

T. C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ SERVİS ŞEFLİĞİ

**MDR VE XDR *ACİNETOBACTER* İZOLATLARINDA
OXA GEN VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ VE SUŞLAR
ARASINDAKİ KLONALİTENİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğba KULA ATİK
Tbp.ÜtĐm.

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL
2015

T. C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOĞİ SERVİS ŞEFLİĞİ

**MDR VE XDR *ACINETOBACTER* İZOLATLARINDA
OXA GEN VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ VE SUŞLAR
ARASINDAKİ KLONALİTENİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğba KULA ATİK
Tbp.ÜtĐm.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa EĞitim Hastanesi Komutanlığı'nın
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı
İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıőtır.

TEZ DANIŞMANI
Mustafa ÖZYURT
Prof.Hv.Vet.Tbp.Kd.Alb.

İSTANBUL
2015

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

“MDR ve XDR *Acinetobacter* izolatlarında OXA gen varlığının gösterilmesi ve suşlar arasındaki klonalitenin araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Hv.Vet.Tbp.Alb. Mustafa ÖZYURT

Üye : Doç.Tbp.Alb Orhan BAYLAN

Üye : Prof.Dr. Ayşegöl KARAHASAN

Y. Üye : Doç.Tbp.Alb. Hakan ERDEM

Y. Üye : Prof.Dr. Tanıl KOCAGÖZ

ONAY:

Tbp.Ütğm. Tuğba KULA ATİK'in 25 Haziran 2015 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Hayati BİLGİÇ

Prof. Tbp. Tümamiral

Komutan Bilimsel Yardımcısı,

Askeri Tıp Fakóltesi Dekanı,

Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan hocalarım Prof.Hv.Vet.Tbp.Kd.Alb. Mustafa ÖZYURT'a ve Doç.Tbp.Kd.Alb. Orhan BAYLAN'a, tez çalışmamın başlangıç aşamasında pozitif kontrol suşlarını temin etmemi sağlayan Prof.Dr. Alper TEKELİ'ye şükran ve saygılarımı arz ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışma imkanı bulduğum ve her zaman desteklerini hissettiğim Uzm.Tbp.Bnb. Bayhan BEKTÖRE'ye, Uzm.J.Tbp.Yzb. M.Burak SELEK'e, Uzm.Tbp.Yzb. Barış YALÇIN'a, Uzm.Öğr.Dz.Tbp.Ütğm. Ümit KARAKAŞ'a, Sağ.Tğm. Hakan DARICI'ya ve Tıbbi Mikrobiyoloji Servis Şefliği'nin tüm değerli personeline teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde her zaman benim yanımda olan, bugünlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan canım annem Sezer KULA'ya, babam Ramazan KULA'ya ve kardeşim Atay Can KULA'ya, her zaman sonsuz sevgisini, anlayışını ve sabrını hissettiğim, varlığıyla yaşama umutla bakmama sebep olan sevgili eşim Bülent ATİK'e, sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Tuğba KULA ATİK

İstanbul

Mayıs 2015

ÖZET

MDR ve XDR *Acinetobacter* İzolatlarında OXA Gen Varlığının Gösterilmesi ve Suşlar Arasındaki Klonalitenin Araştırılması

Acinetobacter baumannii özellikle yoğun bakım ünitelerinde uzun süre canlılığını koruyabilen, kolaylıkla çapraz bulaşa yol açıp fırsatçı enfeksiyonlara ve salgınlara sebep olabilen önemli bir patojendir. Geniş spektrumlu bir β -laktam antibiyotik grubu olan karbapenemlerin de dahil olduğu çoklu ilaca direnç göstermesi, bu patojenle olan enfeksiyonların tedavisinde ciddi problemlerin yaşanmasına neden olmaktadır. Karbapenem direnci, sıklıkla OXA-tipi karbapenemazlar ile oluşmaktadır. *Acinetobacter* izolatlarında OXA-51 benzeri gen bölgesi intrensek olarak saptanırken, OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 benzeri gen bölgeleri de buna eşlik edebilmektedir. Hastane enfeksiyonları (HE)'nin yönetiminde epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konulması çok önemlidir. Bu amaçla klonal ilişkinin tespitinde kullanılan "Değişimli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)", moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri içinde altın standart olarak kabul edilmiştir.

Bu çalışmada, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi Bakteriyoloji Laboratuvarı'na Ocak 2012-Aralık 2014 tarihleri arasında, Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi (AYBÜ)'nden ve Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi (DYBÜ)'nden gönderilen farklı klinik örneklerden HE etkeni olarak izole edilen 100 *A. baumannii* izolatının, dirençten sorumlu olduğu bilinen gen bölgelerini hedef alan primerlerin kullanıldığı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile OXA-tipi β -laktamazlar açısından taranması ve PFGE yöntemi ile de klonal ilişkinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen izolatların 31 (%31)'i AYBÜ'den, 69 (%69)'u ise DYBÜ'den gönderilen klinik örneklerden HE etkeni olarak izole edilmiştir. İzolatların %57'si solunum sistemi örneklerinden elde edilmiştir. Test edilen tüm antibiyotikler içinde en etkili ajanlar %100 duyarlılık oranı ile kolistin; %93 duyarlılık oranı ile tigesiklin olarak saptanmıştır.

İncelenen 100 izolatın tamamında OXA-51 geni, 92 (%92)'sinde OXA-23 geni belirlenmişken; OXA-24 ve OXA-58 genleri ise hiç bir izolatta bulunmamıştır.

Çalışmamızda PFGE genotiplerini belirlemek için benzerlik katsayısının sınır değeri %80 olarak belirlenmiş ve çalışılan 100 izolatın 19 farklı küme içinde olduğu saptanmıştır. Alt tip sayısını belirlemek için ise, benzerlik katsayısının sınır değeri %100 olarak belirlenmiş ve izolatların 92 alt tip içinde olduğu görülmüştür. Toplam 19 küme içinde 'J' kümesi, 25 üyesi ve 24 alt tipi ile (J1-J24) en çok saptanan küme olmuştur. Hastanemizde 2012 yılında 'J' klonunun baskın olduğu, 'G' klonunun 2012'nin son aylarında hastanemize girip 2013 yılında baskın hale geldiği, 'A' ve 'R' klonlarının ise çalışmamız kapsamına dahil her üç yılda da (2012-2014) izlendiği ve 'A' klonunun baskın klon olduğu anlaşılmıştır. 'S' ve 'E' klonları ise sadece 2014 yılında DYBÜ'de saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, Antibiyotik Direnci, OXA-tipi Karbapenemazlar, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Değişimli Alan Jel Elektroforezi (PFGE).

Destekleyen Kurumlar: Çalışmayı destekleyen kuruluş yoktur.

Yazar Adı: Tbp.Ütğm. Tuğba KULA ATİK

Danışman: Prof.Hv.Vet.Tbp.Alb. Mustafa ÖZYURT

SUMMARY

Presence of OXA Gene on MDR and XDR *Acinetobacter* Isolates and Investigation of Clonal Relation between Isolates

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen, which can stay alive especially at intensive care units (ICU) for prolonged periods, easily causing cross contamination and epidemics. Developing multidrug resistance to the antibiotics, including carbapenems, a wide-spectrum β -lactam antibiotic group, causes serious problems in treatment of its infections. Carbapenem resistance generally caused by OXA-type carbapenemases. OXA-51 like gene area are intrinsic while OXA-23, OXA-24 and OXA-58 like gene areas can accompany within *Acinetobacter* isolates. Demonstration of epidemiological relation in managing hospital infections (HI) is crucial. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) method, used in determination of clonal relation, is accepted as the gold standard among molecular epidemiological characterization methods.

In this study, we aimed to scan OXA-type β -lactamases via multiplex polymerase chain reaction (PCR) method and determine clonal relation via PFGE method on 100 *A. baumannii* samples, isolated at Gulhane Military Medical Academy, Haydarpasa Training Hospital, Medical Microbiology Service, Bacteriology Laboratory, from 100 different inpatients in Anesthesiology and Reanimation ICU (ARICU) and Internal Medicine ICU (IMICU) between January 2012 to December 2014.

Thirty-one samples were isolated from ARICU as HI while remaining 69 sample were from IMICU. 57% of the samples were respiratory system samples. Colistin was the most effective antibiotic with 100% efficiency, followed by tigecyclin with 93% efficiency among tested antibiotics.

All isolates possessed OXA-51 gene while 92% had OXA-23 gene. However OXA-24 and OXA-58 genes couldn't detected in any samples.

During PFGE genotyping analyses, similarity coefficient was set as 80% and 19 different clusters were determined for 100 samples. In order to

determine sub-clusters, similarity coefficient was set as 100% and 92 sub-clusters were detected. Among the clusters, J cluster was the most crowded one with 25 member and 24 sub-cluster (J1-J24). According to our results, J cluster was found as the dominant genotype during 2012 which is replaced with G cluster at the end of 2012 and became dominant at 2013. A and R clones were present during our study's time period (2012-2014) and A cluster was the dominant one among these. S and E clusters were only found at IMICU and only at 2014.



Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Antibiotic Resistance, OXA-type Carbapenemases, Polymerase Chain Reaction (PCR), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Supporting Institutions: This study is not supported by any other institution or companies.

Author: Tuğba KULA ATİK, MD

Advisor: Mustafa ÖZYURT, PhD, Prof.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hastane Enfeksiyonları	3
2.2. <i>Acinetobacter</i> spp.	5
2.2.1. Taksonomisi ve Tarihçesi	5
2.2.2. Genel Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikleri	6
2.2.3. Epidemiyolojisi	8
2.2.4. Patogenezi ve Virölansı	9
2.2.5. Risk Faktörleri	12
2.2.6. Enfeksiyonları	12
2.2.7. Tedavi Seçenekleri	13
2.2.7.1. β -laktamlar	13
2.2.7.2. β -laktamaz İnhibitörleri	14
2.2.7.3. Tetrasiklinler	15
2.2.7.4. Aminoglikozidler	15
2.2.7.5. Florokinolonlar	15
2.2.7.6. Polimiksinler	16
2.2.7.7. Sülfonamidler	16
2.2.8. Çoklu İlaç Direnci (ÇİD), Yaygın İlaç Direnci (YİD), Tüm Antimikrobiklere Direnç (TAD)	17
2.2.9. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları	17

2.2.9.1.	Karbapenem Direnci	18
2.2.9.1.1.	Enzimatik Olmayan Direnç Mekanizmaları.....	18
2.2.9.1.2.	β -laktamazlar	19
2.2.9.1.2.1.	Sınıf A β -laktamazlar.....	20
2.2.9.1.2.2.	Sınıf B β -laktamazlar.....	20
2.2.9.1.2.3.	Sınıf C β -laktamazlar	21
2.2.9.1.2.4.	Sınıf D β -laktamazlar	21
2.3.	Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri	24
2.3.1.	Fenotipik Yöntemler	25
2.3.1.1.	Biyotiplendirme.....	25
2.3.1.2.	Serotiplendirme	26
2.3.1.3.	Antibiyotiplendirme	26
2.3.1.4.	Bakteriyofaj Tiplendirme	27
2.3.1.5.	Bakteriyosin Tiplendirme	27
2.3.1.6.	Protein Analizi	27
2.3.2.	Genotipik Yöntemler.....	27
2.3.2.1.	Plazmid Profil Analizi.....	28
2.3.2.2.	Kromozomal DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi	28
2.3.2.2.1.	Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)	29
2.3.2.2.2.	Değişimli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)	29
2.3.2.3.	Ribotiplendirme	32
2.3.2.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yöntemler	32
2.3.2.5.	Multilokus Sekans Analizi.....	34
2.3.2.6.	"Microarray"-DNA "Chip" Teknolojisi.....	35
3.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1.	Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	36
3.1.1.	Cihazlar	36
3.1.2.	Laboratuvar Malzemeleri	37
3.2.	Örnek Kabulü	39
3.3.	Çalışmaya Alınma Kriterleri.....	39
3.4.	Yöntem	40
3.4.1.	İzolasyon ve Tür Tayini	40

3.4.2.	Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	41
3.4.3.	OXA-tipi Direnç Genlerinin Multipleks PZR ile Araştırılması	41
3.4.3.1.	Bakteriyel Genomun Ekstraksiyonu	41
3.4.3.2.	PZR Uygulamaları.....	42
3.4.3.3.	PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	44
3.4.4.	Klonal İlişkinin PFGE ile Araştırılması	45
3.4.4.1.	PFGE İçin Kullanılan Tamponlar ve Karışımlar.....	45
3.4.4.2.	PFGE Protokolü	46
3.4.4.2.1.	İzolatların Hazırlanması	46
3.4.4.2.2.	İzolatların Agaroz Gömülmesi.....	46
3.4.4.2.3.	Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması	47
3.4.4.2.4.	Agaroz Kalıplarının Yıkınması.....	48
3.4.4.2.5.	Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın RE ile Kesilmesi	48
3.4.4.2.6.	Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Yüklenmesi	49
3.4.4.2.7.	Elektroforez.....	51
3.4.4.2.8.	Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi.....	52
4.	BULGULAR.....	54
4.1.	Hastalara Ait Demografik Özellikler	54
4.2.	İzolatların Genel Özellikleri	54
4.3.	Antibiyotik Duyarlılıkları.....	56
4.4.	Direnç Genleri	56
4.5.	PFGE Bantlarının Analizi	66
5.	TARTIŞMA	79
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
7.	KAYNAKLAR.....	92

SİMGELER ve KISALTMALAR

A.B.D.:	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP:	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
AP-PZR:	Rastgele Primerize Edilmiş Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ARI-1:	İmipeneme Dirençli <i>Acinetobacter</i>
AYBÜ:	Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi
BAL:	Bronkoalveolar Lavaj
bp:	Baz Çifti
CHEF:	Contour-Clamped Homojen Elektrik Alanları
CLSI:	Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu
dk:	Dakika
DTA:	Derin Trakeal Aspirasyon
DYBÜ:	Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi
ERIC-PZR:	Enterobakteriyel Genlerde Tekrarlayan Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu
EUCAST:	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
FIGE:	Alan İnversiyon Jel Elektroforezi
gr:	Gram
GSBL:	Genişletilmiş Spektrumlu β -laktamaz
HE:	Hastane Enfeksiyonları
HEKK:	Hastane Enfeksiyon Kontrol Komitesi
HLS I:	Hücre Lizis Solüsyonu I
HLS II:	Hücre Lizis Solüsyonu II
HST:	Hücre Süspansiyon Tamponu
Kb:	Kilobaz
M:	Molar
MALDI-TOF:	Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometre
Mb:	Megabaz
MBL:	Metallo- β -laktamaz
MDR:	Çoklu İlaç Direnci (ÇİD)
mg/ml:	Miligram/Mililitre

ml:	Mililitre
MLST:	Multilokus Sekans Analizi
mM:	Milimolar
PBP:	Penisilin Bağlayan Protein
PDR:	Tüm Antimikrobiklere Direnç (TAD)
PFGE:	Değişimli Alan Jel Elektroforezi
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD:	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RE:	Restriksiyon Enzimi
REP-PZR:	Tekrarlayan Ekstragenik Palindromik Sıra Tabanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP:	Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi
rRNA:	Ribozomal RNA
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
sn:	Saniye
SVS:	Steril Vücut Sıvısı
TAE:	Tris-Asetat-EDTA
TBE:	Tris-Borik Asit-EDTA Tamponu
TE:	Tris-EDTA Tamponu
Tris-HCL:	Tris-Hidroklorid
U/µl:	Ünite/Mililitre
U:	Ünite
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method With Mathematical Averaging
XDR:	Yaygın İlaç Direnci (YİD)
YBÜ:	Yoğun Bakım Üniteleri
µg/ml:	Mikrogram/Mililitre
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. AYBÜ ve DYBÜ’de, 2012, 2013 ve 2014 yıllarındaki HE oranları ve HE etkeni olarak izole edilen mikroorganizmalar.....	4
Tablo 2.2. Sakkarolitik ve asakkarolitik <i>Acinetobacter</i> türlerine ait özellikler .	8
Tablo 3.1. PZR uygulamaları için kullanılan primerler ve beklenen bant büyüklükleri	43
Tablo 3.2. PFGE profillerinin Tenover kriterlerine göre yorumlanması	53
Tablo 4.1. Hastaların demografik özellikleri	54
Tablo 4.2. Örneklerin yıllara göre dağılımı	55
Tablo 4.3. Örneklerin izole edildiği yoğun bakım üniteleri	55
Tablo 4.4. Direnç genleri ve görülme sıklığı	58
Tablo 4.5. Çalışmaya alınan <i>Acinetobacter</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık durumları ve direnç gen profili.....	61
Tablo 4.6. ‘J’ kümesine ait izolatların özellikleri	73
Tablo 4.7. ‘G’ kümesine ait izolatların özellikleri	74
Tablo 4.8. ‘A’ kümesine ait izolatların özellikleri	75
Tablo 4.9. ‘C’ kümesine ait izolatların özellikleri	76
Tablo 4.10. ‘R’ kümesine ait izolatların özellikleri	76
Tablo 4.11. ‘S’ kümesine ait izolatların özellikleri	78
Tablo 4.12. ‘E’ kümesine ait izolatların özellikleri	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. İzolatların klinik örneklerle göre dağılımı.....	55
Şekil 4.2. İzolatların antibiyotik duyarlılık oranları.....	56
Şekil 4.3. OXA-51 ile beraber OXA-23 gen pozitiflik oranlarının yıllara göre dağılımı.....	58
Şekil 4.4. OXA-51 ile beraber OXA-23 direnç geni içeren izolatların (n=92) antibiyotik duyarlılık durumları.....	59
Şekil 4.5. OXA-51 içeren (diğer OXA genlerini içermeyen) izolatların (n=8) antibiyotik duyarlılık durumları.....	59

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. MagCore® HF16 otomatize DNA ekstraksiyon sistemi (RBCBioscience, Tayvan).....	41
Resim 3.2. Tarağın dişlerinin uç kısmına yerleştirilmiş agaroz kalıpları (A-B); Kaset içine dökülen agaroz (C).....	50
Resim 3.3. Oda ısısında 30 dk katılaşmaya bırakılan kaset (A); Tankın içindeki hazneye yerleştirilmiş agaroz (B).....	51
Resim 3.4. CHEF-DR III (Bio-Rad, A.B.D.) sistemi.....	51
Resim 4.1. OXA-karbapenemaz kodlayan genlerin multipleks PZR ile saptanması.....	57
Resim 4.2. İzolatlara ait bant görüntüleri.....	67
Resim 4.3. İzolatlara ait jel görüntülemeye saptanan tüm bantların (Resim 4.2.) Microsoft Excel® programı kullanılarak birarada gösterilmesi.....	68
Resim 4.4. A-B-C İzolatların filogenetik analiz sonuçları.....	69

1. GİRİŞ

Hastane enfeksiyonları (HE), oluşturduğu yüksek maliyet, morbidite ve mortalite oranları ile tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur (1-3). Değişik çalışmalarda HE görülme sıklığının %3,1-14,1 arasında değiştiği bildirilmektedir. Bu oranlar hastaneden hastaneye değişiklik gösterebildiği gibi, aynı hastanenin değişik servisleri arasında da farklı olabilir. Özellikle yoğun bakım üniteleri (YBÜ) HE gelişimi açısından en riskli bölgelerdir (2,4-7). HE etkenleri içinde gram negatif basiller ön sırada yer almaktadır. Bunların başlıcaları; *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'dir (2,4,7).

İlk kez 1911 yılında, Hollandalı mikrobiyolog Martinus Willem Beijerinck tarafından topraktan izole edilen *Acinetobacter* türleri, daha sonraları birçok farklı isim almıştır. Yapısal ve biyokimyasal özellikleri ile sınıflandırılmaları oldukça karmaşık süreçlerden geçmiş olup günümüzde 30 farklı genomik türü tanımlanmıştır (8-10). Taksonomik verilere dayanarak, *Gammaproteobacteria* sınıfında, *Pseudomonadales* takımında ve *Moraxellaceae* ailesi içinde yer alan *Acinetobacter* cinsi içinde tanımlanan türler arasında, insanlarda enfeksiyonlara en sık yol açan etken *A. baumannii*'dir (10).

Non-fermentatif, oksidaz negatif, zorunlu aerobik, gram negatif kokobasil morfolojisinde olan *A. baumannii*, hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmekte ve çapraz bulaş kolaylıkla meydana gelebilmektedir. Bu izolatların neden olduğu pnömoni, bakteriyemi, idrar yolu enfeksiyonu, yara enfeksiyonu ve menenjit gibi çeşitli tipte fırsatçı enfeksiyonlar ile YBÜ'de salgınlar sıkça gelişebilmektedir (5,10).

Geniş spektrumlu bir β -laktam antibiyotik grubu olan karbapenemlere direnç gelişmesi, *Acinetobacter* enfeksiyonlarında tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamıştır. Hatta günümüzde ticari olarak elde edilebilen bütün ajanlara dirençli *A. baumannii* izolatları mevcuttur (5). Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kontrolsüz kullanımının bir sonucu olarak, gelecekte bu

izolatlardan kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde oldukça zorlanılacağı düşünülmektedir.

Acinetobacter baumannii'de karbapenem direncinin bilinen en yaygın sebebi OXA-tipi karbapenemazlardır. OXA-51 benzeri gen bölgesi *A. baumannii* izolatlarında intrensek olarak saptanırken diğer direnç genlerinin varlığı bölgesel olarak değişmektedir (9). Bu nedenle merkezler tarafından kendi direnç genlerinin düzenli olarak araştırılması, direnç gen profilinin daha iyi aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

Epidemiyolojik araştırmalar, çok ciddi küresel bir sağlık sorunu olan HE yönetiminde çok önemlidir. Bu amaçla tanıda kullanılan tiplendirme yöntemleri sıklıkla, hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda ve salgın araştırmalarında enfeksiyon etkenlerinin yayılımı ile epidemik suşların kaynağı ve yayılım yollarının belirlenmesinde, dirençli suşların ve bunların yaygınlığının saptanmasında ve hastalarla olan epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konulmasında kullanılmaktadır (1,2,4). İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi göstermede kullanılan "Değişimli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)", yüksek oranda tekrarlanabilir olmasından dolayı moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri içinde altın standart olarak kabul edilmiştir (5).

Bu nedenle bu çalışmada, üç yıllık bir sürede (2012-2014) çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* izolatlarında, direnç mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlamak amacıyla multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile OXA-tipi karbapenemaz genlerinin (OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58) varlığı araştırılmıştır. Ayrıca izolatlar arasındaki moleküler epidemiyolojik ilişki PFGE yöntemi ile belirlenmiştir. Son olarak da izolatlar arasında öncelikle fenotipik yöntemlerden antibiyotik duyarlılık durumlarına göre belirlenen muhtemel klonal ilişki, direnç genlerindeki ve PFGE kalıplarındaki polimorfizm dikkate alınarak tanımlanmaya çalışılmıştır. Böylelikle, dirençli *A. baumannii* prevalansındaki artışın, salgınlara bağlı olup olmadığı da belirlenebileceği için, sonuçların enfeksiyon kontrol çalışmalarına ışık tutabileceği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastane Enfeksiyonları

Hastaneye başvuru anında inkübasyon döneminde olmayan, hastaneye yattıktan sonra gelişen veya hastanede gelişmesine karşın, bazen taburcu olduktan sonra ortaya çıkabilen enfeksiyonlar, HE olarak tanımlanmaktadır. Genellikle yatıştan 48-72 saat sonra veya taburcu olduktan sonraki ilk 10 gün içinde ortaya çıkmaktadır (1,2).

Günümüzde tıp alanındaki gelişmelerin artmasına, en iyi tekniklerin uygulanmasına rağmen HE, halen oluşturduğu yüksek maliyet, morbidite ve mortalite oranları nedeniyle tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur (2,3). Tanı ve tedavi amaçlı invaziv işlemlerdeki artış, kateter ve sonda uygulamaları, uygunsuz antibiyotik kullanımı, bağışıklık sisteminin zayıfladığı durumlar, HE riskini arttırmaktadır (1,2,4).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, hastanede yatarak tedavi gören yaklaşık her on hastadan birinde HE ortaya çıkmaktadır (5). Ülkemizden, Karahocagil ve ark. (7)'nin Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Araştırma Uygulama Hastanesi'nde Ocak 2009-Mart 2010 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada, HE oranı %3,5 olarak belirlenmiştir. HE'ye neden olan mikroorganizmalar arasında *A. baumannii*, %23,2 izolasyon oranı ile ilk sırada yer almıştır.

Çalışmamızın kapsadığı 2012, 2013 ve 2014 yıllarında, Hastane Enfeksiyon Kontrol Komitesi (HEKK)'nin verileri incelendiğinde; %15,10, %11,63 ve %10,92 oranları ile YBÜ, HE'nin en sık görüldüğü birimlerdir. Yıllara göre Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi (AYBÜ)'nde HE oranı %49,54, %18,85 ve %13,25; Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi (DYBÜ)'nde ise %15,34, %13,99 ve %10,55 olarak belirlenmiştir. AYBÜ'de 2012 ve 2013 yıllarında HE etkeni olarak en sık izole edilen mikroorganizma %20,34 ve %33,33 oranlarıyla *A. baumannii* iken 2014 yılında *A. baumannii* %6,67 oranıyla dördüncü sırada kalmıştır. Yine benzer şekilde 2012 ve 2013

yıllarında DYBÜ'de HE etkeni olarak en sık izole edilen mikroorganizma %21,74 ve %29,03 oranlarıyla *A. baumannii* iken 2014 yılında *A. baumannii* %22,73 oranıyla ikinci sırada kalmıştır (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. AYBÜ ve DYBÜ'de, 2012, 2013 ve 2014 yıllarındaki HE oranları ve HE etkeni olarak izole edilen mikroorganizmalar

AYBÜ (2012) (%49,54)*	DYBÜ (2012) (%15,34)*
1. <i>Acinetobacter</i> spp. (%20,34) 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%20,34) 3. <i>Staphylococcus aureus</i> (%8,47) 4. Non-albicans <i>Candida</i> türleri (%6,78) 5. <i>Candida albicans</i> (%5,08)	1. <i>Acinetobacter</i> spp. (%21,74) 2. <i>Enterococcus</i> spp. (%13,04) 3. <i>Candida</i> türleri (%8,07) 4. <i>Escherichia coli</i> (%8,07) 5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%8,07)
AYBÜ (2013) (%18,85)*	DYBÜ (2013) (%13,99)*
1. <i>Acinetobacter</i> spp. (%33,33) 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%11,11) 3. <i>Candida</i> türleri (%11,11) 4. <i>Enterococcus faecium</i> (%11,11) 5. <i>Candida albicans</i> (%5,56)	1. <i>Acinetobacter</i> spp. (%29,03) 2. <i>Candida</i> türleri (%12,90) 3. Koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i> türleri (%9,68) 4. <i>Enterococcus</i> spp. (%6,45) 5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (%6,45)
AYBÜ (2014) (%13,25)*	DYBÜ (2014) (%10,55)*
1. <i>Enterococcus</i> spp. (%20,00) 2. Koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i> türleri (%13,33) 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%13,33) 4. <i>Acinetobacter</i> spp. (%6,67) 5. <i>Candida albicans</i> (%5,56)	1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (%31,82) 2. <i>Acinetobacter</i> spp. (%22,73) 3. <i>Candida albicans</i> (%9,09) 4. <i>Enterococcus faecalis</i> (%9,09) 5. Koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i> türleri (%9,09)

*YBÜ yıllık HE oranları

2.2. *Acinetobacter* spp.

2.2.1. Taksonomisi ve Tarihçesi

Acinetobacter ilk kez 1911 yılında, Hollandalı mikrobiyolog Martinus Willem Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiştir ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırılmıştır. Günümüze kadar *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolyans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratus* ve *Achromobacter mucosus* gibi farklı isimler almış, yapısal ve biyokimyasal özellikleri ile sınıflandırılmaları oldukça karmaşık süreçlerden geçmiştir (8-10). Brisou ve Prevot (11) tarafından 1954 yılında önerilen ve 1968 yılında Baumann ve ark. (12) tarafından da kullanılan '*Acinetobacter*' cins ismi, Bergey'in Sistemik Bakteriyoloji Kılavuzu'nun 1974 yılı baskısında resmi olarak kabul edilmiştir (13).

Cinsin uzun ve karmaşık tarihinde Bouvet ve Grimont (14) tarafından 1986 yılında yeni bir atılım yapılmış ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına dayanarak *Acinetobacter* cinsi içerisinde 12 genetik tür tanımlanmıştır. Bunlardan, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* ve *A. lwoffii* türleri daha önce tanımlanan türlerdir. Yakın zamanda tanımlanan insan kaynaklı üç tür, *A. parvus*, *A. schindleri*, *A. ursingii* ve aktif çamurdan izole edilen yedi tür *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii* ve *A. gernerii* ile birlikte tanımlanan genomik tür sayısı 33'e yükselmiştir (8). Ancak türlerden *A. lwoffii* ve genomik tür 9, 13BJ ve 14TU, *A. junii* ve *A. grimontii*'nin birbirinin aynı olduğu saptanmış ve genomik tür sayısı toplamda 30 olarak tanımlanmıştır. Türlerden 18'ine özel isimler verilirken diğer genomik türler isimlendirilmemiştir (8,9,15). Fenotipik özellikler kullanılarak *A. calcoaceticus* (*Acinetobacter* genomik tür 1), *A. baumannii* (*Acinetobacter* genomik tür 2), *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU'yu ayırt

etmek zor olduğundan literatürde *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks terimi kullanılmaktadır (10,15). Bu gruplandırma taksonomi ile ilgili olmayıp tanımlamada fenotipik özelliklerinden yola çıkılarak birbirlerinden ayrılması zor olan bu dört türü içeren grubu bir arada ifade etmek için kullanılmaktadır.

Taksonomik verilere dayanarak, *Gammaproteobacteria* sınıfında, *Pseudomonadales* takımında ve *Moraxellaceae* ailesi içinde yer alan *Acinetobacter* cinsi içinde tanımlanan tüm bu türler arasında, insanlarda en sık enfeksiyonlara yol açan etken *A. baumannii*'dir (10,15,16).

2.2.2. Genel Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikleri

Acinetobacter cinsi; gram negatif, zorunlu aerob, non-fermentatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketsiz, kolay üreyen, DNA'daki G+C içeriği %39-47 arasında değişen bakterileri kapsamaktadır (15,17). *Acinetobacter*'ler hızlı üreme esnasında basil morfolojisinde olup duraklama döneminde ise kokobasil formundadır. Kapsüllü olan sınıf üyeleri, Gram boyama sırasında kristal viyoleyi tutma eğilimleri gösterebildiği için yanlışlıkla gram pozitif olarak tanımlanabilmektedir (10,15,18).

