

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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER* SPP.
SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİ VE YENİ NESİL
ANTİBİYOTİKLERİN İN VİTRO
ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Yasemin BÖLÜKBAŞI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Betigül ÖNGEN

İstanbul-2024

İTHAF

“Vicdan insanı terk etmez, insan vicdanı terk eder.” Vicdanımıza sımsıkı sarılıp bu düzende inadına insan kalarak, kimsenin hakkına göz dikmeden var olanlara;

TEŞEKKÜR

Tıbbi Mikrobiyoloji Tıpta Uzmanlık eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, etik değerlere verdiği önem ile her zaman örnek aldığım, beni her konuda yüreklendirerek, yol gösteren ve her türlü desteğiyle yanımda olan öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, sadece akademik anlamda değil manevi olarak her zaman bilgisiyle yoluma ışık olduğu için Sayın Prof. Dr. Betigül ÖNGEN'e çok teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimleri ile eğitimimde emeği geçen İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN, Prof. Dr. Zayre ERTURAN, Prof. Dr. Meltem UZUN, Prof. Dr. Özden BÜYÜKBABA BORAL, Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ, Prof. Dr. Dilek ŞATANA, Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU, Doç. Dr. Lütfiye ÖKSÜZ, Dr. Öğr. Üyesi Deniz Bahar AKGÜN KARAPINAR'a,

Görgüsü ve bilgisiyle her zaman örnek olan çok kıymetli Doç. Dr. Gonca ERKÖSE GENÇ ve tüm zorlu zamanlarımda bıkmadan beni dinleyen ve yanımda olan çok değerli Muazzez UYAR'a,

Tez çalışmamın moleküler testlerinde kullandığım pozitif kontrol suşlarını benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Banu SANCAK'a ve Uzm. Dr. Ekin KIRBAŞ'a,

Çalışmam sırasında özellikle PCR alanındaki engin bilgisinden çokça destek gördüğüm ve manevi desteğini hep hissettiğim kıymetli arkadaşım MSc. Sevilay TURA'ya

Lise yıllarımdan beri birlikte her sıkıntıyı aşabildiğim, bana duydukları güvene minnettar kaldığım ve bana güç veren arkadaşlarım MSc. Demet AÇIKGÖZ ve Elif Nur Kırtıl'a

Fakülte yıllarımdan beri gerek hekimlik etiğiyle gerek dostluklarıyla her zaman yanımda olan ve hiçbir zaman desteklerini eksik etmeyen can arkadaşlarım Dr. Begüm ARDA ve Dr. Tuğçe MUTLU TOPAL'a

Birçok zorluğu beraber atlattığım, olaylara karşı yaklaşımını her zaman takdirle örnek aldığım sevgili eş kıdemim Dr. Betül Minire TOPAL'a ve asistanlık süresi boyunca desteklerini hiç eksik etmeyen tıpta uzmanlık öğrencisi, biyolog, laboratuvar teknisyeni, kayıt personeli ve idari personellere,

Desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen bana her zaman güvenerek yürüdüğüm yolda daha da cesaretlenmem için teşvik eden sevgili annem Nesrin BÖLÜKBAŞI,

babam Adnan BÖLÜKBAŞI, ablam Elif SÖKMEN BÖLÜKBAŞI, eniştem Koray SÖKMEN'e,

Ve son olarak önlerinde uçsuz bucaksız fırsatlar olduğuna inandığım ve ileride bu ülke için çokça güzel işler başaracaklarından emin olduğum sevgili yeğenlerim Kıvanç SÖKMEN ve Arden SÖKMEN'e **sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.**



İÇİNDEKİLER

İTHAF	İİ
TEŞEKKÜR	İİİ
İÇİNDEKİLER.....	V
TABLolar LİSTESİ.....	İX
RESİMLER LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
KISALTMALAR/SEMBOLLER	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT	XVİ
<u>1.</u> GİRİŞ-AMAÇ	1
<u>2.</u> GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Taksonomi.....	4
2.1.3. Genel özellikler.....	4
2.1.4. Epidemiyoloji.....	6
2.1.5. Virölans faktörleri.....	9
2.1.5.1. Porinler	9
2.1.5.2. Hücre duvarı faktörleri (Lipopolisakkaritler/kapsüler polisakkaritler)	10
2.1.5.3. Fosfolipazlar	10
2.1.5.4. Demir kazanım mekanizmaları	10
2.1.5.5. Biyofilm oluşturma.....	11
2.1.5.6. Dışa atım (efluks) pompa mekanizması.....	11
2.2. Antimikrobiyal Direnç Tanımları.....	12
2.2.1. Antibiyotik direnç mekanizmaları.....	12
2.2.2. <i>A. baumannii</i> 'nin antibiyotik direnç mekanizmaları.....	14
2.2.2.1. Beta-laktam-direnci.....	14
2.2.2.2. Aminoglikozit direnci.....	17
2.2.2.3. Tetrasiklin direnci	18
2.2.2.4. Florokinolon direnci	18
2.2.2.5. Polimiksin direnci	19

