC II)	49(94)	18(85,9)	0(0)	4(30,8)
G2 (IC I)	0(0)	0(0)	12(100)	0(0)
G4	0(0)	1(4,7)	0(0)	1(7,7)
G5	1(2)	1(4,7)	0(0)	2(15,3)
G6	0(0)	0(0)	0(0)	1(7,7)
G8	0(0)	0(0)	0(0)	1(7,7)
G13	1(2)	0(0)	0(0)	1(7,7)
-	1(2)	1(4,7)	0(0)	3(23,1)
$P < 0,001$				

IC II hastanemiz *A. baumannii* salgınlarında karbapenem direnci ile anlamlı ilişkilendirilen uluslararası klon olarak belirlenmiştir.

Uluslararası klonların *A. baumannii* virölans özellikleri ile arasında ilişki incelendi. Hastane baskın klonu IC II ile a-hemoliz yapan izolatlar arasında anlamlı fark bulundu ($P < 0,001$). Koloni tipi, swarming ve twitching hareket yeteneği, biofilm ile aralarında fark bulunmadı. IC I klon grubunda ise twitching hareket yeteneği oranı %92 tespit edildi ve IC I ile twitching grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P < 0,001$).

4.12. Biyofilm İlişkili Genlerin PCR Sonuçları

A. baumannii multiplex PCR temelli grup tiplendirme testinde yapılan Grup 1 multiplex PCR analizinde OmpA ve csuE genlerinin sırasıyla 355 bp, 702 bp veya Grup 2 multiplex PCR analizinde sırasıyla 343 bp, 580 bp büyüklüğünde bant elde edilmesi pozitif olarak kabul edilmiştir. Biyofilm ilişkili iki gen (OmpA, csuE) bölgesi çalışmamızdaki izolatlarda yüksek oranda tespit edilmiştir. Gen bölgelerine ait jel elektroforez görüntüsü Resim 20’de gösterilmiştir.



Resim 20. OmpA, csuE Gen Bölgesi Bant Profil Görüntüsü

M: Marker (100 bp)

ICII: Pozitif Kontrol, Grup 1 Multiplex PCR'ye göre csuE (+), OmpA (+)

ICI: Pozitif Kontrol, Grup2 Multiplex PCR'ye göre csuE(+), OmpA (+)

20₁: 20 nolu Örnek, Grup 1 Multiplex PCR'ye göre csuE (-), OmpA (-)

20₂: 20 nolu Örnek, Grup2 Multiplex PCR'ye göre csuE (-), OmpA (-)

22₁: 22 nolu örnek, Grup 1 Multiplex PCR'ye göre csuE (+), OmpA (+)

22₂: 22 nolu örnek, Grup2 Multiplex PCR'ye göre csuE (-), OmpA (-)

Pozitif saptanan biyofilm ilişkili genlerin görülme oranı OmpA ve csuE için sırasıyla %96, %89 olarak belirlenmiştir. Pozitif saptanan genlerin örnek alınan birim ve örnek türü grupları ile arasında ilişki değerlendirildiğinde gruplar arası fark görülmemiştir (sırasıyla OmpA için; $P= 0,388$, $P= 0,217$; csuE için; $P= 1,00$, $P= 0,318$). Dirençli izolatlarda OmpA ve csuE gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($P= 0,007$, $P < 0,001$). ÇİD, AİD ve duyarlı izolatlarda pozitif saptanan biyofilm ilişkili genlerin dağılımı Tablo 40'ta sunulmuştur.

Tablo 40. OmpA ve csuE Genleri Pozitifliği ve Direnç Grupları ile İlişkisi

Pozitif Saptanan Genler	Toplam n(%)	ÇİD n(%)	AİD n(%)	Duyarlı n(%)	P
OmpA	94 (96)	41 (44)	43 (46)	10 (10)	0,007
csuE	87 (89)	40 (46)	43 (49)	4 (5)	<0,001

OmpA ve csuE gen pozitifliğiyle biyofilm oluşturma seviyesi değerlendirildiğinde biyofilm gruplarında OmpA ve csuE gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($P= 0,730$, $P= 0,062$). OmpA ve csuE gen varlığı ile biyofilm oluşturma seviyesinin dağılımı ve sıklığı Tablo 41'de sunulmuştur.

Tablo 41. OmpA ve csuE Genleri Pozitifliği ve Biyofilm Oluşturma Seviyesi ile İlişkisi

Pozitif Saptanan Genler	Yüksek n(%)	Orta n(%)	Düşük n(%)	Negatif n(%)	P
OmpA	19 (20)	31 (33)	33 (35)	11 (12)	0,730
csuE	15 (17)	29 (33)	33 (38)	10 (12)	0,062

Biyofilm ilişkili genlerin endemik ve sporadik genotiplere göre saptanma oranlarına bakıldığında csuE gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $P= 0,141$, $P < 0,001$). Endemik ve sporadik genotiplere göre biyofilm ilişkili gen pozitiflikleri Tablo 42’de sunulmuştur.

Tablo 42. İzolatların Genotipleri ve OmpA, csuE Genleri Pozitifliği ile İlişkisi

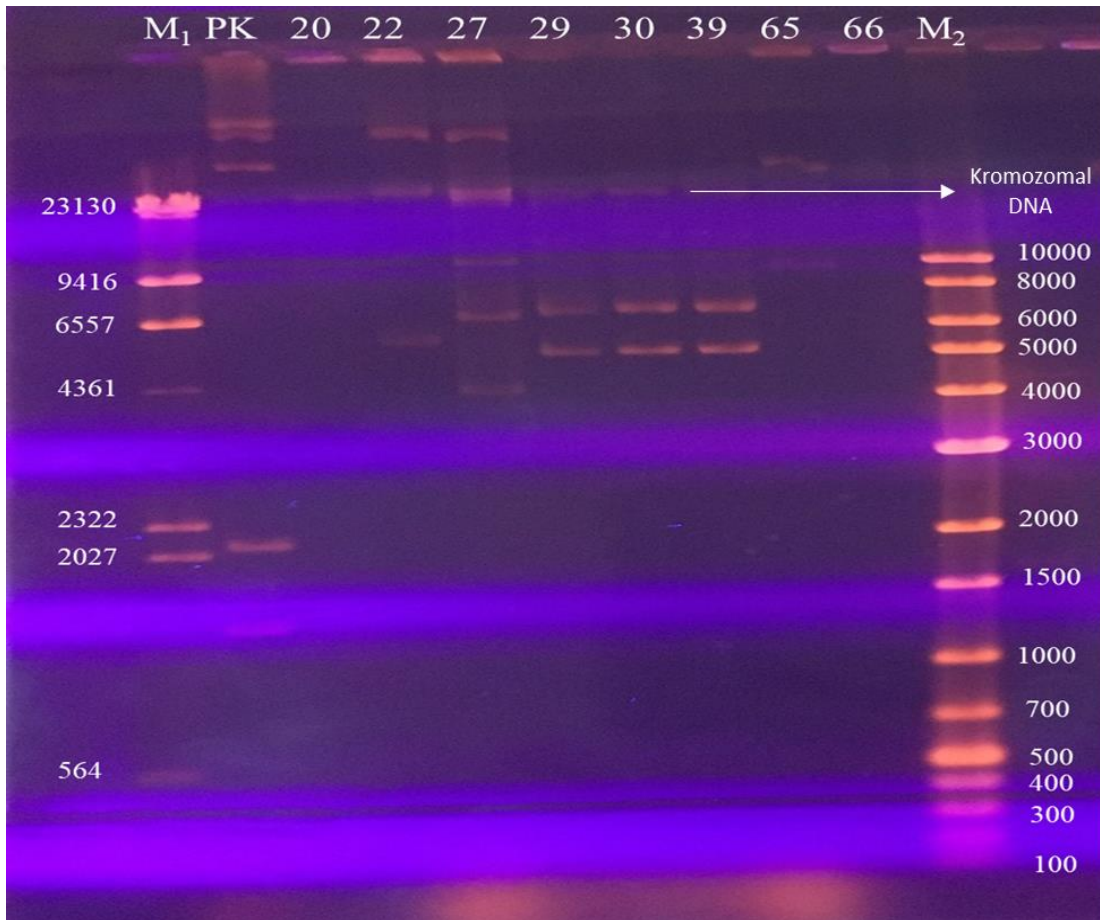
Pozitif Saptanan Genler	Genotip D n(%)	Genotip E n(%)	Genotip A n(%)	Diğer sporadik genotipler n(%)	P
OmpA	51 (54)	20 (21)	12 (13)	11 (12)	0,141
csuE	50 (57)	18 (21)	12 (14)	7 (8)	< 0,001

4.13. Plazmid Ekstraksiyon Sonuçları

A. baumannii izolatlarının plazmid ekstraksiyon deneyinde pozitif kontrol olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922 standart suşunda 6 adet plazmid tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına bakıldığında hem duyarlı izolatların hem de dirençli izolatların farklı büyüklüklerde plazmid taşıdığı belirlenmiştir. Duyarlı izolatlar içinde en fazla 4 plazmid taşıyan izolat saptandı ve bu sadece bir kökende bulundu. Dirençli izolatlar içinde en fazla 6 plazmid taşıyan izolatlar farklı kökenlerde tespit edilmiştir.

Plazmid analizi sonuçlarına göre, tüm *A. baumannii* izolatlarının %73,4’ünün plazmid taşıdığı bulunmuştur. CRAB izolatlarının %74 (63/85)’ünde ve duyarlı izolatların %69 (9/13)’unda plazmid bulunmuştur. Bakteri kökenlerinde 1,3-50,2 Kb boyut aralığında değişen, 1 ila 6 plazmid taşıdığı ve bu plazmidlerin izolatlar arasında heterojen dağıldığı gözlenmiştir. Plazmid boyutu tüm suşların %75’inde > 20 Kb ve %25’inde < 20 Kb büyüklüğünde tespit edilmiştir. Duyarlı izolatta bulunan 3 plazmidin

boyutu > 20 Kb olarak saptanmıştır. Kolistin dirençli suşların tamamının (8/98) plazmid taşıdığı; ancak sadece iki izolatın plazmid profillerinin aynı patern gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm izolatların plazmid karakterizasyon sonuçları IC ve genotiplerinin dağılımı Tablo 43'te sunulmuştur. Genel olarak, duyarlı ve dirençli izolatların plazmid profilleri, genotipleri ve IC'leri arasında bir benzerlik gözlenmemiştir. Sadece IC I saptanan izolatların tümü (12/98) genotip A olarak gruplandırıldığı ve bu suşların plazmid profilleri arasında %50 benzerlik görüldü saptanmıştır. İzolatlara ait plazmid elektroforez görsel örneği Resim 21'de gösterilmiştir.



Resim 21. *A. baumannii* İzolatlarının Plazmid Ekstraksiyonu Jel Elektroforez Görüntüsü
Soldan sağa sırasıyla; Marker 1, PK: Pozitif kontrol, *E. coli* ATCC 25922 suşu, 20, 22, 27, 27, 29, 30, 39, 65, 66 nolu izolatlar, Marker 2.

Tablo 43. *A. baumannii* İzolatlarının Plazmid Karakterizasyonu, Antibiyotik Direnç Paterni, Klonalitesi ve Genotip Analiz Sonuçları

İzolat No	Dirençli Antibiyotikler	Plazmid Sayısı	Plazmid Boyutu (Kb)	IC	Genotip
5	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	4	38,5, 32,2, 1,7, 1,3	CI	A
6	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	-	-	CII	D
7	CAZ,IPM,MEM,CIP,SXT	-	-	CII	E
8	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,CT	5	50,2, 23,1, 3,7, 2,6, 2,3	-	D
9	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	5	50,2, 23,1, 3,7, 2,6, 2,3	CII	D
10	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	-	-	CII	D
11	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	4	49, 33,3, 1,9, 1,4	CI	A
12	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	-	-	CII	D
13	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	3	26,2, 14, 5,1	CII	D
14	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	4	49, 33,3, 1,9, 1,4	CI	A
15	CAZ,IPM,MEM,CIP,SXT	2	22,4, 6	CII	E
17	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	4	49, 33,3, 1,9, 1,4	CI	A
18	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP, CT	2	19, 6,1	CII	D
19	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	-	-	CII	D
20	-	-	-	-	G
21	CAZ,IPM,MEM,CIP,SXT	-	-	CII	E
22	-	2	42,3, 5,4	G13	B
23	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	4	49,2, 26, 2,1, 1,5	CII	E
24	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	-	-	CII	E
25	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	4	38,5, 32,2, 1,7, 1,3	CI	A
26	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	-	-	CII	D
27	-	4	41,1, 10,9, 6,1, 4	-	F
28	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP	-	-	CII	D
29	-	2	6,3, 5,1	G5	C
30	-	2	6,3, 5,1	G5	C
31	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	1	27,4	CII	E
32	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	1	25	CII	E
33	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	-	-	CII	E
34	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	-	-	CII	D
35	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT, TGC	-	-	CI	A
36	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	-	-	CII	D
37	CAZ,IPM,MEM,CIP	4	49, 33,3, 1,9, 1,4	CI	A
38	CAZ,IPM,MEM,CIP	4	49, 33,3, 1,9, 1,4	CI	A
39	-	2	6,3, 5,1	G13	D
41	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	-	-	CII	D
42	CAZ,IPM,MEM,CIP	1	25,1	CI	A

44	CAZ,IPM,MEM,CIP	5	38,5, 28,4, 15,4, 2,5, 1,6	CII	D
45	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	4	27,4, 23,5, 2,5, 1,6	CII	E
46	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	4	27,4, 23,5, 2,5, 1,6	CII	E
47	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	5	15,4, 6,1, 3,71, 2,5, 1,6	CII	D
48	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	2	21,5, 6,3	CII	D
49	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	2	21,5, 6,3	CII	F
50	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	5	44, 28, 12,9, 2,4, 1,6	CII	D
51	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	2	17,6, 6,3	CII	E
52	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	5	44, 28, 12,9, 2,4, 1,6	CII	D
53	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	5	44, 28, 12,9, 2,4, 1,6	CII	D
54	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	5	44, 28, 12,9, 2,4, 1,6	CII	D
55	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	2	17,6, 6,3	CII	E
56	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	4	24, 14,7, 6,5, 1,4	CII	G
57	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	-	-	CII	D
58	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	2	17,6, 6,3	CII	E
59	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	4	29,1, 28,1, 16,6, 4,8	CII	D
60	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	1	6,1	CII	D
61	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	6	29,1, 28,1, 16,6, 4,8, 2,4, 1,5	CII	D
62	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT, CT	6	29,1, 28,1, 16,6, 4,8, 2,4, 1,5	CII	D
63	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	6	29,1, 28,1, 16,6, 4,8, 2,4, 1,5	CII	D
64	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	-	-	CII	D
65	-	1	9,4	G5	D
66	-	-	-	G6	B
67	CAZ,IPM,MEM,AK,CIP	6	6,1, 4,4, 1,9, 1,7, 1,4, 1,3	CI	A
68	-	-	-	G5	E
70	-	-	-	-	B
72	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	3	17,6, 6,3, 1,6	CII	D
73	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	-	-	CII	D
74	CAZ,IPM,MEM,AK,CIP	6	6,1, 4,4, 1,9, 1,7, 1,4, 1,3	CI	A
75	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	1	6,1	CII	F
77	CAZ,IPM,MEM,AK,CIP	3	26,2, 14, 5,1	CII	E
78	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	-	-	CII	D
79	CAZ,IPM,MEM,CIP	4	49, 3,3, 1,9, 1,4	CI	A
80	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	-	-	CII	F