Birçok karbon ve enerji kaynağını kullanabildikleri için, rutin laboratuvar ortamında kullanılan koyun kanlı agar ya da triptik soy agar gibi genel üretim besiyerlerinde, 37°C inkübasyon sıcaklığında kolayca üretilmektedirler. *A. baumannii* ise ayrıca 41°C ve 44°C'de üreyebilir. Kanlı agarda 18-24 saatlik inkübasyon sonunda, özellikle *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksine ait türler *Enterobacteriaceae* üyelerine benzer şekilde 1,5-3 mm çapında, düz, bazen mukoid, opak renkli koloniler oluştururken; MacConkey ve eozin metilen mavisi agarda ise laktoz negatif, şeffaf veya pembe renkli koloniler oluşturmaktadırlar. Ayrıca, *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi dışındaki bazı *Acinetobacter* türleri, MacConkey agarda üreme göstermeyebilmektedirler. *Enterobacteriaceae* üyelerinden farklı olarak glikozu fermente edememesi, nitratı indirgeyememesi ve anaerobik ortamda üreyememesi özellikleri mevcuttur (15,17,18). Glikozu okside eden belli bazı *Acinetobacter* türleri, tirozin içeren

kalp infüzyon agarda veya glikoz eklenmiş kanlı agarda kahverengi renk değişimine neden olmaktadır. Bu fenomen, MacConkey ve Mueller-Hinton besiyerinde de gözlenmiştir (17).

Klinik laboratuvarlarda geleneksel biyokimyasal yöntemlerle fenotipik yönden türler arasında ayırım yapmak güç olduğundan, *Acinetobacter* türleri, sakkarolitik ve asakkarolitik olarak incelenmiştir (Tablo 2.2.). Glikozu okside eden, hemolitik olmayan ve 37°C, 41°C ve 44°C'de üreme gösteren suşların çoğu *A. baumannii*; yine hemolitik olmayan ancak glikozu okside etmeyen suşların birçoğu da *A. lwoffii*; hemoliz ve jelatin hidrolizi yapan suşlar ise *A. haemolyticus* olarak tanımlanmıştır (17).

Acinetobacter cinsi üyelerinden bazıları, birçok karbon kaynağının asimilasyonu temeline dayanan farklı hazır ticari sistemler ile de tanımlanabilir. Fakat bu testlerin en büyük dezavantajı, *Acinetobacter* sınıfına ait daha yeni keşfedilen bazı türlerin tablolarda yer almaması nedeniyle tüm türleri tanımlayamamasıdır. Bu sistemlerde *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU genellikle *A. baumannii* olarak tanımlanmaktadır (15,19). Son yıllarda rutin laboratuvarlara girmiş ve tür tanımlamasında iyi sonuçlar veren bir yöntem de "Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometre (MALDI-TOF)" yöntemidir. Bu yöntem, tür tanımlamasını bir saatten kısa bir sürede yapabilen etkin bir yöntem olmakla birlikte literatüre bakıldığında *Acinetobacter*'leri tür düzeyinde tanımlamasındaki oranlar halen yeterli değildir (20,21). Son yıllarda yapılmış bir çalışmada (22) ise *A. baumannii* tanımlanmasında, bu türe özgü olan OXA-51 karbapenemaz geninin belirlenmesinin kullanılması önerilmiştir. Tür tayininde kesin sonuç veren moleküler yöntem 16S rDNA dizi analizi yöntemidir. Ayrıca 16S-23S rRNA intergenik ara bölge sekansının restriksiyon analizi ile de tür tayini yapılabilmektedir (23).

Tablo 2.2. Sakkarolitik ve asakkarolitik *Acinetobacter* türlerine ait özellikler

Test	Asakkarolitik	Sakkarolitik
Hareket	-	-
Katalaz	+	+
Asit oluşumu:		
D-Glikoz	-	+
D-Ksiloz	-	+
D-Mannitol	-	-
Laktoz	-	+
Sükroz	-	-
Maltoz	-	D
Üreme:		
MacConkey	+	+
SS	D	D
Setrimit	D	D
Simmon sitrat	D	+
Christensen, üreaz	D	D
Nitrat redüksiyonu	D	D
H ₂ S (Kurşun asetat kağıdı)	D	D
Jelatin hidrolizi	D	D
Eskülin hidrolizi	-	-
Lizin dekarboksilaz	-	D
Arjinin dihidrolaz	D	D
Ornitin dekarboksilaz	-	D

D: Değişken

2.2.3. Epidemiyolojisi

Enterobacteriaceae ailesinin neden olduğu dirençli HE'nin 1970'li yıllardan itibaren giderek artan insidansı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı arttırmış ve buna bağlı olarak da *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Acinetobacter* türleri de dahil olmak üzere aerobik, non-

fermentatif gram negatif basillerin hasta örneklerinden etken olarak izolasyonlarında önemli artışlar görülmüştür (1,4).

Acinetobacter cinsi bakteriler, yaşamlarını sürdürebilmek için gereksinimlerinin az olması, çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilmesi, kuruluğa dayanıklı olması, farklı ısı ve pH ortamlarında canlı kalabilmesi nedeniyle doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmekte ve cansız yüzeylerde günlerce canlı kalabilmektedirler. Hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmeleri ve çapraz bulaşın kolaylıkla meydana gelebilmesi nedeniyle özellikle YBÜ olmak üzere hastanelerde ciddi salgınlara yol açabilmekte, hatta hastaneler arasında yayılım söz konusu olabilmektedir (10,24). Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada (25), *Acinetobacter* türlerinin *Pseudomonas* türlerinin ardından en sık saptanan ikinci mikroorganizma (%21,9) olduğu bildirilmiştir.

Günümüzde de geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanımı, hem *Acinetobacter* türleri ile gelişen HE oranını arttırmış hem de bu bakterilerde birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmesine neden olmuştur. Bunun sonucu olarak da YBÜ'de salgınlara yol açan, mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olan ve çoklu antibiyotik direnci nedeniyle tedavi başarısızlıkları gözlenen bu patojenin klinik önemi tüm dünyada artmıştır (24,26).

2.2.4. Patogenezi ve Virülansı

Acinetobacter türleri sağlıklı bireylerin koltuk altı, kasık, parmak arası gibi nemli bölgelerin deri florasında ve solunum sistemi ve daha nadir olarak gastrointestinal ve genitoüriner sistem gibi mukoza membranlarında kolonize olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda en sık izole edilen türler *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. radioresistens* ve *Acinetobacter* genomik tür 3 olarak bildirilmiştir. *A. baumannii*'nin ise oldukça nadir olduğu gösterilmiştir (27-29). Hastane ortamında; enfekte hastalardan ya da kolonizasyon belirlenen hastalardan kolayca çevreye yayılması uzun süren salgınlarla ilişkilendirilmiştir (28). YBÜ'de yatan hastalarda solunum sistemi

kolonizasyonunun yüksek oranda görülmesi, ekipmanları kontamine ederek ve bunlar üzerinde günlerce canlılığını sürdürerek salgınlara yol açtığını göstermiştir. Deri taşıyıcılığı oranlarının yüksek olması nedeniyle de, salgınlar sırasında hem hastalar hem de hasta bakımı sırasında sağlık personelleri kontamine olmakta ve etken sürekli yayılmaktadır. Bu durum için en önemli nokta aslında kullanılan eldivenlerdir. Kolonize veya enfekte hasta bakımı sonrası, aynı eldiven ile birden fazla hastaya temas edildiği ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin düzgün uygulanmadığı durumlarda, sağlık çalışanları da önemli bir kaynak haline gelmektedir (26,30).

In vitro çalışmalar; bakterinin formika, seramik, paslanmaz çelik, kauçuk, polivinil klorür içeren çeşitli yüzeylerde yaşayabileceğini göstermiştir. Hastane ortamında; en çok solunum yolu ekipmanları ve cihazları kolonize olmakla birlikte hava, yatak rayları, hasta çarşafı, minder, perde, cam, hasta kaldırma askısı, temizlik için kullanılan bezler, kovalar, kapı kolları, lavabolar, ventilatör yüzeyleri, peritoneal diyaliz maddeleri, steteskoplar, anjiyografi kateterleri, resüsitasyon ekipmanları, solunum tedavi solüsyonları, tansiyon aletleri, kontamine eldivenler, pamuk, kullanılmış enjektörler, hasta yastıkları, kuru filtreler, bilgisayar klavyeleri gibi diğer yerler de *Acinetobacter* türlerinin kolonize olduğu bölgelerdir (26,31,32).

Acinetobacter cinsi bakterilerin geçmişte virülans potansiyellerinin düşük olduğu, konak savunma mekanizması normal olanlarda enfeksiyon oluşturmalarının oldukça güç olduğu ve genellikle fırsatçı HE'ye neden olduğu kabul edilmekteydi. Fakat son yıllarda bu patojen ile ilişkili toplum kökenli enfeksiyon bildirimlerinin fazlalaşması ve ilaç direncindeki artışla birlikte meydana gelen salgınların artması, bu organizmanın bazen yüksek patojeniteye sahip olabileceğini göstermiştir (30,33). Yine de virülans faktörlerine ve patogeneze dair bilgiler sınırlıdır. Biyofilm oluşturma, *A. baumannii*'nin virülans faktörleri arasında en iyi bilinenlerdendir. Bu özelliği HE'ye yol açma ve hastane ortamında uzun süre canlı kalabilme yeteneği ile ilgilidir. Yine biyofilm üretimi, antimikrobiyal ajanlardan ve konağın bağışıklık yanıtından kaçmasına olanak sağlamak suretiyle enfeksiyonların patogeneze katkıda bulunmaktadır (34,35). Bu patojen epitel hücrelerine,

damar içi kateter, trakeal kanül gibi yüzeylere adezyonunu, polisakkarit yapısındaki kapsülü ve fimbriaları ile yapmaktadır. Polisakkarit kapsül, L-ramnoz, D-glikoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşur. Bakteri yüzeyinin hidrofilik özelliğini sağlayıp bakteriyi fagositoza karşı korur. Ayrıca insan hücrelerine tutunduktan sonra bu patojenin Omp38 ya da OmpA adı verilen bir dış membran proteini (Omp) aracılığı ile apoptozu indüklediği görülmüştür. Bu mekanizma, aynı zamanda plastik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumuna ve insan serumunda canlılığını uzun süre sürdürebilmesine katkı sağlamaktadır. Ayrıca *A. baumannii*'de bulunabilen PER-1 β -laktamaz geninin, biyofilm oluşturma ve epitel hücrelerine adezyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (36-38). Zaten antibiyotik direnci sağlayan genler, virülansı arttırmakta ve klinik olarak daha ölümcül enfeksiyonların oluşmasına neden olmaktadır (34).

Acinetobacter baumannii, hücre duvarının lipopolisakkarit bileşeni Lipid A ile doku lipitlerini yıkan endotoksin üretebilmektedir. Yine Lipid A, potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırır. Bu patojenin jelatinaz, esteraz ve fosfolipaz C gibi hücre dışına salgıladığı virülans faktörleri de mevcuttur (39,40).

Bazı *Acinetobacter* izolatlarında bulunabilen, demiri tutma kabiliyetini sağlayan demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi, önemli bir diğer virülans faktörüdür. *A. baumannii*'nin insan vücudunda canlılığını sürdürebilmek için, insan hücrelerindeki demiri almasını sağlayan bir 'Acinetobaktin sideroforu' ürettiği ilk kez *A. baumannii* 19606 izolatında tanımlanmıştır (41,42).

Çoğunluğu algılama (quorum sensing) sistemi, bu bakterinin bir diğer regülasyon mekanizmasıdır. N-açıl homoserin lakton yapısındaki sinyal moleküllerinin rol oynadığı bu sistem, patojenin uygun olmayan çevresel koşullara adaptasyonunu sağlayabilmektedir (34,39).

2.2.5. Risk Faktörleri

Enfeksiyonu kolaylaştıran faktörler başlıca konağa bağlı ve ortama bağlı (çevresel) faktörler olarak iki ana grupta toplanabilir. Konağa bağlı faktörlerin içinde en ön sırada hastaya ait risk faktörleri gelmektedir. Bunların içinde ilerlemiş yaş, altta yatan hastalık, birden çok hastalık veya gelişen komplikasyon varlığı, bağışıklık yanıtındaki sorunlar, 48 saatten fazla ventilasyon desteği ihtiyacı, serum albümin düzeyinin <2.5 mg/dl ve kolesterol düzeyinin <100 mg/dl olması, mevcut hastalığın ciddiyeti, hastanede uzun süreli yatış hikayesi ve yüksek APACHE II düzeyi yer almaktadır (43,44).

Çevresel faktörlere baktığımızda ise YBÜ'lerde çoğul antibiyotik direnci olan mikroorganizmalar genellikle sağlık personelleri aracılığıyla kolay yayılma olanağı bulmaktadır. Bu çapraz ve çevreden bulaş, ekzojen kolonizasyona yol açar ve böylece antibiyotiklere dirençli, toplumda az sıklıkla görülen mikroorganizmalar ile özellikle gram negatif basillerin yayılması görülür. Sonuçta hastalar kolonize ya da enfekte olarak duyarlı hastalar için de kaynak haline gelmiş olur (39,45,46). Çevreden bulaşmada ayrıca hastanede kullanılan eşyalar, hava, su, yiyecek ve içecekler de risk oluşturabilmektedir. YBÜ'de uygulanan tedavi ve invaziv girişimler de enfeksiyonu kolaylaştıran faktörler arasındadır. Bu işlemler içinde sayılabilecek intravenöz, intraarteriyel, nazogastrik, üriner kateter; entübasyon-mekanik ventilasyon; enteral beslenme ve total parenteral nütrisyon; antiasit, H₂ reseptör blokörü, kortikosteroid tedavisi ve cerrahi girişim, nozokomiyal patojenlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran bağımsız predispozan faktörlerdendir (47,48).

2.2.6. Enfeksiyonları

Acinetobacter baumannii genel olarak hastanede yatan, bağışıklık yanıtı ve savunma sistemi zayıflamış, invaziv girişimler nedeniyle deri

bütünlüğü ve solunum yolu koruması bozulmuş hastaları hedef alan fırsatçı bir patojendir. Bu nedenle enfeksiyonları özellikle geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının yaygın ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin yetersiz olduğu YBÜ'de görülmektedir. Bu hastalarda en sık olarak mekanik ventilasyon ile ilişkili pnömoni, invaziv girişimleri takiben ve pnömoniye sekonder oluşan kan dolaşım enfeksiyonları görülmektedir (14,48,49). *A. baumannii*'ye bağlı üriner sistem, santral sinir sistemi, deri, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonları da bildirilmiştir (49,50).

2.2.7. Tedavi Seçenekleri

Acinetobacter baumannii'de kromozomal olarak kodlanan doğal direnç ve ayrıca kazanılmış direnç varlığı nedeniyle günümüzde bu türe karşı kullanılabilecek etkin antibiyotiklerin sayısı oldukça düşüktür ve *Acinetobacter* enfeksiyonları ile ilgili en büyük sorunu da bu oluşturmaktadır (50).

2.2.7.1. β -laktamlar

Acinetobacter spp. içerisindeki çoğu tür, β -laktam ajanlar da dahil olmak üzere birçok antibiyotik sınıfına karşı 1970'lere kadar duyarlı iken, kontrolsüz antibiyotik kullanımı ve *A. baumannii*'nin güçlü direnç geliştirme yeteneği neticesinde son 10 yıllık süreç içerisinde çoklu ilaç direnci (ÇİD)'ne sahip *A. baumannii* izolatlarının sayısında ciddi bir artış meydana gelmiştir (50,51).

β -laktam ajanlar *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan; penisilinlerin, sefalosporinlerin, monobaktamların ve karbapenemlerin yer aldığı önemli bir antibiyotik grubudur. Bu antibiyotik grubunun etkinliklerinin yüksek ve kimyasal modifikasyonlar ile arttırılabilir olması ve güvenli kullanılabilmeleri, tedavide sıklıkla tercih edilmelerine sebep olmaktadır (50-52). β -laktam ajanlar penisilin bağlayan protein (PBP)'lere bağlanarak etkinlik gösterirler. Böylece hücre duvarı sentezindeki peptidoglikan oluşumunu son

transpeptidasyonu engelleyerek bozarlar ve hücre ölümüne sebep olurlar (51,52).

Anti-psödomonal aktivite ile geniş spektrum gösteren karboksi ve üreidopenisilin yapısındaki penisilinlerin, gram negatif basiller üzerine etkinliği aminopenisilinlerden daha fazladır. Tikarsilin ile karbenisilinin etkisi benzerdir, fakat tikarsilinin etkin dozu daha düşüktür (50,52).

Ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılan, en geniş etki spektrumuna sahip β -laktam ajanlar olan karbapenemlerin, diğer sınıf antibiyotiklere karşı oluşan artan direnç oranları nedeniyle *A. baumannii* enfeksiyonlarında kullanımı artmıştır (53). Karbapenemler, yapılarında bulunan ve molekülü hidrolizden koruyan bir trans- α -1-hidroksietil grubu sayesinde birçok β -laktamaza dayanıklıdır. Ertapenem dışındaki karbapenemler (imipenem, meropenem ve doripenem) *A. baumannii*'ye karşı aktiftirler. Kimyasal yapılarına bağlı olarak, genişletilmiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL)'lara ve kromozomal AmpC β -laktamazlara daha direçlidirler (53,54). Fakat bu ajanlara karşı bildirilen direnç oranlarının %50'lerin üstüne çıkması nedeniyle bu antibakteriyallerin klinik kullanımı giderek kısıtlanmaktadır (54).

2.2.7.2. β -laktamaz İnhibitörleri

β -laktamaz inhibitörleri, β -laktamazlara duyarlı β -laktamların hidrolizini engellemek için önerilmektedir. Sulbaktam yarı sentetik bir β -laktamaz inhibitörüdür ve diğer β -laktamaz inhibitörlerinin (klavulanik asit ve tazobaktam) aksine PBP-2'ye bağlanmaktadır ve *Acinetobacter* spp.'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Farklı ülkelerde tek başına ya da ampisilin ve sefaperazon ile kombine olarak bulunduğu ticari formları mevcuttur. Klavulanik asit ile amoksisilin ve tikarsilin kombinasyonlarının ve sulbaktam ile ampisilin kombinasyonunun *A. baumannii*'ye karşı bakterisidal etki gösterdiği ve karbapenem dirençli izolatlara karşı da etkili olabildiği bildirilmiştir (55).

2.2.7.3. Tetrasiklinler

Tetrasiklinler, bakteri ribozomunun 30S alt ünitesine geri dönüşümlü olarak bağlanarak tRNA'nın mRNA-ribozom kompleksine erişimini engellemek suretiyle protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. *A. baumannii*'ye karşı bu grup antibiyotiklerden özellikle yeni geliştirilen minosiklin türevi olan tigesiklinin etkili olduğu düşünülmektedir. Yapısında bulunan glisilamido kısmı nedeniyle tigesiklin, tetrasikline özgü direnç mekanizmalarına karşı daha dayanıklıdır. Bakteriyostatik bir ajan olan tigesiklinin, *A. baumannii* için zon sınır değerleri yoktur ve bu durum tigesiklinin kullanımını zorlaştırmaktadır. Klinik kullanım sırasında tigesikline karşı direncin ve tedavi başarısızlığının bildirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (56,57).

2.2.7.4. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler, bakteri ribozomunun 30S alt ünitesine geri dönüşümsüz olarak bağlanmak suretiyle protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Bakterisidal ajanlar olan aminoglikozidler içerisinde yer alan amikasinin, *A. baumannii*'ye karşı gentamisinden ve tobramisinden daha etkin olduğu bildirilmektedir. Doku penetrasyonlarının zayıf ve klinik tedavi başarısının kısıtlı oluşu nedeniyle aminoglikozidlerin *Acinetobacter* enfeksiyonlarında diğer ajanlarla birlikte kombine halde kullanılması önerilmektedir (58,59).

2.2.7.5. Florokinolonlar

Nalidiksik asid türevi olan florokinolonlar, DNA'yı negatif süpersarmal haline getiren DNA-giraz (topoizomeraaz II) enzimini, alfa alt birimine bağlanarak inhibe ederler. Bakterisidal ajanlar olan florokinolonların sadece

kombine tedavilerde kullanılması önerilmektedir. ÇİD'e sahip *A. baumannii* izolatlarına karşı florokinolonlar da sınırlı aktiviteye sahiptir (59).

2.2.7.6. Polimiksinler

Polimiksin E (kolistin) ve polimiksin B, ticari olarak sağlanabilen ve ÇİD'e sahip *A. baumannii* enfeksiyonlarında en yüksek duyarlılık oranlarına sahip olan antibiyotik grubudur. Polimiksin B, kolistin ile benzer etkinliğe ve toksisiteye sahiptir; fakat klinikte daha çok kolistin kullanılmaktadır. Bakterisidal bir ajan olan kolistin, gram negatif hücre membranını, lipopolisakkarit ile ilişkili bir elektrostatik mekanizma aracılığıyla bozarak hücre içi yapıların dış ortama sızmasına ve hücre ölümüne sebep olur. Polimiksinler eskiden çok kullanılan ajanlar iken yüksek nefrotoksisite riski nedeniyle zaman içinde önemini yitirmişlerdir. Fakat dirençli etkenlerin artmasına ve tedavide kullanılabilecek etkin bir antibiyotiğin kalmamasına bağlı olarak tekrar yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yine de yüksek nefrotoksisite riski nedeniyle kolistin kullanılan hastaların böbrek fonksiyonları yakından izlenmelidir. Kolistin karbapenemler ve rifampin ile sinerjik etki gösterdiği için tedavide bu ajanlarla kombine şekilde kullanılması önerilmektedir (60,61).

2.2.7.7. Sülfonamidler

Sülfonamidler, dihidropteroat enzimini inhibe ederek folik asit dolayısıyla folinik asit sentez reaksiyonunu inhibe ederler. Sülfonamidlerin yapısı para aminobenzoik asit (PABA) yapısına benzediğinden, bakterilerin üremesinde gerekli olan ve dışarıdan sağlanan bu madde ile sülfonamidler yalancı substrat gibi etkileşerek yarışmaya girmektedir. Besinlerle alınan folik asit, bakterilerden farklı olarak insan hücrelerine geçebildiğinden sülfonamidler etkili olamamaktadır. ÇİD'e sahip *A. baumannii* izolatlarına

karşı sülfonamidler de florokinolonlara benzer şekilde sınırlı aktiviteye sahiptir (62).

2.2.8. Çoklu İlaç Direnci (ÇİD), Yaygın İlaç Direnci (YİD), Tüm Antimikrobiklere Direnç (TAD)

Acinetobacter baumannii enfeksiyonlarında görülen antimikrobiyal direnci tanımlamak için literatürlerde ÇİD, “Yaygın İlaç Direnci (YİD)” ve “Tüm Antimikrobiklere Direnç (TAD)” gibi çeşitli terimler kullanılmaktadır. Ancak bu terimlerle ilgili kabul görmüş ulusal standart bir tanım yoktur ve literatürlerde farklı tanımlamalar kullanılmaktadır. Farklı bölgelerde dirençli izolat oranlarındaki değişiklikler ve aynı zamanda yeni antimikrobiyal ajanların kullanıma girmesiyle direnç tanımlamaları sürekli değişmektedir (63). İlk yapılan çalışmalarda ÇİD terimi, mevcut antimikrobiklerin en az birine direnç şeklinde tanımlanmıştır (64).

İlerleyen yıllarda direnç oranlarındaki artışa bağlı olarak ÇİD terimi, mevcut antibiyotiklerin üçten fazlasına direnç ve hatta bazı çalışmalarda kolistin ve tigesiklin hariç mevcut antimikrobik ajanlara direnç olarak tanımlanmıştır (65-68). Ancak TAD teriminin kullanılmaya başlanması ile direnç tanımlamaları yeniden şekillenmiştir. ÇİD terimi, mevcut antibiyotiklerden üçten fazlasına direnç, TAD terimi ise mevcut tüm antibiyotiklere direnç şeklinde tanımlanmıştır (69,70). Yeni antibiyotiklerin kullanıma girmesi ve mikroorganizmanın bunlara karşı direnç geliştirmesi nedeniyle YİD terimi de ilave edilmiştir. Buna göre YİD terimi, bir ya da iki antibiyotik dışında tüm antibiyotiklere direnç ve TAD terimi ise mevcut tüm antibiyotiklere direnç şeklinde tanımlanmıştır (71-76).

2.2.9. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter baumannii'nin benzilpenisilin, sefoksitin, sefamandol, sefuroksim, glikopeptid, fusidik asit, makrolid, linkozamid, streptogramin,

rifampisin, daptomisin, linezolid, ampisilin, amoksisilin-klavulanat, sefazolin, sefotaksim, seftriakson, ertapenem, trimetoprim, fosfomisin gibi pek çok antibiyotiğe karşı sahip olduğu doğal (intrinsek) direnç, antimikrobiyal direnç genlerini hızlı bir şekilde kazanma yeteneği ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı da eklenince, *Acinetobacter*'ler tüm dünyada geniş antimikrobiyal direnç profili ile önemli bir hale gelmiştir (57,60).

2.2.9.1. Karbapenem Direnci

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de *A. baumannii* enfeksiyonlarında yüksek karbapenem direnç oranlarının saptanmaya başlanması ile birlikte karbapenem direnç mekanizmalarının anlaşılmasının önemi ve gerekliliği zorunlu olmuştur. Geçmişte karbapenem duyarlılık sınır değerlerine ilişkin uluslararası bir fikir birliğinin olmayışı, direnç sorununun anlaşılmasını etkilemekte iken; artık *Acinetobacter* spp. için imipenem ve meropenem'e ait sınır değerleri, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) (77) ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu (CLSI) (78) tarafından benzer şekilde ≤ 2 µg/ml duyarlı; ≥ 8 µg/ml dirençli olarak düzenlenmiştir.

Acinetobacter baumannii'de karbapenemlere karşı direnç, genellikle tek bir mekanizmaya bağlı değildir. β -laktamaz enzimleri, dış membran geçirgenliğinin bozulması, dışa atım (efluks) pompaları ve ilacın hedef bölgesindeki PBP'lerin yapısındaki değişiklikler gibi enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar, direnç gelişiminde birlikte görev almaktadır (51,53).

2.2.9.1.1. Enzimatik Olmayan Direnç Mekanizmaları

İlacın hedef bölgesindeki PBP'lerin yapısındaki değişiklikler; kromozomal mutasyonlar sonucu PBP'nin β -laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması, PBP

sayısında azalma olması veya β -laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir.

β -laktam antibiyotikler, porin F ve porin C kanalları aracılığı ile dış membranı geçerek hücre içine girmektedirler. Dolayısıyla bakteri, porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak dış membran geçirgenliğini bozabilir ve β -laktam antibiyotiklere direnç geliştirebilir. *A. baumannii*'de ÇİD'den sorumlu temel dışa atım pompa sistemi ise, kromozomal olarak kodlanan, üç bölümden oluşmuş "AdeABC" olarak bilinen aktif pompa sistemidir (79,80).

2.2.9.1.2. β -laktamazlar

Acinetobacter baumannii'deki karbapenemlere karşı direnç mekanizmaları arasında en etkin rol, karbapenemaz aktivitesine sahip β -laktamaz enzimlerindir. Gram negatif bakterilerde periplazmik aralıkta bulunan bu enzimler, β -laktam halkası üzerine etki göstererek kovalent açıl ester oluşumuna ve esterin hidrolizi sonucu β -laktam antibiyotiğin inaktif hale gelmesine sebep olurlar. β -laktamaz üreten *Acinetobacter* kökenleri β -laktam ajanlara karşı doğal dirence sahip olabildikleri gibi, kromozomal genlerde mutasyon olması veya kromozom dışı (plazmid, transpozon) genetik materyalin kazanılması sonucu da direnç geliştirebilmektedir (81). β -laktamazlar Ambler sınıflandırması (82) ile A, B, C, D olmak üzere dört grupta toplanmaktadır:

- Grup A karbapenemazlar: KPC, GES
- Grup B karbapenemazlar/metallo- β -laktamaz (MBL)'lar: NDM, VIM, IMP, SIM
- Grup C karbapenemazlar: AmpC
- Grup D karbapenemazlar: OXA, PSE

A, C ve D grubu aktif olmak için serine ihtiyaç duyduklarından dolayı serin β -laktamazlar olarak adlandırılırlar. Grup B enzimleri ise aktivite için çinkoya gereksinim duyarlar. Serin β -laktamazlar, EDTA ile inhibe olmazlarken; MBL'ler ise inhibe olmaktadır. *A. baumannii*'deki karbapenem direncinin en sık rastlanan sebebi, OXA (serin oksasilinaz) tipi enzimlere bağlı enzimatik yıkımdır. Bunu MBL'ler izlemektedir (83).

2.2.9.1.2.1. Sınıf A β -laktamazlar

Grup A, aktif bölgelerinde serin bulunduran ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimleri içermektedir. Bu β -laktamazlar birçok penisilini ve sefalosporini hidrolize edebilen, çoğunlukla β -laktamaz inhibitörlerine karşı duyarlı olan enzimlerdir. Bu gruptaki enzimlerin tümü karbapenemaz aktivitesine sahip değildir ve bu enzim grubunun çoğunu GSBL'ler oluşturur. Bu sınıfta yer alıp da karbapenemaz aktivitesi olan GES ve KPC enzimleri ise en sık *Enterobacteriaceae* ailesinde saptanmakla birlikte, KPC-benzeri ve GES-benzeri enzimler, karbapenemlere dirençli *A. baumannii* izolatlarında da bildirilmiştir (84-86).

2.2.9.1.2.2. Sınıf B β -laktamazlar

Bu gruptaki enzimlerin tümü karbapenemaz aktivitesine sahiptir. MBL olarak da bilinen bu β -laktamazlar, aktif bölgelerinde serin aminoasiti yerine genellikle çinko olmak üzere bir ya da iki metal iyonu bulundurma özellikleri ile diğer sınıflardaki enzimlerden ayrılırlar (87). *A. baumannii* izolatlarında OXA-tipi enzimlere nazaran daha az sıklıkta tespit edilirler; fakat karbapenemlere karşı hidrolitik aktiviteleri oksasilinazlardan daha fazladır. Ayrıca OXA-tipi enzimlerden farklı olarak MBL'ler, çoğunlukla direnç determinantlarının kazanım ve ekspresyonuna olanak sağlayan özelleşmiş genetik yapılar olan integronlar ile birlikte bulunmuşlardır. *A. baumannii*'deki kazanılmış MBL genlerinin birçoğu, sıklıkla sınıf 1 integronlar ile birlikte gen

kasetlerinin bir dizisini içeren şekilde saptanmışlardır. Bu özel genetik yapının klinik açıdan önemi; bir antimikrobiyalın aşırı kullanımının genel bir promotorun sonucu olarak çoklu direnç determinantlarının yüksek düzeyde ekspresyonuna yol açabilmesidir. İntegronlar ile birlikte bulunmaları, genin üst bölgesinde hareketli eleman olarak insersiyon sekanslarına sahip olmaları ve yüksek oranda karbapenemleri hidrolize etme yetenekleri nedeniyle antibiyotik tedavi seçenekleri açısından ciddi problemler oluşturmaktadırlar (87-89).