81	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	4	14,4, 8,2, 5,5, 1,6	CII	D
82	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	3	17,6, 6,3, 1,6	CII	D
83	CAZ,IPM,MEM,CN,CIP,SXT	3	17,6, 6,3, 1,6	CII	D
84	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	6	29,1, 28,1, 16,6, 4,8, 2,4, 1,5	CII	D
85	CAZ,IPM,MEM,CIP,SXT	-	-	G4	E
87	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	3	17,6, 6,3, 1,6	CII	D
88	-	1	39,6	G8	B
89	-	1	6,1	G4	B
91	-	1	10	-	E
92	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,CT	2	21,5, 6,2	CII	D
93	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	2	22,6, 6,3	CII	D
94	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	6	29,1, 28,1, 16,6, 4,8, 2,4, 1,5	CII	D
95	CAZ,IPM,MEM,AK,CIP,SXT,CT	4	28,5, 15,1, 6, 2	CII	E
96	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,TGC, CT	2	22,4, 6	CII	D
97	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP, CT	2	22,4, 6	CII	D
98	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	2	17,6, 6,3	CII	E
99	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	1	6,1	CII	E
100	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	-	-	CII	D
101	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	-	-	CII	D
103	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	2	22,4, 6	CII	D
104	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP	2	22,4, 6	CII	D
105	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	6	44,7, 28,5, 8, 5,1, 2,5, 1,6	CII	D
106	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	6	44,7, 28,5, 8, 5,1, 2,5, 1,6	CII	D
107	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT, CT	3	34, 5,1, 1,6	CII	D
108	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	2	22,4, 6	CII	E
109	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	4	45,3, 28,4, 6, 1,6	CII	D
110	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	6	44,7, 28,5, 8, 5,1, 2,5, 1,6	CII	D
111	CAZ,IPM,MEM,AK,CN,CIP,SXT	6	44,7, 28,5, 8, 5,1, 2,5, 1,6	CII	D
<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	6	48, 40,4, 30,4, 3,7, 2,1, 1,4	-	-

5. TARTIŞMA

Acinetobacter baumannii, kuruluğa ve dezenfektanlara dayanıklı olması, cansız ortamlarda uzun süre hayatta kalmasını sağlayacak önemli virülans özellikleri ve hızla geliştirdiği antibiyotik direnç mekanizmaları gibi eşsiz özellikleri nedeniyle karbapenem direnci dahil olmak üzere ÇİD'e sahip özellikle yoğun bakım birimlerinde çeşitli enfeksiyonlara ve hastane kaynaklı salgınlara yol açabilmesi ile ciddi bir nozokomiyal sorun haline gelmiştir. Bu amaçla dirençli izolatlarının yayılımını önlemek için patogenezi aydınlatacak, tedavide yeni yaklaşımların bulunmasını sağlayacak, kontrol ve önlemlerin belirlenmesinde birçok çalışma başlatılmıştır (30). ABD Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı 2009-2010 verilerine göre *Acinetobacter spp.* tüm sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların %1,8'ini oluştururken, Asya ülkelerinde etkenin görülme oranı daha da artmaktadır (183). Türkiye ulusal sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar sürveyans ağı 2017 yılı raporuna göre ise sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar arasında *A. baumannii* enfeksiyonları %21 oranında yüksek seviyede bulunmuştur (184).

Acinetobacter türleri, uzun süren hastane yatışı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, ağır cerrahi girişim, yabancı cisim uygulamaları, mekanik ventilasyon desteği ve hastaya ait komorbid hastalıkların varlığına bağlı olarak en sık hastane YBÜ'lerden izole edilmektedir (30). Ocak 2009-Aralık 2011 tarihleri arası yapılan sürveyans çalışmasında ABD ve Avrupa'da YBÜ enfeksiyonlarının %7'sinde *A. baumannii complex* izole edilmiştir (185). Ülkemizde yapılan Kalem ve ark.'nın (186) çalışma sonuçlarına göre %69,8 YBÜ'den, %12,4 Göğüs Hastalıkları Servisinden, %3,6 İç Hastalıkları Servisinden, %2,5 Ortopedi Servisinden izole edilmiştir. Paköz ve ark.'nın (187) yaptığı bir diğer çalışmada YBÜ'den %64, nefroloji servisinden %10, üroloji servisinden %6, çocuk hastalıkları servisinden %4, enfeksiyon hastalıkları servisinden %4, göğüs hastalıkları servisinden %4, kardiyoloji servisinden %2, kalp damar cerrahisi servisinden %2, kadın doğum servisinden %2, onkoloji

servisinden %2 oranında tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *A. baumannii* izolatları %58 oranında en fazla YBÜ'den izole edilmiştir. %12,3 göğüs hastalıkları, %8,2 palyatif bakım, %6,1 ortopedi, %4,1 genel cerrahi, %2,1 diyabetik ayak bakım, %1 beyin cerrahisi, %1 dahiliye, %1 kardiyoloji, %1 onkoloji, %1 fizik tedavi ve rehabilitasyon ve %1 pediatri servisi olmak üzere farklı kliniklerden elde edilmiştir. Çalışma grubumuz bu yönüyle incelendiğinde izolatların en sık YBÜ'den izole edilmesiyle diğer çalışmalarla ve literatür bilgisiyle uyumlu bulunmuştur.

Hastane kaynaklı pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonları, *Acinetobacter* ile ilişkili en yaygın enfeksiyonlardır. Diğer daha az yaygın enfeksiyonlar arasında menenjit, yara veya cerrahi alan enfeksiyonları, peritonit, endokardit, menenjit, osteomyelit, artrit ve idrar yolu enfeksiyonları bulunur (18). Klinik prezentasyonu geniş olan *Acinetobacter* izolatlarının izole edildiği örneklerin dağılımı birçok çalışmada değişkenlik göstermektedir. Çalışkan ve Kirişçi'nin (188) yaptığı çalışmada %35 oranında en sık trakeal aspirat, %14 yara, %32 kan, %2 balgam, %16 idrar, %1 katater örneklerinde üremiştir. Gözütok ve ark.'nın (189) çalışmasında %39 kan, %30 endotrakeal aspirat, %17 idrar, %13 yara, %1 oranında balgam örneklerinden tanımlanmıştır. Şay Coşkun'un (190) dirençli *A. baumannii* izolatları ile yaptığı çalışmada %41,8'i solunum yolu, %35,4'ü kan, %13,9'u yara, %6,7'si idrar, %1,7'si BOS ve %0,4'ü steril vücut sıvısı örneklerinden izole edilmiştir.

Çalışmamızda izolatlar en sık DTA örneğinde (%32), daha sonra sırasıyla %21 yara, %17 kan, %15 balgam, %9 idrar, %4 doku biyopsi kültürü, %1 plevral sıvı kültürü, %1 BOS örneklerinde üremiştir. *A. baumannii*'nin YBÜ'lerde ventilatör ekipmanlarındaki kolonizasyona bağlı sık solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olması, çalışmamızda örneklerin çoğunun YBÜ'den gelmesi, izolatların en sık trakeal aspirat örneklerinden izole edilmiş olmasını desteklemiştir.

A. baumannii, ciddi antimikrobiyal direnç potansiyeline sahip, klinik olarak önemli, ağırlıklı olarak sağlık bakımı ile ilişkili organizmalar grubu olan ESCAPE organizmalarından biridir. Diğer ESCAPE organizmaları *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Clostridioides* (eski adıyla *Clostridium*) *difficile*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae*'dir (191). Karbapeneme dirençli *A. baumannii*, Dünya Sağlık

Örgütü'nün (DSÖ) etkili ilaç geliştirme için antibiyotiğe dirençli bakterilerin listesinde kritik öncelikli patojenlerden biri olmuştur (192).

1970'li yıllarda çoğu antibiyotiğe duyarlı iken, suşlar zamanla yeni direnç mekanizmaları geliştirmiş, özellikle antibiyotik direnç genlerinin elde edilmesi ve temelde antimikrobiyal inaktive edici enzimler ve dışa atım pompaları sayesinde dirençli *A. baumannii* suşları ortaya çıkmıştır (2,30). Dünya çapında 100'den fazla merkezden alınan sürveyans verilerinin analiz edildiği 2009 raporunda (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection; MYSTIC), *Acinetobacter* izolatları %61 seftazidime, %67 siprofloksasine dirençli bildirilmiştir (193). Bu sonuçlar, 2007 raporunda yayınlanan sonuçlarla kıyaslandığında önemli ölçüde artış olduğu görülmüştür (sırasıyla %34, %40 direnç) (194). Karbapenemler ve kombine tedaviye eklenen aminoglikozitlerin (tobramisin için) sık kullanımıyla direnç oranlarının karbapenemde %46-52'den %86-92'ye, tobramisinde %59'dan %92'ye yükselmesi ABD Sürveyans Network analizinde gösterilmiştir (195). Üç veya daha fazla antibiyotik sınıfında en az bir ajana duyarlı olmama olarak tanımlanan ÇİD ise, 2003-2005 yılları arasında %21'den, 2009-2012 yılları arasında %35'e yükselmiştir (196).

Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (ECDC) tarafından koordine edilen sadece Avrupa Birliği (AB)'ne üye ülkeleri kapsayan Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı olan EARS-Net 2019 raporunda 30 ülkeden veriler toplanmıştır. 2019 yılında, sürveyans ağı takibindeki antimikrobiyal gruplardan en az birine (florokinolonlar, aminoglikozitler veya karbapenemler) dirençli izolatların yüzdesi, rapor eden ülkeye bağlı olarak %0 ile %95,8 arasında değişmiştir. Genel olarak, en yüksek direnç yüzdeleri Orta doğu, Akdeniz ülkelerinden ve Güney-Güneydoğu Avrupa'dan bildirilmiştir. Rapora göre 2015-2019 yılları arasında *A. baumannii*'ye ait karbapenem direnci %32,1'den %32,6'ya, aminoglikozid direnci %32,4'ten %33'e çok az değişim gösterirken, florokinolon direncinde %38,5'ten %36,9'a gerileme gözlenmiştir. ÇİD *Acinetobacter* türlerinde ise %27,6'dan %29,7'ye yükselme rapora edilmiştir (197).

DSÖ Avrupa Ofisi tarafından yürütülen, AB üyesi olmayan Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı olan CAESAR-Net 2020 raporuna göre, 2019 yılı Türkiye kan ve BOS örneklerinde üreyen *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci %90, gentamisin/tobramisin direnci %80, amikasin direnci %70, siprofloksasin/levofloksasin direnci %91, ÇİD ise %80 olarak bildirilmiştir (198).

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde Savcı ve ark.'nın (199) araştırmasında klinik örneklerde *A. baumannii* direnç oranları; sulbaktam-ampisilin %95, piperasilin-tazobaktam %93, sefotaksim %97, seftazidim %93, sefepim %93, imipenem %66, meropenem %65, tobramisin %8, gentamisin %90, amikasin %65, trimetoprim-sulfametaksazol %66, siprofloksasin %92, tigesiklin %15 ve kolistin %3 olarak bulunmuştur. Özünel ve ark.'nın (200) yaptığı diğer çalışmada Çorum'da 2012-2013 yılları arasında DTA örneklerinde üreyen *A. baumannii* izolatları piperasiline %92, imipeneme %86, meropeneme %83, sefepime %85, gentamisine %77, amikasına %71, levofloksasine %85, trimetoprim-sulfametaksazole %47, tigesikline %3,7, kolistine %1,8 dirençli tespit edilmiştir. Cesur ve ark.'nın (201) 2017'de yaptığı çok merkezli çalışmada, YBÜ hastalarının çeşitli klinik örneklerinden toplanan *A. baumannii* izolatları imipeneme %94, meropeneme %90 oranında dirençli bulunmuş, izole kolistin direnci saptanmamıştır. İzolatların tamamı ÇİD olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda tüm izolatlar direnç paternine göre %45 AİD, %42 ÇİD, %13 duyarlı izolat olarak tanımlanmıştır. İzolatlarda en yüksek antibiyotik direnç oranları seftazidim %87, imipenem- meropenem %87, siprofloksasin %87 olarak bulunmuştur. Ayrıca diğer antibiyoklere direnç oranları gentamisin %74, amikasin %60, trimetoprim-sulfametaksazol %60, tigesiklin %2, kolistin %8 olarak bulunmuştur. 57 adet YBÜ izolatın 25'inin ÇİD, 26'sının AİD grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Verilerimiz süurveyans bildirileri ve yapılan çalışmalarla benzer olup, zamanla karbapenemler dahil birçok ilaca duyarlılığın önemli derecede azalmasına antibiyotiklerin sık ve uygunsuz kullanımının yol açtığı öngörülmüştür.

ÇİD *A. baumannii* suşlarının artmasıyla elimizdeki son etkili ajan olan kolistin klinik kullanımı da artmıştır. Kolistine direnç ilk olarak Çek Cumhuriyetinden bildirilmiş olup zamanla kolistin direncindeki artış Avrupa ve Amerika ülkelerinden de bildirmeye başlamıştır (202). Yunanistan'da Maraki ve ark.'nın (203) yaptığı çalışmada kolistin direnci %7,9 bulunurken, Amerikadan Zilberbeg ve ark.'nın (196) yaptığı çalışmada direncin 2006-2008'de %2,8'den 2009-2012'de %6,9'a yükseldiği bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan Çalışkan ve Kirişçi'nin (188) çalışmasında 2013-2018 yılları arası kolistin direnç ortalaması %3 olarak belirlenmiştir. Fakat bu çalışmada kolistin Vitek 2 Compact (bioMerieux, Fransa) cihazı ile test edilmiştir.

Kolistin antibiyotik duyarlılığı testi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Kolistin duyarlı izolatların, özellikle duyarlılık sınır değerine yakın bulunan sonuçların

agar dilüsyonu, disk difüzyonu ve gradyan difüzyonu gibi yöntemlerle yanlış duyarlı verildiği tespit edilmiştir. Bu sebeple CLSI ve EUCAST tarafından 2016 yılında yayınlanan ortak öneride, kolistin MİK testi için ISO-20776 SMD yönteminin kullanılması önerilmiş, SMD kolistin antimikrobiyal duyarlılık testi için referans test olarak belirlenmiştir (204).

Ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda kolistin duyarlılığı referans test SMD yöntemi ve otomatize test sonuçlarıyla karşılaştırılmış, otomatize sistemlerin BH ve ÇBH oranları bildirilmiştir. Vourli ve ark.'nın (205) yaptığı çalışmada 117 *A. baumannii* izolatında kolistin duyarlılığı SMD yöntemi referans alınarak Vitek 2 otomatize sistemi ve agar dilüsyon (AD) yöntemiyle test edilmiştir. Kolistine direnç SMD, AD, Vitek 2 sonuçlarına göre sırasıyla %24,8, %35,9, %16,2 oranında bulunmuştur. Çalışmada Vitek 2 sisteminin BH oranı ise %1,1 olarak çok düşük bulunurken, ÇBH oranı %37,9 olarak yüksek düzeyde saptanmıştır. Türkiye'den Tanrıverdi ve ark. (206) Vitek 2 sisteminin büyük hata oranını %1,1, çok büyük hata oranını da %55,8 tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre 98 *A. baumannii* izolatın 8'i SMD ile kolistine dirençli saptanmış, bu izolatların 6'sı Vitek 2 sistemde duyarlı bulunmuştur. Buna göre Vitek 2 *A. baumannii* izolatlarında ÇBH %75 olarak diğer çalışmalara kıyasla yüksek saptandı, BH ise gözlenmedi. Verilere bakıldığında Vitek 2 sisteminin kolistin dirençli *A. baumannii* izolatlarını belirlemede yetersiz kaldığı, özellikle MİK değeri sınıra yakın (2 mg/L) olan izolatların SMD ile doğrulanması gerektiği görülmüştür.

Birçok antibiyotiğe doğal dirençli olmakla beraber edinsel kazanımla tedavideki mevcut antibiyotiklere özellikle karbanemlere hızla direnç geliştirmesi nedeniyle, *A. baumannii* dünyada önemli bir patojen haline gelmiştir (113). *A. baumannii*, kromozomal veya plazmid kaynaklı β -laktamazlar, aminoglikozid modifiye edici enzimler, efluks pompaları, dış membran geçirgenliğinin değişikliği, hedef alanların modifikasyonları, gibi bir dizi antibiyotik direnç mekanizmasına sahiptir (113). Bu direnç mekanizmaları farklı sınıflardaki antibiyotikleri hedef alır ya da tek bir antibiyotik sınıfında direncin ortaya çıkmasını sağlamak için birkaç farklı mekanizma birlikte çalışabilir.