2.2.9.1.2.3. Sınıf C β -laktamazlar

AmpC veya *Acinetobacter* kökenli sefalosporinazlar olarak da bilinen bu sınıfa ait enzimler, *A. baumannii*'de doğal olarak bulunmaktadır. Diğer gram negatif bakterilerden farklı olarak *A. baumannii*'de genin üst bölgesinde *ISAbal* elemanının bulunması durumunda ekspresyonları indüklenebilir. Bu sınıfa ait enzimlerin karbapenemaz aktiviteleri yoktur; fakat porin mutasyonları gibi diğer direnç mekanizmalarıyla birlikte bulunduklarında karbapenem duyarlılığında azalmaya neden olabilmektedirler (81,82).

2.2.9.1.2.4. Sınıf D β -laktamazlar

Acinetobacter baumannii'de karbapenem direncinin bilinen en yaygın sebebi olan OXA-tipi karbapenemazlar, oksasilini benzilpenisiline göre daha iyi parçalayan β -laktamaz grubudur. Ayrıca bunlar aminopenisilinleri, metisilini ve bazı birinci kuşak sefalosporinleri inaktive edebilirler. OXA-tipi karbapenemazların MBL'lere göre karbapenemleri hidrolize etme yetenekleri daha düşüktür; fakat bu enzimlerin önemli karbapenemazlar olmalarını sağlayan sebep, ekspresyonlarının insersiyon sekans elemanları ile yeniden düzenlenmesidir (82,83,90). Ayrıca dışa atım pompalarının artan ekspresyonu ve porin kaybı gibi diğer direnç mekanizmaları ile birlikte bu enzimlerin direnç oluşturmadaki etkinlikleri de oldukça artmaktadır (79). Tüm

bu sayılan özelliklerinin yanında *A. baumannii*'de prevalansı en yüksek olan karbapenemaz grubu, OXA-tipi karbapenemazlardır ve bu tez çalışmamızda bu enzim tipinin ve epidemiyolojisinin araştırılmış olmasının da en önemli sebebi budur.

Günümüzde *A. baumannii*'de tanımlanan OXA-tipi karbapenemazlar filogenetik olarak beş temel grupta toplanmıştır. Bunlar; OXA-23 benzeri, OXA-40/24 benzeri, OXA-58 benzeri, OXA-51/69 benzeri ve OXA-143 benzeri enzimlerdir (15,91,92). Ayrıca 2013 yılına ait bir çalışmada (93) ise bu beş gruba ait olmayan ve yeni bir grup oluşturduğu düşünülen OXA-235 enzimi tanımlanmıştır.

OXA-23 benzeri β -laktamazlar: İlk olarak 1985 yılında İskoçya'da imipeneme dirençli bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmış ve ARI-1 (imipeneme dirençli *Acinetobacter*) olarak isimlendirilmiştir. Sonrasında OXA-27 ve OXA-49 diye adlandırılan ve OXA-23 enzimi ile %99 aminoasit benzerliğine sahip iki farklı enzim, Singapur ve Çin'de *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. OXA-23 benzeri β -laktamazlar, aminopenisilinleri ve oksasilinleri hidrolize ederken oksimino-sefalosporinleri ve karbapenemleri zayıf olarak hidrolize ederler. OXA-23 benzeri β -laktamazlar, tüm dünyada sıklıkla özellikle HE ile ilişkili salgınlarda bildirilmektedir ve amoksasiline, tikarsiline, meropeneme ve imipeneme karşı dirence yol açmaktadır. OXA-23 benzeri enzimleri kodlayan genler, kromozomal olabileceği gibi çeşitli plazmidler üzerinde de bulunabilmektedir. Çalışmalarda IS4 ailesine ait *ISAbal1*'in her zaman *bla_{OXA-23}* genine yakın bir bölgede yer aldığı gösterilmiştir. Bu durum, *ISAbal1*'in düzenleyici rol oynadığını ve *bla_{OXA-23}*'ün ekspresyonunda ve muhtemelen kazanılmasında kilit rol oynadığını düşündürmektedir (82,91,94,95). Bu enzim, ülkemizden de ilk kez 2008 yılında bildirilmiştir (95).

OXA-40/24 benzeri β -laktamazlar: İlk olarak OXA-24 olarak adlandırılmış olan OXA-40 enzimi 1997 yılında İspanya'dan bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır. Sonrasında ise OXA-40/24 enzimi ile %99'un üzerinde

aminoasit benzerliğine sahip iki farklı enzim olan OXA-25 ve OXA-26, Belçika ve İspanya'dan bildirilerek bu enzim ailesi içine dahil edilmiştir. En son 2004 yılında ise yine %99 aminoasit benzerliği olan OXA-72 enzimi, Tayland'da izole edilen bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır. OXA-40/24 benzeri enzimlerin penisilinleri hidrolizleyebildikleri, karbapenemlere karşı düşük aktivite gösterdikleri ve bazı sefalosporinlere karşı ise çok düşük aktivitede oldukları gösterilmiştir. OXA-40/24 benzeri enzimleri kodlayan genler, kromozomda ya da plazmid üzerinde bulunabilirler (82,91,96-98). Bu enzim, ülkemizden de ilk kez 2013 yılında bildirilmiştir (98).

OXA-58 benzeri β -laktamazlar: OXA-58 enzimi, ilk olarak Fransa'da izole edilen bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır. OXA-23 enzimi ile %48, OXA-40/24 enzimi ile %49 ve OXA-51 enzimi ile %59 aminoasit benzerliği bulunan enzim, 30 Kb'lık bir plazmid üzerinde bulunmuştur. Bu enzim ailesi içerisinde OXA-96 ve OXA-97 enzimleri de yer almaktadır. OXA-58 enzimi, penisilinlere ve imipeneme karşı zayıf aktivite, meropeneme karşı çok zayıf aktivite gösterirken; seftazidim ve sefotaksime karşı aktif değildir. OXA-58 enzimi diğer direnç mekanizmaları ile birlikte çalıştığında yüksek düzeyde karbapenem direncine sebep olmaktadır (82,91,99-101). Ülkemizden ise ilk olarak 2006 yılında bildirilmiştir (101).

OXA-51/69 benzeri β -laktamazlar: OXA-51 benzeri β -laktamazlar, *A. baumannii*'ye özgü, AmpC-tipi sefalosporinazlar gibi doğal β -laktamazlardandır. OXA-51 enzimi ilk olarak 1996 yılında Arjantin'de bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır. Günümüzde OXA-51 benzeri enzimler, β -laktamazlar arasında 68 üyesiyle en geniş enzim ailelerinden biridir. Ancak bu enzimlerin tümü zayıf karbapenemaz aktivite gösterirler ve ampisilinden daha zayıf substrat olan sefaloridin hariç sefalosporinlerin hiçbirisi bu enzimlerle hidrolize olmaz. Ek olarak *A. baumannii* OXA-51 enzim analizleri, tüm izolatlarda *bla*_{OXA-51} geni bulunmasına rağmen sadece *ISAbal* ile komşu olan *bla*_{OXA-51} genlerini taşıyan suşların karbapenem dirençli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *ISAbal*, *bla*_{OXA-51} için düzenleyici gibi

görülmektedir. OXA-51 benzeri β -laktamazların sıklıkla diğer kümelerle ait kazanılmış OXA-tipi enzimlerle kombine olarak bulunduğu ve belirli şartlar altında karbapenem direncinde en azından sinerjik rolü olabileceği öne sürülmüştür (82,91,101,102).

OXA-143 enzim ailesi: Brezilya'da 2004 yılında izole edilen karbapenem dirençli bir *A. baumannii* izolatında saptanmıştır; fakat bu enzim ailesinin önemine ve prevalansına ait veriler, henüz yeterli değildir (103,104).

OXA-235 enzim ailesi: Meksika ve A.B.D.'da 2013 yılında izole edilen *A. baumannii* izolatlarında tanımlanan OXA-235 enzimi, plazmid üzerinde ve gen bölgesinin her iki yönünde de *ISAba1* elemanı ile bitişik olarak saptanmıştır (93).

2.3. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri

Çok ciddi küresel bir sağlık sorunu olan HE'nin yönetiminde, epidemiyolojik araştırmalar çok önemlidir. Bu yüzden belirli bir patojenle oluşan enfeksiyonlarda beklenenin dışında bir artış gözlenmesi halinde araştırmalar başlatılır. HE'nin kontrolünde erken bir uyarıcı olarak görev yapan mikrobiyoloji laboratuvarlarının bu kapsamda en önemli görevleri arasında; sürveyans, nozokomiyal patojenlerin doğru olarak tanımlanması, rutin laboratuvar değerlendirmeleri sırasında YBÜ'deki olası epidemilerin erkenden hissedilmesi ve bunun analizi, yeni sorumlu patojenlerin takibi, antibiyotik direnç paternlerinin izlenmesi ve akılcı antibiyotik kullanımına katkıda bulunulması sayılabilir (1,2,105).

Tiplendirme yöntemleri; hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların ve enfeksiyon etkenlerinin yaygınlığının incelenmesi, salgın araştırmalarında epidemik suşlara ait kaynak araştırılması, yayılım yollarının belirlenmesi ve hastalardaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konulması gibi değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok fenotipik ve genotipik

tiplendirme yöntemleri bulunmaktadır ve tüm bu yöntemlerin etkinlikleri birlikte kullanıldıklarında artmaktadır (4,106).

2.3.1. Fenotipik Yöntemler

Fenotipik yöntemler, genellikle genetik özelliklerin bir yansıması olup bakterilere özgüdür; fakat fenotipik özelliklerine göre aynı olduğu gözlenen tür genetik olarak farklılıklar da gösterebilir. Çünkü fenotipik yöntemler, genel olarak çevre selektif baskısından etkilenebilir; stabil olmayan antijenik özellikler random mutasyonla değişebilir; direnç paternleri, kullanılan antibiyotiklerin selektif baskısından etkilenebilir; kullanılan yöntemler, bakteride yapısal değişikliklere neden olabilir ve fenotipik yöntemler, her bir tür içindeki kökenleri yeterince ayıramayabilir. Bu yüzden fenotipik yöntemlerin düşük ayırım gücü nedeniyle aynı fenotipik özelliklere sahip kökenler saptandığında ek olarak alt tiplendirme yapılmalıdır (105-107).

2.3.1.1. Biyotiplendirme

Acinetobacter baumannii izolatlarının klinik laboratuvarlarda rutin olarak hızlı ve doğru şekilde fenotipik yöntemlerle belirlenebilmesi, epidemiyolojik açıdan oldukça önemlidir. Fenotipik yöntemler içinde ilk olarak bakterilerin tür ayrımında kullanılan glikozdan asit oluşumu, jelatin hidrolizi, değişik ısılarda üreme özelliği (37°C, 41°C, 44°C) gibi biyokimyasal özelliklerin araştırılması esasına dayanan biyotiplendirme sayılabilir. Bu testlerin duyarlılığında ve tekrarlanabilirliğinde problemler yaşanmakta ayrıca genetik faktörlerden etkilenim nedeniyle ayırt etme yeteneğinde yetersizlikler bulunmaktadır (105,108,109).

2.3.1.2. Serotiplendirme

Bakterilerdeki antijenik yapıların farklılığına dayanan bu tiplendirme yönteminde, aynı türün farklı suşları arasında veya farklı türlere ait suşlar arasında oluşabilecek çapraz reaksiyonlar nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar saptanabilmektedir. Bu sistem, hastane kaynaklı salgın çalışmaları için umut verici olmakla birlikte yoğun emek gerektirmekte ve aynı zamanda DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri ile de desteklenmesi gerekmektedir (109).

2.3.1.3. Antibiyotiplendirme

Antibiyotiplendirme, epidemiyolojik açıdan önemli bir yöntem olmakla birlikte ayırım gücünün düşüklüğü, epidemiyolojik çalışmalarda değerini sınırlamaktadır. Benzer olmayan suşlar, sahip oldukları aynı plazmid nedeniyle bazen aynı antibiyogram profilini gösterebildikleri gibi benzer suşlar, bazen enfeksiyon atakları sırasında yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak aynı olan duyarlılık profilleri değişebilmektedir (110).

Fenotipik yöntemlerle MBL üreten *A. baumannii* izolatlarının tespit edilebilmesinde kombine disk testi, çift disk sinerji testi gibi disk difüzyon zon değerlerinin veya gradient test yöntemi, mikrodilüsyon testi gibi minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin kullanıldığı antibiyotiplendirme yöntemleri mevcuttur (87-89). Tiplendirme için antibiyogram sonuçlarının kullanılması, kolay bir yöntem olmakla birlikte ayırım gücü düşük olduğu için diğer yöntemlerle ve diğer epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (110).

2.3.1.4. Bakteriyofaj Tiplendirme

Zaman alıcı ve tekrarlanabilirliğinin düşük olmasına rağmen, diğer yöntemlerle birlikte değerlendirildiğinde epidemiyolojik çalışmalar için yararlı bir yöntem olmaktadır (106).

2.3.1.5. Bakteriyosin Tiplendirme

Bakteriyofaj tiplendirmeye göre uygulaması daha kolaydır ve DNA-DNA hibridizasyon tekniği ile birlikte çalışıldığında klinik olarak önemli *Acinetobacter* suşlarının tiplendirilmesinde yararlıdır (106).

2.3.1.6. Protein Analizi

Epidemiyolojik çalışmalarda protein analizi için *Acinetobacter* türlerinin hem hücre duvarı hem de tüm hücre proteinleri kullanılabilir. Tüm hücre proteinlerinin örnek hazırlama aşaması, diğerlerine kıyasla daha kolay olduğu için bu yöntem avantajlı bulunmuştur. Fakat bu tiplendirme yönteminin bir dezavantajı, fenotipik değişikliğe yol açmayan sessiz mutasyonların tespit edilememesidir (106).

2.3.2. Genotipik Yöntemler

Son yıllarda HE epidemiyolojisinde ve kontrolünde sayıları ciddi şekilde artan genotiplendirme çalışmaları; enfeksiyonların hızlı tanısı, üretilmesi zor etkenlerin identifikasyonları, klonal benzerliklerinin saptanması, antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi ve izlenmesi konularında klasik mikrobiyolojik çalışmalara göre önemli katkılar ve yeni açılımlar sağlamıştır. Genotipik yöntemlerin amacı, endemik veya epidemik HE etkenlerinin

klonalitesini saptamak ve mikroorganizmaların kaynağını (çevre, personel) belirlemektir (15,106).

2.3.2.1. Plazmid Profil Analizi

Kısa bir dönemde oluşan salgınların analizinde çok uygun bir yöntem olan plazmid profil analizi, epidemiyolojik yönden incelenecek kökenlerin plazmidlerinin ayrılarak, agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmesi esasına dayanmaktadır. Pek çok laboratuvar da uygulanabilen, fazla araç gereç gerektirmeyen, ucuz, kolay, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Ekstrakromozomal bir element olan plazmidlerin, bakteri türleri ve hatta cinsleri arasında başta konjugasyon olmak üzere birçok mekanizma ile nakledilebilmesinden dolayı özel bir direnç geni veya gen kasetinin yayılmasından şüphe edildiği durumlarda plazmid profil analizi yararlıdır. Epidemik kökenin plazmid taşıması, taşıdığı plazmidi kolayca kaybedilmesi veya kazanabilmesi nedenleriyle uzun süreli takipte plazmid profil analizi yerine diğer moleküler tiplendirme yöntemleri tercih edilmektedir (15,106).

2.3.2.2. Kromozomal DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi

Restriksiyon enzimleri kısa DNA dizilerini tanıyarak çift zincirli DNA'yı kesen enzimlerdir. Restriksiyon enzimlerinin bugüne dek bakterilere ait toplam 250 kadar farklı DNA dizisini tanıyarak kesildiği belirlenmiştir. Bu enzimlerin kullanım alanları; DNA parmak izi incelemesi, epidemiyolojik araştırmalar, mikroorganizmaların türünün belirlenmesi, restriksiyon haritalama, tek nükleotit polimorfizmi ve nokta mutasyonların saptanması, moleküler klonlama ve zincir ayırma çoğaltma yöntemi ile DNA çoğaltma yöntemleridir (106,111).

2.3.2.2.1. Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

Kromozomal DNA, bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve parçalar, agaroz jel içinde elektroforez ile ayrılır. Parçalar, agaroz jelden nitroselüloza veya naylon membrana geçirilir. Membrana bağlı nükleik asit daha sonra bir veya daha çok işaretli ve incelenen gen ile homolog olan prob ile hibridize edilir. Tekrarlanabilirliği yüksek, uygulaması kolay ve hızlı olan RFLP’de sadece problemlerle hibridize olan DNA parçaları görülür hale geldiği için sonuçların analizi de büyük ölçüde kolaylaşmıştır (106,112). *Acinetobacter* ile ilgili bu yöntemin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (113).

2.3.2.2.2. Değişimli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)

Araştırmacıların aynı hastada enfeksiyona ve kolonizasyona yol açan suşlar arasındaki ilişkiyi gözlemlemesinde, kontaminasyona ve enfeksiyona neden olabilen suşların ayırımında, hastanede yatan hastalar arasındaki bulaşmayı takipte, tedavi sonrasında tekrarlayan enfeksiyonun reenfeksiyon mu yoksa relaps mı olduğunu belirlemede ve antibiyotiklere dirençli suşların hastane içi ve hastaneler arasındaki yayılımını takip etmekte kullanılan PFGE, yüksek oranda tekrarlanabilir olmasından dolayı moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri içinde altın standart olarak kabul edilmiştir (106,111,114). Diğer epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinde olduğu gibi PFGE’de de başlıca iki yaklaşım esas alınır. Bunlardan ilki “karşılaştırma yöntemi” ile suşların tamamı aynı anda çalışılarak elde edilen paternler karşılaştırılır; diğer yöntem olan “kütüphane tiplendirme yöntemi”nde ise oluşturulan “fingerprint” katalogları kullanılarak elde edilen paternlerin epidemiyolojik bağlantıları ortaya konulmaya çalışılır. Birinci yöntem, salgınlarda kullanılırken ikinci yöntem ise sürveyans yaparken kullanılan sistemdir (114).

Temel olarak PFGE teorisi, DNA parçalarının agaroz jelde yürütülmesi esasına dayanır. Bilindiği gibi DNA parçalarının agaroz jel üzerindeki

hareketini, jelin içeriği ve yoğunluğu, elektriksel alanın gradienti, elektroforez tamponunun özellikleri ve sıcaklık gibi birçok faktör etkilemektedir. Devamlı alan elektroforezi sırasında moleküller, statik elektrik alan altında hareket ederler ve 30-50 Kb'den daha büyük DNA'lar büyüklükleri ne olursa olsun aynı hızla hareket ettikleri için jelde büyük, yekpare bir bant olarak görülürler. Ancak DNA, elektroforez sırasında farklı yönlerle itilerek hareket edecek olursa, daha küçük olan DNA parçaları daha hızlı olarak yön değiştirirler ve böylece bantlar birbirinden ayrılarak dizilirler. Bu sebeple PFGE yönteminde DNA molekülleri, belirli zaman aralıklarında birbirlerine farklı açıdaki çoklu elektriksel alanların etkisinde bırakılmaktadır.

DNA molekülleri, bir elektriksel akıma uygun hareket ederken kısa bir süre sonra diğer akıma uygunluk göstermek zorunda kalmaktadırlar. Bu hizalamanın meydana gelmesi, DNA parçalarının moleküler ağırlığına bağlıdır. Küçük moleküller, hızlı bir şekilde yer değiştirip hareket ederken büyük moleküller, yeni elektriksel alana geçiş yapabilmek için çok fazla zamana ihtiyaç duyarlar. Bu durum, büyük parçaların başlama noktasına daha yakın olduğunu gösterir ve böylece yaklaşık 5 Mb büyüklüğüne kadar DNA parçalarının ayırımına izin verilir. DNA parçalarının hareketini etkileyen başka unsurlardan olan jelin içeriği ve yoğunluğu ile ortam sıcaklığı, PFGE sisteminde sabit kalmaktadır (111,114,115).

Büyük DNA parçalarının genomik düzeyde gösterilebilmesi için özel örnek hazırlama ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Büyük DNA'nın kolay kırılmasından dolayı gözlenemeyecek kadar küçük ve çok sayıda DNA fragmanı elde edilir ve yüksek viskoziteden dolayı pipetlemesi de güçtür. Bu nedenle uygun kromozomal DNA fragmanlarının hazırlanması için PFGE yönteminde, bakteri öncelikle agaroz yonga içine yüklenir ve daha sonra bu yongalar enzimlerle muamele edilerek hücre duvarı ve proteinleri uzaklaştırılır. Bu şekilde saflaştırılan sağlam DNA agaroz yonganın uygun büyüklükte bir parçası restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek, kromozomal DNA daha küçük parçalara kesilmiş olur. Bu agaroz yonga parçaları jeldeki kuyucuklara yerleştirilerek elektroforeze tabi tutulur ve böylece total genomik DNA farklı

elektroforetik hareketlerle değişik sayıda restriksiyon fragmanlarına ayrılır (114,116,117).

Günümüzde değişimli alan prensibine dayanan çeşitli elektroforetik teknikler arasından en yaygın olarak kullanılanları, FIGE (Alan İnversiyon Jel Elektroforezi) ve CHEF (Contour-Clamped Homojen Elektrik Alanları) gibi elektriksel alan açısının değişimine bağlı olan tekniklerdir. FIGE, kolay ve ucuz bir yöntemdir ve 4-1000 Kb büyüklüğündeki nispeten küçük DNA parçalarını ayırmak için kullanılabilecek en iyi tekniktir. Bu sistemde elektroforez sırasında periyodik olarak akım yön değiştirir. DNA, 180° yön değiştiren akımla kolayca ileri ve geri yönlerde yer değiştirebilmektedir. İleri doğru akım uygulama süresi, seperasyon sırasında daha uzundur ve ters akım uygulaması minimize edilir. CHEF ise FIGE'ye göre daha hızlıdır ve 3 Mb büyüklüğünden fazla olan daha büyük DNA parçalarını ayırıştıran en iyi sistemdir. Bu sistem, altıgen şeklinde yerleştilmiş elektrotlardan meydana gelir. Bu elektrotlar, 120°'lik açılarda sabit hızda elektrik akımının oluşması için kullanılmaktadır. Böylece parçalar bozulmadan düz bir şekilde hareket eder (111,114,116).

Sonuçların yorumlanmasında PFGE için geliştirilmiş olan kriterlere göre, genetik farklılık sayısı arttıkça ve epidemiyolojik ilişki azaldıkça suşlar arasındaki farklı bant sayısı da artmaktadır. Buna göre aynı sayıda ve boyutlarda bant içerenlere "Aynı İzolat"; salgın suşu ile aralarında iki-üç bant farkı olanlara (üç bant farkı tek bir genetik olayla oluşabilir) aynı kökenin epidemiyolojik ilişkili alt tipleri olarak kabul edilen "Yakın İlişkili İzolat"; salgın suşu ile aralarında dört-altı bant farkı olanlara (altı bant farkı olası olarak iki genetik olayla oluşabilir) "Olası İlişkili İzolat" denilir. Salgın suşu ile arasında yedi veya daha fazla bant farkı olan profillere üç veya daha fazla genetik olayla ilişkili olabileceğinden dolayı "İlişkisiz İzolat" denilir. Eğer PFGE işlemi sonunda en az 10 bant oluşmuş ise bu kriterler kullanılabilir. Daha az sayıda bant oluşursa, kriterlerin güvenilirliği ve ayırt etmedeki yeterliliği bilinmemektedir (111,114,116,118).

Tekrarlanabilirlik ve yüksek ayırım gücü nedeniyle altın standart olarak kabul edilen PFGE yönteminin en önemli dezavantajı pahalı ve işlem

süresinin uzun oluşudur. Araştırmacıların tek başına PFGE tiplendirmesinin bir kıymetinin olmadığını ve sonuçların ancak yeterli epidemiyolojik ve çevresel veriler ile birlikte değerlendirilmesi halinde anlamlı olabileceğini bilmeleri önemlidir (106,111,114).

2.3.2.3. Ribotiplendirme

Ribozomal RNA (rRNA) genleri, evrim boyunca en fazla korunan genlerdir ve teorik olarak tüm bakterilerde bulunmaktadır. Ribotiplendirme, rRNA genlerinin RFLP analizine dayanan bir tiplendirme yöntemidir. Genomik DNA üzerinde, rRNA'yı kodlayan yüksek derecede korunmuş genlerdeki polimorfizm araştırılmaktadır. Safılaştırılmış bakteri DNA'sı, restriksiyon enzimleri ile kesilip, elektroforez ile DNA parçaları ayrıştırıldıktan sonra *E. coli* rRNA'sından üretilmiş prob ile hibridizasyon uygulanmaktadır ve oluşan bantların analizi ile bakteriler gruplandırılmaktadır. Ayrım gücü orta düzeyde, tekrarlanabilirliği ise oldukça iyi olan bu yöntemin bir diğer avantajı da otomatizasyona uygun olması ve geliştirilen bilgisayar programları ile bantların karşılaştırılıp suşların tür düzeyinde tanımlanmasıdır. Ribotiplendirme diğer yöntemlerle kombine edilerek kullanıldığında değerli epidemiyolojik bilgiler sağlayabilmektedir (109).

2.3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Yöntemler

DNA dizisinin primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile $>10^6$ kat çoğaltılması esasına dayanan bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olup mikroorganizmaların hızlı bir şekilde tiplendirilmesine olanak sağlar. Buna karşın, kontaminant DNA'nın amplifikasyonuna ya da epidemi ile ilgisi bulunmayan mikroorganizmaların çok benzer nükleik asit sıralarının tanımlanmasına bağlı olarak yanlış pozitif sonuç vermesi, primerlerin sadece hedeflenen nükleik asit sırasını tanımlaması da PZR'nin güvenilirliğini azaltan başlıca olumsuz özelliklerdir (106,111). A.

baumanni'nin tiplendirilmesinde AP-PZR (Rastgele Primerize Edilmiş Polimeraz Zincir Reaksiyonu), ERIC-PZR (Enterobakteriyel Genlerde Tekrarlayan Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu), REP-PZR (Tekrarlayan Ekstragenik Palindromik Sıra Tabanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi) ve RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) yöntemleri başarılı bir şekilde kullanılabilir (119). PZR temelli tiplendirme yöntemleri genel olarak termal döngü cihazı ve elektroforez gereçleri dışında özel donanım gerektirmeyen, kısıtlı bir bölge için epidemiyolojik ilişkiyi belirlemede hızlı ve düşük maliyetli yöntemlerdir; fakat geniş çaplı ve karşılaştırmalı epidemiyolojik çalışmalar için PFGE ile karşılaştırıldıklarında ayırt etme etkinlikleri oldukça düşüktür. Genel olarak PZR temelli tiplendirme yöntemleri, kısıtlı bir bölge için epidemiyolojik ilişkiyi belirlemede hızlı olan fakat geniş çaplı ve karşılaştırmalı epidemiyolojik çalışmalar için uygun olmayan yöntemlerdir (15).

Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemlerin bir diğer kullanım alanı da karbapenemazların tespit edilmesi hususudur. Daha önceleri karbapenemazlar izoelektrik odaklama yöntemi ile izoelektrik noktaları belirlenerek tanımlanmakta iken günümüzde artık genotip düzeyinde tanımlanmaları için mutlaka altın standart olan moleküler yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu enzimlerin tanımlanması, rutin tanı için gerekli değildir; epidemiyolojik çalışmalarda ve yeni çıkan direnç mekanizmalarının erken tanısında önem taşımaktadır. Moleküler yöntemler içinde bu amaçla en sık kullanılanlar, yapılması kolay, gen ailesi için özgül olan PZR temelli yöntemlerdir. Gene özgül PZR veya multipleks PZR yöntemi; bakterinin karbapenemaz genlerinden hangilerini taşıyıp taşımadığının tek bir test ile belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu konuda moleküler tekniklerin kısıtlılığı ise; henüz bilinmeyen karbapenemaz genlerine özgül primerlerin tespit edilemeyişinden kaynaklanan başarısızlıklardır (81,96,120).

2.3.2.5. Multilokus Sekans Analizi

Multilokus sekans analizi (MLST) yöntemi ayırt etme gücü yüksek olan bir tiplendirme yöntemidir ve özellikle uzun dönemli ya da global epidemiyolojik çalışmalarda ve hastalığa neden olma açısından en yüksek virülansa sahip klonların tanımlanmasında en uygun yöntemlerden birisidir. Gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlayan, DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Gen ürünlerinin yerine, korunmuş metabolik fonksiyonlardan sorumlu (housekeeping) genlerin dizilerinin karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Yedi farklı yapısal metabolik genin yaklaşık 500 bp parçalarının PZR ile çoğaltılması ve dizi analizi yapılmaktadır. MLST yöntemi ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve çeşitli epidemiyolojik araştırmalarda kullanılması, diğer bir önemli çalışma alanıdır (15,111,121).

Acinetobacter baumannii için MLST şeması ilk olarak Bartual ve ark. (122) tarafından oluşturulmuştur. Bu şemada yedi korunmuş gen bölgesine (*gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* ve *rpoD* genleri) ait 305-513 bp'lık diziler incelenmektedir. Ayırt etme gücünün iyi olmasına karşın MLST, oldukça pahalı bir yöntemdir, yoğun iş gücü gerektirir ve rutin salgın analizi için uygun değildir. Bu yöntemin en önemli özelliği, *A. baumannii* epidemiyolojik çalışmaları için kullanılabilen bir arşivleme sistemi olmasıdır. Bu yöntem ile tiplendirme verisi, nümerik koda çevrilebilmekte, böylece aynı protokolü kullanan farklı laboratuvarlar arasında karşılaştırma imkanı sağlanmaktadır. Günümüzde *A. baumannii* için kullanılan iki MLST şeması (PubMLST ve Pasteur) bulunmaktadır (122,123). İki şemadan da elde edilen sekans tipleri ve klonal kompleksler sonrasında uluslararası Avrupa klon I, II ya da III içinde kategorize edilebilmektedir. Günümüzde *A. baumannii*'nin moleküler taksonomisi gelişmeye devam etmektedir (121).

2.3.2.6. “Microarray”-DNA “Chip” Teknolojisi

Gen ekspresyon düzeyi ve düzey farklılıklarının ölçülmesi, genom baz dizisinin ve genomlar arası dizi farklarının ortaya konulması ve patojen mikroorganizmanın cins/tür düzeyinde tanımlanması için kullanılan “Microarray” teknolojisi, hibridizasyona dayalı bir yöntemdir. Genellikle cam, naylon, membran veya silikon yapıdaki katı yüzeyler üzerinde tasarlanmış olan minyatürize alanlara yerleştirilmiş prob adı verilen tek iplikçikli DNA parçacıkları aracılığıyla bir genomda depolanmış olan veya eksprese edilen bilginin, özgün kimyasal bağlanma temeline dayanan bir prensiple gerçekleştirilir. Bu amaçla, *A. baumannii*’nin antibiyotik dirençle ilgili 91 hedef sekansını saptamaya yönelik geliştirilmiş “Microarray” mevcuttur (124).

Karbapenemazların genotipik yöntemlerle tespit edilmesinde kullanılan PZR temelli yöntemlerin dışında “Microarray” teknikleri, DNA problemleri, RFLP ve altın standart yöntem olan klonlama ve dizi analizi yöntemleri de mevcuttur (120).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

“MDR ve XDR *Acinetobacter* izolatlarında OXA gen varlığının gösterilmesi ve suşlar arasındaki klonalitenin araştırılması” konulu tez çalışması, epidemiyolojik ve deneysel nitelikte bir araştırmadır. Çalışmamızın etik kurul onayı, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 17.07.2014 günü yapılan 26. oturumunda 2014-63 proje numarası ile alındı. Çalışmamızın mali desteği de GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Epidemiyolojik Çalışma Grubu tarafından 02.06.2014 tarihinde kabul edilen toplantı tutanağı ile sağlandı.

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

3.1.1. Cihazlar

- -80°C derin dondurucu (Thermo Scientific, A.B.D.)
- Etüv (Nüve, Türkiye ve Memmert, Almanya)
- VITEK2 otomatize identifikasyon sistemi (Biomerieux, Fransa)
- McFarland densitometre (Biomerieux, Fransa)
- MagCore® HF16 otomatize DNA ekstraksiyon sistemi (RBCBioscience, Tayvan)
- Soğutmalı santrifüj cihazı (Jouan, Almanya)
- Kuru blok termostat (Biosan, Türkiye)
- Vorteks cihazı (Biosan, Türkiye)
- Otoklav (Tuttnauer, A.B.D.)
- Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Bio-Rad, A.B.D.)
- UV jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad, A.B.D.)
- Termal döngü cihazı (Bio-Rad, A.B.D.)
- Mikrodalga fırın (Beko, Türkiye)
- Hassas terazi (Denver, A.B.D.)

- CHEF-DR III PFGE (Bio-Rad, A.B.D.)
- Gel Doc XR görüntüleme sistemi (Bio-Rad, A.B.D.)
- pH metre (Hanna, A.B.D.)
- Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı (Biosan, Türkiye)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Thermolyne karıştırıcı (Thermo Scientific, A.B.D.)

3.1.2. Laboratuvar Malzemeleri

- Skim milk agar (Oxoid, İngiltere)
- %5 koyun kanlı agar hazır besiyeri (Salubris, Türkiye)
- Oksidaz testi (Oxoid, İngiltere)
- Katalaz ayırıcı (%3 Hidrojen peroksit) (Merkez Laboratuvarı, Türkiye)
- Krigler demir agar hazır besiyeri (Salubris, Türkiye)
- Hareket besiyeri (BD Difco, A.B.D.)
- Sitrat hazır besiyeri (Salubris, Türkiye)
- VITEK2 GN kartı (Biomerieux, Fransa)
- VITEK2 AST-N262 kartı (Biomerieux, Fransa)
- MagCore® genomik DNA bakteriyel kit (RBCBioscience, Tayvan)
- Mikro tüp 1,5 ml (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- Pipet 0,5-10 µl (Witeg, Almanya)
- Pipet 20-200 µl (BrandTech, A.B.D.)
- Pipet 100-1000 µl (BrandTech, A.B.D.)
- Filtreli steril pipet ucu 0,1-10 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- Filtreli steril pipet ucu 1-200 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- Filtreli steril pipet ucu 100-1000 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)

- Steril öze (Medbar, Türkiye)
- PZR tüpü 0,2 ml (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- OXA-23 primeri 501bp (Iontek, Türkiye)
 - 5'GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA
 - 5'ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT
- OXA-24 primeri 246bp (Iontek, Türkiye)
 - 5'GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA
 - 5'AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT
- OXA-51 primeri 353bp (Iontek, Türkiye)
 - 5'TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG
 - 5'TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG
- OXA-58 primeri 599bp (Iontek, Türkiye)
 - 5'AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG
 - 5'CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC
- PZR Master Mix 2X (Thermo Scientific, A.B.D.)
- Agaroz (SeaKem, A.B.D.)
- Tris-Asetat-EDTA (TAE) tampon 10X (Sigma, Almanya)
- DNA Ladder 100 bp (GeneON, Almanya)
- Jel yükleme solüsyonu 6X (SNP, Türkiye)
- GelStar nükleik asit jel görüntüleme 10000X (Lonza, A.B.D.)
- Tris-Hidroklorid (Tris-HCL) [Molekül ağırlığı: 157,60] (Sigma, Almanya)
- EDTA [Molekül ağırlığı: 372,20] (Wisent, Kanada)
- Lizozim 5 gr (Amresco, A.B.D.)
- Proteinaz K 100 gr (Roche, İsviçre)
- Sarkozil %1 (Sigma, Almanya)
- Tris-base [Molekül ağırlığı: 121,1] (Sigma, Almanya)
- Borik asit [Molekül ağırlığı: 61,83] (Sigma, Almanya)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) %20 (Sigma, Almanya)
- Sodyum hidroksit tablet [Molekül ağırlığı: 40] (Sigma, Almanya)
- Apa I kesme enzimi 5000 U (Thermo Scientific, A.B.D.)

- Düşük erime ısıları agaroz (Bio-Rad, A.B.D.)
- Agaroz (HiMedia, Hindistan)

3.2. Örnek Kabulü

Çalışmamızda, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi Bakteriyoloji Laboratuvarı'na Ocak 2012-Aralık 2014 tarihleri arasında AYBÜ'den ve DYBÜ'den gönderilen, farklı klinik örneklerden (derin trakeal aspirat [DTA], bronkoalveolar lavaj [BAL], kan, doku, steril vücut sıvısı [SVS], idrar) HE etkeni olarak izole edilen 100 *A. baumannii* izolatu, bu etkenin neden olabildiği HE'nin epidemiyolojisine ışık tutmak amacı ile bir arada değerlendirildi. Tez kapsamındaki çalışmalar, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi Bakteriyoloji ve Moleküler Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Hastalara ait bilgiler, hastane bilgisayar sistemi kullanılarak elde edildi.

3.3. Çalışmaya Alınma Kriterleri

Çalışma süresi içerisinde AYBÜ ve DYBÜ'de yatmakta olan hastalardan alınıp gönderilen klinik örneklerden izole edilen ve HEKK tarafından HE etkeni olarak değerlendirilen *A. baumannii* izolatları çalışmaya alındı. Koloni sayısı sınır değerleri; BAL için $>10^4$ CFU/ml, DTA için $>10^5$ CFU/ml, doku için $>10^5$ CFU/gr ve idrar için ise $>10^5$ CFU/ml olarak saptandı. Aynı hastadan izole edilmiş olan birden fazla *A. baumannii* suşu varlığında, ilk izole edilen suş çalışmaya alındı, diğer izolatlar çalışma dışı bırakıldı.

3.4. Yöntem

Çalışmaya aldığımız *A. baumannii* izolatları araştırmanın bağımsız değişkenleri iken; bu izolatlarda araştırılan OXA-tipi β -laktamazların varlığı ise bağımlı değişkenleri oluşturmaktaydı. Araştırmanın kontrol değişkenleri de OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 geni içerdiği bilinen kontrol suşlarıydı. Çalışmamızda OXA-tipi β -laktamazların varlığı, dirençten sorumlu olduğu bilinen gen bölgelerini hedef alan primerlerin kullanıldığı multipleks PZR ile araştırıldı. Ayrıca izolatlar arasındaki moleküler epidemiyolojik ilişki, PFGE yöntemi ile belirlendi. Son olarak da izolatlar arasında öncelikle fenotipik yöntemlerle belirlenen muhtemel klonal ilişki, direnç genlerindeki ve PFGE kalıplarındaki polimorfizm dikkate alınarak tanımlanmaya çalışıldı.

3.4.1. İzolasyon ve Tür Tayini

Çalışmaya, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi Laboratuvarı'na, Ocak 2012-Aralık 2014 tarihleri arasında AYBÜ ve DYBÜ'den gönderilen farklı klinik örneklerden izole edilen ve -80°C'de gliserollü skim milk stok besiyeri içinde stoklanmış halde bekletilen, çalışmaya alınma kriterlerine uygun 100 *A. baumannii* izolatu alındı.

Bu amaçla, konvansiyonel yöntemler (oksidaz, katalaz, şeker fermentasyonu, motilite, sitrat, 42°C'de üreme) ve VITEK2 (Biomerieux, Fransa) otomatize identifikasyon sistemi ile doğrulaması yapılmış ve saflaştırılarak çalışma izolatları olarak uygun şekilde etiketlenip -80°C'de stoklanmış olan izolatların, %5 koyun kanlı agara pasajlanarak subkültürleri yapıldı. Takiben çalışma izolatlarının tamamına VITEK2 (Biomerieux, Fransa) otomatize identifikasyon sistemi ile yeniden tanımlama yapıldı.

3.4.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Kültür plaklarında saf halde üremiş olan bakteri kolonileri, 0.5 McFarland bulanıklığı sağlanacak şekilde süspanse edildi ve izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için VITEK2 (Biomerieux, Fransa) otomatize identifikasyon sisteminin AST-N262 kartı kullanılarak amikasin, ampisilin/sulbaktam, sefepim, sefaperazon/sulbaktam, seftazidim, siprofloksasin, kolistin C, gentamisin, imipenem, levofloksasin, meropenem, netilmisin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, tetrasiklin, tigesiklin, trimetoprim/sülfametoksazol'e olan duyarlılıkları incelendi. Sonuçlar, CLSI tarafından *A. baumannii* suşları için önerilen kriterlere göre yorumlandı (78).

3.4.3. OXA-tipi Direnç Genlerinin Multipleks PZR ile Araştırılması

3.4.3.1. Bakteriyel Genomun Ekstraksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu uygulamalarında kullanılacak olan kalıp DNA'nın ekstraksiyonu için, MagCore® HF16 otomatize DNA ekstraksiyon sistemi (RBCBioscience, Tayvan) (Resim 3.1.) ve MagCore® genomik DNA bakteriyel kiti (RBCBioscience, Tayvan) üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde kullanıldı.



Resim 3.1. MagCore® HF16 otomatize DNA ekstraksiyon sistemi (RBCBioscience, Tayvan)

Öncelikle -80°C'de stoklanan *A. baumannii* suşlarının %5 koyun kanlı agara pasajları yapıldı ve plaklar 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üremiş kolonilerden 3-5 koloni steril plastik öze ile toplandı ve içerisinde 1000 µl steril deiyonize su bulunan ependorf tüplerine aktarıldı. Vorteks ile homojenizasyon yapıldı ve hazırlanan hücre süspansiyonu 8000 rpm devirde 3 dk santrifüj edilerek yıkama işlemine tabii tutuldu. İşlem sonunda supernatant atıldı ve peletin üzerine 1000 µl steril deiyonize su konuldu ve yıkama işlemi tekrar uygulandı. Bu yıkama işlemi üç defa tekrarlandı. Son yıkama işleminden sonra peletin üzerine 200 µl lizozim eklendi ve vortekslenerek 37°C'ye ayarlanmış ısı bloğu üzerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon sırasında her 5 dk'da bir vorteks ile homojenizasyon yapıldı. 30 dk sonrasında 4 µl RNAaz A eklendi ve oda ısısında 10 dk bekletildi. Bu inkübasyon sonrasında da 40 µl Proteinaz K konuldu ve direk cihaza yüklendi. Multipleks PZR'de kalıp olarak kullanılacak DNA, 45 dk sonra cihazdan alındı.

3.4.3.2. PZR Uygulamaları

Çalışma izolatlarında, OXA-tipi karbapenemaz genlerinin araştırılması amacıyla OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 gen bölgelerini belirleyen primerler kullanılarak Keskin ve ark. (5)'nin önerdiği multipleks PZR yöntemi uygulandı. PZR uygulamaları için kullanılan primerler ve beklenen bant büyüklükleri Tablo 3.1.'de gösterildi.

Amplifikasyonda kullanılan her bir reaksiyon karışımı, toplam hacim 50 µl olacak şekilde 0,2 ml'lik PZR tüpü içerisinde hazırlandı:

- PZR Master Mix 2X (Taq DNA polimeraz [0.05 U/µL], reaksiyon tamponu, 4 mM MgCl₂, her dNTP'den 0.4 mM): 25 µl
- Primerler (100 µMolar):
 - o OXA-23-R: 0,5 µl
 - o OXA-23-F: 0,5 µl
 - o OXA-24-R: 0,5 µl

- o OXA-24-F: 0,5 µl
- o OXA-51-R: 0,5 µl
- o OXA-51-F: 0,5 µl
- o OXA-58-R: 0,5 µl
- o OXA-58-F: 0,5 µl
- DNaz RNaz içermeyen steril deiyonize su: 16 µl
- Kalıp DNA: 5 µl

Her PZR çalışmasında, OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 gen bölgelerini taşıdığı bilinen pozitif kontrol izolatlarına ait kalıp DNA ile elde edilen reaksiyon karışımları da uygulamaya dahil edildi. Negatif kontrol olarak ise kalıp DNA yerine 5 µl DNaz RNaz içermeyen steril deiyonize su eklenen reaksiyon karışımı kullanıldı.

Tablo 3.1. PZR uygulamaları için kullanılan primerler ve beklenen bant büyüklükleri

Primer	Nükleotid Sekansı (5'- 3')	Beklenen Bant Büyüklüğü
OXA-23- OXA-23-	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501bp
OXA-24- OXA-24-	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246bp
OXA-51- OXA-51-	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353bp
OXA-58- OXA-58-	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599bp

Multipleks PZR uygulamasında, termal döngü cihazının amplifikasyon koşulları:

- 94°C'de, 5 dk ön denatürasyon
- 30 siklus:
 - o 94°C'de, 25 sn denatürasyon
 - o 52°C'de, 40 sn birleşme

- o 72°C'de, 50 sn uzama
- 72°C'de, 6 dk son uzama
- 4°C'de ∞

3.4.3.3. PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Öncelikle 10X TAE tamponundan 100 ml, steril deiyonize sudan 900 ml alındı ve 1000 ml'lik 1X TAE tamponu hazırlandı. Sonrasında 40 ml 1X TAE tamponu içerisinde 0,6 gr agaroz mikrodalga fırında çözdürülerek %1,5 konsantrasyonluk agaroz jel hazırlandı ve karışım yükleme jel kalıbına döküldü. Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu jel üzerine eklendi. İlk kuyucuğa 10 µl DNA ladder aktarıldı. Ardından 8 µl PZR ürünü, 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara 10 µl yükleme yapıldı. Jel, bu tank içinde 100 V'da 45 dk boyunca elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, 100 ml 1X TAE içine 10 µl GelStar (floresan boya) eklenerek hazırlanan karışımın içinde 30 dk bekletildi ve sonrasında UV görüntüleme sisteminde sonuçlar incelendi. Sonuçlar değerlendirilirken her multipleks PZR uygulamasında *A. baumannii*'ye intrensek olduğu bilinen OXA-51 gen bölgesinin pozitif olmasına dikkat edildi. Tüm PZR uygulamalarında çalışmaya dahil edilen ve araştırılan karbapenemaz gen bölgelerini taşıdığı bilinen pozitif kontrollerle karşılaştırma yapıldı. Pozitif kontrol izolatları ile aynı büyüklükte gen bölgesine sahip (beklenen bant büyüklüğünde) sonuçlar pozitif olarak kabul edildi. Yine her PZR uygulamasına dahil edilen negatif kontrolde bant olmamasına dikkat edildi. Negatif kontrolde herhangi bir bant olması durumunda PZR uygulaması tekrarlandı.

3.4.4. Klonal İlişkinin PFGE ile Araştırılması

Acinetobacter baumannii izolatlarının makrorestriksiyon analizi, Durmaz ve ark. (117)'nin, Turabelidze ve ark. (125)'nin protokolünü temel alarak standardize ettikleri PFGE protokolünde, bazı küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi.

3.4.4.1. PFGE İçin Kullanılan Tamponlar ve Karışımlar

- **Hücre süspansiyon tamponu (HST), pH 8,0:** 100 mM Tris-HCL+100 mM EDTA içerecek şekilde steril distile su içerisinde hazırlandı. +4°C'de saklandı.
- **Hücre lizis solüsyonu I (HLS I), pH 8,0:** 50 mM Tris-HCL+50 mM EDTA+2,5 mg/ml Lizozim+1,5 mg/ml Proteinaz K içerecek şekilde steril distile su içerisinde hazırlandı. Oda ısısında saklandı.
- **Hücre lizis solüsyonu II (HLS II), pH 8,0:** 0,5 M EDTA+%1 Sarkozil+400 µg/ml Proteinaz K içerecek şekilde steril distile su içerisinde hazırlandı. Oda ısısında saklandı.
- **Tris-EDTA tamponu (TE), pH 7,6:** 10 mM Tris-HCl+0,1 mM EDTA içerecek şekilde steril distile su içerisinde hazırlandı. Oda ısısında saklandı.
- **10X Tris-Borik asit-EDTA tamponu (TBE), pH 8,0:** 0,89 M Tris-base+0,89 M Borik asit+20 mM EDTA içerecek şekilde steril distile su içerisinde hazırlandı. +4°C'de saklandı.
- **Restriksiyon enzimi karışımı:** Kullanımdan hemen önce her izolat için 200 µl deiyonize su, 25 µl 10X Apa I restriksiyon enzimi tamponu ve 12,5 µl (10 U/µl) Apa I restriksiyon enzimi ilave edilerek restriksiyon enzim karışımı hazırlandı.

3.4.4.2. PFGE Protokolü

Çalışmaya başlamadan önce, ileriki aşamalarda sıkıntı yaşamamak adına aşağıda sıralanan ön hazırlıklar yapıldı.

1. Su banyosu 50°C'ye, etüv ise 37°C'ye ayarlandı.
2. Agaroz kalıbı ve tankın içine konulacak distile su, +4°C'ye kaldırıldı.
3. Kırık buz hazırlandı.

3.4.4.2.1. İzolatların Hazırlanması

1. %5 koyun kanlı agarda 24 saat boyunca saf kültür halinde üreyen koloniler, plastik öze ile toplanarak 1 ml soğuk HST içinde süspansiyon edildi.
2. Hücre süspansiyonu, 13000xg'de, 4°C'de, 2 dk santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı ve pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı.
4. Bakteri yoğunluğu, McFarland 4 bulanıklığı olacak şekilde ayarlandı.
5. Bakteri süspansiyonu kırık buz içinde bekletildi.

**Bu aşamada HST'nin soğuk olması, uzun süreli vorteks ve pipetaj yapılmaması ve işlemler sırasında bakterilerin ısıya maruz bırakılmaması, kaliteli DNA hazırlanması için önemli olup böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, bakteri DNA'sının erken denatürasyonu engellenmektedir.*

3.4.4.2.2. İzolatların Agarozda Gömülmesi

1. HST içerisinde %2'lik düşük erime ısıları agaroz hazırlandı. 0,2 gr agaroz 100 ml'lik balona koyuldu, üzerine 9 ml HST eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 sn tutuldu, çıkarılarak hafifçe

karıştırıldı. Tekrar 2-3 sn mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 50°C'ye ayarlanmış su banyosuna konuldu. %20'lik sodyum dodesil sülfattan (SDS) (50°C'de ısıtılmış) 1 ml eklenerek iyice karıştırıldı. Balon, içinde su banyosundan alınmış su bulunan beher içerisine oturtularak çalışma alanına getirildi.

2. HST içerisinde hazırlanmış ve kırık buz içinde bekletilen bakteri süspansiyonundan 100 µl alındı ve yeni bir ependorfa aktarıldı. Üzerine 100 µl düşük erime ısıli agaroz-SDS karışımı eklendi ve birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı.
3. +4°C'den çıkartılan agaroz kalıbına, hava kabarcığı olmayacak şekilde yavaş yavaş, 100 µl hücre-agaroz-SDS karışımı koyuldu.
4. Agaroz kalıbı, agaroz katılaşınca kadar +4°C'de, 15 dk bekletildi.

*Bu aşamada agarozun homojen katılaşması ve kaliteli DNA hazırlanması için *agaroz kalıplarının soğukta tutulması* önemli olup böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, bakteri DNA'sının erken denatürasyonu engellenmektedir.

3.4.4.2.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

1. 15 ml'lik steril kapaklı tüplere, 0,5 ml HLS I konuldu.
2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirildi ve 37°C'ye ayarlanmış etüv içindeki karıştırıcı üzerinde 1 saat bekletildi. (Not: Tüp hafif yatık pozisyonda yerleştirildi.)
3. HLS I dökülerek, yerine 0,5 ml HLS II konuldu.
4. 55°C'ye ayarlanmış etüv içindeki karıştırıcı üzerinde 2 saat bekletildi. (Not: Tüp, hafif yatık pozisyonda yerleştirildi.)

3.4.4.2.4. AgaroZ Kalıplarının Yıkaması

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dk bekletildi.
2. Dikkatlice HLS II aspire edildi.
3. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50°C'ye ısıtılmış olan steril distile sudan 4 ml eklendi ve 50°C'ye ayarlanmış etüv içindeki karıştırıcı üzerinde 15 dk bekletildi. (Not: Tüp, hafif yatık pozisyonda yerleştirildi.)
4. Su tamamen aspire edildi ve 3. basamakta belirtilen su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Sonrasında su tamamen aspire edildi.
5. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dk olmak üzere), 4 ml TE tamponuyla yıkandı. (Not: Yıkama sonrası agaroz kalıpları şeffaflaştı.)
6. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

3.4.4.2.5. AgaroZ Kalıpları İçindeki DNA'nın RE ile Kesilmesi

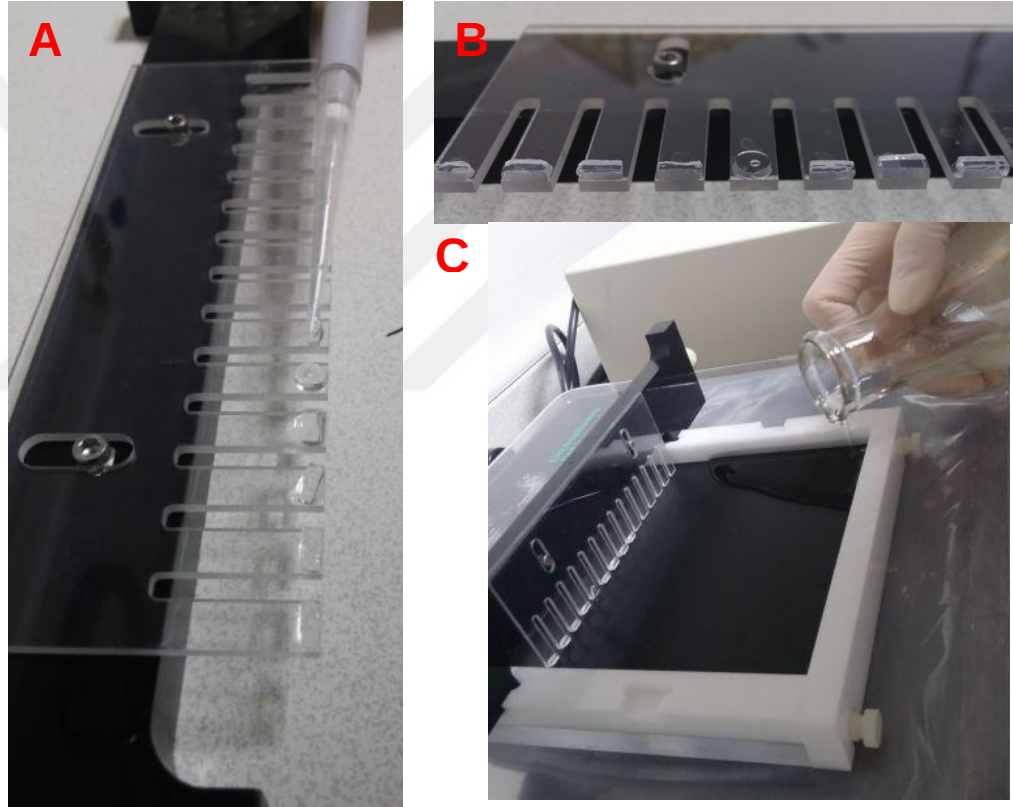
1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla ¼ oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1X Apa I tamponu içine konularak 30°C'ye ayarlanmış etüv içindeki karıştırıcı üzerinde 10 dk bekletildi ve sonrasında sıvı aspire edildi. Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklandı.
2. Her agaroz kalıbı için toplam hacim 237,5 µl olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlandı:
 - 25 µl 10X Apal tamponu
 - 12,5 µl Apal enzimi (10 U/µl)
 - 200 µl steril distile su

3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konuldu ve 30°C'ye ayarlanmış etüv içindeki karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dk bekletildi ve kalıplar, elektroforez için hazır hale gelmiş oldu.

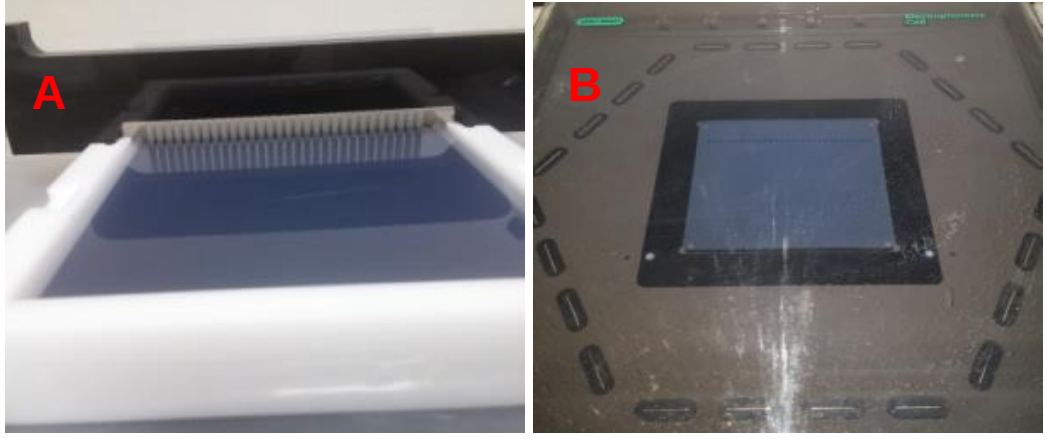
3.4.4.2.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Yüklenmesi

1. 0,5X TBE içinde 100 ml olacak şekilde %1'lik agaroz hazırlandı. 1 gr agaroz 200 ml'lik balona konuldu. Üzerine 100 ml 0,5X TBE eklendi ve yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatıldı ve mikrodalga fırında 60 sn tutuldu. Balon çıkarıldı, hafifçe karıştırıldı ve tekrar 15 sn mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözüldükten sonra balon, 50°C'ye ayarlanmış su banyosuna konuldu.
2. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, sızdırmaması için etrafı bantlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine yerleştirildi.
3. Önce 30 dişli tarağın ortasındaki dişin uç kısmına, kontrol suşuna ait kalıptan çok ince bir parça yüklendi ve sonrasında RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, tarağın dişlerinin uç kısmına yerleştirildi (Resim 3.2. A-B).
4. Kağıt havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı ve kalıpların tarağa iyice yapışması amacıyla tarak bu halde 15 dk buzdolabında bekletildi.
5. Örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.
6. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturmada yavaş yavaş kaset içine döküldü (Resim 3.2. C).

7. Oda ısısında 30 dk katılaşmaya bırakıldı ve sonrasında tarak dikkatlice çıkarıldı (Resim 3.3. A).
8. Agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı, kenarlara yapışan kopmuş agar artıkları kağıt havlu ile temizlendi ve tabla üzerindeki agaroz tankın içindeki hazneye yerleştirildi (Resim 3.3. B).
9. Son olarak tankın içine 2 lt soğuk 0,5X TBE tamponu döküldü.



Resim 3.2. Tarağın dişlerinin uç kısmına yerleştirilmiş agaroz kalıpları (A-B); Kaset içine dökülen agaroz (C)



Resim 3.3. Oda ısısında 30 dk katılaşmaya bırakılan kaset (A); Tankın içindeki hazneye yerleştirilmiş agaroz (B)

3.4.4.2.7. Elektroforez

CHEF-DR III (Bio-Rad, A.B.D.) (Resim 3.4.) sisteminde uygulanan elektroforez koşulları:

- Başlangıç vuruş süresi: 5 sn
- Bitiş vuruş süresi: 30 sn
- Vuruş açısı: 120°
- Akım: 6 V/cm²
- Sıcaklık: 14°C
- Elektroforez süresi: 18 saat



Resim 3.4. CHEF-DR III (Bio-Rad, A.B.D.) sistemi

3.4.4.2.8. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 100 ml 1X TBE içine 10 µl GelStar eklenerek hazırlanan karışımın içinde 30 dk boyandı.
2. UV görüntüleme sisteminde görüntülendi.
3. Gel Doc XR görüntüleme sistemi kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Fotoğraflar TIFF formatında kayıt edildi.
4. Tüm elektroforez görüntüleri Adobe Photoshop CS5 programı kullanılarak markerlar aynı hizada olacak şekilde hizalanarak tek bir fotoğrafta birleştirildi. Fotoğraf son olarak JPEG formatına dönüştürüldü.
5. Bant profillerinin analizinde açık kaynak kodlu PyElph yazılım sistemi (versiyon 1.4) kullanıldı. Her izolat için %20 ışıma eşik değeri üzerinden otomatik olarak saptanan bantlar tek tek kontrol edilerek programın saptayamadığı bantlar manuel olarak işaretlendi. Örneklerle karışmamaları için marker içeren sıralar tanıtıldı. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant toleransı %2 olarak alındı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” hesaplama sistemi kullanılarak PFGE profillerinin, dendogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı.
6. Tenover ve ark. (118) tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak, bant profillerine göre izolatların birbirleriyle ilişkileri değerlendirildi (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. PFGE profillerinin Tenover kriterlerine göre yorumlanması

Kategori	Genetik Farklılık (n)	Farklı Bant (n)	Epidemiyolojik Yorum
Aynı izolatlar	0	0	Salgının bir parçası
Yakın ilişkili izolatlar	1	1-3	Büyük olasılıkla salgının bir parçası
Muhtemel ilişkili izolatlar	2	4-6	Salgınla ilişkili olabilir
İlişkisiz izolatlar	≥ 3	≥ 7	Salgına ait değil

- Aynı izolatlar: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik olarak birbirinden farksız kabul edilir. Epidemiyolojik olarak ilişkilidir.
- Yakın ilişkili izolatlar: Salgın suşu ile aralarında 1-3 bant farkı vardır. Büyük bir olasılıkla salgınla ilişkili suşlardır.
- Muhtemel ilişkili izolatlar: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı vardır. Muhtemelen salgınla ilişkilidirler.
- İlişkisiz izolatlar: Salgın suşları ile aralarında ≥ 7 bant farkı olan suşlardır. Salgınla ilişkileri bulunmayan suşlardır.