β -laktam antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu en önemli mekanizmalar, kromozom veya plazmid kontrolünde β -laktamaz enzimlerin üretilmesidir (118). Ambler sınıf A grubu GBSL'ler fenotipik olarak penisilin ve 3.-4. kuşak sefalosporin direnciyle ilişkilendirilmiştir (119-125). Sınıf B β -laktamazlar, blaIMP, blaVIM, blaNDM, blaGIM, blaSIM genleri varlığı ile ilişkilendirilmiş MBL'lerdir ve aztreonam hariç karbapenemleri ve diğer β -laktamları hidrolize ederler (4,126,127). MBL üreten izolatların artması, mortalitesi yüksek klinik enfeksiyonlara neden olması, dirençli izolatların tespitinde hızlı, kolay, ucuz ve güvenli bir şekilde uygulanabilen fenotipik testlerin kullanımını yaygınlaştırmıştır (207). MBL hem fenotipik hem de genotipik yöntemlerle saptanabilmektedir (207). Birçok yayında enzim varlığı fenotipik ve genotipik olarak ilişkilendirilmiştir (4). Bazı yayınlarda da fenotipik enzim varlığı saptanmış, fakat enzimi ekprese eden genler tespit edilmemiştir (208).

MBL pozitif *A. baumannii* suşları farklı coğrafyadaki çeşitli hastane laboratuvarlarında fenotipik testler ile araştırılmaktadır. MBL pozitiflik oranı %36'dan %99'a kadar değişmektedir (29,209-215). Ülkemizde yapılan çalışmalarda %44,1, %51,6 ve %69 olacak şekilde MBL pozitifliği saptanmıştır (216-218). Dünya çapında pozitiflik oranlarının geniş aralıkta değişkenlik göstermesi, çalışmalarda kullanılan fenotipik testin farklılıklarından ve hastane tedavi protokollerinin değişkenliğine bağlı olarak farklı antibiyotik seçimlerinden kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızda karbapenem dirençli suşların ise %83,5'inde MBL pozitifliği tespit edilmiştir. MBL pozitiflik oranı ülkemizden bildirilen oranların üzerinde iken, diğer ülkelerin araştırma sonuçlarıyla benzer bulunmuştur. Ayrıca fenotipik test sonuçlarının genotipik testlerle korfirme edilememesi çalışmayı sınırlandırmaktadır.

Karbapenem direncinde en sık görülen direnç mekanizması Sınıf D β -laktamazlar veya oksasilineazlardır. *Acinetobacter* türlerinde OXA-51 grubu doğal β -laktamazların yanı sıra edinsel CHDL'lar da tanımlanmıştır. OXA-51 doğal β -laktamazlar *A. baumannii* için genotipik bir belirteç olup ISAbal gibi IS elemanları varlığında eksprese edilerek karbapenem direncinde rol oynarlar. CHDL grubu OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 ve OXA-235 oksasilineazlardan *A. baumannii*'de en yaygın görülen, %56 OXA-51 ile homoloji gösteren OXA-23'tür. Kromozomal veya plazmid genleri tarafından kodlanan OXA-23 benzeri enzimler, ISAbal IS varlığı ile antibiyotiklere direnci artırır. OXA-24/40 benzeri enzimler kromozomal veya plazmid, OXA-58 ise genellikle plazmid kökenli bir gen tarafından kodlanır ve IS elementleriyle

ilişkilidir (132-135). Sınıf D β -laktamaz tespitinde henüz önerilen bir fenotipik yöntem yoktur ve genotipik yöntemlerle tespit edilmektedir (207).

Oksasilinazlar ilk 1985'te ARI-1 olarak bildirilmiş, 2000 yılına gelindiğinde genetik testler sonucu OXA-23 olarak adlandırılmıştır (5). Artan karbapenemaz direnci ile OXA-23 pozitifliği Avrupa, Orta Doğu ülkeleri, Güney Amerika ve Avustralya'da yapılan araştırmalarda tespit edilmiştir. Kısa sürede Birleşik Krallık, Fransa, Çin, Kore, Kolombiya'daki hastanelerden OXA-23 pozitif *A. baumannii* izolatları salgın etkeni olarak bildirilmiştir (219). Nowak ve ark.'nın (220) yaptığı çalışmada İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan toplanan 65 *A. baumannii* izolatının %80'i OXA-23, %4,6'sı OXA-40, %1,5'i OXA-58 ve %1,5'inin OXA-23 ve OXA-58'i birlikte pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmadaki izolatların 22'si AİD ve 20'si TİD olarak bildirilmiştir. Körfez ülkelerini (Suudi Arabistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Umman, Katar, Bahreyn ve Kuveyt) kapsayan çok merkezli büyük bir araştırmada 117 *A. baumannii* izolatının tamamı blaOXA-51, 107 izolatın blaOXA-23, beş izolatın blaOXA-24 genini taşıdığı saptanmıştır. BlaOXA-58 geni izolatlarda negatif bulunmuştur (221). Güney Afrikada iki ayrı hastanenin toplam 72 *A. baumannii* izolatıyla yapılan bir çalışmada, bir hastanenin suşlarında OXA-23 %96 oranında pozitif bulunurken, diğer OXA genleri negatif bulunmuştur. Diğer hastane suşlarında ise OXA-23 %91 oranında, OXA-58 %4 oranında pozitif saptanmıştır (222). Amudhan ve ark.'nın (223) yürüttüğü çalışmada 116 *A. baumannii* arasından 99 izolatta OXA-51, 95 izolatta OXA-23, 89 izolatta ise her iki gen birlikte pozitif bulunmuştur. İki izolatın OXA-24, aynı bu iki izolattan birinin de OXA-51 ve OXA-58 genlerini taşıdığı belirlenmiştir. Correa ve ark.'nın (224) araştırmasında 2008-2010 yılları arasında Kolombiya'da 14 hastaneden izole edilen 121 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolat değerlendirilmiş, 118 izolat OXA-51 ve OXA-23 pozitif, 3 izolat ise yalnız OXA-51 pozitif olarak tespit edilmiştir. Almanya'daki bir çalışmada 70'i *A. baumannii*, biri *A. pittii* olan karbapenem dirençli izolatların 66 (%93)'sı OXA-23 taşıdığı, OXA-24 ve OXA-58 genlerinin hiçbirini taşımadığı saptanmıştır (225). İran'da Tafreshi ve ark.'nın (226) 2016-2018 yıllarında yanık hastalarında izole ettikleri 84 *A. baumannii* suşlarında OXA-51, OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 genleri sırasıyla %100, %53,6, %41,7 ve %30,9 pozitif olarak bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Gür ve ark. (227) 2006 yılında SENTRY Antimikrobiyal sürveyans programı kapsamında Ankara ve İstanbul'dan elde edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarını çalışmışlardır. Çalışmada Ankara'daki 18

suştan 17'si blaOXA-58 geni pozitif ve aynı klona aitken, 26 izolat (25'i İstanbul'dan ve biri Ankara'dan) blaOXA-23 geni pozitif olup aynı veya benzer klonlarda bulunmuştur. Çiftçi ve ark (228) çeşitli illerdeki (Afyonkarahisar, Ankara, Bolu, Elazığ, Erzurum, Isparta, İstanbul, Kahramanmaraş, Konya, Sakarya, Van) 13 üniversite ve devlet hastanesinden 2008-2011 tarihleri arasında izole edilen toplam 834 karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatlarını araştırmışlardır. Çalışmada toplam blaOXA-23/OXA-51 ve blaOXA-58 gen pozitiflikleri sırasıyla %53,7 ve %12,5 olarak tespit edilmiştir. blaOXA-23 ve blaOXA-58 gen pozitiflikleri ise sırasıyla %74,4 ve %17,3 olarak saptanmıştır. Yirmi beş izolatın hem blaOXA-23 hem de blaOXA-58 geni taşıdığı belirlenmiştir. blaOXA-24 hariç, karbapeneme dirençli izolatların tamamında OXA tipi genler saptanmıştır. Telli ve ark. (229) karbapenem dirençli izolatların tamamında OXA-51 geni, 18 (%42)'inde OXA-23 grup, 5 (%12)'inde OXA-58 grup direnç geni pozitif bulunurken, OXA-24 grup direnç geni taşıyan izolat bulunmamıştır. Yalnız OXA-51 direnç geni olan olan 23 suş bulunmuştur. Dört suşta OXA-23 ve OXA-58 birlikte pozitif saptanmıştır.

Çalışmamızda toplam izolatların 93 (95%)'ü blaOXA-51 gen grubu, 84 (%86)'ü blaOXA-23 gen grubu pozitif olarak belirlenmiştir. Karbapenem dirençli 85 izolatın 84 (%98,8)'ünün blaOXA-23 gen grubu ve blaOXA-51 gen grubuna sahip olduğu saptanmıştır. blaOXA-24/40 ve blaOXA-58 gen grubu pozitifliği ise izolatlar arasında tespit edilmemiştir. MBL negatif saptanan karbapenem dirençli 13 izolatın blaOXA-23 gen grubu, blaOXA-51 gen grubu taşıdığı saptanmıştır. Sonuçlarımız literatürle benzer olup dirençli ÇİD ve AİD gruplarında karbapenem direncinin belirleyicisi olarak OXA-23 pozitifliği ilişkili bulunmuştur. Çalışmamızda blaOXA-51 grup enzimleri saptanmayan karbapenem dirençli bir izolat ve duyarlı 4 izolat belirlenmiştir. BlaOXA-51 genleri, *A. baumannii* izolatlarının en azından büyük çoğunluğunda mevcut olduğu açık olmasına rağmen, bu türün tüm izolatlarında mevcut olup olmadıkları konusunda bazı tartışmalar vardır (230). Tutarlı bir şekilde bulunurlarsa ve aynı zamanda bu türe özgülse, *A. baumannii*'yi tanımlamak için basit ve kullanışlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir (231).

OXA-51 doğal β -laktamazlar ve OXA-23 grubu β -aktamazların ISAbal gibi IS elemanları varlığında eksprese edilerek karbapenem direncinin artmasında etkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bahador ve ark.'nın (178) yaptığı çalışmada 88 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının blaOXA-51 ve blaOXA-23 genlerin

üzerinde ISAb1 varlığı, yüksek oranda karbapenem direnci ile ilişkili bulunmuştur. İzolatların tek başına blaOXA-51 geni, blaOXA-51 ya da blaOXA-23 genleri barındırması, karbapenem direncinde belirgin bir fark oluşturmamıştır. Genel olarak, ISAb1 pozitif izolatları özellikle doripeneme karşı yüksek oranlarda karbapenem direnci göstermiştir. Bu yüksek direnç oranına rağmen, hem ISAb1 hem de ISAb4 barındıran blaOXA-23/blaOXA-51 pozitif izolatların %13'ü imipeneme duyarlı bulunmuştur. ISAb1 pozitif izolatları arasında, bu elementler izolatların %60 (31/52)'inde blaOXA-51 genin aksında insersiyon yapmışken, blaOXA-23 geninin sadece %31'inde ISAb1 tespit edilmiştir. Sadece blaOXA-51 geni içeren 13 (%15) CRAB izolatının tamamında ISAb1 elementleri bulunmuştur. İlginç bir şekilde, test izolatları karbapenem dirençli blaOXA-51 veya blaOXA-23 pozitif izolatların %32 (27)'inde ISAb1 veya ISAb4 elementlerine rastlanmamıştır. Turton'un (7) yaptığı çalışmada da yalnızca blaOXA-51 pozitif izolatlar arasında, ISAb1 elementi barındıran izolatlar karbapenem dirençli bulunmuştur. Karbapenem dirençli tüm izolatların blaOXA-23 pozitif olup, ISAb1 sekansı taşıdığı saptanmıştır.

Türkiye'den IS elementleriyle ilgili makale sayısı çok az olup, ISAb1 birkaç çalışma ve tez çalışmasında bildirilmiştir. Özkul ve Hazirolan'ın (232) çalışmasında karbapenem dirençli izolatların %87,5'inde blaOXA-23 geni pozitif bulunmuştur. Toplam ISAb1 insersiyon geni 22 (%50) izolatta tespit edilmiştir. blaOXA-23 pozitif 18 (18/28) izolatta ISAb1 genin üst bölgesinde saptanmıştır. blaOXA-23 ve ISAb1/blaOXA-23 pozitif tüm suşlar karbapenem dirençli olarak belirlenmiştir. Çiçek ve ark.'nın (233) araştırma sonuçlarına göre bir ISAb1 elementi, suşların %80'inde blaOXA-51 geninin yukarısında yerleşmiş olduğu ve bu kombinasyonun yüksek düzeyde karbapenem direnci sağladığı gösterilmiştir. ISAb1 66 suшта hem blaOXA-51 hem de blaOXA-23 ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızda ISAab1/blaOXA-51 geni tüm izolatların 89 (91%)'unda, ISAb1/blaOXA-23 geni ise izolatların 84 (%86)'ünde pozitif olarak saptanmıştır. Suşların 84 (%86)'ünde ISAb1/blaOXA-51 ve ISAb1/blaOXA-23 birlikte saptanmıştır. Karbapenem dirençli izolatların %98,8'inde blaOXA-51, blaOXA-23 ve bu genlerle ilişkili ISAab1/blaOXA-51, ISAb1/blaOXA-23 pozitif olarak bulunmuştur. Yalnız blaOXA-51 geni taşıyan 9 izolatın 5'i ISAb1/balOXA-51 pozitif olmasına rağmen imipenem-meropenem duyarlı bulunmuştur. ISAb1/blaOXA-51 ve ISAb1/blaOXA-23 genleri karbapenem dirençli ÇİD ve AİD gruplarında anlamlı

derecede yüksek bulunmuştur. Araştırma verilerimiz örnek çalışmalarla benzer olup, ülkemizden bu alanda literatüre güncel veriler sunmaktadır.

Tedavide kullanılan antimikrobiyallerin sınırlı hale gelmesi, ÇİD *A. baumannii*'nin epidemiyolojik açıdan takibi ve bunun için sürveyans çalışmaları gerekmektedir. Bu amaçla laboratuvarlarda dirençli izolatların klonal yakınlığını incelemek, salgın kaynağını belirlemek, yayılımı kontrol altına alabilmek amacıyla uygulaması kolay, hızlı, güvenilir, ayırt ediciliği yüksek olarak belirlenen REP-PCR sıklıkla kullanılmaktadır (164).

Shoja ve ark.'nın (234) yaptıkları çalışmada, 124 klinik *A. baumannii* izolatında karbapenem direnci genlerini ve dirençli izolatların klonal yakınlığını araştırmışlardır. İzolatların imipenem, meropenem, kolistin ve tigesikline direnç oranları sırasıyla %78,2, %73,4, %0,8 ve 0 olarak bulunmuştur. MBL üretimi çift disk sinerji testi ve E-testi ile araştırılmış, sırasıyla %42,3 ve %79,4 oranında pozitif bulunmuştur. Tüm izolatlar blaOXA-51 pozitifken, karbapenem dirençli izolatlarda blaOXA-23 %85,6 ve blaOXA-24/40 %6,2 pozitif olarak saptanmıştır. blaOXA-58 ve MBL ilişkili blaVIM, blaIMP, blaSIM tespit edilmemiştir. Karbapenem dirençli izolatlar REP-PCR ile 6 genotipe (A-F) ayrılmıştır. Tüm klonların YBÜ'den yayıldığı belirlenmiştir. Genotip A %30,9 oranında baskın klon olarak bulunmuş, Genotip B ve Genotip C'de sırasıyla %28,9, %26,8 yüksek oranlarında saptanmıştır. 27 karbapenem duyarlı izolat ise diğer bant profilleriyle benzerlik göstermeyip tek patern olarak bulunmuştur. Zeighami ve ark.'nın (180) YBÜ'den izole ettikleri ÇİD *A. baumannii* izolatlarının REP-PCR ile klonal yakınlığı ve bu klonların biyofilm oluşumu ile arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışılan izolatların tamamı imipeneme dirençliyken, %91'i de AİD olarak saptanmıştır. Çalışmada 8 (A-H) tip, 21 subtip belirlenmiştir. 21 subtipin 14'ünde kümelenme gözlenirken, 7'si tek bant paterni göstermiştir. A1 ve C1 kümelenmesi *A. baumannii* izolatlarında yaygın bulunmuştur. Biyofilm ilişkili *bap* geni, REP tip A'da anlamlı yüksek bulunurken, diğer genler ile REP tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Meshkat ve ark.'nın (235) yaptığı başka bir çalışmada da REP-PCR yöntemiyle izolatlar 10 farklı kümeye (A-J) yayılmış, 8 izolat tek patern göstermiştir.