4. BULGULAR

4.1. Hastalara Ait Demografik Özellikler

Çalışmaya dahil edilen örneklerin izole edildiği 100 hastanın, 51 (%51)'i erkek, 49 (%49)'u kadındı. Yaş aralığı incelendiğinde, hastaların 77 (%77)'sinin 65 yaş ve üstünde, 23 (%23)'ünün ise 65 yaş altında olduğu görüldü (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Hastaların demografik özellikleri

Cinsiyet	Sayı (%)
Erkek	51 (51)
Kadın	49 (49)
Yaş	Sayı (%)
≥65	77 (77)
<65	23 (23)

4.2. İzolatların Genel Özellikleri

Çalışmaya alınan 100 izolatın hepsinin konvansiyonel yöntemlerle *A. baumannii* olduğu düşünüldü ve VITEK2 (Biomerieux, Fransa) otomatize identifikasyon sistemi ile bütün izolatlar *Acinetobacter baumannii* kompleks olarak tanımlandı. İzolatların 41°C ve 44°C'de üreme özelliğine bakılarak *A. baumannii* olduğu kabul edildi.

İzolatların 39 (%39)'u 2012, 32 (%32)'si 2013 ve 29 (%29)'u 2014 yıllarında izole edildi (Tablo 4.2.). İzolatların 31 (%31)'i AYBÜ'den, 69 (%69)'u ise DYBÜ'den gönderildi (Tablo 4.3.).

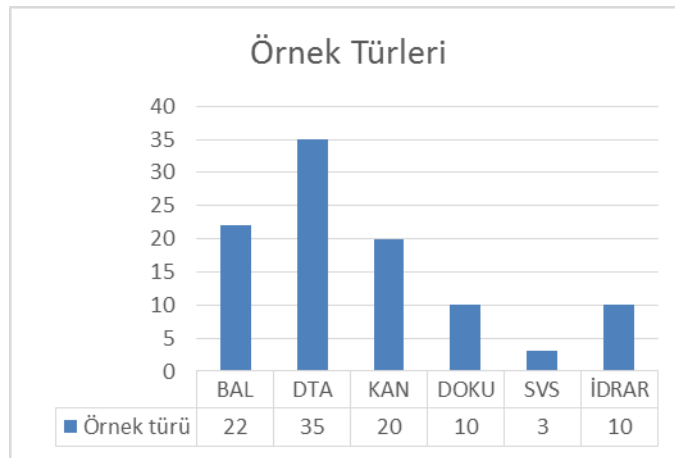
Tablo 4.2. Örneklerin yıllara göre dağılımı

Yıllar	Sayı (%)
2012	39 (39)
2013	32 (32)
2014	29 (29)

Tablo 4.3. Örneklerin izole edildiği yoğun bakım üniteleri

Klinik	Sayı (%)
AYBÜ	31 (31)
DYBÜ	69 (69)

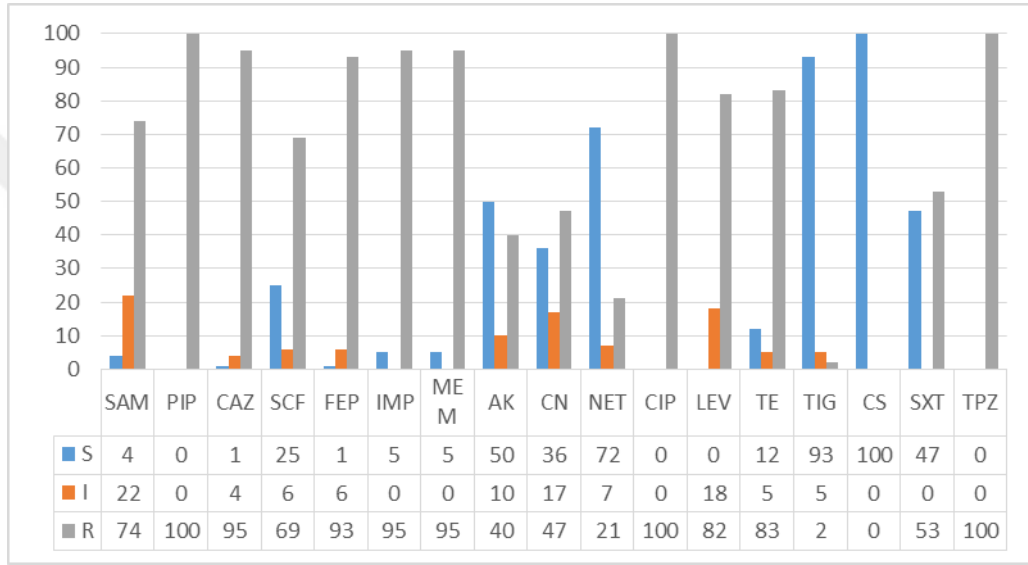
Çalışmaya alınan izolatların izole edildikleri klinik örnekler ve izolasyon oranları, Şekil 4.1.'de gösterildi. Etken izolasyonu %57'lik oranla en sık solunum sistemi örneklerinden (DTA: %35, BAL: %22) oldu.



Şekil 4.1. İzolatların klinik örneklerle göre dağılımı

4.3. Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik duyarlılık oranları, Şekil 4.2.'de gösterildi. İzolatların tamamının piperasilin, piperasilin/tazobaktam ve siprofloksasine karşı dirençli oldukları gözlemlendi. Test edilen tüm antibiyotikler içinde en etkili ajanlar %100 duyarlılık oranı ile kolistin; %93 duyarlılık oranı ile tigesiklin olarak tespit edildi.



Şekil 4.2. İzolatların antibiyotik duyarlılık oranları

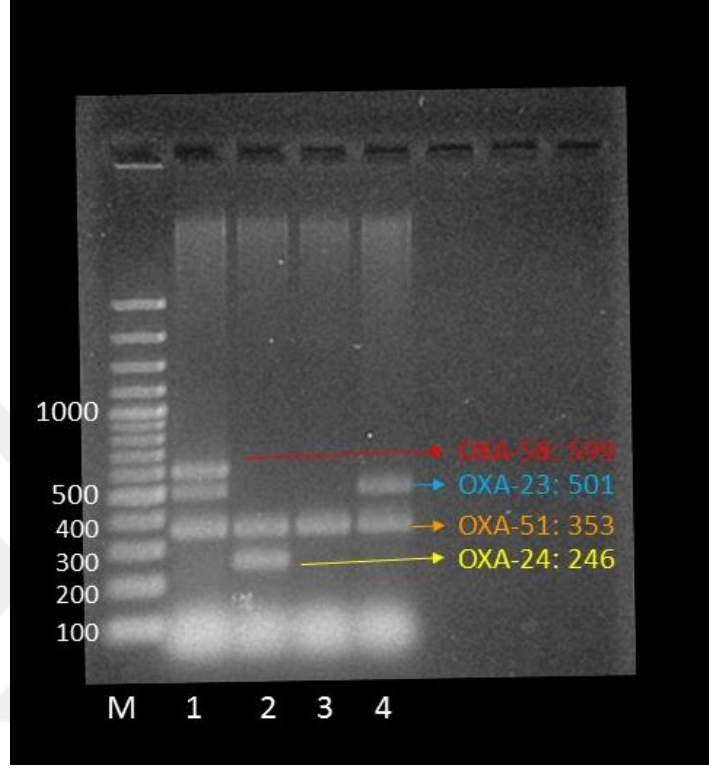
S: Duyarlı; I: Orta duyarlı; R: Dirençli

SAM: Ampisilin/sulbaktam; PIP: Piperasilin; CAZ: Seftazidim; SCF: Sefaperazon/sulbaktam; FEP: Sefepim; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikasin; CN: Gentamisin; NET: Netilmisin; CIP: Siprofloksasin; LEV: Levofloksasin; TE: Tetrasiklin; TIG: Tigesiklin; CS: Kolistin; SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol; TPZ: Piperasilin/tazobaktam.

4.4. Direnç Genleri

Çalışma izolatlarının OXA tipi direnç genlerine bakıldığında (Resim 4.1.) hepsinde bu türe intrensek olduğu bilinen OXA-51 gen bölgesi pozitif

olarak bulundu. Örneklerin 92 (%92)'sinin OXA-23 gen bölgesi taşıdığı tespit edildi. OXA-24 ve OXA-58 gen bölgesi pozitifliği ise izolatların hiçbirinde saptanmadı (Tablo 4.4.).



Resim 4.1. OXA-karbapenemaz kodlayan genlerin multipleks PZR ile saptanması.

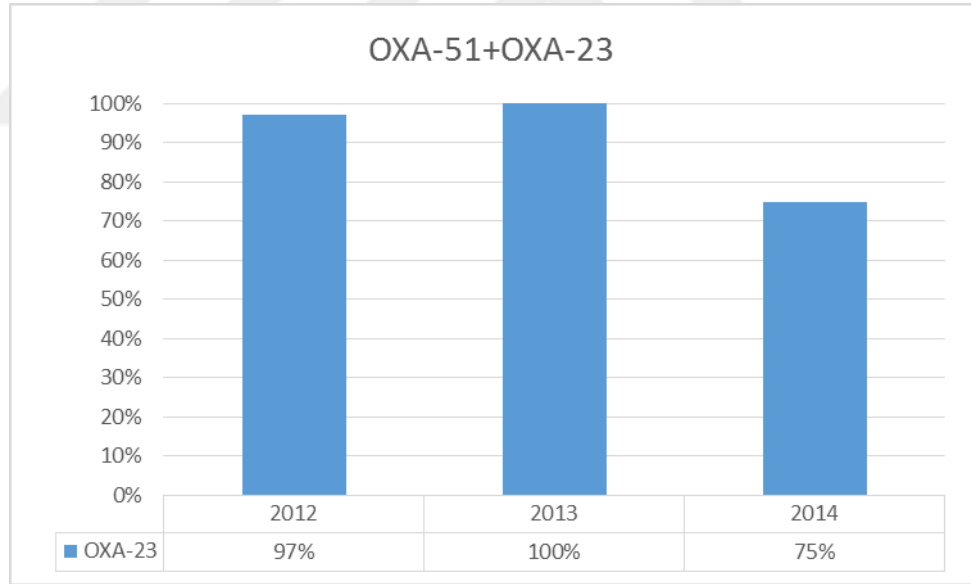
M: 100 bp DNA Marker

1. Sıra: OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 genlerini içeren pozitif kontrol izolatı
2. Sıra: OXA-24 ve OXA-51 genlerini içeren pozitif kontrol izolatı
3. Sıra: Sadece OXA-51 içeren (diğer OXA genlerini içermeyen) sekiz izolatı temsil eden görüntü
4. Sıra: Hem OXA-23 hem de OXA-51 genlerini içeren 92 izolatı temsil eden görüntü

Tablo 4.4. Direnç genleri ve görülme sıklığı

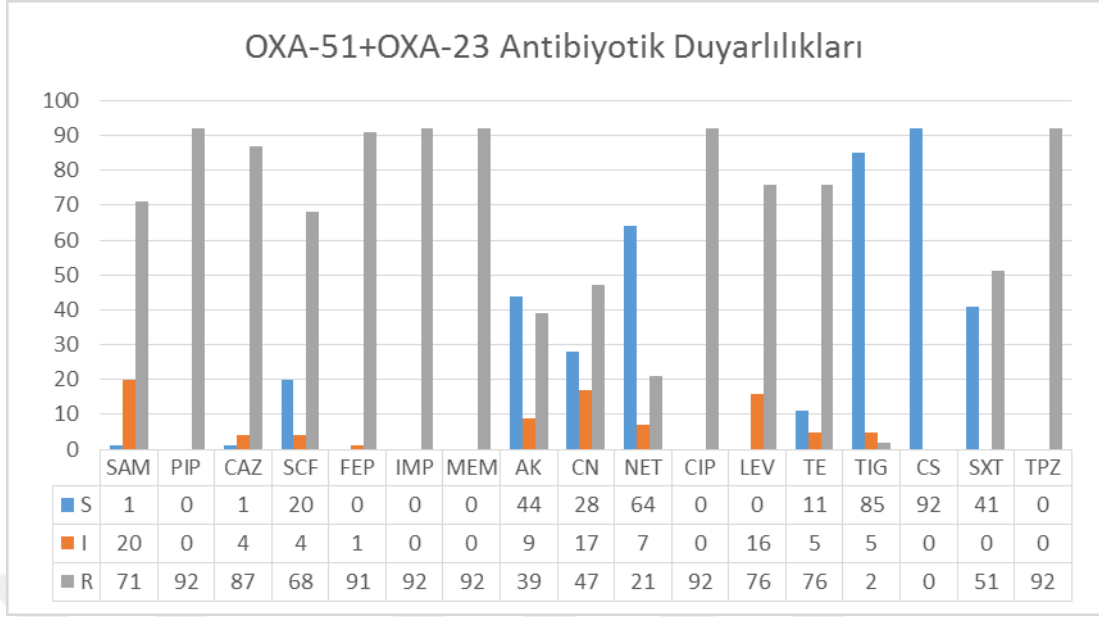
Direnç Geni	Pozitif (%)	Negatif (%)
OXA-23	92 (92)	8 (8)
OXA-24	0 (0)	100 (100)
OXA-51	100 (100)	0 (0)
OXA-58	0 (0)	100 (100)

OXA-51 ile beraber OXA-23 gen pozitifliğinin yıllar içerisinde değiştiği görüldü ve pozitiflik oranlarının yıllara göre dağılımı Şekil 4.3.'de gösterildi. OXA-51 ve OXA-23 gen pozitifliği birlikteliği, 2012 yılında izole edilen 39 izolatin 38 (%97)'inde, 2013 yılında izole edilen 32 izolatin hepsinde, 2014 yılında ise izole edilen 29 izolatin 22 (%75)'sinde görüldü.

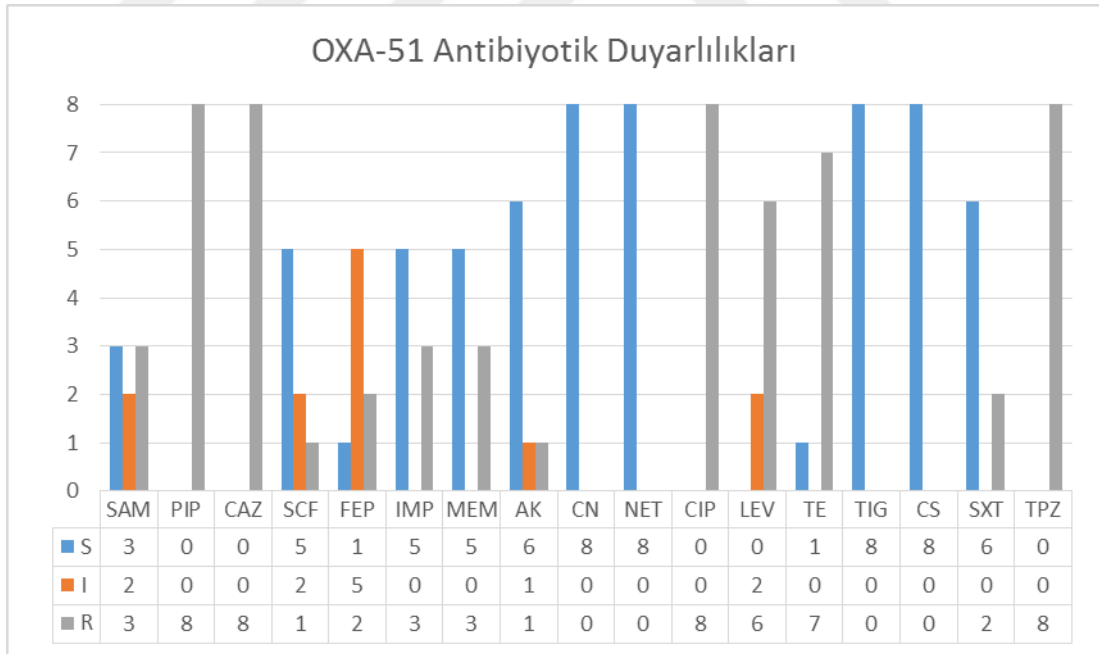


Şekil 4.3. OXA-51 ile beraber OXA-23 gen pozitiflik oranlarının yıllara göre dağılımı

OXA-51 ile beraber OXA-23 direnç geni içeren izolatların antibiyotik duyarlılık durumları Şekil 4.4.'de; tek başına OXA-51 içeren izolatların antibiyotik duyarlılık durumları ise Şekil 4.5.'de gösterildi.



Şekil 4.4. OXA-51 ile beraber OXA-23 direnç geni içeren izolatların (n=92) antibiyotik duyarlılık durumları



Şekil 4.5. OXA-51 direnç geni içeren (diğer OXA direnç genlerini içermeyen) izolatların (n=8) antibiyotik duyarlılık durumları

Sadece OXA-51 geni içeren izolatların (n=8) antibiyotik duyarlılıkları ile OXA-51 ve OXA-23 genlerini birlikte içeren izolatların (n=92) antibiyotik duyarlılıklarını istatistiksel olarak karşılaştırmak, ilk grubun izolat sayısının yetersizliğinden dolayı yapılamadı.

Tek başına OXA-51 içeren (diğer OXA genlerini içermeyen) sekiz izolatın beşi fenotipik olarak imipeneme veya meropeneme duyarlı, üçü ise dirençli olarak bulundu. Sekiz izolatın hepsi gentamisine, netilmisine, tigesikline ve kolistine duyarlı olarak bulundu. OXA-51 ile beraber OXA-23 direnç geni içeren 92 izolatın hepsi imipeneme veya meropeneme dirençli olarak bulundu.

Çalışmaya alınan *Acinetobacter* izolatlarının antibiyotik duyarlılık durumları ve direnç gen profili Tablo 4.5.'de görülmektedir.

Tablo 4.5. Çalışmaya alınan *Acinetobacter* izolatlarının antibiyotik duyarlılık durumları ve direnç gen profili

No	Stok No	Tarih	Cin-siyet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58
1	695	09.01.2012	K	1969	AYB	KAN	16 I	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
2	697	17.01.2012	E	1926	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	4 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
3	700	19.01.2012	K	1963	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
4	701	25.01.2012	E	1945	DYB	DOKU	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
5	704	31.01.2012	K	1923	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	160 R	≥128 R	P	-	P	-
6	712	16.02.2012	E	1991	AYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	4 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
7	713	17.02.2012	K	1910	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
8	720	29.02.2012	E	1923	DYB	DOKU	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 S	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
9	726	23.03.2012	E	1956	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
10	731	23.03.2012	E	1923	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
11	737	03.04.2012	E	1949	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
12	738	09.04.2012	E	1991	AYB	SVS	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
13	742	12.04.2012	K	1991	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
14	744	12.04.2012	E	1982	AYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
15	745	18.04.2012	E	1991	AYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
16	749	26.04.2012	K	1918	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
17	752	04.05.2012	E	1924	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
18	761	07.06.2012	E	1982	DYB	SVS	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
19	772	01.07.2012	K	1923	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
20	776	11.07.2012	E	1932	AYB	DOKU	≥32 R	≥12 8 R	8 S	16 S	16 I	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
21	797	22.08.2012	K	1937	DYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-

No	Stok No	Tarih	Cin-siyet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58
22	805	05.09.2012	K	1934	DYB	DOKU	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
23	806	05.09.2012	K	1924	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	2 S	2 S	32 I	4 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	-	-	P	-
24	810	05.09.2012	K	1934	DYB	İDRAR	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
25	823	27.09.2012	K	1920	DYB	KAN	16 I	≥12 8 R	32 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	2 S	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
26	826	27.09.2012	K	1929	DYB	İDRAR	16 I	≥12 8 R	≥32 R	16 S	≥32 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	2 S	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
27	830	15.10.2012	E	1924	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	1 S	≥4 R	≥8 R	4 S	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
28	831	15.10.2012	K	1927	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
29	832	15.10.2012	E	1941	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥32 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	≤1 S	≥4 R	≥8 R	4 S	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
30	833	16.10.2012	E	1928	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 S	≥16 R	16 I	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
31	834	12.11.2012	K	1929	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
32	835	12.11.2012	E	1929	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
33	837	16.11.2012	E	1991	AYB	İDRAR	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	2 S	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
34	839	20.11.2012	K	1924	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	≥16 R	4 S	≥4 R	4 I	2 S	1 S	≤0,5 S	160 R	≥128 R	P	-	P	-
35	850	13.12.2012	E	1930	DYB	DOKU	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	4 S	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
36	852	13.12.2012	E	1920	AYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	≥16 R	4 S	≥4 R	4 I	2 S	1 S	≤0,5 S	160 R	≥128 R	P	-	P	-
37	853	15.12.2012	E	1992	AYB	BAL	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	4 S	≤1 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
38	855	31.12.2012	E	1948	DYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	8 I	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
39	856	31.12.2012	E	1931	AYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	≥16 R	2 S	≥4 R	4 I	2 S	1 S	≤0,5 S	160 R	≥128 R	P	-	P	-
40	1	08.01.2013	E	1936	AYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
41	2	08.01.2013	E	1912	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
42	3	13.01.2013	K	1927	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
43	4	24.01.2013	K	1940	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-

No	Stok No	Tarih	Cin-siyet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58
44	5	24.01.2013	E	1931	AYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
45	10	10.02.2013	E	1958	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	8 I	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
46	22	03.04.2013	K	1927	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
47	26	09.05.2013	K	1941	DYB	DTA	16 I	≥12 8 R	≥64 R	32 I	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	4 I	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
48	30	22.05.2013	K	1921	AYB	IDRAR	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≥8 R	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
49	31	23.05.2013	K	1953	DYB	IDRAR	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
50	34	24.05.2013	E	1924	DYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
51	37	14.06.2013	E	1939	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	4 I	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
52	44	10.07.2013	K	1921	AYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	4 I	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
53	48	22.07.2013	K	1936	DYB	IDRAR	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
54	49	22.07.2013	K	1936	DYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	16 I	≥4 R	4 I	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
55	51	29.07.2013	K	1920	DYB	IDRAR	16 I	≥12 8 R	32 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	4 S	8 S	≥4 R	≥8 R	4 S	4 I	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
56	52	29.07.2013	E	1955	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	4 I	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
57	53	30.07.2013	E	1952	DYB	DOKU	8 S	≥12 8 R	≥64 R	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
58	55	05.08.2013	K	1956	DYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	4 I	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
59	57	02.09.2013	K	1922	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	4 I	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
60	59	02.09.2013	K	1920	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
61	61	10.09.2013	E	1924	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
62	66	23.09.2013	E	1929	DYB	IDRAR	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
63	69	06.10.2013	E	1993	AYB	BAL	16 I	≥12 8 R	32 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
64	73	22.10.2013	E	1992	AYB	SVS	16 I	≥12 8 R	16 I	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	16 S	2 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
65	74	24.10.2013	E	1992	AYB	KAN	16 I	≥12 8 R	16 I	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	16 S	2 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
66	84	28.11.2013	E	1938	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	8 I	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-

No	Stok No	Tarih	Cin-siyet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58
67	88	09.12.2013	K	1936	AYB	KAN	16 I	≥12 8 R	16 I	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	16 S	2 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
68	94	13.12.2013	K	1936	AYB	DOKU	16 I	≥12 8 R	16 I	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	16 S	2 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
69	95	20.12.2013	K	1945	DYB	DTA	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
70	96	26.12.2013	K	1926	DYB	KAN	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
71	97	26.12.2013	K	1935	DYB	KAN	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
72	110	22.01.2014	E	1938	DYB	İDRAR	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
73	111	25.01.2014	E	1929	DYB	DOKU	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	≤1 S	≥4 R	4 I	≤1 S	≤0,5 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
74	113	29.01.2014	E	1947	AYB	BAL	4 S	≥12 8 R	≥64 R	≤8 S	16 I	0,5 S	0,5 S	≤2 S	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-
75	118	26.02.2014	E	1946	DYB	DTA	16 I	≥12 8 R	32 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
76	119	13.03.2014	E	1934	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	32 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
77	123	19.03.2014	E	1937	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	32 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
78	131	18.06.2014	E	1944	AYB	BAL	4 S	≥12 8 R	≥64 R	≤8 S	8 S	1 S	1 S	≤2 S	≤1 S	2 S	≥4 R	4 I	≤1 S	≤0,5 S	≤0,5 S	160 R	≥128 R	-	-	P	-
79	132	23.06.2014	K	1959	DYB	DTA	4 S	≥12 8 R	≥64 R	≤8 S	16 I	1 S	0,5 S	≤2 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-
80	133	02.07.2014	K	1959	DYB	BAL	16 I	≥12 8 R	32 R	16 S	32 R	0,5 S	0,5 S	≤2 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	40 S	≥128 R	-	-	P	-
81	137	10.08.2014	E	1943	DYB	KAN	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	16 I	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	4 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-
82	139	05.09.2014	K	1928	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	≤1 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
83	143	04.10.2014	K	1924	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
84	144	09.10.2014	E	1924	DYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
85	146	13.11.2014	K	1920	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
86	147	13.11.2014	K	1949	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	32 I	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	8 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
87	148	18.11.2014	K	1934	DYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	32 I	16 I	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-
88	151	02.12.2014	K	1974	DYB	DOKU	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	32 I	16 I	≥16 R	≥16 R	≤2 S	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-
89	152	05.12.2014	K	1924	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-

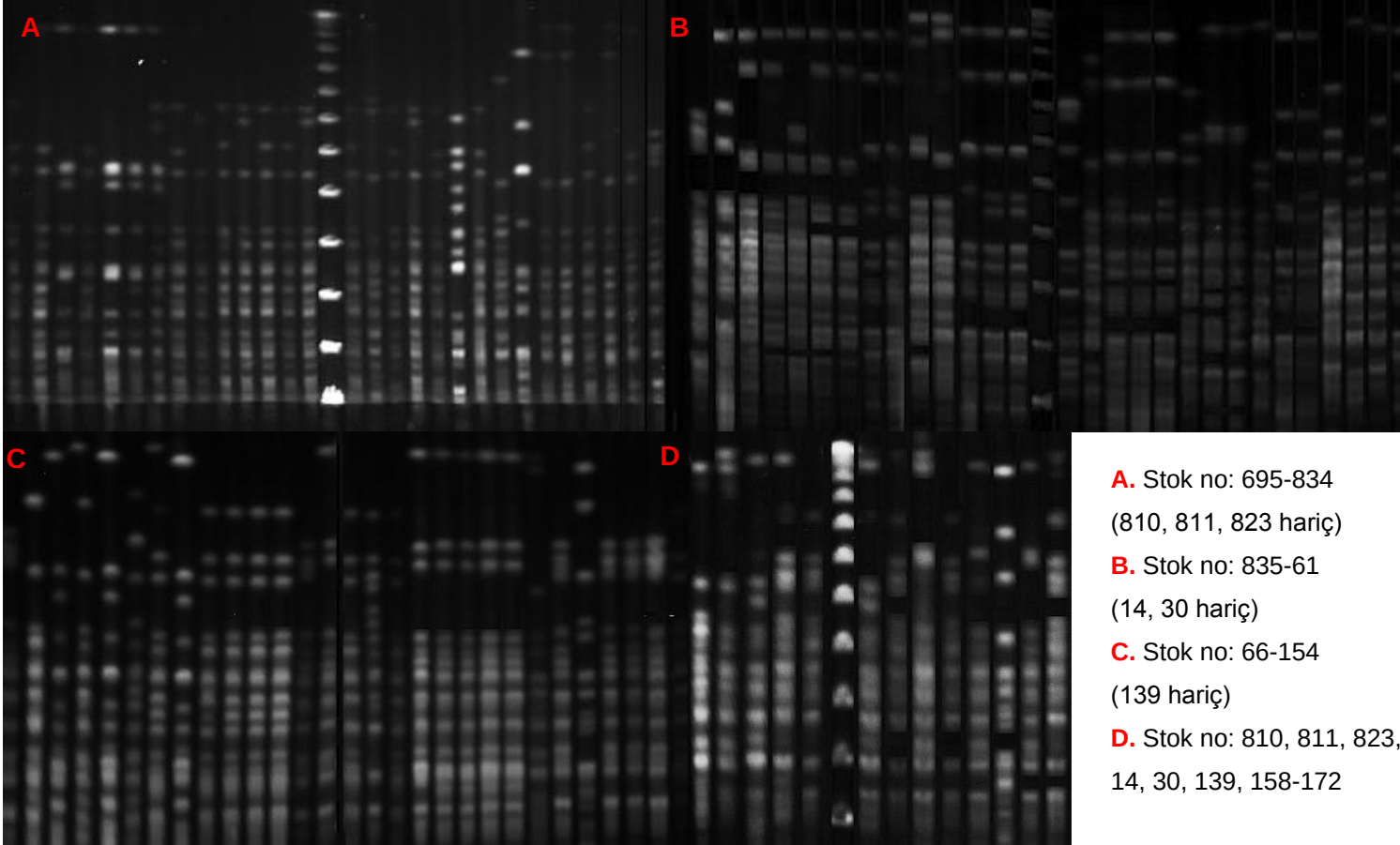
No	Stok No	Tarih	Cin-siyet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58
90	153	19.12.2014	E	1939	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	32 I	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	4 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-
91	154	24.12.2014	E	1947	DYB	BAL	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	8 S	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≥8 R	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
92	158	25.12.2014	E	1934	AYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	4 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
93	159	25.12.2014	E	1958	AYB	BAL	16 I	≥12 8 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	2 S	8 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
94	161	25.12.2014	K	1936	AYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	4 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
95	162	25.12.2014	K	1936	DYB	KAN	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 S	≥16 R	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
96	166	25.12.2014	K	1936	DYB	IDRAR	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	8 S	8 I	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
97	168	30.12.2014	K	1936	AYB	DTA	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
98	169	30.12.2014	K	1926	DYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	4 S	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
99	171	30.12.2014	E	1931	DYB	DOKU	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	8 S	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-
100	172	30.12.2014	K	1936	AYB	BAL	≥32 R	≥12 8 R	≥64 R	32 I	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-

K: Kadın, E: Erkek, AYB: Anestezi Yoğun Bakım, DYB: Dahiliye Yoğun Bakım, S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli, P: Pozitif

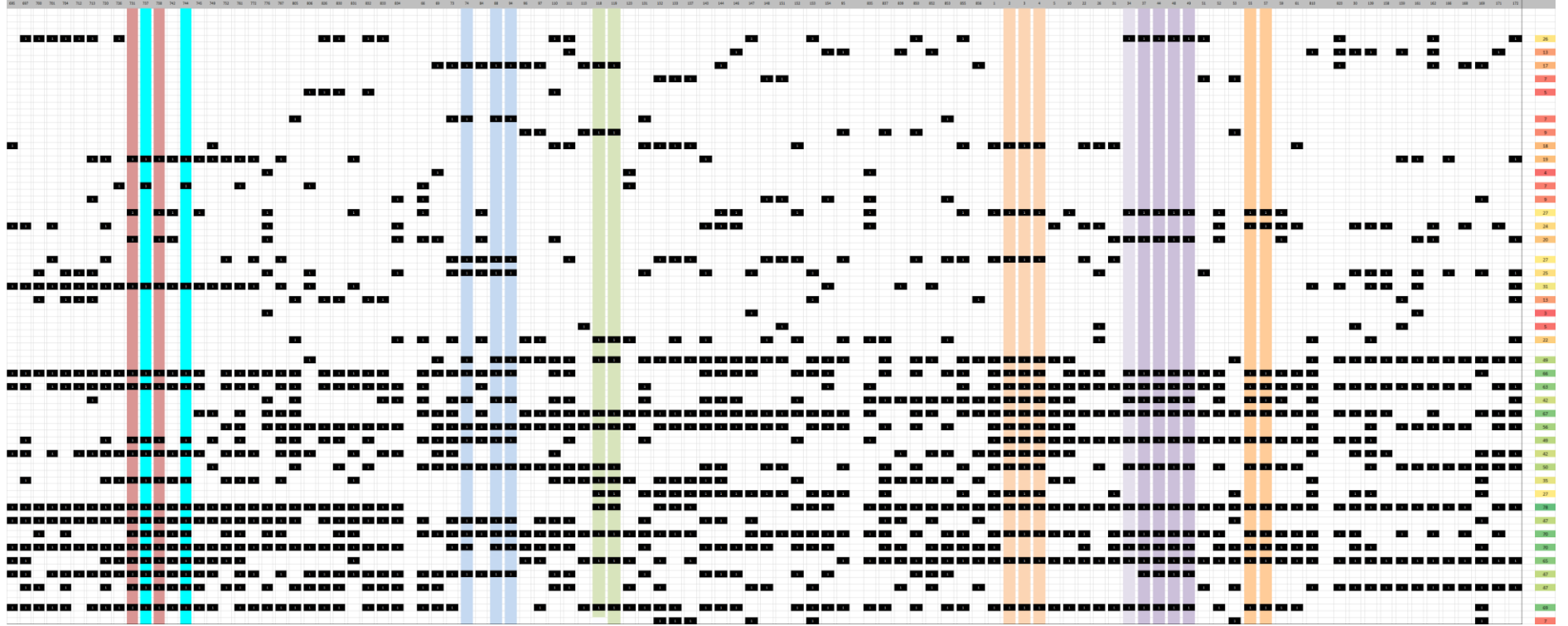
Tabloda duyarlı izolatlar mavi, orta duyarlı izolatlar turuncu, gen pozitifliği saptananlar ise yeşil renkte gösterilmiştir.

4.5. PFGE Bantlarının Analizi

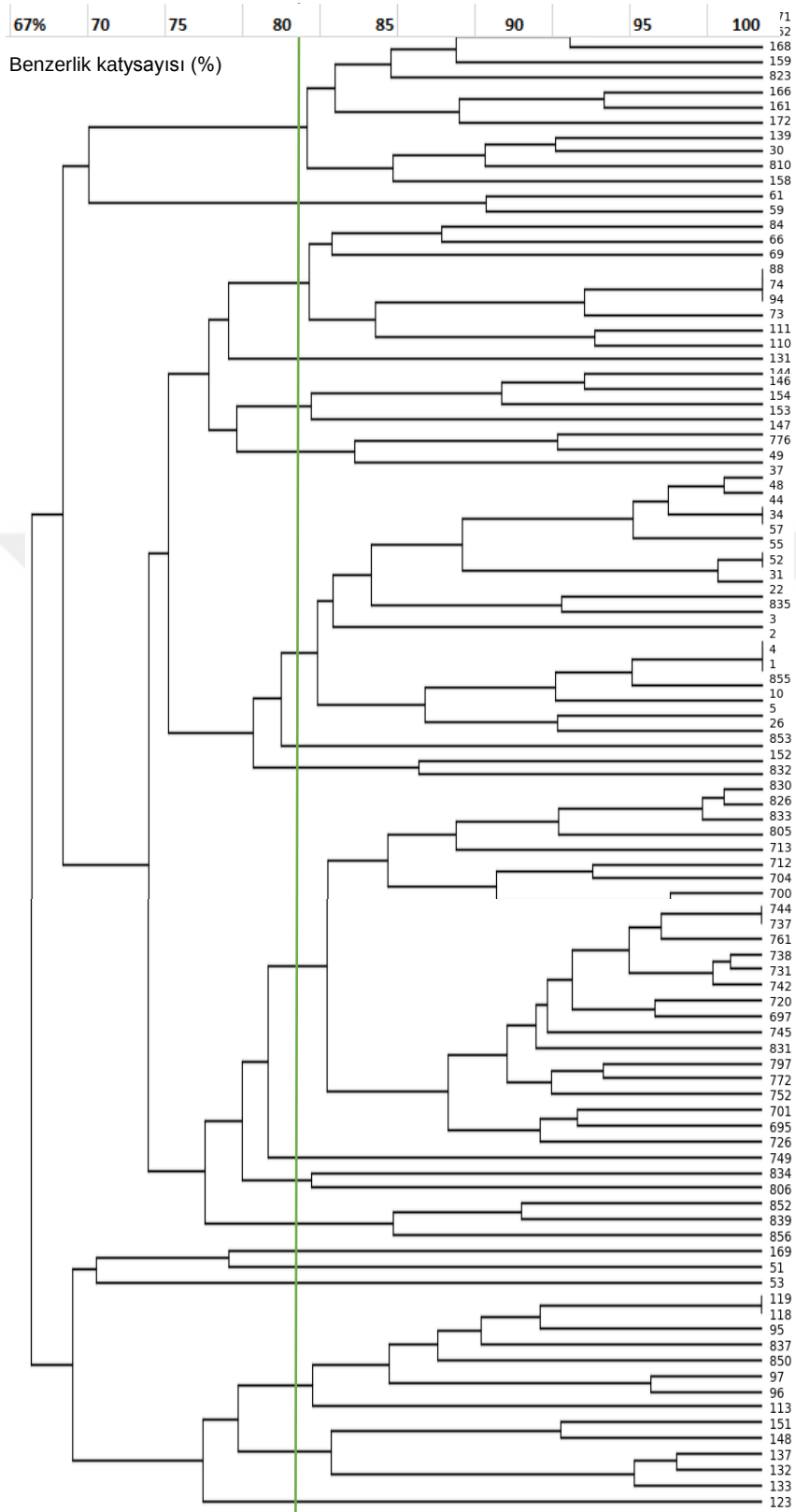
Öncelikle PFGE yöntemiyle tiplendirmeye alınan 100 izolata ait bant görüntüleri Tenover kriterlerine (118) göre değerlendirildi (Resim 4.2.). Bu değerlendirmeyi daha rahat ve anlaşılır şekilde yapabilmek için markerlar referans alınarak jel görüntülerindeki tüm bantları simgeleyen bir tablo, Microsoft Excel® programı kullanılarak oluşturuldu (Resim 4.3.). Buna göre birbirinden farklı toplam 42 bantın varlığı gözlemlendi. Aynı molekül ağırlığına sahip bantların görülme sıklığı tespit edildi ve herhangi bir bantın görülme sıklığının %3 ile %78 arasında değiştiği saptandı. Örneklerin %70-78'inde üç adet bantın; örneklerin yarısından fazlasında ise 10 adet bantın tekrar ettiği gözlemlendi. Tüm izolatlar içinde %100 benzerliğe sahip dörtten fazla izolat olmadığı için bu durum salgın olarak değerlendirilmedi. Takiben işlemleri gerçekleştirilen 100 izolata ait bant görüntülerinin analizinde, açık kaynak kodlu PyElph yazılım sistemi (versiyon 1.4) kullanıldı. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant toleransı %2 olarak alındı. UPGMA hesaplama sistemi kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Tüm izolatların benzerlik katsayılarının %67 ile %100 arasında değiştiği görüldü. PFGE genotiplerini belirlemek için benzerlik katsayısının sınır değeri %80 olarak belirlendi ve çalışılan 100 izolatın 19 farklı küme içinde olduğu saptandı. Alt tip sayısını belirlemek için ise, benzerlik katsayısının sınır değeri %100 olarak belirlendi ve izolatların 92 alt tip içinde olduğu görüldü. Dendogram üzerinde farklı kümeler büyük harflerle; aynı küme içerisindeki alt tipler ise rakamlar ile gösterildi (Resim 4.4. A-B-C).



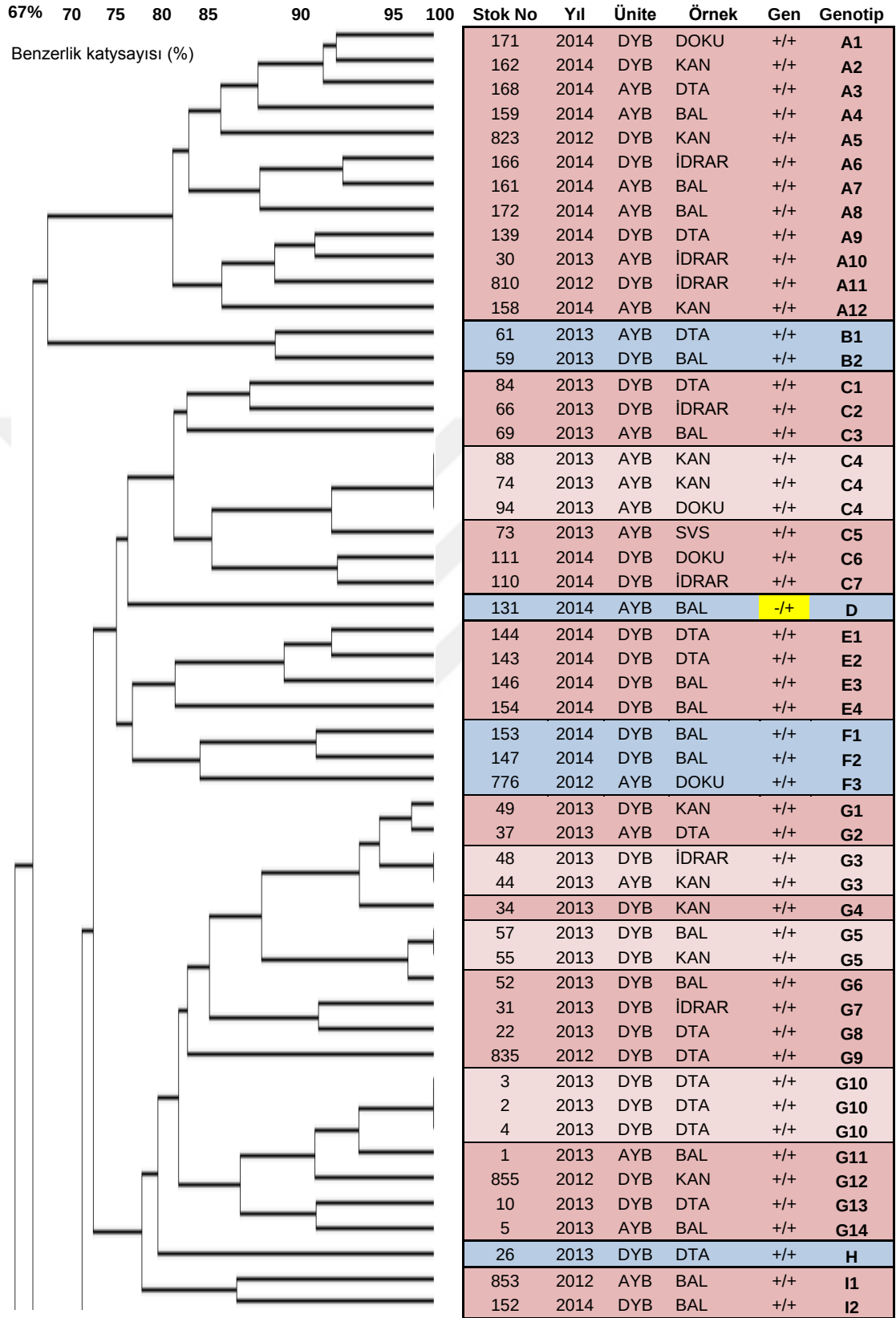
Resim 4.2. İzolatlara ait bant görüntüleri.



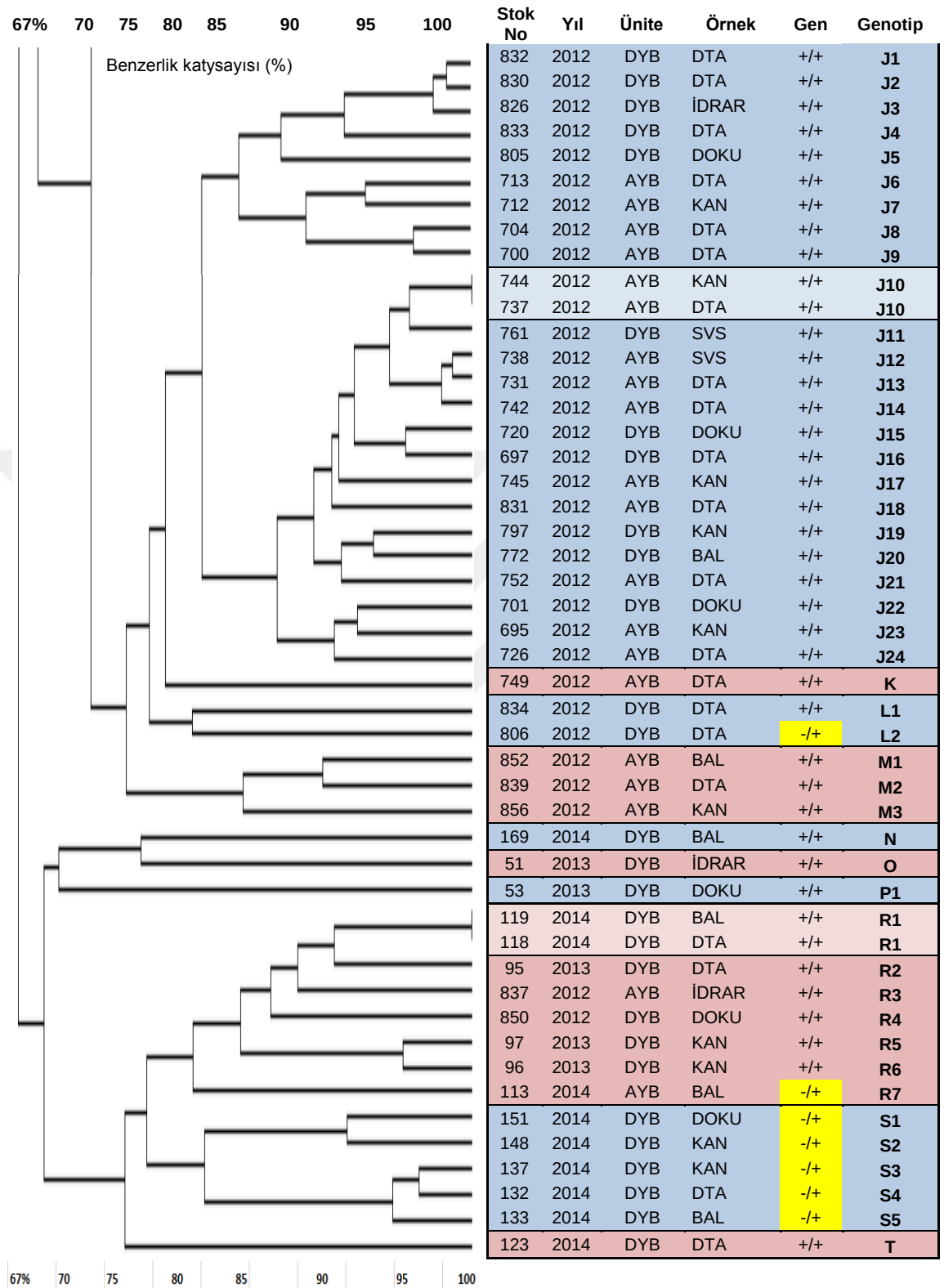
Resim 4.3. İzolatlara ait jel görüntülemeye saptanan tüm bantların (Resim 4.2.) Microsoft Excel® programı kullanılarak birarada gösterilmesi. Birebir aynı bantlara sahip izolatlar aynı renklerle gösterilmiştir.



Resim 4.4. A. İzolatların filogenetik analiz sonuçları



Resim 4.4. B. İzolatların filogenetik analiz sonuçları



Resim 4.4. C. İzolatların filogenetik analiz sonuçları

19 farklı küme içinde en büyük kümeyi 25 üyeli 'J' kümesi oluşturdu. Bu küme içerisinde 24 alt tip (J1-J24) tespit edildi. Bu kümeye giren izolatların hepsinin 2012 yılında hem AYBÜ'den hem de DYBÜ'den gelen farklı klinik örneklerden izole edildiği belirlendi. AYBÜ'de yatan iki hastaya ait kan ve DTA örneklerinden izole edilen iki izolat (Stok no: 744 ve 737) %100 bant profil benzerliği göstererek J10 alt tipini oluşturdu (Tablo 4.6.).

'J' kümesini takiben 18 üyeli 'G' kümesi tespit edildi. Bu küme içerisinde 14 alt tip (G1-G14) görüldü. Bu kümeye giren izolatların 2012-2013 yıllarında hem AYBÜ'den hem de DYBÜ'den gelen farklı klinik örneklerden izole edildiği belirlendi. AYBÜ ve DYBÜ'de tedavi gören iki hastaya ait kan ve idrar örneklerinden izole edilen iki izolat (Stok no: 44 ve 48) %100 bant profil benzerliği göstererek G3; DYBÜ'de tedavi gören iki hastaya ait kan ve BAL örneklerinden izole edilen iki izolat (Stok no: 55 ve 57) %100 bant profil benzerliği göstererek G5; DYBÜ'de tedavi gören üç hastaya ait DTA örneklerinden izole edilen üç izolat (Stok no: 2,3 ve 4) %100 bant profil benzerliği göstererek G10 alt tipini oluşturdu (Tablo 4.7.).

'G' kümesini takiben 12 üyeli 'A' kümesi tespit edildi. Bu küme içerisinde 12 alt tip (A1-A12) görüldü. Bu kümeye giren izolatların 2012-2014 yılları arasında hem AYBÜ'den hem de DYBÜ'den gelen farklı klinik örneklerden izole edildiği belirlendi (Tablo 4.8.). 'A' kümesini takiben dokuz üyeli 'C' kümesi tespit edildi. Bu küme içerisinde yedi alt tip (C1-C7) görüldü. Bu kümeye giren izolatların 2013-2014 yıllarında hem AYBÜ'den hem de DYBÜ'den gelen farklı klinik örneklerden izole edildiği belirlendi. 2013 yılında AYBÜ'de tedavi gören üç hastaya ait kan ve doku örneklerinden izole edilen üç izolat (Stok no: 74, 88 ve 94) %100 bant profil benzerliği göstererek C4 alt tipini oluşturdu (Tablo 4.9.). 'C' kümesini takiben sekiz üyeli 'R' kümesi tespit edildi. Bu küme içerisinde yedi alt tip (R1-R7) görüldü. Bu kümeye giren izolatların 2012-2014 yılları arasında hem AYBÜ'den hem de DYBÜ'den gelen farklı klinik örneklerden izole edildiği belirlendi. 2014 yılında DYBÜ'de tedavi gören iki hastaya ait BAL ve DTA örneklerinden izole edilen iki izolat (Stok no: 118 ve 119) %100 bant profil benzerliği göstererek R1 alt tipini oluşturdu (Tablo 4.10.).

Tablo 4.6. 'J' kümesine ait izolatların özellikleri

NO	Stok No	Tarih	Cinsiyet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	PFGE profili
1	832	15.10.2012	E	1941	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥32 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	≤1 S	≥4 R	≥8 R	4 S	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	J1
2	830	15.10.2012	E	1924	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	1 S	≥4 R	≥8 R	4 S	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	J2
3	826	27.09.2012	K	1929	DYB	İDRAR	16 I	≥128 R	≥32 R	16 S	≥32 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	2 S	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	J3
4	833	16.10.2012	E	1928	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 S	≥16 R	16 I	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J4
5	805	05.09.2012	K	1934	DYB	DOKU	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J5
6	713	17.02.2012	K	1910	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	J6
7	712	16.02.2012	E	1991	AYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	4 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	J7
8	704	31.01.2012	K	1923	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	160 R	≥128 R	P	-	P	-	J8
9	700	19.01.2012	K	1963	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	J9
10	737	03.04.2012	E	1949	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J10
11	744	12.04.2012	E	1982	AYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J10
12	761	07.06.2012	E	1982	DYB	SVS	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J11
13	738	09.04.2012	E	1991	AYB	SVS	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J12
14	731	23.03.2012	E	1923	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J13
15	742	12.04.2012	K	1991	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J14
16	720	29.02.2012	E	1923	DYB	DOKU	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 S	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J15
17	697	17.01.2012	E	1926	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	4 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J16
18	745	18.04.2012	E	1991	AYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J17
19	831	15.10.2012	K	1927	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J18
20	797	22.08.2012	K	1937	DYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J19
21	772	01.07.2012	K	1923	DYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J20
22	752	04.05.2012	E	1924	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	J21
23	701	25.01.2012	E	1945	DYB	DOKU	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J22
24	695	09.01.2012	K	1969	AYB	KAN	16 I	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J23
25	726	23.03.2012	E	1956	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	J24

Tablo 4.7. 'G' kümesine ait izolatların özellikleri

NO	Stok No	Tarih	Cinsi yet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	PFGE profili
1	49	22.07.2013	K	1936	DYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	16 I	≥4 R	4 I	≥16 R	≤0,5 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G1
2	37	14.06.2013	E	1939	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	4 I	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G2
3	44	10.07.2013	K	1921	AYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	4 I	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G3
4	48	22.07.2013	K	1936	DYB	İDRAR	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G3
5	34	24.05.2013	E	1924	DYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G4
6	55	05.08.2013	K	1956	DYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	4 I	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	G5
7	57	02.09.2013	K	1922	DYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	4 I	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	G5
8	52	29.07.2013	E	1955	DYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	4 I	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	G6
9	31	23.05.2013	K	1953	DYB	İDRAR	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G7
10	22	03.04.2013	K	1927	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G8
11	835	12.11.2012	E	1929	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	G9
12	2	08.01.2013	E	1912	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G10
13	3	13.01.2013	K	1927	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	8 I	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G10
14	4	24.01.2013	K	1940	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G10
15	1	08.01.2013	E	1936	AYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	G11
16	855	31.12.2012	E	1948	DYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	8 I	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G12
17	10	10.02.2013	E	1958	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	32 I	8 I	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	G13
18	5	24.01.2013	E	1931	AYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	G14

Tablo 4.8. 'A' kümesine ait izolatların özellikleri

NO	Stok No	Tarih	Cinsi yet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	PFGE paterni
1	171	30.12.2014	E	1931	DYB	DOKU	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	8 S	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A1
2	162	25.12.2014	K	1936	DYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 S	≥16 R	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A2
3	168	30.12.2014	K	1936	AYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A3
4	159	25.12.2014	E	1958	AYB	BAL	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	2 S	8 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A4
5	823	27.09.2012	K	1920	DYB	KAN	16 I	≥128 R	32 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	2 S	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A5
6	166	25.12.2014	K	1936	DYB	İDRAR	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	8 S	8 I	16 I	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A6
7	161	25.12.2014	K	1936	AYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	4 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A7
8	172	30.12.2014	K	1936	AYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	32 I	≥64 R	≥16 R	≥16 R	16 S	8 I	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A8
9	139	05.09.2014	K	1928	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	≤1 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	A9
10	30	22.05.2013	K	1921	AYB	İDRAR	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≤1 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≥8 R	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	A10
11	810	05.09.2012	K	1934	DYB	İDRAR	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	2 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	A11
12	158	25.12.2014	E	1934	AYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	4 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	A12

Tablo 4.9. 'C' kümesine ait izolatların özellikleri

NO	Stok No	Tarih	Cinsi yet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	PFGE profili
1	84	28.11.2013	E	1938	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	8 I	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	C1
2	66	23.09.2013	E	1929	DYB	İDRAR	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	C2
3	69	06.10.2013	E	1993	AYB	BAL	16 I	≥128 R	32 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	C3
4	74	24.10.2013	E	1992	AYB	KAN	16 I	≥128 R	16 I	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	16 S	2 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	C4
5	88	09.12.2013	K	1936	AYB	KAN	16 I	≥128 R	16 I	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	16 S	2 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	C4
6	94	13.12.2013	K	1936	AYB	DOKU	16 I	≥128 R	16 I	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	16 S	2 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	C4
7	73	22.10.2013	E	1992	AYB	SVS	16 I	≥128 R	16 I	16 S	32 R	≥16 R	≥16 R	16 S	2 S	≤1 S	≥4 R	≥8 R	8 I	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	C5
8	111	25.01.2014	E	1929	DYB	DOKU	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	≤1 S	≥4 R	4 I	≤1 S	≤0,5 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	C6
9	110	22.01.2014	E	1938	DYB	İDRAR	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	C7

Tablo 4.10. 'R' kümesine ait izolatların özellikleri

NO	Stok No	Tarih	Cinsi yet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	PFGE profili
1	118	26.02.2014	E	1946	DYB	DTA	16 I	≥128 R	32 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	R1
2	119	13.03.2014	E	1934	DYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	32 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	R1
3	95	20.12.2013	K	1945	DYB	DTA	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	R2
4	837	16.11.2012	E	1991	AYB	İDRAR	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	2 S	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	R3
5	850	13.12.2012	E	1930	DYB	DOKU	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	4 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	4 S	1 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	R4
6	97	26.12.2013	K	1935	DYB	KAN	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	R5
7	96	26.12.2013	K	1926	DYB	KAN	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤1 S	4 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	R6
8	113	29.01.2014	E	1947	AYB	BAL	4 S	≥128 R	≥64 R	≤8 S	16 I	0,5 S	0,5 S	≤2 S	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-	R7

'R' kümesini takiben beş üyeli 'S' kümesi tespit edildi. Bu küme içerisinde beş alt tip (S1-S5) görüldü. Bu kümeye giren izolatların 2014 yılında DYBÜ'den gelen farklı klinik örneklerden izole edildiği belirlendi. Bu kümeye giren izolatların hepsinin OXA-23 direnç geninin negatif olduğu saptandı (Tablo 4.11.).

'S' kümesini takiben dört üyeli 'E' kümesi tespit edildi. Bu küme içerisinde dört alt tip (E1-E4) görüldü. Bu kümeye giren izolatların 2014 yılında DYBÜ'den gelen BAL ve DTA örneklerinden izole edildiği belirlendi (Tablo 4.12.).

'E' kümesini takiben üçer üyeli 'F' ve 'M'; ikişer üyeli 'B', 'I' ve 'L'; son olarak da tek üyeli 'D', 'H', 'K', 'N', 'O', 'P' ve 'T' kümeleri tespit edildi. Bunlardan 'D' kümesinin, 2014 yılında AYBÜ'den gelen BAL örneğinden izole edildiği ve OXA-23 direnç geninin negatif olduğu saptandı.

Tablo 4.11. 'S' kümesine ait izolatların özellikleri

NO	Stok No	Tarih	Cinsi yet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FE P	IMP	MEM	AK	CN	NE T	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	PFGE profili
1	151	02.12.2014	K	1974	DYB	DOKU	≥32 R	≥128 R	≥64 R	32 I	16 I	≥16 R	≥16 R	≤2 S	2 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-	S1
2	148	18.11.2014	K	1934	DYB	KAN	≥32 R	≥128 R	≥64 R	32 I	16 I	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≤1 S	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-	S2
3	137	10.08.2014	E	1943	DYB	KAN	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	16 I	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≤1 S	4 S	≥4 R	4 I	≥16 R	1 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-	S3
4	132	23.06.2014	K	1959	DYB	DTA	4 S	≥128 R	≥64 R	≤8 S	16 I	1 S	0,5 S	≤2 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	-	-	P	-	S4
5	133	02.07.2014	K	1959	DYB	BAL	16 I	≥128 R	32 R	16 S	32 R	0,5 S	0,5 S	≤2 S	≤1 S	2 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	40 S	≥128 R	-	-	P	-	S5

Tablo 4.12. 'E' kümesine ait izolatların özellikleri

NO	Stok No	Tarih	Cinsi yet	Doğum Tarihi	Ünite	Örnek Türü	SAM	PIP	CAZ	SCF	FEP	IMP	MEM	AK	CN	NET	CIP	LEV	TE	TIG	CS	SXT	TPZ	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	PFGE profili
1	144	09.10.2014	E	1924	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	E1
2	143	04.10.2014	K	1924	DYB	DTA	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≤2 S	≥16 R	4 S	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≥320 R	≥128 R	P	-	P	-	E2
3	146	13.11.2014	K	1920	DYB	BAL	≥32 R	≥128 R	≥64 R	≥64 R	≥64 R	≥16 R	≥16 R	≥64 R	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	2 S	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	E3
4	154	24.12.2014	E	1947	DYB	BAL	16 I	≥128 R	≥64 R	16 S	≥64 R	≥16 R	≥16 R	8 S	≥16 R	≥32 R	≥4 R	≥8 R	≥16 R	≥8 R	≤0,5 S	≤20 S	≥128 R	P	-	P	-	E4

5. TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonları, hastanede kalış süresini uzatarak, morbidite ve mortalite oranlarını arttıran ve tedavi maliyetlerini yükselterek ekonomik kayıplara yol açan önemli bir problemdir (4). Özellikle YBÜ başta olmak üzere HE'de izolasyon sıklığı artan mikroorganizmalar arasında ilk sırada gram negatif basiller gelmektedir (7). Klinik önemi tüm dünyada artan, doğada, toprakta ve sularda uzun süre yaşayabilen *A. baumannii*, hastane ortamındaki cansız yüzeylerde de canlılığını günlerce sürdürebilmekte ve özellikle YBÜ'de ciddi salgınlara yol açabilmektedir (10,24,26). A.B.D.'deki Hastane Kaynaklı Enfeksiyonları İzleme Sistemi (126), bu ülkedeki *Acinetobacter* insidansının gram negatif basiller içindeki oranının, 1973'te %1,4 iken 2003'te %6,2'ye yükseldiğini bildirmiştir. Custovic ve ark. (127) 2013 yılında AYBÜ'de HE oranını %12,3 olarak tespit etmişler ve enfeksiyon etkenleri arasında da en sık izole edilen bakterinin *A. baumannii* olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamız kapsamına dahil 2012, 2013 ve 2014 yıllarında, hastanemiz AYBÜ'de HE oranı, sırasıyla %49,54, %18,85 ve %13,25; DYBÜ'de ise %15,34, %13,99 ve %10,55 olarak belirlenmiştir. AYBÜ ve DYBÜ'de 2012 ve 2013 yıllarında HE etkeni olarak en sık izole edilen mikroorganizma *A. baumannii* iken 2014 yılında *A. baumannii* geride kalmıştır. Bu düşüşün nedeninin kurumumuzda uygulanan enfeksiyon kontrol önlemleri bünyesinde antibiyotik kullanım politikasındaki değişiklikler ve son yıllarda kurumumuzda tedavi edilen hasta profilindeki farklılaşma olduğu kanaatindeyiz. Benzer şekilde Abdallah ve ark. (128) 2013-2014 yıllarında eğitim, salgın yönetimi, bulaş önlemleri, çevre temizliği gibi başarılı enfeksiyon kontrol programları neticesinde karbapenem dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* oranlarının düştüğünü bildirmişlerdir.