Ülkemizde *A. baumannii* ile ilgili hastane kaynaklı salgın takibinde REP-PCR moleküler temelli epidemiyolojik bildirim sınırlı sayıda yapılmaktadır. Sarı ve ark.'nın (236) yürüttüğü bir çalışmada 62 ÇİD *A. baumannii* izolatı araştırılmıştır. İzolatların

%100'nün imipeneme dirençli olduğu, tamamının blaOXA-23 ve blaOXA-51 genleri taşıdığı belirlenmiştir. blaOXA-40 ve blaOXA-58 hiçbir izolatta bulunmamıştır. REP-PCR yöntemiyle isolatların %77,4'ü baskın klon küme A olacak şekilde benzerliklerine göre dört ayrı kümelenme göstermiştir. Küme A'yı oluşturan isolatların %58,3'ünün cerrahi yoğun bakım (CYB) servisinde yatan hastalardan izole edildiği, salgının muhtemelen CYB servisindeki ortak bir atadan kaynaklandığı ve diğer servislere buradan yayıldığı düşünülmüştür. Ergin ve ark. (237) kan kültüründen izole ettikleri 100 *A. baumannii* suşunu REP-PCR ile değerlendirdiklerinde, suşların %62'sinin 13 paterne ayrıldığını ve büyük çoğunluğunun patern 1 içinde bulunduğunu tespit etmişlerdir. Çiçek ve ark. (233) çeşitli örneklerden izole ettikleri 101 *A. baumannii* izolatinin 12 farklı genotipe dağıldığını, Genotip 6 ve 9'un (%19,8 / n=20) en yaygın gruplar olduğunu belirlemiştir. Çalışmada farklı REP genotiplerinde aynı antibiyotik duyarlılık paterni ve direnç genlerinin bulunmasıyla, direncin horizontal geçebileceği öne sürülmüştür.

Çalışmamızda, REP-PCR bant paternine göre 7 genotip (A-G) ve 21 subtip klasifiye edilmiştir. 21 subtip arasında, 8 farklı kümelenme gözlenirken, 13 izolat diğer isolatlarla benzerlik göstermeyerek tek patern olarak belirlenmiştir. İzolatların %53'ünde Genotip D saptanmış ve klon hastanemizin endemik genotipi olarak saptanmıştır. Genotip D isolatlarının, YBÜ'lerin %59'u olmak üzere servisler ve poliklinikler dahil tüm birimlerden izole edilmesi, tek klondan yayılım olduğunu göstermektedir. Genotip D ÇİD, AİD ve duyarlı gruplarda sırasıyla %49, %68, %15 oranında tespit edilmiştir. Genotip A isolatlarının hiçbir duyarlı grupta saptanmamıştır. Diğer sporadik genotiplerin %70'i duyarlı grupta bulunduğu ve isolatların farklı birimlerden alınan örneklerden izole edildiği belirlenmiştir. Gruplar arası fark değerlendirildiğinde Genotip D'nin AİD grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Genotip D grubundaki isolatlar antibiyotik duyarlılık testlerinde seftazidim, imipenem, meropenem ve siprofloksasine %96, gentamisine %94, amikasinine %79, SXT'ye %62, tigesikline %2, kolistin %13 dirençli bulunmuştur. Kolistin direncinin toplam orana göre (%8) yüksek bulunması, YBÜ'lerde kolistin kullanımının fazla olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Kolistin ve tigesiklinin, hastanemiz *A. baumannii* enfeksiyonları tedavisinde kullanılabilecek antimikrobiyaller olduğu görülmektedir. MBL pozitiflik oranı Genotip D'de %77 olup, MBL pozitifliği Genotip D'de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Karbapenem

direnci ilişkili OXA-51, OXA-23, ISAb1/OXA-51, ISAb1/OXA-23 genleri ile Genotip D arasında anlamlı fark bulunmuştur. Genotip B ve Genotip C'nin tümünün duyarlı izolatlardan oluştuğu ve OXA-23 ve ISAb1/OXA-23 genleri taşımadığı saptanmıştır. Biyofilm ilişkili genler olan *csuE* ve *OmpA* tüm genotiplerde farklı oranlarda tespit edilirken, *csuE* ve Genotip D arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Fakat genotipler ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

A. baumannii'nin dünya çapında ÇİD birkaç soyunun görünürdeki üstünlüğü nedeniyle, izolatlarının yerel, ulusal ve de uluslararası küresel ölçekte yayılma şeklini ve epidemiyolojisini aydınlatma gereği duyulmuştur. Bu amaçla özellikle Avrupa salgılarından sonra *Acinetobacter* türleri için IC başlığı altında ICI, IC II, IC III (EU I, EU II, EU III) klonal soyları tanımlanmıştır. Baskın klonal soylar direnç ve virülans genlerin edinimi yeteneği ile ön plana çıkmaktadır (165,238).

Higgins ve ark.'nın (239) yaptığı dünya çapındaki bir araştırmada imipenem dirençli 492 *A. baumannii* izolatı çalışılmış, suşların imipenem direnci, intrinsik blaOXA-51 geninin üst kısmına ISAb1 segmentinin varlığı veya edinilmiş karbapenemaz blaOXA-23, blaOXA-40 veya blaOXA-58 ile ilişkili bulunmuştur. İzolatlar REP-PCR, sekans tip multiplex PCR ve PFGE yöntemleriyle ICI, II ve III içeren sekiz farklı küme halinde gruplanmıştır. IC II, en çok (246 izolat) ve en yaygın görülen klon olarak belirlenmiştir (ABD, pan-Avrupa, İsrail, Asya, Avustralya ve Güney Afrika). Nowak ve ark. (220) Yunanistan, İtalya ve İspanya'da 15 farklı hastaneden %97 imipenem dirençli buldukları *A. baumannii* izolatlarında, karbapenem direnç genlerini, hastane içi genotiplerini ve uluslararası klon tipini araştırmışlardır. Çalışmada IC II'nin Avrupa'da baskın klonal soy olduğu REP-PCR ile konfirme edilmiş, epidemik AİD/TİD *A. baumannii* klonunun bu ülkelerde yayılmaya devam ettiği bildirilmiştir. İran'da yanık hastalarında yapılan çalışmada 37 ÇİD *A. baumannii* izolatı değerlendirilmiş, *A. baumannii* enfeksiyonlarında ÇİD ve karbapenem dirençli IC I (18/37; %48.6) ve II'nin (18/37; %48,6) yaygınlığı gösterilmiştir (240).

Ülkemizdeki çalışmalarda Metan ve ark. (241) tarafından identifiye edilen 98 *A. baumannii* izolatı araştırılmış, farklı sayıda izolat içeren 8 ayrı küme grubu (A, C, D, E, G, H, J, L) ve 3 tek patern gösteren (B, F, I) genotip grubu saptanmıştır. Bu çalışmada Genotip D ve Genotip E'nin, IC II klonlarından oluştuğu; Genotip J'nin, IC I klonundan oluştuğu gözlenmiştir. A, C, G ve L genotipleri hiçbir IC klonuyla tanımlanmamıştır. *Acinetobacter* izolatlarının %99'u ÇİD ve %77'si AİD olarak bulunmuş, karbapenem

dirençli 75 izolat blaOXA-58 ya da ISAb1/blaOXA-51 ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmada çok sayıda ÇİD ve AİD *A. baumannii*'nin hastanede endemik olduğunu bildirilmiştir. Türkiye ve Azerbaycan'ın yürüttüğü çok merkezli bir çalışmada ise *A. baumannii*'nin karbapenem direnci ilişkili IC klonlarının yayılımı araştırılmıştır. 11 hastaneden 112 izolat toplanmış, izolatların tamamının blaOXA-51, 75 (%67)'nin blaOXA-23, 7 (%6,2)'sinin blaOXA-58, 5 (%4,5)'nin ise blaOXA-24/40 genlerini taşıdığı tespit edilmiştir. İzolatlar 15 farklı küme grubu ve 8 tek patern gösteren klonlar olarak genotiplendirilmiştir. Baskın küme D izolatları Türkiye'nin yedi farklı bölgesinde tespit edilirken, küme F izolatları kuzey ve doğu bölgelerinde saptanmıştır. EU klon I, Antalya, İstanbul, ve Erzurum örneklerinden üç izolatu içeren J kümesinde gruplanırken, EU klon II ise Kayseri ve Diyarbakır örneklerinden izole edilen 15 izolatta gruplanmıştır (242).

Çalışmamızda 7 farklı klon grubu tespit edilmiş olup, IC II izolatların 71 (%73)'ini oluşturarak hastanemizin uluslararası baskın klonu olarak tanımlanmıştır. IC II ve IC I klon gruplarının tamamı ÇİD ve AİD izolatlarından oluşurken; G5, G6, G8, G13 klon grup izolatlarının tümü ve IC tanımlanamayan grup izolatlarının %80'i duyarlı izolatlardan oluşmuştur. IC'lerin genotiplere dağılımı incelendiğinde IC II'nin büyük çoğunluğu (49/71) Genotip D'ye gruplanırken, 18'i Genotip E'ye, 3'ü Genotip F'ye, 1'i de Genotip G'ye dağılım göstermiştir. Genotip D ve IC II grupları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. IC I klonunun tamamı ise Genotip A'ya gruplanmıştır. IC II ve IC I klon gruplarının %100'ünde OXA-51, OXA-23, ISAb1/OXA-51, ISAb1/OXA-23 genleri pozitif olarak saptanmıştır. Çalışma sonuçları dünya ve Türkiye verileriyle uyumlu bulunmuş, IC II hastanemiz *A. baumannii* salgınlarında karbapenem direnci ile anlamlı ilişkilendirilen IC olarak belirlenmiştir.

A. baumannii'nin direnç kazanımı ile ilgili araştırmalarda ve dirençli suşların takibi için uygulanan epidemiyolojik analizlerde plazmid profilleri değerlendirilerek çalışmalar yapılmıştır. Seifert ve ark.'nın (243) bir çalışmasında *Acinetobacter* türleri plazmid DNA profiline göre identifiye edilmiştir. Yine aynı grubun bir başka çalışmasında dokuz hastane salgınından izole edilen 103 *A. baumannii*, PFGE yöntemi ve plazmid analizi ile karakterize edilmiştir. Salgın suşlarında PFGE ile sekiz farklı patern ve beş olası varyant tanımlanırken, plazmid analiziyle altı farklı, iki ilişkili patern tanımlanmış ve bir salgın suşunda ise plazmid tespit edilememiştir. Çalışmada *A. baumannii* 'nin epidemiyolojik olarak tiplendirilmesinde PFGE mükemmel ayırt etme

gücü göstermiştir. Plazmid analizinin de iyi tanımlanmış hastane salgın izolatlarında uygun maliyetli bir yöntem olarak ilk adımda kullanılabileceği belirtilmiştir (244).

Patojenik bakterilerin antibiyotik direnç genlerinin yayılımında, horizontal gen aktarımında bir araç olarak plazmidler önemli role sahiptir. Yapılan bir araştırmada YBÜ'den alınan klinik örneklerden elde edilen 272 izolatın 36'sı *Acinetobacter* türlerine ait olup, bunların 28'i *A. baumannii* olarak tanımlanmıştır. *Acinetobacter spp*'nin %90'dan fazla izolatı minimum 23 antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. *A. baumannii* izolatları %80 üzeri β -laktam antibiyotiklere dirençli belirlenmiştir. Tüm *A. baumannii* izolatlarında çoklu plazmid profili görülmüştür. Dirençli bulunan 26 izolatta 1 ila 5 arasında, 4-50 Kb moleküler boyutlara sahip plazmidler saptanmıştır. *A. baumannii*'nin üç izolatında, akridin turuncusu ve etidyum bromür gibi geleneksel küreme ajanları kullanılarak plazmid eliminasyonu sağlanmış ve bu kürlenmiş izolatlar, orijinal izolatlarla kıyasla çok düşük MİK değerleri göstermiştir. Çalışmada kürlenmiş suşlarda plazmidin fiziksel kaybı, antibiyotik direnç belirteçlerinin plazmid kaynaklı aktarılabileceğini göstermiştir (245).

Salgado- Camargo ve ark.'nın (166) yaptığı bioinformatik çalışmada, GenBank veri tabanından (NCBI) *A. baumannii*'ye ait 173 plazmid profili analiz edilmiştir. Plazmid boyutlarının 1,1 Kb ile 216,7 Kb aralığında değiştiği ve bir izolatta 6 adete kadar plazmid bulunduğu belirlenmiştir. Değerlendirilen plazmidlerin sadece %35,2'sinin direnç geni taşıdığı bulunmuştur. Bu plazmidlerin 38 tanesinin 1 direnç geni, 15 tanesinin 2 direnç geni ve 8 tanesinin de 3 veya daha fazla direnç geni taşıdığı tespit edilmiştir. Plazmidlerin %60,6'sının aminoglikozidlere, %49,1'inin β -laktam antibiyotiklere, %26,2'sinde sülfonamid grubu antibiyotiklere, %14,7'sinin ise makrolid grubu antibiyotiklere doğrudan sorumlu genleri taşıdığı saptanmıştır. Analizde belirlenen 23 plazmid soyundan sadece 13'ünde antibiyotik direnç genlerine sahip üyeler bulunmuştur. Bir plazmid soyunun yalnızca birkaç üyesinin direnç genlerine sahip olduğu ve bu durumun genlerin soyun ortaya çıkmasından sonra ikincil kazanımla elde edildiği düşünülmüştür. *A. baumannii*'de karbapenem direncini oluşturan en baskın mekanizma, plazmidlerde kodlanan OXA tipi β -laktamazların aktivitesidir. Analiz edilen plazmidlerde, blaOXA genlerini taşıyan üyelere sahip yedi soy bulunmuştur. LN_1 soyunun yedi üyesinin ve LN_5'in iki üyesinin blaOXA-23 genlerini, hepsi Meksika izolatlarından elde edilen LN_6'nın dört üyesinin blaOXA-72 genlerini, LN_11 ve LN21'nin tüm üyelerinin blaOXA-58 genlerini taşıdığı bulunmuştur. LN_14

soyunun bir üyesinin ve LN_17'den birer üyenin de blaOXA-24 genlerini taşıdığı belirlenmiştir. Çalışmada *A. baumannii* plazmidlerinin az sayıda plazmid soyunda dağılım gösterdiği ve bazı yaygın plazmidlerin, konjugasyon veya plazmid mobilizasyonu ile bağlantılı genlere sahip olmadığı bulunmuştur.

Çalışmamızda tüm *A. baumannii* izolatlarının %73,4'ünün plazmid taşıdığı bulunmuştur. CRAB izolatlarının %74 (63/85)'ünde ve duyarlı izolatların %69 (9/13)'unda plazmid varlığı tespit edilmiştir. CRAB izolatlarında plazmidle geçtiği bilinen blaOXA-23 pozitif bulunurken, duyarlı izolatların hiçbirinde blaOXA-23 saptanmamıştır. Bakteri kökenlerinin 1,3-50,2 Kb boyut aralığında değişen, 1 ila 6 plazmid taşıdığı ve bu plazmidlerin izolatlar arasında heterojen dağıldığı gözlenmiştir. Kolistin dirençli suşların tamamının (8/98) plazmid taşıdığı, ancak izolatların plazmid profillerinin sadece iki izolatta aynı olduğu, diğer izolatlarda farklı patern gösterdiği tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, tüm IC I'ler (12/98) Genotip A'da gruplanmış ve bu izolatların plazmid profilleri arasında %50 benzerlik görülmüştür. Genel olarak, duyarlı ve dirençli izolatların genotip, IC ve plazmid profilleri arasında ilişki görülmemiştir. Bu sonuçlar, *A. baumannii* plazmidlerinin tamamının spesifik direnç genleri taşımadığını ve plazmid konjugasyonunun sınırlı olduğunu desteklemektedir. Ayrıca kolistin dirençli suşların tamamının plazmid taşıması, plazmid aracılı direncin olabileceğini düşündürmüştür, fakat şuan için *A. baumannii*'de plazmidal (mcr genleri) direnç tanımlanmamıştır (246). Çalışmamız ülkemizde bu alanda çalışılmış ilk araştırma olup, literatüre birçok yeni bilgi katmıştır.