Acinetobacter türlerinin geleneksel biyokimyasal yöntemlerle fenotipik yönden birbirlerinden ayrılması güçtür. Bu durumdan dolayı da VITEK2 (Biomerieux, Fransa) otomatize identifikasyon sistemi gibi izolatların biyokimyasal özelliklerine göre tür düzeyinde tanımlama yapan hazır ticari sistemlerle, türler arasında ayırım yapabilmek zorlaşmaktadır. Bu sistemlerde

A. baumannii, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU genellikle *A. baumannii* olarak tanımlanmaktadır (15,19). Bizim çalışmamızda da VITEK2 (Biomerieux, Fransa) otomatize identifikasyon sistemi, çalışmaya alınan bütün izolatları *Acinetobacter baumannii* kompleks olarak tanımlamıştır. Türler arası ayırmada izolatların 41°C ve 44°C'de üreme özelliğine bakılmış ve bütün izolatların *A. baumannii* olduğu anlaşılmıştır. *A. baumannii* tanımlamasında önerilen bir diğer yöntem de bu türe özgü olduğu bilinen, OXA-tipi karbapenemazların bir çeşidi olan OXA-51 geninin belirlenmesidir. Bazı çalışmalarda farklı türlerde de plazmid kökenli OXA-51 geninin varlığının anlaşılmaması, bu yöntemin tam güvenilir bir yöntem olmadığını düşündürse de çoğu çalışmada hala bu yöntem tür tayini için kullanılmaktadır (5,22). Bizim çalışmamızda da çalışmaya alınan bütün izolatların OXA-51 geni pozitif olarak bulunmuştur.

İnvaziv işlemlerin sıklıkla uygulandığı, antibiyotiklerin kontrolsüz kullanıldığı, bağışıklık sistemi zayıflamış ve altta yatan hastalığı olan kişilerin tedavi edildiği hastane birimlerinde özellikle de YBÜ'de, *A. baumannii* HE etkeni olarak sıklıkla izole edilen fırsatçı bir patojendir (129). Bizim çalışmamızda da izolatlarımızın 31 (%31)'i AYBÜ'den, 69 (%69)'u DYBÜ'den gelen örneklerden izole edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen örneklerin 77 (%77)'si bağışıklık sistemi zayıflamış, çoklu antibiyotik baskısı altında olan ve çok sayıda invaziv girişim yapılan, 65 yaş ve üstündeki yaşlı hastalardan izole edilmiştir. Park ve ark. (130) tarafından yapılan çalışmada da *A. baumannii*'nin izole edildiği hastaların %73'ü YBÜ'de yatmaktadır ve ortalama standart sapma yaşı da 62 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Guo-xin ve ark. (131) tarafından yapılan çalışmada da *A. baumannii*'nin izole edildiği hastaların çoğu yaşlı hastalardır (ortalama yaş:56±21).

Hastane ortamında en çok solunum yolu ekipmanlarında kolonize olan *A. baumannii*, başta solunum sistemi enfeksiyonları ve buna sekonder gelişen kan dolaşım enfeksiyonları olmak üzere çok çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır (14,26,31,32,48,49). Park ve ark. (130) tarafından yapılan çalışmada *A. baumannii*'nin izole edildiği klinik örneklerin %77'si solunum sistemi örnekleridir. Mezzetesta ve ark. (132) tarafından yapılan çalışmada *A.*

baumannii kaynaklı oluşan HE'nin %70,1'i solunum yolu enfeksiyonları; %16,9'u ise kan ile ilişkili enfeksiyonlardır. Literatürle uyumlu olacak şekilde, bizim çalışmamızda en çok izole edilen örnek türü, %57'lik oranla solunum sistemi örnekleridir (DTA: %35, BAL: %22). Bunu %20'lik izolasyon oranıyla kan örnekleri izlemektedir.

Son 10 yılda *A. baumannii*'nin klinik önemi, antimikrobiyal direnç genlerinin hızlı aktarımı sonucu ortaya çıkan ÇİD ve dirençli suşlar tarafından oluşan salgınlar nedeniyle ciddi şekilde artmıştır (130,132). Geçmişte karbapenemler tedavide son çare iken bugün ticari olarak elde edilebilen bütün antibiyotiklere dirençli izolatların oluşması, bu patojenin tedavisinde halen ciddi problemlerin yaşanmasına neden olmaktadır.

Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi Verileri (133), 2000-2003 yılları arasında Türkiye'den izole edilen 779 *A. baumannii* kökeninde imipenem direncini %48 olarak bildirmektedir. Türkiye'de gram negatif hastane kaynaklı kökenlerin, β -laktam antibiyotiklere direncinin araştırıldığı çok merkezli HİTİT çalışmasında (134,135) da, *A. baumannii* kökenlerinin imipenem direnç oranlarının 2005'de %52,2, 2007'de ise %55 olduğu saptanmıştır. Leblebicioğlu ve ark. (136) tarafından 2012 yılında ülkemizde yapılan araştırmada da *A. baumannii* izolatlarının doripenem, imipenem ve meropenem yüksek oranda dirençli (MİK90 $\geq$ 64mg/L) olduğu rapor edilmiştir. Ülkemizde 2010 yılında Keskin ve ark. (5) tarafından yapılmış bir çalışmada da *A. baumannii* izolatlarının imipenem duyarlılığı %8; meropenem duyarlılığı ise %6,5 olarak bildirilmiştir. Hastanemizdeki altı yıllık direnç durumuna bakıldığında, 2006-2011 yılları arasında *A. baumannii*'deki karbapenem direnci %50'lerden %75'lere yükselmiştir. Çalışmamızın yapıldığı 2012-2014 yıllarında ise bu oranın literatürlerle uyumlu olacak şekilde %95'lere çıktığı gözlenmektedir.

Çalışmamızda test edilen tüm izolatlar için en etkili antimikrobiyal ajan %100 duyarlılık oranı ile kolistin olarak tespit edilmiştir. İkinci sırada ise %93 duyarlılık oranı ile tigesiklin yer almıştır. Benzer şekilde Guo-xin ve ark. (131) tarafından yapılan çalışmada, *A. baumannii*'nin kolistin duyarlılığı %100, tigesiklin duyarlılığı %91,3; Mezzetesta ve ark. (132) tarafından yapılan

çalışmada kolistin duyarlılığı %100, tigesiklin duyarlılığı %94 olarak rapor edilmiştir. Hastanemizde 2009-2011 yıllarında *A. baumannii* izolatlarında %4,3 oranında kolistin direnci saptanırken; çalışmamızın yapıldığı 2012-2014 yıllarında kolistin dirençli *A. baumannii* izolatu saptanmamıştır. Enfeksiyon kontrol önlemlerinin başında gelen, kısıtlı antibiyotik bildirimi ve akılcı antibiyotik kullanımının bir sonucu olarak görülen bu duyarlılık artışının mutlak suretle diğer antibiyotik grupları ve etkenler için de hastanelere yerleştirilmesi esastır.

Acinetobacter baumannii'de direnç artışından sorumlu mekanizmalar arasında en yaygın olanı, enzimatik direnç mekanizmalarından OXA-tipi karbapenemazlardır ve bu tez çalışmamızda bu enzim tipinin ve epidemiyolojisinin araştırılmış olmasının da en önemli sebebi budur. Bu amaçla kullandığımız multipleks PZR yöntemi; izolatlarımızın araştırdığımız OXA-tipi karbapenemaz genlerinden (OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58) hangisini ya da hangilerini taşıyıp taşımadığını tek bir reaksiyon ile kolaylıkla belirlememize olanak sağlamıştır. Çalışma izolatlarımızın hepsinde bu türe intrensek olduğu bilinen OXA-51 gen bölgesi; 92 (%92)'sinde ise OXA-23 gen bölgesi pozitif olarak bulunmuştur. OXA-24 ve OXA-58 gen bölgesi pozitifliği hiçbir izolatta saptanmamıştır. Turton ve ark. (137) ve Yang ve ark. (138) tarafından yapılan çalışmalarda multipleks PZR yöntemi ile *A. baumannii* izolatlarının tamamında OXA-51 kodlayan gen bölgesi pozitifliği gösterilmiştir.

Dünyada birçok ülkede OXA-23 geni taşıyan imipenem dirençli *A. baumannii* izolatları, hastane salgınlarından ya da sporadik olgulardan izole edilmiştir. Hastane salgınlarına sebep olan karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarına ait bildirimler son 10 yıl içerisinde Fransa, İngiltere, İspanya, Portekiz, Hollanda, Çek Cumhuriyeti, Polonya, Bulgaristan, Yunanistan, İtalya ve Türkiye gibi Avrupa ülkelerinden gerçekleştirilmiştir. Avrupa'da *A. baumannii* salgın izolatlarında en çok OXA-23 benzeri ve OXA-58 benzeri gen bölgesi saptanmıştır. OXA-24 salgınlardan ziyade sporadik olgulardan bildirilmiştir (139). D'Arezzo ve ark. (140)'nın İtalya'da yaptığı çalışmada, YBÜ'de salgınlara sebep olan ÇİD bulunan *A. baumannii* izolatlarında OXA-

58 prevalansının düştüğü, OXA-23 prevalansının ise yükseldiği saptanmıştır. Bu durumun muhtemel sebebi, OXA-23'ün karbapenemaz aktivitesinin OXA-58'e göre daha fazla olması ile açıklanmıştır (132). Ikonomidis ve ark. (141) tarafından yapılan 2005-2009 yıllarını kapsayan çalışmada da imipenem direncinde ve OXA-23 pozitif izolatların yayılımında artış olduğu saptanmıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda, Gür ve ark. (95)'nin 2008 yılında Ankara ve İstanbul'da izole edilen 321 *A. baumannii* izolatı ile yaptıkları çalışmada, %58,6 oranında karbapenem direnci tespit edilmiştir. Çalışmada, izolatların %59,1'inin OXA-23, %40,9'unun OXA-58 kodlayan geni taşıdıkları gösterilmiştir. Ankara'da izole edilen izolatların biri hariç hepsinin OXA-58; İstanbul'da izole edilen izolatların ise biri hariç hepsinin OXA-23 geni taşıdıkları belirlenmiştir. Buna göre OXA-tipi karbapenemazların dağılımında bölgesel farklılıkların olabileceği ileri sürülmüştür. Ergin ve ark. (142) tarafından yapılan, 2004-2010 yıllarında toplanan *A. baumannii* izolatlarında OXA-tipi enzim varlığının araştırıldığı çalışmada, yedi yıllık süreç içerisinde OXA-23 benzeri enzimlerin, OXA-58 benzeri enzimlerin yerini aldığı, 2008-2010 yılları arasında OXA-23 benzeri enzim varlığının artarak yaygın enzim tipi haline geldiği vurgulanmıştır. Benzer şekilde ülkemizden 2008-2012 arası yılları kapsayan çalışmalarda (143-145) da *A. baumannii* izolatlarında OXA-23 benzeri enzimlerin baskın enzim tipi olduğu gösterilmiştir. Multipleks PZR ile oksasilinaz enzimlerinin araştırıldığı bir tez çalışmasında (146) da tüm suşlarda OXA-23 ve OXA-51 pozitifliği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da %92 oranındaki OXA-23 gen pozitifliğine karşın hiç OXA-58 ve OXA-24 gen pozitifliğinin görülmemesinin sebebinin hem Gür ve ark. (95) tarafından bildirilen bölgesel farklılıklardan hem de tüm dünyada OXA-23 gen pozitifliğinin artan prevalansından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

OXA-23 karbapenemaz üreten izolatların imipenem ve meropenem hidrolizinin yüksek düzeyde olduğu bilinmektedir. Yang ve ark. (138) ile D'Arezzo ve ark. (140) OXA-23 ve OXA-51 gen pozitifliği bulunan *A. baumannii* izolatlarının tümünde %100 oranında imipenem direnci saptamışlardır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da OXA-23 ve OXA-51

geninin birlikte pozitif olduğu 92 izolatın tümünde imipenem ve meropenem direnci tespit edilmiştir. Bu izolatlarda görülen karbapenem direncinin OXA-23 ve OXA-51 gen pozitifliğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda tek başına OXA-51 içeren (diğer OXA genlerini içermeyen) sekiz izolatın beşi (%62,5) fenotipik olarak imipeneme ve meropeneme duyarlı, üçü (%37,5) ise dirençli olarak bulunmuştur. Bu izolatlarda karbapenem direncine MBL gibi diğer karbapenemaz enzimlerinin varlığı sebep olmuş olabilir (87). Ayrıca OXA-51 geninin upstream bölgesine yerleşmiş *ISAbal1*'in promoter olarak da karbapenem direnci ile ilişkili olabileceği bilinmektedir (90). Başlangıçta tez konusu kapsamında öngörülmediği için karbapenem direncinden sorumlu diğer nedenler bu çalışma sırasında ortaya konulamamıştır. Fakat yakın zamanda çalışılması planlanmaktadır.

Salgın ve sporadik enfeksiyon suşlarının ayrımı ancak, şüpheli bakteri izolatlarının aralarındaki genomik benzerliklerin ve farklılıkların ortaya konulduğu, epidemiyolojik analize yardımcı olacak moleküler teknikler ile yapılabilmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, dirençli *A. baumannii* izolatlarında klonal yayılımları tespit etmek ve epidemiyolojik ilişkileri belirlemek amacıyla PFGE yöntemi uygulanmıştır. PFGE yöntemiyle tiplendirmeye alınan 100 izolata ait bant görüntüleri hem Tenover kriterlerine (118) göre hem de açık kaynak kodlu PyElph yazılım sistemi (versiyon 1.4) kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. PyElph yazılım sistemi (versiyon 1.4) ile tüm izolatların benzerlik katsayılarının %67 ile %100 arasında değiştiği görülmüştür. Çalışma izolatlarımız arasında %80 benzerlik katsayısı sınır alınarak 19 farklı PFGE paterni; %100 benzerlik katsayısı sınır alınarak ise 92 farklı alt tip belirlenmiştir.

Seifert ve ark. (147) tarafından yapılan, dokuz farklı hastane salgınından elde edilen 103 *A. baumannii* izolatının PFGE analizinde, benzerlik katsayısı %87 olarak alınmış, dendogram bu oranda işaretlenmiştir. Sonuçta izolatların sekiz farklı ve beş muhtemel ilişkili kümeye ayrıldığı saptanmıştır. Sonuçlar farklı yöntemler (plazmid analizi, antibiyotik duyarlılık

profilleri ve biyotiplendirme) ile kıyaslanmış ve PFGE'nin izolatların birbiri ile ilişkisini göstermede en üstün yöntem olduğu anlaşılmıştır.

Yine Adams-Haduch ve ark. (148) ve Park ve ark. (130) tarafından yapılan çalışmalarda, PFGE analizi sonucunda bizim çalışmamıza da benzer şekilde %80 benzerlik katsayısı sınır alınmış ve bu şekilde 65 *A. baumannii* izolatının 24 kümeye ayrıldığı ve YİD bulunan 30 *A. baumannii* izolatının 28 farklı genotipte olduğu anlaşılmıştır.

Çalışmamızda saptanan toplam 19 küme içinde 'J' kümesi, 25 üyesi ve 24 alt tipi ile (J1-J24) en çok saptanan küme olmuştur. Bu klon, çalışma sürecimizde ilk defa AYBÜ'de yatan bir hastanın kan örneğinden izole edilmiştir (Stok no: 695). Bu klonun daha sonraki dönemlerde DYBÜ'de 11; AYBÜ'de ise 13 hastaya ait farklı klinik örneklerden izole edilmesi, farklı YBÜ arasındaki transferin olası nedenleri üzerinde düşünülmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Kümenin hepsi 2012 yılında izole edildiği için, 'J' klonunun 2012 yılında hastanemizde baskın olduğu ancak 2013-2014 yıllarında ise bu klonun kaybolduğu gözlenmiştir. AYBÜ'de yatan iki hastaya ait kan ve DTA örneklerinden izole edilen iki izolatın (Stok no: 744 ve 737), gentamisin duyarlılık durumları birbirlerinden farklı iken bant profil benzerliği %100 bulunmuş ve J10 alt tipini oluşturmuştur. *A. baumannii*'nin aminoglikozid direncinde, fosfotransferaz, asetiltransferaz ve nükleotidiltransferaz gibi aminoglikozid modifiye edici enzimlerin üretilmesi önemli rol oynamaktadır. Bu enzimleri kodlayan genler bakteriler arasında plazmid ve transpozonlarla yayılma eğilimindedir. J10 alt tipindeki fenotipik farklılığın aksine genotipik benzerliğin nedeninin, plazmidlerin rutin PFGE protokolleri ile kromozomal DNA'dan tam olarak ayırt edilememesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

'J' kümesini takiben 18 üyesi ve 14 alt tipi ile (G1-G14) 'G' kümesi en çok saptanan ikinci küme olmuştur. Bu klon, çalışma sürecimizde ilk defa DYBÜ'de yatan bir hastanın DTA örneğinden izole edilmiştir (Stok no: 835). Sonraki dönemde ise DYBÜ'de yatan üç hastanın DTA örneklerinde (Stok no: 2, 3 ve 4) ve AYBÜ'de yatan bir hastanın da BAL örneğinde (Stok no: 1) aynı klonun gözlenmesi, bu klonun transferinde solunum sistem ekipmanlarının bir rolünün olabileceğini düşündürmüştür. 'G' klonunun Kasım

2012-Eylül 2013 tarihleri arasında saptanması nedeniyle, bu klonun 2012 yılındaki 'J' klonunun yerini aldığı ve 2013 yılında hastanemizde baskın klon olduğu gözlenmiştir. G10 alt tipini oluşturan izolatların (Stok no: 2, 3 ve 4), J10 alt tipini oluşturan izolatlara benzer şekilde aminoglikozid duyarlılık durumlarının birbirlerinden farklı olduğu saptanmıştır. Fenotipik olarak belirlenen bu farklılığın sebebinin yine direnç mekanizmasında rol alan plazmitlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

'G' kümesini takiben saptanan 12 üyeli ve 12 alt tipli (A1-A12) 'A' kümesine giren izolatlar, çalışmanın yapıldığı her üç yılda (2012-2014) da hem AYBÜ hem de DYBÜ'den izole edilmiştir. Bu yüzden 'A' klonunun 2012-2014 yılları arasında en baskın klon olduğu gözlenmiştir.

'A' kümesini takiben saptanan dokuz üyeli ve yedi alt tipli (C1-C7) 'C' kümesi 2013-2014; sekiz üyeli ve yedi alt tipli 'R' kümesi ise 2012-2014 yılları arasında hem AYBÜ'den hem de DYBÜ'den izole edilmiştir. 'C' küme elemanlarının hepsinde, 'R' küme elemanlarının ise biri (R7) hariç tamamında hem OXA-51 hem de OXA-23 direnç genleri pozitif olarak bulunmuştur. R7 alt tipine ait bir izolat ile 'D' kümesine ait bir izolat benzer şekilde 2014 yılında farklı zamanlarda AYBÜ'den gelen BAL örneklerinden izole edilmiş ve bu izolatların her ikisinde de OXA-23 direnç geni negatif olarak bulunmuştur. Bu benzerlik bu iki alt tip arasında gen aktarımının olabildiğini düşündürdüğü için bu durumu aydınlatacak genetik incelemelerin yapılması planlanmaktadır.

Beş üyeli ve beş alt tipli (S1-S5) 'S' klonu, çalışma sürecimizde ilk defa dış merkezden gelerek hastanemiz DYBÜ'ye alınan bir hastanın DTA örneğinden izole edilmiştir (Stok no: 132). Bu tarihe kadar hastanemizde bulunmayan bu klonun DYBÜ'de yatan diğer hastalar için de kaynak oluşturduğu düşünülmektedir. YBÜ'ne hasta alınırken öncelikle hastaların izole bir alanda tutulması, kolonizasyon durumunun netleşmesini takiben YBÜ'deki diğer hastaların yanına aktarılması bu nedenle çok önemlidir.

Dört üyeli ve dört alt tipli (E1-E4) 'E' klonu, çalışma sürecimizde ilk defa DYBÜ'de yatan bir hastanın DTA örneğinden izole edilmiştir (Stok no: 143). Bu tarihe kadar hastanemizde bulunmayan bu klonun da tıpkı 'S' klonu

gibi, DYBÜ'ye dış merkezden gelen bir başka hasta kaynaklı olduğu saptanmıştır. Bu durum enfeksiyon kontrol programları kapsamında YBÜ'ne hasta alımı ile ilgili hususların gözden geçirilmesinin gerekliliğini bir kez daha ortaya koymaktadır. Bu kümeye giren izolatların tümünün 2014 yılında DYBÜ'den gelen solunum yolu örneklerinden (BAL, DTA) izole edilmiş olması, bulaşta solunum yolu ekipmanlarının rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Özetle, hastanemizde 2012 yılında 'J' klonunun baskın olduğu, 'G' klonunun 2012'nin son aylarında hastanemize girip 2013 yılında baskın hale geldiği, 'A' ve 'R' klonlarının ise çalışmamızın yapıldığı her üç yılda da (2012-2014) baskın olduğu anlaşılmaktadır. 'S' ve 'E' klonlarının 2014 yılında sadece DYBÜ'de saptanması, bu klonun hastanemizin sadece bu bölgesinde sınırlı kaldığını ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin iyi uygulanması sonucu AYBÜ'ne bu klonun transfer edilmediğini göstermektedir.

Guo-xin ve ark. (131)'nin yaptığı çalışmada, 62 *A. baumannii* izolatının PFGE analizi sonucunda dokuz farklı klona ayrıldığı anlaşılmıştır. En sık saptanan klonlar ise A, B ve C olarak isimlendirilmiştir. A ve C klonları üçer alt tipe sahipken, B klonu ise dört alt tipe sahiptir. A klonundaki izolatların hepsi karbapenem direnci gösterirken, B ve D klonlarının ise bir kısmı karbapenem direnci göstermiştir.

Mezzetesta ve ark. (132) tarafından yapılan çalışmada, Apal restriksiyon enzimi ile yapılan PFGE analizi sonucunda, Tenover kriterlerine göre karbapeneme dirençli 52 *A. baumannii* izolatının aynı klona ait olduğu ve bu izolatların hepsinin OXA-23 direnç genine sahip olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda OXA-23 direnç geni başta 'J', 'G', 'A', 'C' ve 'E' klonları olmak üzere çok sayıda klonda pozitif olarak bulunmuştur. Fakat OXA-23 negatifliği özellikle 2014 yılında DYBÜ'de 'S' kümesinde; AYBÜ'de ise 'D' kümesinde ve R7 alt tipinde toplanmıştır. Bunlar içinde 'S' kümesinin ve R7 alt tipinin dendogramda birbirlerine çok yakın bulunması, aralarındaki klonal ilişkiye bir kanıt oluşturmaktadır.

Yang ve ark. (138)'nin Kore'de karbapenem dirençli 49 *A. baumannii* izolatu ile yaptıkları çalışmada, PFGE yöntemi ile suşların tamamının aynı klon içinde toplandığı belirtilmiştir.

Ülkemizden bu konuda yapılmış çalışmalara baktığımızda, Gökmen ve ark. (149) tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada, *A. baumannii* salgın izolatlarının PFGE analizi sonucunda, suşların tamamının bir ana küme içerisinde, yakın ilişkili iki alt küme içerisinde toplandıkları tespit edilmiştir.

Keskin ve ark. (5)'nin yaptığı çalışmada, 201 *A. baumannii* izolatının PFGE küme analizi sonucunda, izolatların dört genotip altında (A-D) kümелendiği görülmektedir. Dört gruba ait izolatların birbirleriyle olan benzerliği, %70'in altında bulunmuştur. İzolatlar içerisinde baskın izolat grubuna rastlanmadığı için ortak bir salgın izolatu saptanmamıştır. A grubu hariç diğer grupların hepsinde OXA-23 direnç geni pozitif olarak bulunmuştur.

Gür ve ark. (95)'nin yaptığı çalışmada, OXA-23 direnç geni pozitifliği gözlenen, İstanbul'dan izole edilen 25 suş ile ve Ankara'dan izole edilen bir suş PFGE ile klonal olarak ilişkili bulunmuş ve bu klonun iki farklı şehirde dağıldığı düşünülmüştür.

Hastanemizde daha önce Yalçın (150) tarafından yapılan, 2009-2011 yılları arasındaki 183 *A. baumannii* izolatının PFGE ile klonal ilişkisinin saptandığı tez çalışmasında, PFGE genotiplerini belirlemek için benzerlik katsayısı sınır değeri %80 olarak belirlenmiş ve izolatların 26 farklı genotip içinde olduğu tespit edilmiştir. Alt tip tespitinde ise benzerlik katsayısının sınır değeri %100 olarak belirlenmiş ve izolatların 128 alt tip içinde olduğu saptanmıştır. IV. ve XX. genotiplerine ait klonların 2009-2011 yılları arasında üç yıl boyunca, hem AYBÜ'ne hem de DYBÜ'ne ait örneklerden izole edildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda gözlenen 'A' ve 'R' klonlarının üç yıl boyunca (2012-2014) yaygın olarak saptanması, bu klonların Yalçın tarafından saptanmış olan IV. ve XX. klonlarıyla benzer olabileceğini düşündürmektedir.

Gördebil (151) tarafından 2011 yılında yapılmış bir tez çalışmasında, toplam 55 *A. baumannii* izolatının PFGE analizi sonucunda %80 benzerlik katsayısına göre 16 farklı PFGE kümesi belirlenmiş ve bunlar arasında en büyük kümeyi 29 üyeli 'A' kümesi oluşturmuştur.

Sarı (152) tarafından 2014 yılında yapılmış bir tez çalışmasında, 216 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatu PFGE ile değerlendirilmiş ve Tenover kriterlerine göre 18 farklı PFGE paterni ayırt edilmiştir. Tüm tipler arasında patern A ve D'nin baskın tip olduğu saptanmıştır.

Kılınç (153) tarafından 2011 yılında yapılmış bir tez çalışmasında ise 48 *A. baumannii* izolatu, PFGE ile değerlendirilmiş ve izolatların altı farklı küme içinde toplandığı anlaşılmıştır.

Acinetobacter baumannii moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalarda, uluslararası klon olarak adlandırılan sekiz klon (IC 1-8) tanımlanmıştır. IC 1, IC 2 ve IC 3, Avrupa klonu I, II ve III'ü temsil etmektedir ve IC 2, en çok yayılım gösteren ve çoklukla karbapenem direnci ile ilişkili olan klondur (91). Çalışmamızın bir eksiği, saptadığımız baskın klonların bu uluslararası klonlar ile ilişkisinin belirlenememesi olabilir. Bunun için bu tezin bir devamı olmak üzere, çalışmada saptadığımız baskın klonlarımızın MLST yöntemi kullanılarak uluslararası klonlar ile ilişkilendirilmesine yönelik bir araştırma yapılması planlanmıştır.

Çalışmamızda, OXA-51 ve OXA-23 gen bölgesi pozitifliğinin yoğun olarak saptanması ve mevcut klonal benzerliğin ortaya konulması, bu ajanın yayılımının engellenmesine yönelik uygulanacak enfeksiyon kontrol programlarının belirlenmesinde, merkezler tarafından kendi OXA-tipi direnç gen profillerinin ve baskın klonların tespit edilmesinin ne kadar önemli olduğunu göstermiş ve dezenfeksiyon önlemlerinin yanısıra temas izolasyonunun gerekliliğini de bir kez daha vurgulanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamıza alınan *A. baumannii* suşlarının %69 izolasyon oranıyla en sık izole edildiği birim DYBÜ; %57'lik oranla en sık izole edildiği klinik örnek türü ise solunum sistemi örnekleri (DTA: %35, BAL: %22) olmuştur.
2. VITEK2 (Biomerieux, Fransa) otomatize identifikasyon sistemi ile bütün izolatlar *Acinetobacter baumannii* kompleks olarak tanımlanmış, 41°C ve 44°C'de üreme özelliğine bakılarak izolatların *A. baumannii* olduğu kabul edilmiştir. Bu durum *Acinetobacter* izolatlarının biyokimyasal özelliklerine göre yarı otomatize veya tam otomatize sistemlerle yapılan tür düzeyindeki tanımlamalarda sorunlar yaşandığı için, çıkan sonucun konvansiyonel yöntemlerle birlikte değerlendirilmesinin gerekliliğini ortaya koymuştur.
3. Test edilen tüm antibiyotikler içinde en etkili ajanlar, %100 duyarlılık oranı ile kolistin; %93 duyarlılık oranı ile tigesiklin olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan 100 izolatın tamamının piperasilin, piperasilin/tazobaktam ve siprofloksasine karşı dirençli olduğu gözlenmiştir.
4. Suşlardaki oksasilinaz enzimlerini araştırmak için yapılan multipleks PZR sonuçlarına göre; 100 izolatın tamamında OXA-51 gen bölgesi; 92 (%92)'sinde OXA-23 gen bölgesi belirlenmişken; OXA-24 ve OXA-58 gen bölgeleri ise hiç bir izolatta bulunmamıştır. Bu sonuçlar, OXA-23 direnç geninin, ülkemizde ve dünyada görülme sıklığındaki artış ile uyumlu bulunmuştur.
5. Epidemiyolojik tiplendirmede yöntemleri içinde PFGE, tekrarlanabilirliği ve yüksek ayırım gücü gibi özellikleri nedenleriyle altın standart olarak kabul görmüş bir yöntemdir. PFGE yöntemiyle tiplendirmeye alınan tüm çalışma izolatlarının benzerlik katsayılarının %67 ile %100 arasında değiştiği görülmüştür. İzolatların, %80 benzerlik katsayısı sınır alınarak 19 farklı PFGE paterni; %100 benzerlik katsayısı sınır alınarak ise 92 farklı alt tip içinde toplandıkları belirlenmiştir.