Bakterilerin sağkalımını, patojenitesini artıran önemli virülans özellikleri ve doğal ya da edinsel sahip oldukları direnç mekanizmaları, mikroorganizmanın fenotipik ve genotipik özelliklerini belirlemekte, çevreye ve konak yanıtına uyumunu kolaylaştırmaktadır. *A. baumannii*'de antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi birçok mekanizma ile oluşmaktadır. Çeşitli mekanizmalar ile gelişen direnç, beklenmeyen fenotipik ve genotipik değişikliklere sebep olabilmektedir. Bakterilerde antibiyotiklere karşı oluşan bu adaptasyon “biyolojik uyum bedeli (biological fitness cost)” olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik uyum bedeli bakterilerde üreme yeteneğinde azalma ile ilişkilendirilmekte, antibiyotik direnci kazanmış bakteri sahip olduğu tüm virülans özelliklerini yeterince gösterememektedir. Biyolojik uyum bedeli olmasa da bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanabileceği bilinmekle birlikte *Acinetobacter* için

hem direnç mekanizmaları hem de virülans özelliklerinin aydınlatılmasını sağlayacak çalışmalar gerekmektedir (80,88).

Önceki çalışmalarda *E. coli* ve *Salmonella enterica*'da kazanılan kinolon direncinin biyolojik uyum bedeli olarak bakterilerin üremesini ve virülansını azalttığı gösterilmiştir (247). *Acinetobacter* türlerinde biyolojik uyum bedeli ile ilgili süreci aydınlatmak çok az çalışma bulunması, konu ile ilgili bilgilerimizi sınırlandırmaktadır. Bir çalışmada *A. baumannii* ATCC 19606 suşunun kolistin dirençli mutanlığı (RC64), dirence karşı oluşan bakteriyel uyum sürecinde bakteri üremesini yavaşlatmış, virülansı azaltacak OMP'lerde, metabolik enzimlerinde değişiklikler meydana getirmiştir (248). Kang YS ve ark.'nın (249) yaptığı çalışmada ise rifampisin dirençli *A. baumannii* suşlarının duyarlı suşlara kıyasla, QS kaybı, swimming ve swarming hareketlerinde azalma, fimbria ekspresyonunda zayıflık gibi virülans özelliklerinde azalma görülmüştür. Çalışma sonucunda bakterilerde farklı antibiyotiklere karşı gelişen direncin bakteri genotipik ve fenotipik özelliklerinin değişmesine neden olabileceği bildirilmiştir.

Acinetobacter türlerinin yaklaşık üçte birinde bulunan K1 tipi polisakkarit kapsül yapısı bakterinin kompleman aktivasyonunu engelleyip fagositozdan kaçmasını sağlayan önemli bir virülans faktörüdür (68). Geisinger ve ark.'nın (66) K lokusu taşıyan izolatları kloramfenikol ve eritromisin'nin MİK değerleri altında bu antibiyotiklere maruz bırakıldığında K lokus ekzopolisakkarit üretimini arttığı, antibiyotiklere direnç geliştiği görülmüştür. İndükleyen antibiyotiğe karşı hiperekzopolisakkarit üretiminin mutasyonel olmadığı ve geri dönüşümlü olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda M tipi koloni oluşumu gösteren kapsüllü iki izolat tespit edilmiştir. İzolatların ikisi de ÇİD grupta saptanmıştır. Koloni tipi ile direnç grupları arasında ilişki bulunmamıştır. M tipi kapsüllü izolat sayısının az olması, kapsül sentezinin antibiyotik stresine bağlı geri dönüşümlü olmasına ve dirence bağlı uyum sürecinde virülans özelliğini kaybetmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

A. baumannii'nin diğer bir önemli virülans özelliği hemolitik aktivite göstermesidir. Yapılan çalışmalarda bakteri hemoliz yeteneği ölçümünde farklı türde kan ürünü kullanımı nedeniyle hemoliz sonuçlarında farklılıklar görülmüştür. Dahdouh ve ark.'nın (250) yaptığı çalışmada 59 dirençli *A. baumannii* klinik izolatının %5'lik

koyun kanlı agarda hemoliz aktivitesi %54 oranında bulunmuştur ve hemoliz türü hepsinde α -hemoliz olarak tespit edilmiştir. Yine Dahdouh ve ark.'nın (251) yaptığı farklı bir çalışmada %90 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında hemoliz oranı %48 olarak bulunmuş, izolatların biri β -hemoliz gösterirken diğerlerinde α -hemoliz saptanmıştır. İran'da Aliramezani ve ark.'nın (252) üç farklı hastaneden topladığı 100 *A. baumannii* izolatının ise %5'lik *Brucella* kanlı agarda %47 oranında α -hemoliz oluşturduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda koyun kanlı agarda test ettiğimiz izolatların %64'ü α -hemoliz türünde aktivite gösterirken, sadece iki izolatta ise β -hemoliz aktivitesi saptanmıştır. AİD grubu ve IC II klonal soy ile α -hemoliz grubu arasında anlamlı ilişki gözlenmiştir. Hemolitik aktivite sonuçları yapılan çalışmalarla benzer olarak bulunmuştur.

Acinetobacter cinsi geçmişte flagella kaybına bağlı olarak hareketsiz olarak bilinmekteyken yakın zamanda fimbria varlığı gösterilmiştir. Tip IV pili sistemi *A. baumannii*'nin yarı katı ve bazı abiyotik yüzeylerde bakteri motilitesini sağlamaktadır. Pililer, bakterinin hızla yayılmasını, hücrel yüzeylere bağlanmasını ve kolonize olmasını kolaylaştırarak önemli bir virülans özelliği haline gelmiştir.

Bakteriyel hareketlik, yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa* ve *Dichelobacter nodosus* gibi farklı türlerde artan virülansla ilişkilendirilmiştir (253,254). 2011 yılında Avustralya'da Eijkelkamp ve ark.'nın (89) çalışmasında 52 klinik *A. baumannii* izolatında twitching ve swarming hareket yeteneği araştırılmış, 17 izolatta twitching hareketi, 3 izolatta swarming hareketi tespit edilmiştir. IC I suşlarının tamamında twitching hareketi görülmüştür. Swarming hareketi ise ICI, ICII ve IC III'e ait olmayan farklı suşlarda saptanmıştır. Ayrıca bazı izolatlarda twitching ve swarming hareketinin yalnızca birinin pozitif olması nedeniyle bu iki hareket türünün birbiri ile ilişkili olmayan farklı fenotipik özellikler olduğu belirtilmiştir. Hindistan'da Vijayakumar ve ark.'nın (255) kan ve balgam örneklerinden izole ettikleri 60 ÇİD *A. baumannii* ile yaptıkları araştırmada, 30 kan izolatının 26'sında twitching hareketi pozitif bulunmuştur. Twitching pozitif suşların hiçbirinde swarming hareketi tespit edilmemiştir. Balgam izolatlarının yedisi twitching pozitif iken, bu izolatların ikisinde hem twitching hem de swarming hareketi pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmada kan izolatlarının daha hareketli olduğu, ÇİD fenotipleri ile hareket arasında herhangi bir korelasyon olmadığı gözlenmiştir. Ülkemizdeki bir çalışmada Eraç ve ark. (14) 16 ÇİD *A. baumannii* izolatında hareket yeteneği araştırmış, yalnız bir suşta twitching, yedi

sušta ise swarming motilitesi gözlemiştir. Twitching pozitif izolatta aynı zamanda swarming hareketi de saptanmıştır. Çalışmada swarming hareketinin virülansla ilişkili bir özellik olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda 23 izolatta twitching hareketi pozitif, iki izolatta ise swarming pozitif olarak tespit edilmiştir. Twitching izolatlarının ikisi balgam, üçü doku biyopsisi, beşi DTA, ikisi idrar, dördü kan, biri plevral sıvı kültürü, altı tanesi de yara kültürü olacak şekilde çeşitli örnek türlerinde saptanmıştır. Twitching negatifiği ile AİD arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Ayrıca duyarlı izolatların üçünde twitching hareketi pozitif bulunmuştur. Eijkelkamp ve ark.'nın (89) çalışma sonucuna benzer olarak IC I olarak saptanan ve hepsinin Genotip A'da gruplandığı izolatların tamamında twitching hareketi pozitif tespit edilmiş ve IC I klonal soy ile twitching grupları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Sadece iki sušta swarming hareketi pozitif olan izolatların biri ÇİD olup DTA örneğinden, diğeri ise AİD olup balgam örneğinden izole edilmiştir. Swarming hareketi ile direnç grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Çalışmamızda duyarlı suşlarda twitching hareket yeteneğinin görülmesi, twitching hareketinin AİD izolatları arasında negatif ilişki görülmesi, *A. baumannii*'nin biyolojik uyum bedeli sürecinde geliştirdiği direnç mekanizmalarına sekonder hareket yeteneğinde azalma olabileceğini desteklemektedir. Ayrıca çalışmalarda motilite testinin MHB ve LB besiyerlerinde ayrı ayrı ve farklı agar konsantrasyonlarında çalışılmış olması nedeniyle, elde edilen sonuçların hem besiyerine hem de besiyerinde bulunan agar miktarına bağlı olarak farklılık gösterebileceği gözlenmiştir. Bizim araştırmamızda ise her iki hareket yeteneği LB ve MHA'da farklı konsantrasyonlarda çalışılmış, uygun inkübasyon sonunda sonuçlar açısından bir farklılık görülmemiştir.

Çevresel yüzeylere bakteriyel kolonizasyon, pili yoluyla adezyon ve ardından biyofilm oluşumu ile sağlanır. Biyofilm üretimi, bakterilerin çevresel koşullara adaptasyonu kolaylaştırır, kuruluğa ve dezenfektanlara dayanaklı olmasını sağlar, hayatta kalma sürelerini uzatır. Ayrıca bakterinin antibiyotik direnci geliştirmesine ve konak immün sisteminden kaçmasına olanak sağlar (30). Biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki, birçok çalışmada ele alınmış, çalışma sonuçlarında farklılıklar nedeniyle henüz netleştirilememiştir.

Geçmişten bugüne yapılan çalışmalar incelendiğinde, biyofilm oluşturma yeteneği olan suşlarda, antibiyotik direncinin arttığını gösteren gösteren araştırmalar bulunmaktadır. Thummeepak ve ark.'nın (256) yaptığı çalışmada 225 *A. baumannii*

klirik izolatinin %86,2 (194/225)'si ÇİD olarak tanımlanmıştır. Tüm izolatların %76,9 (173/225)'u biyofilm oluşturma yeteneği göstermiştir. İzolatların biyofilm ile örnek türü grupları arasında anlamlı ilişki bulunmuş, idrar örneklerinde güçlü biyofilm oluşumu görülmüştür. ÇİD izolat insidansı %86,2 olarak saptanmış, bunların %77,3 (150/194)'ünde biyofilm oluşumu, ÇİD olmayan izolatların ise %74,2 (23/31)'sinde biyofilm oluşumu saptanmıştır. Biyofilm ve direnç grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmada biyofilm oluşturma yeteneği ile gentamisin direnci arasında ise ilişki saptanmıştır. Ayrıca test edilen ompA, bfmS, bap, blaPER-1 ve epsA biyofilm genlerinin prevalansı sırasıyla %84, %84, %48, %30, %22 olarak saptanmıştır. Dokuz (%4) izolatta ise tüm genler pozitif olarak tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu ile ilgili genler, ompA ve bap, çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* suşları ile ilişkili bulunmuştur.

Zeighami ve ark.'nın (180) yaptığı bir araştırmada ise çeşitli örneklerden elde edilen 100 ÇİD *A. baumannii* izolatının %91'i AİD olarak tespit edilmiştir. Tüm izolatlarda biyofilm oluşumu gözlenmiş, bunların %58'inde güçlü biyofilm oluşumu görülmüştür. Güçlü biyofilm üreten izolatların tamamının AİD olduğu saptanmıştır. AİD fenotipi ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Çalışmadaki izolatların hepsinin en az bir biyofilm ilişkili gen taşıdığı, genlerden en yaygın olanının gen csuE (%100) olduğu bulunmuştur. Diğer genlerin yüzde oranları ise şöyledir: pgaB (%98), epsA ve ptk (%95), bfmS (%92) ve ompA (%81). İzolatların %98'inin ise aynı anda dörtten fazla biyofilm ilişkili geni taşıdığı tespit edilmiştir. Eijkelkamp ve ark.'nın (89) çalışmasında IC II *A. baumannii* izolatlarının biyofilm oluşturma seviyesinin, twitching hareketi pozitif olan IC I suşlarından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu düşük olan izolatlarda twitching hareketinin zon çapının da daha küçük olduğu görülmüştür.

Ülkemizde *A. baumannii*'nin biyofilm oluşumu ve ilişkili genleriyle ilgili çalışma sayısı çok az olup; mevcut çalışmalar ise konuya ek, kapsamlı düzeyde bilgi sağlayamamaktadır. Eraç ve ark. (14) tarafından yürütölen ÇİD *A. baumannii* izolatlarında virulans faktörlerinin araştırıldığı çalışmada, incelenen 16 suştan 12'sinde güçlü biyofilm, üçünde orta, birinde ise zayıf biyofilm oluşumu saptanmış ve ÇİD ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Çalı ve ark.'nın (257) çalışmasında YBÜ ve çeşitli servislerden izole edilen hastane kaynaklı *A. baumannii* izolatlarının tamamı biyofilm oluşturmıştır. Altınok ve ark.'nın (258) yaptığı çok merkezli çalışmada ise ÇİD invaziv *A. baumannii* izolatlarının %60,3 (94/156)'ünün

biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Bu 94 izolatın 17'sinin zayıf, 33'ünün orta, 44'ünün ise kuvvetli biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatlar arasında biyofilm saptanan 94 izolatın 79 (%84)'unda virölans geni de saptanmıştır. Biyofilm yapan izolatlar arasında csgA, ompA, csuE, fimH virölans genlerinin sıklığı ise sırasıyla; %41,5 (n= 39), %24,5 (n= 23), %20,2 (n= 19) ve %5,3 (n= 5) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ilişkili (csgA, csuE ve ompA) genlerin gl ve orta pozitif biyofilm oluşumu gösteren suşlarda yüksek olduğu belirlenmiştir.

Birçok antibiyotiğe duyarlı bulunan *A. baumannii* suşlarının, İD suşlara kıyasla daha fazla biyofilm oluşturduğunu bildiren araştırmalar da mevcuttur. Qi ve ark. (259) 272 *A. baumannii* klinik suşunda antibiyotik direnci, biyofilm oluşumu ve biyofilme özgü direnç arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Suşlar 31'i İD ve 166'sı AİD olarak sınıflandırılmış, suşların 249'unda biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Duyarlı olan suşların, İD ve AİD suşlarına göre daha güçlü biyofilm oluşturdukları tespit edilmiştir. Biyofilm yeteneği ile antibiyotik grupları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, aminoglikozit, karbapenem, florokinolonlar, ampisilin-sulbaktam, trimetprim-sulfametaksazol, tetrasiklin ve penisilin gruplarına duyarlı olan izolatlarda biyofilm oluşumu, bu antibiyotiklere dirençli olan izolatlardan daha yüksek düzeyde saptanmıştır. Sefalosporinler ve lipopeptitler ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Li ve ark. (260) tarafından yapılan bir çalışmada kolistine dirençli suşlarda, duyarlı olan gruba kıyasla biyofilm oluşturma yeteneği anlamlı olarak düşük tespit edilmiştir ($P < 0.001$). Başka bir çalışma da *A. baumannii*'nin meropenem direnci ve biyofilm oluşturma yeteneği arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmiştir (261).

Bizim alışmamızda tüm izolatların %88 oranında biyofilm oluşturduğu gözlenmiş olup %20 (20)'sinin yüksek, %33 (32)'ünün orta, %35 (34)'inin düşük biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. Yüksek biyofilm oluşturan suşların 14 (%70)'ünün balgam, DTA ve yara örneklerinde, 6 (%30)'sının diğer vücut sıvılarında ürediği tespit edilmiştir. rnek türü ile biyofilm oluşturma seviyesi arasında ilişki görülmemiştir. Yüksek düzeyde biyofilm oluşturan izolatların 9 (%45)'u İD, 6 (%30)'sı AİD, 5 (%25)'i ise duyarlı suş grubunda bulunmuştur. Duyarlı suşların ise tamamında biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Direnç grubu ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş olup, bu ilişkiyi duyarlı suşların oluşturduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşturma seviyesi ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki incelendiğinde; seftazidim, imipenem, meropenem, SXT ve siprofloksasin'e duyarlı izolatlarda, bu antibiyotiklere

dirençli olanlara göre daha güçlü biyofilm oluşumu saptanmıştır. Biyofilm ilişkili genlerin görüme oranı OmpA ve csuE için sırasıyla %96 ve %89 olarak belirlenmiştir. ÇİD izolatlarında duyarlı izolatlara göre OmpA ve csuE gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Her iki gen tüm biyofilm oluşturan suşlarda yüksek oranda pozitif olarak tespit edilmiştir. Biyofilm gruplarında ise OmpA ve csuE gen pozitifliği açısından istatistiksel olarak bir ilişki bulunmamıştır. Bakteri hareket yeteneği ile biyofilm üretimi arasında da ilişki görülmemiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar bu alanda ülkemizde yapılan en kapsamlı veri kaynağı olup, kısmen benzer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre ise, ilaç direnci geliştirmede ve daha uzun hayatta kalmada biyofilmin bakteriyel adaptif bir mekanizma olarak, ihtiyaç olduğu düşünülmüştür. Biyofilm üretimi ve antibiyotik direnç gelişimi arasında ilişkiyi netleştirecek daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyofilm sayesinde bakterinin hastane ortamında sağkalımının artması, farklı hastane alanlarından izole edilebilmesi, biyotik ve abiyotik yüzeylerde uzun süre canlılığını koruyabilmesi değerlendirildiğinde, *A. baumani*'nin farklı yüzeylerde de biyofilm oluşturabileceğini düşünülmüştür. Literatürde *A. baumannii*'nin çeşitli yüzeylerde aynı anda biyofilm oluşumunu araştıran sadece bir yayın bulunmuş olup bu konuyla ilgili çok az araştırma yapılmıştır. Espinal ve ark.'nın (262) yaptığı çalışmada, 221 *A. baumannii* klinik izolatu arasından klonal ilişkili olmayan 4 izolat seçilip, kuru ve likit ortamda lamel üzerinde biyofilm oluşumu test edilmiş, SEM ile görüntülenmiştir. Biyofilm üreten *A. baumannii* klinik izolatlarının, kuru yüzeylerde biyofilm oluşturmayan benzerlerine göre daha uzun süre hayatta kaldıkları gösterilmiştir. Pour ve ark.'nın (263) çalışmasında ise üriner sistem örneklerinden izole edilen 44 *A. baumannii* suşunun, polipropilen tüp, polikarbonat pleyt, cam tüp ve üriner kateter üzerinde biyofilm oluşumu test edilmiştir. Polipropilen yüzeyde *A. baumannii* adezyonu, polikarbonat yüzeyde ise biyofilm oluşumu yüksek bulunmuştur. Kolistin düşük MİK konsantrasyonu ile hazırlanan ortamda ise bakterinin üriner katetere yapışmasında azalma gözlemlenmiştir. Yine başka bir çalışmada ise özel bir pleyt üzerinde imipenem tedavi dozu ve süresine bağlı *A.baumani*'nin biyofilm oluşumunda azalma gösterilmiştir (264).

Çalışmamızda biyofilm oluşumunu test etmek için plastik tüp, seramik yüzey, foley kateter, vasküler kateter ve kantitatif biyofilm ölçümünde kullandığımız polistren plak dahil beş farklı yüzey kullanılmıştır. Spektrofotometrik sonuçlara göre yüksek,

orta, düşük ve negatif biyofilm gruplarından 5'er örnek seçilip, yüzeylere uygulandıktan sonra SEM ile görüntülenmiştir. 10.000 X mikroskop alanında bakteri sayısı ve agregasyon düzeyi spektrofotometrik biyofilm sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda örnek türü ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişki bulunmamıştır. Biyofilm oluşumu en yoğun foley kateter üzerinde gözlenmiştir. Araştırma sonuçlarımız literatüre yeni veri oluşturmaya birlikte konuyu aydınlatmak ve kanıta dayalı bilgiyi artırmak için bu alanda birçok yeni çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Dirençli *A. baumannii* izolatlarının küresel çapta yayılımının hızla artması, tedavide antimikrobiyal ajanların kısıtlı olması nedeniyle, *A. baumannii* enfeksiyonları tüm dünya ülkelerinde sağlık hizmetlerinde önemli bir sorun ve ciddi bir maddi yük haline gelmiştir. *A. baumannii*'nin antibiyotik direnç geliştirme mekanizmaları, virülans özellikleri ve klonal yayılımına ilişkin çalışmalar dünyada ve ülkemizde sınırlı sayıda yapılmaktadır. Yapılan araştırmalar direnç geliştiren izolatların bazı virülans özelliklerini kaybettiğini ya da daha az gösterdiğini öne sürerken, bazı çalışmalar ise dirençli izolatların hastane ortamında daha uzun kalmasını sahip olduğu virülans mekanizmalarıyla açıklamışlardır. Çalışmalar, *A. baumannii*'nin hayatta kalmasının, patojenitesinin ve direnç mekanizmalarının tek bir mekanizma ile açıklanamayacağını, bakterinin hayatta kalmak için multifaktöriyel ve kombine stratejilere sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın kısıtlı yönleri, örnek alınan hastaların hastanede kalış süresi, örneklerin kaçınıcı günde ve antibiyotik kullanım sürecinde alınıp alınmadığı ve önceki antibiyotik kullanım öyküleri gibi bilgilere ulaşılammış olması olarak sıralanabilir. Ayrıca çalışmada duyarlı *A. baumannii* izolatların sayının az olması, MBL enzimlerinin moleküler temelli testlerle konfirme edilememesi ve *A. baumannii*'nin pek çok virülans faktörü ve direnç mekanizmasına sahip olması araştırmamızı değerlendirmeyi sınırlandırmaktadır.

Çalışmamızda *A. baumannii*'nin fenotipik ve genotipik özelliklerini belirlemede birçok yöntem kullanılmıştır. Bu alandaki birçok çalışmaya göre geniş bir veri sunumuyla kapsamlı bir araştırma niteliğindedir. Endemik *A. baumannii* izolatlarının antibiyotik direnç paternini, klonal yakınlığını, IC ve plazmid profillerini belirlenmesi ile epidemiyolojik olarak birçok veri sağlamıştır. Ayrıca izolatların patojeniteyi belirleyen virülans özellikleri ve bunların dirençli izolatlarla ilişkisi araştırılmış olup literatüre güncel birçok yeni bilgi katmıştır. Virülans özelliklerini ve direnç mekanizmalarını

içeren yayınların artırılması, epidemiyolojik verilerle takibi süreci anlamamızı sağlayacak ve *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı korunma, nleme ve tedavide fayda sağlayacak, olası komplikasyonları ve mortaliteyi azaltmada etkili olacaktır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Klinik izolatların büyük çoğunluğu DTA'dan (%32) elde edildi. DTA'yı sırasıyla yara (%21), kan (%17), balgam (%15), idrar (%9), doku biyopsi örneği (%4), BOS (%1), ve plevral sıvı (%1) örnekleri takip etmiştir.
2. İzolatların 57 (%58)'si YB, 38 (%39)'i diğer servislerde yatan hastalardan, 3 (%3)'ü poliklinik hastalarından toplanan örneklerden izole edilmiştir.
3. *A. baumannii* izolatları direnç paternine göre %45 AİD, %42 ÇİD %13 duyarlı olarak tanımlanmıştır. İzolatlarının antibiyotiklere direnç oranları; seftazidim, imipenem, meropenem ve siprofloksasin için %87, gentamisin %74, amikasin %60, trimetoprim-sulfametaksazol %60, tigesiklin %2, kolistin %8 olarak bulunmuştur.
4. Tüm izolatların 8'i SMD ile kolistine dirençli saptanmış, bu izolatların 6'sı Vitek 2 sisteminde duyarlı bulunmuştur. Buna göre EUCAST sistemine göre çalışıldığında Vitek 2'nin *A. baumannii* izolatlarında ÇBH oranı %75 olarak bulunmuş, BH ise gözlenmemiştir.
5. Karpabenem dirençli izolatların %83,5'inde MBL pozitifliği tespit edilmiştir. Toplam izolatların 93 (95%)'ünde blaOXA-51, 84 (%86)'ünde blaOXA-23 saptanmıştır. blaOXA-24/40 ve blaOXA-58 tespit edilmemiştir.
6. Karpabenem dirençli 85 izolatın 84 (%98,8)'ü blaOXA-23 ve blaOXA-51 gen grubu ve bunlarla ilişkili ISAbal1/blaOXA-51 ve ISAbal1/blaOXA-23 pozitif olarak bulunmuştur. Bu genler karpabenem dirençli ÇİD ve AİD gruplarında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
7. İzolatların REP-PCR ile analizinde 7 genotip (A-G) ve 21 subtip klasifiye edilmiştir. İzolatların 52 (%53)'sinde genotip D saptanmış ve hastanemizin endemik suşu olarak belirlenmiştir. Genotip D'nin 49 (%94)'unu ise D1 suptipi oluşturmaktadır. Tespit edilen diğer genotipler sayıca az görüldüğünden sporadik olarak değerlendirilmiştir.

8. Genotip D tüm örnek gruplarında ve YBÜ, servisler ve poliklinikler olmak üzere tüm birimlerde en yüksek oranda izole edilen genotip olarak tespit edilmiştir.
9. Genotip D ÇİD, AİD ve duyarlı gruplarda sırasıyla %49, %68, %15 oranında tespit edilmiştir. Genotip A izolatlarının hiçbirisi duyarlı grupta saptanmamıştır. Genotip D izolatları ile AİD grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.
10. MBL pozitiflik oranı Genotip D’de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Karbapenem direnci ilişkili OXA-51, OXA-23, ISAb1/OXA-51, ISAb1/OXA-23 genleri ile de Genotip D arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.
11. REP-PCR, hastane salgınlarında, enfeksiyon kontrolü takibinde, epidemiyolojik analizlerde hızlı, güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilir.
12. İzolatların multiplex PCR ile 7 farklı klon grubu tespit edilmiş, IC II’nin izolatların 71 (%73)’ini oluşturarak hastanemizin uluslararası baskın klonu olduğu saptanmıştır.
13. IC II ve IC I gruplarının tamamını ÇİD ve AİD izolatları oluştururken; G5, G6, G8, G13 klon grup izolatlarının tümü ve IC tanımlanamayan grup izolatlarının %80’i duyarlı izolatlardan oluşmuştur.
14. IC II’nin büyük çoğunluğu %69 (49/71)’u Genotip D’ye gruplanırken, IC I’in tamamı ise Genotip A’ya gruplanmıştır. Genotip D ve IC II grupları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.
15. IC II ve IC I gruplarının tamamında OXA-51, OXA-23, ISAb1/OXA-51, ISAb1/OXA-23 genleri pozitif olarak saptanmıştır. IC II hastanemiz *A. baumannii* salgınlarında karbapenem direnci ile ilişkilendirilen IC olarak belirlenmiştir.
16. Tüm *A. baumannii* izolatlarının %73,4’ünün plazmid taşıdığı bulunmuştur. CRAB izolatlarının %74 (63/85)’ünde ve duyarlı izolatların %69 (9/13)’unda plazmid tespit edilmiştir. 1,3-50,2 Kb boyut aralığında değişen, 1 ila 6 adet arasında değişen plazmidlerin izolatlar arasında heterojen dağıldığı gözlenmiştir.
17. Genel olarak, duyarlı ve dirençli izolatların genotip, IC ve plazmid profilleri arasında ilişki görülmemiştir. Sadece tüm IC I’ler (12/98) Genotip A’da gruplanmış ve bu izolatların plazmid profilleri arasında %50 benzerlik görülmüştür.
18. *A. baumannii* izolatlarının iki tanesi (%2) M koloni, 96 (%98) tanesi ise S koloni oluşturmuş, %64’ü α -hemoliz yapmış, sadece iki izolatta β -hemoliz gözlenmiştir. Koloni tipi ile direnç grubu arasında ilişki görülmezken, AİD ve IC II klonal soy ile α -hemoliz arasında anlamlı ilişki gözlenmiştir.

19. Çalışmada 23 izolatta twitching pozitif, iki izolatta ise swarming pozitif olarak tespit edilmiştir. Hareket yeteneği ile direnç grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
20. IC I ve Genotip A'da izolatların tamamında twitching hareketi pozitif tespit edilmiş ve IC I ile twitching arasında anlamlı fark bulunmuştur.
21. İzolatların %88 biyofilm oluşturduğu gözlenmiş, %20 (20)'sinin yüksek, %33 (32)'ünün orta, %35 (34)'inin düşük biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir.
22. Yüksek biyofilm oluşturan izolatların 14 (%70)'ünün balgam, DTA ve yara örneklerinden, 6 (%30)'sının diğer vücut sıvılarından ürettiği tespit edilmiştir. Örnek türü ile biyofilm oluşturma arasında ilişki görülmemiştir.
23. Yüksek düzeyde biyofilm oluşturan izolatların 9 (% 45)'u ÇİD, 6 (%30)'sı AİD, 5 (%25)'i ise duyarlı grubunda bulunmuştur. Duyarlı suşların ise tamamında biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Direnç grubu ile biyofilm arasında anlamlı ilişki bulunmuş olup, bu farkı duyarlı suşların oluşturduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşturma seviyesinin seftazidim, imipenem, meropenem, SXT, siprofloksasin, duyarlı izolatlarda, bu antibiyotiklere dirençli olanlara göre daha güçlü olduğu saptanmıştır.
24. Biyofilm ilişkili OmpA ve CsuE genleri sırasıyla %96 ve %89 oranında saptanmıştır. Dirençli izolatlar ile OmpA ve csuE gen pozitifliği arasında ve csuE ve Genotip D arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Genotip ve OmpA/csuE pozitifliği ile biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.
25. Test edilen tüm yüzeylerde biyofilm oluşumu görülmüş, foley kateter üzerinde diğer yüzeylere kıyasla daha yoğun olduğu saptanmıştır.
26. Çalışmamızda, yapılan fenotipik ve genotipik testlerle hastanemiz *A. baumannii* izolatlarının virülans ve antibiyotik direnciyle ilgili geniş bir veri sağlanmıştır. *A. baumannii* gibi çoğul dirençli izolatların tanımlanması, virülansı ve epidemiyolojisi ile ilgili çalışmaların yapılması, hastanelerde uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasında yardımcı olacaktır.
27. Virülans ve direnç mekanizmaları ile ilgili klinik suşlar ile yapılacak daha kapsamlı ve ileri araştırmalar bakterinin oluşturduğu hastalıkların patogenezi anlamamızı sağlayacak ve *A. baumannii*'nin nozokomiyal enfeksiyonlarının kontrol altında tutulmasında ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Gordona NC, Warehama DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35: 219-222.
2. Almasaudi SB. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25: 586-596.
3. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK. Global challenge of multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51: 3741-3784.
4. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Mikrobiol Rev*. 2008;21(3): 538-582.
5. Paton RH, Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI- 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 1993;2: 81-88.
6. Pagano M, Martins AF, Barth AL. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz J microbiol*. 2016;47: 785–792.
7. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiol Lett*. 2006;258: 72–77.
8. Doi Y, Murray GL, Peleg AY. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36: 85-98.
9. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;5: 643.
10. Nutman A, Marchaim D. 'How to do it' - a molecular investigation of a hospital outbreak. *Clin microbiol Infect*. 2019;25(6): 688-695.
11. Turton J, Gabriel S, Valderrey C, Kaufmann M, Pitt T. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin microbiol Infect*. 2007;13: 807–815.
12. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37: 130–155.
13. Dughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. Minireview The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter spp.*: An Overview. *Virulans Microbes Environ*. 2011;26(2): 101-112.