6. Toplam 19 küme içinde 'J' kümesi 25 üyesi ve 24 alt tipi ile (J1-J24) en çok saptanan küme olmuştur. Hastanemizde 2012 yılında 'J' klonunun baskın olduğu, 'G' klonunun 2012'nin son aylarında hastanemize girip 2013 yılında baskın hale geldiği, 'A' ve 'R' klonlarının ise çalışmamızın yapıldığı her üç yılda da (2012-2014) her iki YBÜ'de de baskın olarak bulunduğu anlaşılmıştır. 'S' ve 'E' klonları ise sadece 2014 yılında DYBÜ'de saptanmıştır. Bu sonuçlara göre bazı klonların her üç yılda da hastanemizde yerleşik şekilde baskın klon olarak görüldüğü, bazı klonların ise dış merkezden gelen hastalar nedeniyle hastanemize sonradan taşındığı anlaşılmıştır.
7. Bu çalışmada, hem YBÜ'ye hasta alınırken hastaların başta izole bir alanda tutulması, kolonizasyon durumunun netlik kazanmasından sonra diğer hastaların yanına aktarılması gerekliliği, hem de salgın suşlarının hastane içinde yayılımının engellenmesi için gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında alınmasının gerekliliği bir kez daha ortaya konmuştur.
8. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında OXA-tipi direnç genlerinin tespit edilmesinin ve moleküler yöntemlerle klonalite takibinin yapılmasının, hastane içindeki bu sorunlu patojenin yayılımının önlenmesine yönelik çalışmalarda ve doğru antimikrobiyal tedavinin seçilmesinde yönlendirici olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Çetinkaya Şardan, Y., Hastane enfeksiyonları: tanımlar, sürveyans, epidemilere yaklaşım. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Üçüncü Baskı, Ankara, Nobel Tıp Kitapevleri, s.545-557, 2008.
2. Peşken, Y., Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisi. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları, Samsun, Deomed Medikal Yayıncılık, s.203-13, 2002.
3. Yalçın, A. N., Hastane enfeksiyonları maliyet analizi. Hastane Enfeksiyonları Korunma ve Kontrol, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi. 60, 15-22, 2008.
4. Güner, R., Karabay, O., Kayacan, Z. Ç., Köse, Ş., Müezzinoğlu, A., Öztürk, R., Çetinkaya Şardan, Y., Şencan, İ., Ünal, S., Yıldırım, A., T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Sağlıkta Dönüşüm Programı, Hastane enfeksiyonlarının önlenmesi: Türkiye Deneyimi Eylül 2004-Aralık 2010. T.C. Sağlık Bakanlığı Yayın No:825, Ankara, Kayıhan Ajans, 2011.
5. Keskin, H., Tekeli, A., Dolapçı, İ., Öcal, D., Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında beta-laktamaz kaynaklı direncin moleküler karakterizasyonu. Mikrobiyol Bul. 48(3), 365-76, 2014.
6. Korten, V., Hastane İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi ve Genel Risk Faktörleri. Hastane enfeksiyonları, Ankara, 1. baskı, Güneş Kitabevi, s.34-44, 1993.
7. Karahocagil, M. K., Yaman, G., Göktaş, U., Sünnetçioğlu, M., Çıkman, A., Bilici, A., Yapıcı, K., Baran, A. İ., Binici, İ., Akdeniz, H., Hastane enfeksiyon etkenlerinin ve direnç profillerinin belirlenmesi. Van Tıp Derg. 18(1), 27-32, 2011.
8. Towner, K. J., *Acinetobacter*: An old friend, but a new enemy. J Hosp Infect. 73(4), 355-63, 2009.
9. Gerischer, U.: *Acinetobacter* Molecular Microbiology. Norfolk, UK, 2008.

10. Bergogne-Berezin, E., Towner K. J., *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 9(2), 148-65, 1996.
11. Brisou, J., Prevot, A. R., Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. Ann Inst Pasteur. 86(6), 722–28, 1954.
12. Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R. Y., A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (Genus *Acinetobacter*). J Bacteriol. 95(5), 1520–541, 1968.
13. Bergey, D. H., Buchanan, R. E., Gibbons, N. E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, 1974.
14. Bouvet, P. J., Grimont, P. A., Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol. 36(2), 228-40, 1986.
15. Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L., *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 21(3), 538-82, 2008.
16. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, 1994.
17. Başustaoğlu, A.: Klinik Mikrobiyoloji Cilt 1-2. Ankara, 2009.
18. Prashanth, K., Badrinath, S., Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using Arbitrarily Primed PCR&Pulse Field Gel Electrophoresis [Comparative study]. Indian J Med Res. 122(5), 408-18, 2005.
19. Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., Dijkshoorn, L., Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species

- 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 162(4), 393-404, 2011.
20. Kishii, K., Kikuchi, K., Matsuda, N., Yoshida, A., Okuzumi, K., Uetera, Y., Yasuhara, H., Moriya, K., Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for species identification of *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures. Clin Microbiol Infect. 20(5), 424-30, 2014.
21. Ecker, J. A., Massire, C., Hall, T. A., Ranken, R., Pennella, T. T., Agasino Ivy, C., Blyn, L. B., Hofstadler, S. A., Endy, T. P., Scott, P. T., Lindler, L., Hamilton, T., Gaddy, C., Snow, K., Pe, M., Fishbain, J., Craft, D., Deye, G., Riddell, S., Milstrey, E., Petruccelli, B., Brisse, S., Harpin, V., Schink, A., Ecker, D. J., Sampath, R., Eshoo, M. W., Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. J Clin Microbiol. 44(8), 2921–932, 2006.
22. Zander, E., Higgins, P. G., Fernández-González, A., Seifert, H., Detection of intrinsic bla_{oxa}-51-like by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. Int J Med Microbiol. 303(2), 88-89, 2013.
23. Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L., Monti-Bragadin, C., Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. J Clin Microbiol. 33(5), 1108-113, 1995.
24. Romanelli, R. M., Jesus, L. A., Clemente, W. T., Lima, S. S., Rezende, E. M., Coutinho, R. L., Moreira, R. L., Neves, F. A., Brás Nde, J., Outbreak of resistant *Acinetobacter baumannii* measures and proposal for prevention and control. Braz J of Infect Dis. 13(5), 341-47, 2009.
25. Aksaray, S., Dokuzoğuz, B., Güvener, E., Yücesoy, M., Yuluğ, N., Kocagöz, S., Unal, S., Cetin, S., Calangu, S., Günaydin, M., Leblebicioğlu, H., Esen, S., Bayar, B., Willke, A., Findik, D., Tuncer, I., Baysal, B., Günseren, F., Mamikoğlu, L., Surveillance of antimicrobial

- resistance among gram negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. J Antimicrob Chemother. 45(5), 695-99, 2000.
26. Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A. M., Heritage, J., Hawkey, P. M., Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. J Clin Microbiol. 36(7), 1938-941, 1998.
27. Somerville, D. A., Noble, W. C., A note on the gram-negative bacilli of human skin. Rev Eur Etud Clin Biol. 15(6), 669-71, 1970.
28. Giamarellou, H., Antoniadou, A., Kanellakopoulou, K., *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?. Int J Antimicrob Agents. 32(2), 106-19, 2008.
29. Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol. 35(11), 2819-825, 1997.
30. Markogiannakis, A., Fildisis, G., Tsiplakou, S., Ikonomidis, A., Koutsoukou, A., Pournaras, S., Manolis, E. N., Baltopoulos, G., Tsakris, A., Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 29(5), 410-17, 2008.
31. Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., Rüden, H., Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Clin Microbiol. 35(6), 1394-397, 1997.
32. Weber, D. J., Rutala, W. A., Miller, M. B., Huslage, K., Sickbert-Bennett, E., Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: *Norovirus*, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. Am J Infect Control. 38(5 Suppl 1), 25-33, 2010.
33. Tasbakan, M. S., Bacakoğlu, F., Başoğlu, O. K., Gürgün, A., Başarık, B., Çitim Tuncel, S., Sayiner, A., The comparison of patients with

- hospitalized health-care associated pneumonia to community-acquired pneumonia. *Tuberk Toraks*. 59(4), 348-54, 2011.
34. McConnell, M. J., Actis, L., Pachón, J., *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*. 37(2), 130-55, 2013.
 35. Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E., Actis, L. A., Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 149(Pt 12), 3473-484, 2003.
 36. Iwashkiw, J. A., Seper, A., Weber, B. S., Scott, N. E., Vinogradov, E., Stratilo, C., Reiz, B., Cordwell, S. J., Whittall, R., Schild, S., Feldman, M. F., Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog*. 8(6), e1002758, 2012.
 37. Kim, S. W., Choi, C. H., Moon, D. C., Jin, J. S., Lee, J. H., Shin, J. H., Kim, J. M., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., Lee, J. C., Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett*. 301(2), 224-31, 2009.
 38. Choi, C. H., Hyun, S. H., Lee, J. Y., Lee, J. S., Lee, Y. S., Kim, S. A., Chae, J. P., Yoo, S. M., Lee, J. C., *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol*. 10(2), 309-19, 2008.
 39. Joly-Guillou, M. L.. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect*. 11(11), 868-73, 2005.
 40. Luke, N. R., Sauberman, S. L., Russo, T. A., Beanan, J. M., Olson, R., Loehfelm, T. W., Cox, A. D., St Michael, F., Vinogradov, E. V., Campagnari, A. A., Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun*. 78(5), 2017-23, 2010.

41. Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H., Actis, L. A., The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology*. 150(Pt 11), 3657-667, 2004.
42. Goel, V. K., Kapil, A., Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiol.* 1, 16, 2001.
43. Cisneros, J. M., Rodríguez-Baño, J., Fernández-Cuenca, F., Ribera, A., Vila, J., Pascual, A., Martínez-Martínez, L., Bou, G., Pachón, J., Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: A nationwide study. *Clin Microbiol Infect.* 11(11), 874-79, 2005.
44. Lee, S. O., Kim, N. J., Choi, S. H., Hyong Kim, T., Chung, J. W., Woo, J. H., Ryu, J., Kim, Y. S., Risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A case-control study. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(1), 224-228, 2004.
45. Agodil, A., Zarrilli, R., Barchitta, M., Anzaldi, A., Di popolo, A., Mattaliano, A., Ghiraldi, E., Travali, S., Alert surveillance of intensive care unit-acquired *Acinetobacter* infections in a Sicilian hospital. *Clin Microbiol Infect.* 12(3), 241-47, 2006.
46. Jung, J. Y., Park, M. S., Kim, S. E., Park, B. H., Son, J. Y., Kim, E. Y., Lim, J. E., Lee, S. K., Lee, S. H., Lee, K. J., Kang, Y. A., Kim, S. K., Chang, J., Kim, Y. S., Risk factors for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. *BMC Infect Dis.* 10, 228, 2010.
47. Fillaux, J., Dubouix, A., Conil, J. M., Laguerre, J., Marty, N., Retrospective analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated during a 4-year period in a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27(7), 647-53, 2006.

48. Saltoğlu, N., *Acinetobacter baumannii* infeksiyonları ve tedavisi. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Adana, 2007.
49. Gaynes, R., Edwards, J. R., Overview of nosocomial infections caused by gram negative bacilli. Clin Infect Dis. 41(6), 848-54, 2005.
50. Valencia, R., Arroya, L. A., Conde, A., Aldana, J. M., Torres, M. J., Fernández-Cuenca, F., Garnacho-Montero, J., Cisneros, J. M., Ortiz, C., Pachón, J., Aznar, J., Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 30(3), 257-63, 2009.
51. Nicolau, D., Carbapenems: A potent class of antibiotics. Expert Opin Pharmacother 9(1), 23-37, 2008.
52. Zhanel, G. G., Wieber, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., Noreddin, A. M., Karlowsky, J. A., Comparative review of the carbapenems. Drugs. 67(7), 1027-52, 2007.
53. Pogue, J. M., Mann, T., Barber, K. E., Kaye, K. S., Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, surveillance and management. Expert Rev Anti Infect Ther. 11(4), 383-93, 2013.
54. Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H., An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 5(12), 939-51, 2007.
55. Levin, A. S., Multiresistant *Acinetobacter* infections: A role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. Clin Microbiol Infect. 8(3), 144-53, 2002.
56. Mendes, R. E., Farrell, D. J., Sader, H. S., Jones R. N., Comprehensive assessment of tigecycline activity tested against a worldwide collection of *Acinetobacter* spp. (2005- 2009). Diagn Microbiol Infect Dis. 68(3), 307-11, 2010.
57. Gordon, N. C., Wareham, D. W., A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. J Antimicrob Chemother. 63(4), 775-80, 2009.

- 58.Çalangu, S., Klinikte aminoglikozid kullanımı.Klimik Derg. 2(3), 185-87, 1989.
- 59.Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L., Tocalli, L., Gismondo, M. R., In vitro selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. J Antimicrob Chemother. 56(2), 353-59, 2005.
- 60.Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., Bai, N., Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. j antimicrob chemother, 67(7), 1607-15, 2012.
- 61.Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis. 40(9), 1333-41, 2005.
- 62.Yamazhan, T., Sülfonamidler ve aminoglikozidler. ANKEM Derg. 21(Ek 2), 52-56, 2007.
- 63.Tünay, H., Demirdal, T., Demirtürk, N., *Acinetobacter* enfeksiyonlarında dirençle ilgili değişen tanımlamalar ve dirençte güncel durum. Türk Mikrobiyal Cem Derg 42(4), 123-26, 2012.
- 64.Chan, P. C., Huang, L. M., Lin, H. C., Chang, L. Y., Chen, M. L., Lu, C. Y., Lee, P. I., Chen, J. M., Lee, C. Y., Pan, H. J., Wang, J. T., Chang, S. C., Chen, Y. C., Control of an outbreak of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 28(4), 423-29, 2007.
- 65.Al Jarousha, A. M., El Jadba, A. H., Al Afifi, A. S., El Qouga, I. A., Nosocomial multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the neonatal intensive care unit in Gaza City, Palestine. Int J Infect Dis. 13(5), 623-28, 2009.
- 66.Enoch, D. A., Summers, C., Brown, N. M., Moore, L., Gillham, M. I., Burnstein, R. M., Thaxter, R., Enoch, L. M., Matta, B., Sule, O., Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK. J Hosp Infect. 70(2), 109-18, 2008.

67. Wybo, I., Blommaert, L., De Beer, T., Soetens, O., De Regt, J., Lacor, P., Piérard, D., Lauwers, S., Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Belgian university hospital after transfer of patients from Greece. *J Hosp Infect.* 67(4), 374-80, 2007.
68. Liao, C. H., Sheng, W. H., Chen, Y. C., Hung, C. C., Wang, J. T., Chang, S. C., Predictive value of the serum bactericidal test for mortality in patients infected with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect.* 55(2), 149-57, 2007.
69. Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Matthaiou, D. K., Vartzili, S., Nikita, D., Michalopoulos, A., Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients. *Int J Antimicrob Agents.* 32(5), 450-54, 2008.
70. Apisarnthanarak, A., Pinitchai, U., Thongphubeth, K., Yuekyen, C., Warren, D. K., Fraser, V. J., A multifaceted intervention to reduce pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in 3 intensive care units in a Thai tertiary care center: a 3-year study. *Clin Infect Dis.* 47(6), 760-67, 2008.
71. Grosso, F., Qinteria, S., Peixe, L., Emergence of an extreme-drug-resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii* carrying bla_{oxa-23} in a patient with acute necrohaemorrhagic pancreatitis. *J Hosp Infect.* 75(1), 82-3, 2010.
72. Paterson, D. L., Doi, Y., A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 45(9), 1179-181, 2007.
73. Paterson, D. L., Lipman, J., Returning to the pre-antibiotic era in the critically ill: the XDR problem. *Crit Care Med.* 35(7), 1789-791, 2007.
74. Souli, M., Galani, I., Giamarellou, H., Emergence of extensively drug-resistant pan-drug-resistant gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* 13(47), pii:19045, 2008.
75. Liang, W., Liu, X., Huang, J., Zhu, D. M., Li, J., Zhang, J., Activities of colistin and minocycline-based combinations against extensive drug

- resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. BMC Infect Dis. 11, 109, 2011.
76. Kuo, S. C., Chang, S. C., Wang, H. Y., Lai, J. F., Chen, P. C., Shiau, Y. R., Huang, I. W., Lauderdale, T. L., 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. 12, 200, 2012.
 77. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0, 2012.
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v2.0_pdf.
 78. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth informational supplement (M100-S24). Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, 2014.
 79. Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez L., Conejo, M. C., Ayala, J. A., Perea, E. J., Pascual, A., Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 51(3), 565-74, 2003.
 80. Nordmann, P., Picazo, J. J., Mutters, R., Korten, V., Quintana, A., Laeuffer, J. M., Seak, J. C., Flamm, R. K., Morrissey, I., Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. J Antimicrob Chemother. 66(5), 1070-78, 2011.
 81. Queenan, A., Bush, K., Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 20(3), 440-58, 2007.
 82. Ambler, R. P., The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 289(1036), 321-31, 1980.
 83. Bush, K., Jacoby, G. A., Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54(3), 969-76, 2010.

84. Robledo, I. E., Aquino, E. E., Santé, M. I., Santana, J. L., Otero, D. M., León, C. F., Vázquez, G. J., Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3), 1354-57, 2010.
85. Bonnin, R. A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J. R., Poirel, L., Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(1), 349-54, 2011.
86. Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., Class a carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 60(3), 470-82, 2007.
87. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., Nordman, P., Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?. *Clin Microbiol Rev.* 18(2), 306-25, 2005.
88. Lee, K., Yong, D., Yum, J. H., Lim, Y. S., Bolmström, A., Qwörnström, A., Karlsson, A., Chong, Y., Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 43(2), 942-44, 2005.
89. Cornaglia, G., Giamarellou, H., Rossolini, G. M., Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis.* 11(5), 381-93, 2011.
90. Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., Pitt, T. L., The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *Fems Microbiol Lett.* 258(1), 72-7, 2006.
91. Higgins, P., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H., Global spread of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 65(2), 233-38, 2010.
92. Higgins, P. G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., Seifert, H., OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(12), 5035-38, 2009.

93. Higgins, P. G., Pérez-Llarena, F. J., Zander, E., Fernández, A., Bou, G., Seifert, H., OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(5), 2121-126, 2013.
94. Mendes, R. E., Bell, J. M., Turnidge, J. D., Castanheira, M., Jones, R. N., Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother.* 63(1), 55-9, 2009.
95. Gur, D., Korten, V., Unal, S., Deshpande, L. M., 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.* 57(Pt 12), 1529-532, 2008.
96. 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.* 44(6), 1556-561, 2000.
97. Afzal-Shah, M., Woodford, N., Livermore, D. M., Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(2), 583-38, 2001.
98. Sarı, A. N., Biçmen, M., Gülay, Z., The first report on the outbreak of OXA-24/40-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 66(5), 439-42, 2013.
99. Bogaerts, P., Naas, T., Wybo, I., Bauraing, C., Soetens, O., Piérard, D., Nordmann, P., Glupczynski, Y., Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J Clin Microbiol.* 44(11), 4189-192, 2006.
100. Poirel, L., Lebessi, E., Héritier, C., Patsoura, A., Foustoukou, M., Nordmann, P., Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-

- resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. Clin Microbiol Infect. 12(11), 1138-141, 2006.
101. Vahaboglu, H., Budak, F., Kasap, M., Gacar, G., Torol, S., Karadenizli, A., Kolayli, F., Eroglu, C., High prevalence of OXA-51-type class D β -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. J Antimicrob Chemother. 58(3), 537-42, 2006.
102. Evans, B. A., Hamouda, A., Towner, K. J., Amyes, S. B., OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 14(3), 268-75, 2008.
103. Da Silva, G. J., Quinteira, S., Bértolo, E., Sousa, J. C., Gallego, L., Duarte, A., Peixe, L., Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. J Antimicrob Chemother. 54(1), 255-58, 2004.
104. Patel, G., Bonomo, R. A., "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. Front Microbiol. 4, 48, 2013.
105. Seltsmann, G., Beer, W., Claus, H., Seifert, H., Comparative classification of *Acinetobacter baumannii* strains using seven different typing methods. Zentralbl Bakteriell. 282(4), 372-83, 1995.
106. Durmaz, R., Hastane infeksiyonu salgınında moleküler biyolojik yöntemler. Hastane İnfeksiyonları Derg. 9, 196-202, 2005.
107. Derbentli, Ş., Hastane İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisinde Moleküler Yöntemlerin Yeri. İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler, İstanbul, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın, s.6-13, 2002.
108. Gulati, S., Kapil, A., Goel, V., Das, B., Dwivedi, S. N., Mahapatra, A. K., Biotyping of *Acinetobacter* species isolated from clinical samples. Indian J Med Res. 110, 160-63, 1999.
109. Gonçalves, C. R., Vaz, T. M., Araujo, E., Boni, R., Leite, D., Irino, K., Biotyping, serotyping and ribotyping as epidemiological tools in the evaluation of *Acinetobacter baumannii* dissemination in hospital units,

- Sorocaba, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 42(5), 277-82, 2000.
110. Winstanley, T., Courvalin, P., Expert systems in clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 24(3), 515-56, 2011.
111. Çetinkaya, E., Ayhan, K., Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. Karaelmas Fen ve Mühendislik Derg. 2(1), 53-62, 2012.
112. Zaidi, N., Konstantinou, K., Zervos, M., The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. Arch Pathol Lab Med. 127(9), 1098-1105, 2003.
113. Krawczyk, B., Lewandowski, K., Kur, J., Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the recA sequences. Mol Cell Probes. 16(1), 1-11, 2002.
114. Goering, R. V., Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infect Genet Evol. 10(7), 866-75, 2010.
115. Schwartz, D. C., Cantor, C. R., Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 37(1), 67-75, 1984.
116. Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., Heersma, H., Dijkshoorn, L., Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 43(9), 4328-355, 2005.
117. Durmaz, R., Otlı B., Çalışkan, A., Gürsoy, N., *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin moleküler tiplendirmesinde kullanılabilecek kısa süreli “Pulsed-Field Gel” elektroforez (PFGE) protokolü. ANKEM Derg. 21(2), 113-17, 2007.
118. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33(9), 2233-239, 1995.

119. Bou, G., Cerveró, G., Domínguez, M. A., Quereda, C., Martínez-Beltrán, 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. 6(12), 635-43, 2000.
120. Abbott, I., Cerqueira, G. M., Bhuiyan, S., Peleg, A. Y., Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. Expert Rev Anti Infect Ther. 11(4), 395-409, 2013.
121. Higgins, P. G., Janssen, K., Fresen, M. M., Wisplinghoff, H., Seifert, H., Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* blood-stream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 50(11), 3493-500, 2012.
122. Bartual, S. G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M. A., Wisplinghoff, H., Rodríguez-Valera, F., Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 43(9), 4382-390, 2005.
123. Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S., The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS One. 5(4), e10034, 2005.
124. Dally, S., Lemuth, K., Kaase, M., Rupp, S., Knabbe, C., Weile, J., DNA microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 57(10), 4761-768, 2013.
125. Turabelidze, D., Kotetishvili, M., Kreger, A., Morris, J. G., Sulakvelidze, A., Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 38(11), 4242-245, 2000.
126. Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., Heersma, H., Dijkshoorn, L., Standardization and

- interlaboratory reproducibility assesment of pulsed field gel electrophoresis generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. sept. 43(9), 4328-335, 2005.
127. Custovic, A., Smajlovic, J., Tihic, N., Hadzic, S., Ahmetagic, S., Hadzagic, H., Epidemiological monitoring of nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*. Med Arch. 68(6), 402-406, 2014.
128. Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Charles, C., Landman, D., Quale, J., Reduction in the prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in New York City. Am J Infect Control. pii: S0196-6553(15)00114-5, 2015.
129. Opazo, A., Domínguez, M., Bello, H., Amyes, S. G., González-Rocha, G., OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. J Infect Dev Ctries. 6(4), 311-16, 2012.
130. Park, Y. S., Lee, H., Lee, K. S., Hwang, S. S., Cho, Y. K., Kim, H. Y., Uh, Y., Chin, B. S., Han, S. H., Jeong, S. H., Lee, K., Kim, J. M., Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases—a multicentre study. Int J Antimicrob Agents. 36(5), 430-35, 2010.
131. Guo-Xin, M., Dan-Yang, S., Xi-Zhou, G., Jun-Chang, C., Rui, W., Zhi-Gang, C., Liang-An, C., Laboratory to clinical investigation of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in a general hospital. Jundishapur J Microbiol. 7(1), e13120, 2014.
132. Mezzatesta, M. L., Caio, C., Gona, F., Cormaci, R., Salerno, I., Zingali, T., Denaro, C., Gennaro, M., Quattrone, C., Stefani, S., Carbapenem and multidrug resistance in gram-negative bacteria in a single centre in Italy: considerations on in vitro assay of active drugs. Int J Antimicrob Agents. 44(2), 112-16, 2014.
133. Souli, M., Galani, I., Giamarellou, H., Emergence of extensively drug resistant and pandrug-resistant gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill. 13(47), pii:19045, 2008.

134. Gur, D., Hascelik, G., Aydin, N., Telli, M., Gültekin, M., Ogülnç, D., Arikan, O. A., Uysal, S., Yaman, A., Kibar, F., Gülay, Z., Sumerkan, B., Esel, D., Kayacan, C. B., Aktas, Z., Soyletir, G., Altinkanat, G., Durupinar, B., Darka O., Akgün, Y., Yayla, B., Gedikoglu, S., Sinirtas, M., Berktaş, M., Yaman, G., Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother.* 21(4), 383-89, 2009.
135. Gur, D., Gulay, Z., Akan, O. A., Aktaş, Z., Kayacan, C. B., Cakici, O., Eraç, B., Gultekin, M., Oğunç, D., Soyletir, G., Unal, N., Uysal, S., Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyol Bul.* 42(4), 537-44, 2008.
136. Leblebicioglu, H., Cakir, N., Celen, M., Kurt, H., Baris, H., Laeuffer, J., Comparative activity of carbapenem testing (the COMPACT study) in Turkey. *BMC Infect Dis.* 12, 42, 2012.
137. Turton, J. F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M. E., Pitt, T. L., Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol.* 44(8), 2974-976, 2006.
138. Yang, H. Y., Lee, H. J., Suh, J. T., Lee, K. M., Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 beta-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J.* 50(6), 764-70, 2009.
139. Kempf, M., Rolain, J. M., Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents.* 39(2), 105-14, 2012.
140. D'Arezzo, S., Principe, L., Capone, A., Petrosillo, N., Petrucca, A., Visca, P., Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother.* 66(1), 54-61, 2011.
141. Ikonomidis, A., Pournaras, S., Maniatis, A. N., Legakis, N. J., Tsakris, A., Discordance of meropenem versus imipenem activity against

- Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 28(4), 376-77, 2006.
142. Ergin, A., Hascelik, G., Eser, O. K., Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. Scand J Infect Dis. 45(1), 26-31, 2013.
143. Cicek, A. C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A. O., Peleg, A. Y., Sandalli, C., OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. Clin Microbiol Infect. 20(5), 410-15, 2014.
144. Ciftci, I. H., Aşık, G., Karakeçe, E., Oksüz, L., Yağcı, S., Sesli Çetin, E., Ozdemir, M., Atasoy, A. R., Koçoğlu, E., Gül, M., Kurtoğlu, M. G., Köksal Çakırlar, F., Seyrek, A., Berktaş, M., Gültepe, B., Ayyildiz, A., Distribution of blaOXA genes in *Acinetobacter baumannii* strains: a multicenter study. Mikrobiol Bul. 47(4), 592-602, 2013.
145. Zeka, A. N., Poirel, L., Sipahi, O. R., Bonnin, R. A., Arda, B., Ozinel, M., Ulusoy, S., Bor, C., Nordmann, P., GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. J Antimicrob Chemother. 69(4), 1145-146, 2014.
146. Özbey N., Karbapenemlere Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Moleküler Tiplendirme ve Karbapenemazların Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, 2012.
147. Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., Heersma, H., Dijkshoorn, L., Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 43(9), 4328-335, 2005.
148. Adams-Haduch, J. M., Onuoha, E. O., Bogdanovich, T., Tian, G. B., Marschall, J., Urban, C. M., Spellberg, B. J., Rhee, D., Halstead, D. C., Pasculle, A. W., Molecular epidemiology of carbapenem-

- nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. J Clin Microbiol. 49(11), 3849-854, 2011.
149. Gökmen, T., Güran, M., Benk, G., Kızılyıldırım, S., Köksal, F., Yanık
Ünitesinde kısa-dönem/uzun-dönem *Acinetobacter baumannii* salgını.
Ankem Derg. 26(3), 120-25, 2012.
150. Yalçın B., Yoğun Bakım Ünitelerinde *Acinetobacter* Kolonizasyon
Basıncı ve Çoklu İlaç Direncine Sahip İzolatlarda Klonal İlişkinin
Gösterilmesi, Uzmanlık Tezi, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi,
İstanbul, 2012.
151. Gördebil S., Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii*
İzolatlarında Direnç Genlerinin PCR İle Araştırılması ve PFGE
Yöntemiyle Genotip Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova
Üniversitesi, Adana, 2011.
152. Sarı A. N., Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Kan
Kültürlerinde Üremiş *Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA-58 Tipi
Karbapenemaz Üretiminin ve Moleküler Epidemiyolojisinin
Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir,
2014.
153. Kılınç O., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Yoğun Bakım ve Cerrahi Servis Hastalarından İzole Edilen Multi-Drug
Resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Repetative
Sequence Based-PCR (Rep-PCR) ve Pulsed Field Gel
Electrophoresis (PFGE) Yöntemleri ile Kökenlerinin Araştırılması,
Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2011.