14. Eraç B, Yılmaz FF, Limoncu MH, Öztürk İ. Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2014;48(1): 70-81.
15. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Future Microbiol. 2009;4: 273-278.
16. Giannouli M, Antunes LC, Marhetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. BMC Infect Dis. 2013;13: 282.
17. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Tenover JC, White (Eds.). Manual of Clinical Microbiology 9 th ed. Washington ASM Press 2007: 770- 802.
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 Tanısal Mikrobiyoloji Kitabı. 1. Baskı. Ankara, Hipokrat Kitabevi, 2017: 385-400.
19. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. N Engl J Med. 2008;358: 1271-1281.
20. Jung J, Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99: 2533-2548.
21. Brisou J, Prevot AR. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. Ann Inst Pasteur. 1954;86(6): 722–728.
22. Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J Bacteriol. 1968;96(1): 39-42.
23. Lessel E. Subcommittee on nomenclature of *Moraxella* and allied bacteria. Int J Syst Bacteriol. 1971;21: 213–214.
24. Bouvet PJ, Grimont PA. 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: 228-240.
25. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS. 1989;97(7): 595-605.
26. Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res Microbiol. 1989;140(4-5): 291-299.

27. List of prokaryotic names with standing in nomenclature <https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter>
28. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 1991;29: 277-282.
29. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov. a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65: 934-942.
30. Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 1996;9: 148-165.
31. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description Of Leeds *Acinetobacter* Medium A New Selective And Differential Medium For Isolation Of Clinically important *Acinetobacter* spp and comparison with Herellea agar and Holton's agar. J Clin Microbiol. 1994;32(10): 2353-2358.
32. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008; 2195-2201.
33. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. Virulence. 2012;3(3): 243-250.
34. Wang J, Ruan Z, Feng Y, Fu Y, Jiang Y, Wang H, et al. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. PLoS One. 2014;9(8): e104882.
35. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2): 380–407.
36. Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of *non-baumannii* *Acinetobacter* species. Front Microbiol. 2016;7: 49.
37. French GL, Phillips I. Antimicrobial resistance in hospital flora and nosocomial infections. In: Mayhall CG (ed). Hospital Epidemiology and Infection Control. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999:1243-64.
38. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis. 2006;42: 692- 699.
39. Timsit JF, Gattait V, Misset B, Goldstein FW, Renaud B, Carlet J. The digestive tract is a major site for *Acinetobacter baumannii* colonization in intensive care unit patients. J Infect. 1993;168: 1336-1337.
40. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B. Factors influencing survival in patients with multi-drug-resistant *Acinetobacter* bacteraemia. Eur J Intern Med. 2009;20: 540–544.
41. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data

- reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(1): 1-14.
42. Rodriguez-Bano J, Cisneros JM, Fernandez-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25: 819-824.
 43. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzman-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42: 276-292.
 44. Golia S, Sangeetha KT, Vasudha CL. Microbial profile of early and late onset ventilator associated pneumonia in the intensive care unit of a tertiary care hospital in Bangalore, India. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(11): 2462–2466.
 45. Chung DR, Song JH, Kim SH, Thamlikitkul V, Huang SG, Wang H. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(12): 1409–1417.
 46. Kuo SC, Chang SC, Wang HY, Lai JF, Chen PC, Shiau YR. Emergence of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex over 10 years: nationwide data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) program. *BMC Infect Dis.* 2012; 12: 200.
 47. Luna CM, Rodriguez-Noriega E, Bavestrello L, Guzman-Blanco M. Gram-negative infections in adult intensive care units of Latin America and the Caribbean. *Crit Care Res Pract.* 2014;2014:480463.
 48. Spellberg B, Rex JH. The value of single-pathogen antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12: 963.
 49. Esen S, Leblebicioğlu H. Prevalence of nosocomial infections of intensive care units in Turkey: A multicentre 1-day point prevalence study. *Scand J Infect Dis.* 2004;36: 144-148.
 50. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest.* 2006;129(1): 102-109.
 51. Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2): 685-686.
 52. Wang JT, McDonald LC, Chang SC, Ho M. Community-acquired *Acinetobacter baumannii* bacteremia in adult patients in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4): 1526-1529.
 53. Cordes LG, Brink EW, Checko PJ, Lentnek A, Lyons RW, Hayes PS, et al. A cluster of *Acinetobacter* Pneumonia in foundry workers. *Ann Intern Med.* 1981;95(6): 688-93.

54. Sheppard FR, Keiser P, Craft DW, Gage F, Robson M, Brown TS, et al. The majority of US combat casualty soft-tissue wounds are not infected or colonized upon arrival or during treatment at a continental US military medical facility. *Am J Surg*. 2010;200(4): 489-95.
55. Maegele M, Gregor S, Steinhausen E, Bouillon B, Heiss MM, Perbix W et al. The long-distance tertiary air transfer and care of tsunami victims: injury pattern and microbiological and psychological aspects. *Crit Care Med*. 2005;33(5): 1136-1140.
56. Oncül O, Keskin O, Acar HV, Küçükardali Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM, et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J Hosp Infect*. 2002;51(1): 47-51.
57. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis*. 2008;8: 751-762.
58. Skariyachan S, Taskeen N, Ganta M, Venkata Krishna B. Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Crit Rev Microbiol*. 2019;45(3): 315-333.
59. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7: 55.
60. Smani Y, Fabrega A, Roca I, Sanchez-Encinales V, Vila J, Pachon J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2014;58: 1806–1808.
61. Iyer R, Moussa SH, Durand-Réville TF, Tommasi R, Miller A. *Acinetobacter baumannii* OmpA Is a Selective Antibiotic Permeant Porin. *ACS Infect Dis*. 2018;4(3): 373-381
62. Rumbo C, Tomas M, Fernandez Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33- 36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect. Immun*. 2014;82: 4666–4680.
63. Novović K, Mihajlović S, Dinić M, Malešević M, Miljković M, Kojić M, et al. *Acinetobacter spp.* porin Omp33-36: Classification and transcriptional response to carbapenems and host cells. *PLoS One*. 2018;13(8): e0201608.
64. Rossi E, Longo F, Barbagallo M, Peano C, Consolandi C, Pietrelli A, et al. Glucose availability enhances lipopolysaccharide production and immunogenicity in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol*. 2016;11(3): 335-349.
65. Chin CY, Gregg KA, Napier BA, Ernst RK, Weiss DS. A PmrB-Regulated Deacetylase Required for Lipid A Modification and Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12): 7911-7914.
66. Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog*. 2015;11(2): e1004691.

67. Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014;47(4): 275-281.
68. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun*. 2010;78(9): 3993-4000.
69. Flores-Diaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, Alape-Giron A, Flieger A. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80: 597–628.
70. Stahl J, Bergmann H, Göttig S, Ebersberger I, Aeverhoff B. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. *PLoS One*. 2015;10(9): e0138360.
71. Fiester SE, Arivett BA, Schmidt RE, Beckett AC, Ticak T, Carrier MV, et al. Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2016;11: e0167068.
72. Elhosseiny NM, Attia AS. *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1): 33.
73. d'Enfert C, Ryter A, Pugsley AP. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J*. 1987;6(11): 3531-3538.
74. Harding CM, Kinsella RL, Palmer LD, Skaar EP, Feldman MF. Medically Relevant *Acinetobacter* Species Require a Type II Secretion System and Specific Membrane-Associated Chaperones for the Export of Multiple Substrates and Full Virulence. *PLoS Pathog*. 2016;12(1): e1005391.
75. Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WG. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(5): 336-51.
76. Bentancor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litran T. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2012;194: 3950–3960.
77. Haurat MF, Elhenawy W, Feldman MF. Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. *Biol Chem*. 2015;396: 95–109.
78. Kwon SO, Ghoo YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;297(2): 150-156.
79. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachon J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine*. 2011;29: 5705–5710.

80. Aşık G. *Acinetobacter baumannii* virölansının açıklanmasında güncel yaklaşımlar. Mikrobiyol Bul. 2011;45(2): 371-380.
81. Zimbley DL, Park TM, Arivett BA, Penwell WF, Greer SM, Woodruff TM, et al. Stress response and virulence functions of the *Acinetobacter baumannii* NfuA Fe-S scaffold protein. J Bacteriol. 2012;194(11): 2884-2893.
82. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberman SL, 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): 513-521.
83. Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S, Kolayli F, Balıkcı E, et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Med Sci Monit. 2004;10(6): 180-184.
84. Weber BS, Harding CM, Feldman MF. Pathogenic *Acinetobacter*: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. J Bacteriol. 2015;198(6): 880-887.
85. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. Microbiology. 2011;157(9): 2534-44.
86. Barker J, Maxted H. Observations on the growth and movement of *Acinetobacter* on semi-solid media. J Med Microbiol. 1975;8: 443-446.
87. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS Jr. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. MBio. 2013;4(4): e00360-13.
88. Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS One. 2011;6(8): e22674.
89. Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. FEMS Microbiol Lett. 2011;323(1): 44-51.
90. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol. 2010;8: 634-644.
91. Skieba E, de Berardinis V, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D, et al. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. Int J Med Microbiol. 2012;302(3): 117-128.
92. McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW, et al. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. J Microbiol. 2012;50(3): 434-443.
93. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol. 2002;56: 289-314.

94. Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R, et al. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol.* 2010;192(24): 6336–6345.
95. Zhang J, Xu LL, Gan D, Zhang X. In vitro study of bacteriophage AB3 endolysin LysAB3 activity against *Acinetobacter baumannii* biofilm and biofilm-bound *Acinetobacter baumannii*. *Clin Lab.* 2018;64: 1021–1030.
96. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 2013;121: 1–51.
97. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(2): 91-102.
98. Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 2011;36(5): 347-355.
99. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(8): 2003-2020.
100. de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol.* 2009;160(3): 213–218.
101. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology (Reading, England).* 2003;149(12): 3473-3484.
102. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA LA, Actis LA Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology.* 2008;154: 3398–3409.
103. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* 2014;37: 119-127.
104. Loehfelm TW, Luke NR AA, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol.* 2008;190: 1036–1044.
105. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR, et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2001;183: 2888–2896.
106. Harding CM, Pulido MR, Di Venzio G, Kinsella RL, Webb AI, Scott NE, et al. Pathogenic *Acinetobacter* Species have a Functional Type I Secretion System and Contact-Dependent Inhibition Systems. *J Biol Chem.* 2017;292(22): 9075-9087.
107. Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litran T. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1–6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol.* 2009;191: 5953–5963.

108. Bentancor LV, O'Malley JM, Bozkurt-Guzel C, Pier GB T, Maira-Litran T. Poly-N-acetyl-beta-(1–6)-glucosamine is a target for protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Infect Immun*. 2012;80(2): 651-656.
109. Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322: 67–84.
110. Dexter C, Murray GL, Paulsen IT, Peleg AY. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(5): 567-573.
111. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*. 2014;71: 292–301.
112. Evans BA, Hamouda A, Amyes SG. The rise of carbapenem- resistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr Pharm Des*. 2013;19: 223–238.
113. Manchanda V, Sanchaita S, Singh NP. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *J Glob Infect Dis*. 2010;2: 291–304.
114. Ko KS, Suh JY, Kwon KT et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea, *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(5): 1163-1167.
115. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG 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.
116. Çiftçi İH, Aşık G. *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. *Ankem Derg*. 2011;25(3): 196-207.
117. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289: 321-31.
118. Bonnin RA, Nordmann P, Poirel L. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11: 571–583.
119. Naas T, Namdari F, Réglie-Poupet H, Poyart C, Nordmann P. Panresistant extended-spectrum b-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J. Antimicrob. Chemother*. 2007;20060(5), 1174–1176.
120. Endimiani A, Luzzaro F, Migliavacca R, Mantengoli E, Hujer AM, Hujer KM, et al. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended spectrum b-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007;51(6): 2211–2214.

121. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum b-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. J. Antimicrob. Chemother. 2006;58(1): 178–182.
122. Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, et al. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54: 4872–4878.
123. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 b-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 2006;57(5): 975–978.
124. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 b-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. J. Clin. Microbiol. 2004;42(9): 3978–3984.
125. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2012;50: 3016–3022.
126. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006;12: 826–836.
127. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front Microbiol. 2012;3: 148.
128. Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC b-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 2000;44(2): 428–432.
129. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49: 2941–2948.
130. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2005;12(2): 123–130.
131. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. Int J Mol Sci. 2015;16(5): 9654–9692.

132. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases*. 2014;2(12): 787-814.
133. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16: 35–40.
134. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44: 1556–1561.
135. Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49: 202–208.
136. Girlich D, Damaceno QS, Oliveira AC, Nordmann P. OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58: 2976–2978.
137. Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Seifert H. OXA- 235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57: 2121–2126.
138. Jamal S, Al Atrouni A, Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Osman M. Molecular mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*, with a special focus on its epidemiology in Lebanon. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;15: 154-163.
139. Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol*. 2011;6(4): 407-422.
140. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, Van Den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol*. 2004;53:1233–1240.
141. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49: 2949–53.
142. 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: 3375–3380.

143. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49: 4362–4364.
144. Hamouda A, Amyes SG. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004;54(3): 695–696.
145. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;19: 1–24.
146. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol.* 2000;49: 929–936.
147. Ribera A, Ruiz J, Vila J. Presence of the TetM determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47: 2310–2312.
148. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, et al. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet.* 2015;15: 225–234.
149. Girardello R, Visconde M, Cayo R, Figueiredo RC, Mori MA, Lincopan N, et al. Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87: 37–44.
150. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55: 3370–3379.
151. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54: 4971–4977.
152. Lin MF, Lin YY, Lan CY. Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol.* 2017;55: 130–136.
153. Mattoes HM, Kuti JL, Drusano GL, Nicolau DP. Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: dosage strategies for meropenem. *Clin Ther.* 2004;26: 1187-1198.
154. Gardiner D, Dukart G, Cooper A, Babinchak T. Safety and efficacy Gardiner D, Dukart G, Cooper A, Babinchak T. Safety and efficacy of intravenous tigecycline in subjects with

- secondary bacteremia: pooled results from 8 phase III clinical trials. Clin Infect Dis. 2010;50: 229–238.
155. Freire AT, Melnyk V, Kim MJ, Datsenko O, Dzyublik O, Glumcher F, et al. 311 Study Group. Comparison of tigecycline with imipenem/cilastatin for the treatment of hospital-acquired pneumonia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68: 140–151.
156. Gordon NC, Wareham DW. A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. J Antimicrob Chemother. 2009;63: 775–780.
157. Goff DA, Kaye KS. Minocycline: an old drug for a new bug: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis. 2014;59(6): 365–366.
158. Penwell WF, Shapiro AB, Giacobbe RA, Gu RF, Gao N, Thresher J, et al. Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59: 1680–1689.
159. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. Clin Infect Dis. 2010;51: 79–84.
160. Choi HK, Kim YK, Kim HY, Uh Y. Inhaled colistin for treatment of pneumonia due to colistin-only-susceptible *Acinetobacter baumannii*. Yonsei Med J. 2014;55: 118–125.
161. Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, Rivera JI, Syed A, Shields RK, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. Clin Infect Dis. 2015;60: 1295–1303.
162. Tünay H, Demirdal T, Demirtürk N. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarında Dirençle İlgili Değişen Tanımlamalar ve Dirençte Güncel Durum. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2012;42(4): 123-126.
163. Ahmed S, Alp E. Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains. J Infect Dev Ctries. 2015;9: 347-354.
164. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2000;6(12): 635-643.
165. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agents. 2013;41(1): 11-19.

166. Salgado-Camargo AD, Castro-Jaimes S, Gutierrez-Rios RM, Lozano LF, Altamirano-Pacheco L, Silva-Sanchez J, et al. Structure and Evolution of *Acinetobacter baumannii* Plasmids. *Front Microbiol.* 2020;11: 1283.
167. Brovedan MA, Cameranesi MM, Limansky AS, Morán-Barrio J, Marchiaro P, Repizo GD. What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus? *World J Microbiol Biotechnol.* 2020;36(8): 109.
168. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* 1981;145(3): 1365-1373.
169. Green MR, Sambrook J. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;10: 163
170. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. valid from 2019-01-01.
171. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement, document M100-S27. Wayne, PA; 2017.
172. International Standards Organization. ISO - ISO 20776-1:2019 - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 1: Broth Micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Geneva; 2019. <https://www.iso.org/standard/70464.html>
173. Şafak B, Tombak Ö, Eren Topkaya A. Kolistin Antimikrobiyal Duyarlılık Testinin Vitek-2 Ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleriyle Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi. *Namık Kemal Tıp Dergisi.* 2020;8(1): 73-78.
174. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM. Imipenem-Edta Disk Method For Differentiation Of Metallo-Beta-Lactamase-Producing Clinical Isolates Of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Mikrobiol,* 2002;40: 3798-801.
175. Can F, Kaya M, Bayindir Bilman F, Uncu H, Demirbilek M, Yazici AC. Activity of tigecycline on planktonic and sessile cells of *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyol Bul.* 2009;43(4): 587-95.
176. Sbordon L, Bortolaia C. Oral Microbial Biofilms and Plaque-Related Diseases: Microbial Communities and Their Role in The Shift From Oral Health to Disease. *Clinical Oral Investigation,* 2003;(7): 181–188.
177. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimikrob Agents* 2006;27(4): 351-353.

178. Bahador A, Raoofian R, Pourakbari B, Taheri M, Hashemizadeh Z, Hashemi FB. Genotypic and Antimicrobial Susceptibility of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Analysis of ISAbA Elements and bla OXA-23-like Genes Including a New Variant. Front Microbiol. 2015;6: 1249.
179. Reboli AC, Houston ED, Monteforte JS, Wood CA, Hamill RJ. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. Journal of clinical Microbiology. 1994;32(11): 2635–2640.
180. Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, Samadi E, Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. BMC Infect Dis. 2019;19: 629.
181. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. Drug Resist Updat. 2012;15(4): 237-47.
182. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989.
183. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges, Clin Microbiol Rev. 2017;30: 409-447.
184. Hekimoğlu CH, Batır E. Ulusal Sağlık Hizmeti ile İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Etken Dağılımı ve Antibiyotik Direnç Raporu-2017. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara. 2018;3
185. Lynch JP, Zhanel GG, Clark NM. Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment Options, Semin Respir Crit Care Med. 2017;38: 311-325.
186. Kalem F, Ertuğrul Ö, Dağı HT. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnci. Abant Tıp Dergisi. 2017;6(1): 20-25.
187. Paköz N, Kaya E, Orhan Z, Kayış A, Aral M. Farklı klinik örneklerden izole edilen çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında tigesiklin, kolistin direncinin disk difüzyon, E-test ve otomatize sistem yöntemleri ile karşılaştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg. 2018;75(2): 109-116.
188. Çalışkan A, Kirişçi Ö. Bir devlet hastanesinde 2013-2018 döneminde *Acinetobacter* enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılığı ve çoğul antibiyotik direnci. Turk Hij Den Biyol Derg. 2020;77(4): 487-492
189. Gözütok F, Sarıgüzel FM, Çelik İ, Berk E, Aydın B, Güzel D. Hastane Enfeksiyonu etkeni *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması. ANKEM Derg 2013; 27(1): 7-12.
190. Şay Coşkun US. Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında antibiyotik direncinin araştırılması. ANKEM Derg. 2018;32(2): 37-44.

191. De Rosa FG, Corcione S, Pagani N, Di Perri G. From ESKAPE to ESCAPE, from KPC to CCC. Clin Infect Dis. 2015;60(8): 1289-1290.
192. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18(3): 318-327.
193. Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;65(4): 414-426.
194. Rhomberg PR, Jones RN. Contemporary activity of meropenem and comparator broad-spectrum agents: MYSTIC program report from the United States component (2005). Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(2): 207-215.
195. Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahm DF. *Acinetobacter baumannii* 2002-2008: increase of carbapenem-associated multiclass resistance in the United States. Microb Drug Resist. 2010;16(3): 209-215.
196. Zilberberg MD, Kollef MH, Shorr AF. Secular trends in *Acinetobacter baumannii* resistance in respiratory and blood stream specimens in the United States, 2003 to 2012: A survey study. J Hosp Med. 2016;11(1): 21-26.
197. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. 2020
198. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance-Annual report 2020,Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.2020.
199. Savcı Ü, Özveren G, Yenişehirli G, Bulut Y, Özdaş S. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının in-vitro duyarlılık durumları. Turkish Journal of Clinics and Laboratory. 2015;6(1): 24-29.
200. Özünel L, Boyacıoğlu Zİ, Güreser AS, Taylan-Özkan A. Çorum Eğitim ve Araştırma Hastanesinde derin trekeal aspirat örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2014;71(2): 81-88.
201. Cesur S, Irmak H , Yalçın A , Berktaş M , Baysan B , Kınıklı S , ve ark. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli kültür örneklerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Ortadoğu Tıp Dergisi. 2017;9(2): 51-55.
202. Hejnar P, Kolár M, Hájek V. Characteristics of *Acinetobacter* Strains (Phenotype Classification, Antibiotic Susceptibility and Production of β -Lactamases) Isolated From Haemocultures From Patients At the Teaching Hospital in Olomouc. Acta Univ Palacki Olomuc, Fac Med. 1999;142: 73-77.

203. Maraki S, Mantadakis E, Mavromanolaki VE, Kofteridis DP, Samonis G. A 5-year Surveillance Study on Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Tertiary Greek Hospital. *Infect Chemother.* 2016;48(3): 190-198.
204. EUCAST. 2016. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. EUCAST
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.
205. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(9): 2528-2530.
206. Tanrıverdi Y, Çınar C, Bilgin K, Vural Dg, Birinci A. Kolistin Direncinin Saptanmasında Sıvı Mikrodilüsyon ve Otomatize Sistem Sonuçlarının Karşılaştırılması. *DÜ Sağlık Bil Enst Derg.* 2020;10(3): 297-301.
207. Aktaş Z. Direnç Mekanizmaları ve Direnç Belirleme Yöntemleri. *Ankem.* 2012;26(2): 278-282
208. Safari M, Mozaffari Nejad AS, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). *Saudi J Biol Sci.* 2015;22(4): 424-429.
209. De AS, Kumar SH, Baveja SM. Prevalence of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in intensive care areas in a tertiary care hospital. *Indian. J. Crit Care Med.* 2010;14: 217-219.
210. Owlia P, Azimi L, Gholami A, Asghari B, Lari AR. ESBL- and MBL-mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients. *Infez Med.* 2012;20(3) :182-187.
211. Peymani A, Nahaei MR, Farajnia S, Hasani A, Mirsalehian A, Sohrabi N, Abbasi L. High prevalence of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Tabriz, Iran. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(1): 69-71.
212. Kabbaj H, Seffar M, Belefquih B, Akka D, Handor N, Amor M, et al. Prevalence of Metallo- β -Lactamases Producing *Acinetobacter baumannii* in a Moroccan Hospital. *ISRN Infectious Diseases.* 2013: 3
213. Benamrouche N, Lafer O, Benmahdi L, Benslimani A, Amhis W, Ammari H, et al. Phenotypic and genotypic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in Algerian hospitals. *J Infect Dev Ctries.* 2020;14(12): 1395-1401.
214. Ranjbar R, Farahani A. Study of genetic diversity, biofilm formation, and detection of Carbapenemase, MBL, ESBL, and tetracycline resistance genes in multidrug-

- resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wound infections in Iran. Antimicrob Resist Infect Control. 2019;8: 172.
215. Alkasaby NM, El Sayed Zaki M. Molecular Study of *Acinetobacter baumannii* Isolates for Metallo- β -Lactamases and Extended-Spectrum- β -Lactamases Genes in Intensive Care Unit, Mansoura University Hospital, Egypt. Int J Microbiol. 2017;2017: 3925868.
 216. Ocak M, Özer B, İnci M, Duran N. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* kökenlerinde antibiyotik direnci ve IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2 tipi Metallo- β -Laktamazların araştırılması. Klimik Dergisi. 2015;28(1): 23-27.
 217. Dağı HT, Kuş H, Keyik Ş, Arslan U, Tuncer İ, Fındık D. Karbapenemlere Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. Ankem Derg. 2012;26(4): 187-192.
 218. Köseoğlu EÖ, Ergin A, Haşcelik G. Erişkin hastalardan izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç ve metallo-beta-laktamaz varlığı. Mikrobiyol Bul. 2009;43: 383-390.
 219. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1): 24-38.
 220. Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins PG, Roca I, Vila J, et al. MagicBullet Working Group WP4. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. J Antimicrob Chemother. 2017;72(12): 3277–3282.
 221. Zowawi HM, Sartor AL, Sidjabat HE, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM. Molecular epidemiology of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in the gulf cooperation council states. Dominance of OXA-23-type producers. J Clin Microbiol. 2015;53: 896–903.
 222. Lowe M, Ehlers MM, Ismail F, Peirano G, Becker PJ, Pitout JDD, et al. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiological and Beta-Lactamase Data From Two Tertiary Academic Hospitals in Tshwane, South Africa. Front Microbiol. 2018;9: 1280.
 223. Amudhan SM, Sekar U, Arunagiri K, Sekar B. OXA beta-lactamase-mediated carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Indian J Med Microbiol. 2011;29(3): 269-274.
 224. Correa A, Del Campo R, Escandón-Vargas K, Perenguez M, Rodríguez-Baños M, Hernández-Gómez C. Distinct Genetic Diversity of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Colombian Hospitals. Microb Drug Resist. 2018;24(1): 48-54.
 225. Rieber H, Frontzek A, Pfeifer Y. Molecular Investigation of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter spp.* from Hospitals in North Rhine-Westphalia, Germany. Microb Drug Resist. 2017;23(1): 25-31.
 226. Tafreshi N, Babaeekhou L, Ghane M. Antibiotic resistance pattern of *Acinetobacter baumannii* from burns patients: increase in prevalence of bla_{OXA-24-like} and bla_{OXA-58-like} genes. Iran J Microbiol. 2019;11(6): 502-509.

227. Gur D, Korten V, Unal S, Deshpande LM, Castanheira M. 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): 1529-1532.
228. Çiftçi İH, Aşık G, Karakeçe E, Öksüz L, Yağcı S, Çetin E ve ark. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında blaOXA genlerinin dağılımı: Çok merkezli bir çalışma. Mikrobiyoloji Bülteni. 2013;47(4): 592-602.
229. Telli M, Eyigör M, Korkmazgil B, Aydın N, Atalay MA. *Acinetobacter spp.* Klinik İzolatlarında Karbapenem Direncinin Moleküler Epidemiyolojisi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2017;47(4): 190-196.
230. Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. J Antimicrob Chemother. 2006;57(1): 1-3
231. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol. 2006;44(8): 2974-2976.
232. Özkul C, Hazırolan G. Oxacillinase Gene Distribution, Antibiotic Resistance, and Their Correlation with Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* Bloodstream Isolates. Microb Drug Resist. 2020;29: 1089.
233. Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, et al. OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. Clin Microbiol Infect. 2014;20(5): 410-415.
234. Shoja S, Moosavian M, Rostami S, Abbasi F, Tabatabaiefar MA, Peymani A. Characterization of Oxacillinase and Metallo- β -Lactamas Genes and Molecular Typing of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Ahvaz, South-West of Iran. Jundishapur J Microbiol. 2016;9(5): e32388.
235. Meshkat Z, Salimizand H, Amini Y, Khakshoor M, Mansouri D, Farsiani H. Molecular characterization and genetic relatedness of clinically *Acinetobacter baumannii* isolates conferring increased resistance to the first and second generations of tetracyclines in Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1): 51.
236. Sarı B, Baran I, Alaçam S, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Aksu N. Nozokomiyal çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında oksasilinaz genlerinin multipleks PCR ile araştırılması ve klonal ilişkilerinin Rep-PCR ile değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2015;49(2): 249-258.
237. Ergin A, Hascelik G, Eser OK. Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. Scand J Infect Dis. 2013;45(1): 26-31.

238. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2): 197-201.
239. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(2): 233-238.
240. Mahdian S, Sadeghifard N, Pakzad I, Ghanbari F, Soroush S, Azimi L, et al. *Acinetobacter baumannii* clonal lineages I and II harboring different carbapenem-hydrolyzing- β -lactamase genes are widespread among hospitalized burn patients in Tehran. *J Infect Public Health.* 2015;8(6): 533-542.
241. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B, Reijden TV, Dijkshoorn L. Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. *Infect Genet Evol.* 2013;14: 92-97.
242. Ahmed SS, Alp E, Ulu-Kilic A, Dinc G, Aktas Z, Ada B, 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.
243. Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G. Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 1994 Jan;32(1): 82-86.
244. Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G. Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 1994;32(7): 1816-1819.
245. Patwardhan RB, Dhakephalkar PK, Niphadkar KB, Chopade BA. A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *Indian J Med Res.* 2008;128(2): 178-187.
246. Lima WG, Alves MC, Cruz WS, Paiva MC. Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(6): 1009-1019.
247. Smani Y, López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, Docobo-Pérez F, Martí S, Vila J. In vitro and in vivo reduced fitness and virulence in ciprofloxacin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18: E1–E4.
248. Rojas RL, Herrera JD, McConnel MJL, Perez FD, Smani Y, Reyes MF, et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin resistant of *A. baumannii*. *The Journal of Infectious Diseases.* 2011;203: 545–548.
249. Kang YS, Park W. Trade-off between antibiotic resistance and biological fitness in *Acinetobacter* sp. Strain DR1. *Environ Microbiol.* 2010;12: 1304–1318.

250. Dahdouh E, Gómez-Gil R, Pacho S, Mingorance J, Daoud Z, Suárez M. Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. PLoS One. 2017;12(4): e0176824.
251. Dahdouh E, Hajjar M, Suarez M, Daoud Z. *Acinetobacter baumannii* Isolated from Lebanese Patients: Phenotypes and Genotypes of Resistance, Clonality, and Determinants of Pathogenicity. Front Cell Infect Microbiol. 2016;6: 163.
252. Aliramezani A, Soleimani M, Fard RMN, Nojoomi F. Virulence determinants and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients. Germs. 2019;9(3): 148-153.
253. Alarcon I, Evans DJ, Fleiszig SM. The role of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* exit from and translocation of corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50: 2237–2244.
254. Han X, Kennan RM, Davies JK, Reddacliff LA, Dhungyel OP, Whittington RJ, et al. Twitching motility is essential for virulence in *Dichelobacter nodosus*. J Bacteriol. 2008;190: 3323–3335.
255. Vijayakumar S, Rajenderan S, Laishram S, Anandan S, Balaji V, Biswas I. Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Front Public Health. 2016;4: 105.
256. Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U, Sitthisak S. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Int Microbiol. 2016;19(2): 121-129.
257. Çalı A, Çelik C, Tutar U, Bakıcı MZ. Hastanede Yatan Hastalardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Biyofilm Formasyon Aktiviteleri. Kocaeli Tıp Dergisi. 2018;7(3): 82-88.
258. Altınok Ö, Boral B, Ergin A, Köseoğlu EÖ. Çok ilaca dirençli invaziv *Acinetobacter baumannii* izolatlarında biyofilm ve biyofilm ilişkili virülans genlerinin varlığı. Mikrobiyol Bul. 2020;54(1): 40-49.
259. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol. 2016;7: 483.
260. Li J, Nation RL, Owen RJ, Wong S, Spelman S, Franklin C. Antibigrams of Multidrug-Resistant Clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising Therapeutic Options for Treatment of Infection with Colistin-Resistant Strains. Clin. Infect. Dis 2007;45(5): 594-598.
261. Perez LR. *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. J. Chemother. 2015;27: 13–16.
262. Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Hosp Infect. 2012;80(1): 56-60.

263. Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Zamin FR, Zinjarde SS, Chopade BA. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011;62(3): 328-338.
264. Yang CH, Su PW, Moi SH, Chuang LY. Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. Molecules. 2019;24(10): 1849.



8. EKLER

8.1. Ek.1 Etik Kurul Onayı

Araştırma Hitit Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu
25/10/2018 tarihli 2018-173 karar numarası ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