2.3.	<i>A. baumannii</i> Enfeksiyonları	20
2.3.1.	Pnömoni.....	21
2.3.2.	Bakteriyemi ve sepsis	21
2.3.3.	Travma, yara yeri, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları.....	22
2.3.4.	Menenjit.....	23
2.3.5.	İdrar yolu enfeksiyonları.....	23
2.3.6.	Diğer enfeksiyonlar	24
2.4.	Tedavi Seçenekleri.....	24
2.5.	Çalışmada Kullanılan Yeni Nesil Antibiyotikler ile İlgili Genel Bilgiler	25
2.5.1.	Sefiderokol	25
2.5.2.	Eravasiklin.....	27
2.5.3.	İmipenem-relebaktam.....	28
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1.	Gereçler	30
3.1.1.	Çalışma grubu seçimi	30
3.1.2.	Etik Kurul onayı	30
3.1.3.	Kullanılan malzemeler	30
3.1.3.1.	Besiyerleri	30
3.1.3.2.	Antibiyotikler	31
3.1.3.3.	Primerler (Sentromer-Türkiye)	31
3.1.3.4.	Standart referans suşlar	32
3.1.3.5.	Kimyasal malzemeler	32
3.1.3.6.	Ticari kitler.....	33
3.1.3.7.	Plastik ve sarf malzemeler	33
3.1.3.8.	Cam malzemeler	34
3.1.3.9.	Cihaz ve ekipmanlar	34
3.2.	Yöntemler.....	35
3.2.1.	Suşların izolasyonu ve saklanması	35
3.2.2.	Besiyerleri ve stok çözeltilerinin hazırlanması	36
3.2.2.1.	Triptik Soy Agar	36
3.2.2.2.	Mueller Hinton Agar	36
3.2.2.3.	Kasyon-ayarlı Mueller Hinton II Buyyon	36
3.2.2.4.	%20 gliserollü buyyon.....	36

3.2.2.5.	Mg ⁺² stok çözeltilerinin hazırlanması	36
3.2.2.6.	Ca ⁺² stok çözeltilerinin hazırlanması.....	37
3.2.2.7.	Zn ⁺² stok çözeltilerinin hazırlanması.....	37
3.2.3.	Dondurulan suşların üretilmesi	37
3.2.4.	Bakterilerin tanımlaması ve antibiyotik duyarlılık deneyleri	37
3.2.4.1.	Otomatize sistemle tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testi.....	37
3.2.4.2.	Disk difüzyon ve gradient test yöntemi	38
3.2.4.3.	Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle sefiderokol duyarlılığının saptanması.....	39
3.2.4.3.1.	MHB'nin şelasyon işlemi	39
3.2.4.3.2.	Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması	40
3.2.4.3.3.	Bakteri inokulumunun hazırlanması.....	40
3.2.4.3.4.	Deneyin yapılışı.....	40
3.2.4.3.5.	MİK değerlerinin belirlenmesi	42
3.2.4.3.6.	Sonuçların değerlendirilmesi	42
3.2.4.4.	SMD yöntemiyle kolistin duyarlılığının saptanması.....	42
3.2.4.4.1.	MİK değerlerinin belirlenmesi	42
3.2.5.	Moleküler analiz	43
3.2.5 1.	PCR deneyi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	43
	Etilendiamintetraetik (EDTA) asit	43
	Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon çözeltisi	44
	Etidyum bromür	44
	%1'lik agaroz jel	44
	Yükleme tamponu	44
	dNTP karışımı	44
	Primerler	44
3.2.5.2.	DNA ekstrasyonu.....	45
3.2.5.3.	PCR yöntemi	46
3.2.5.3.1.	PCR karışımlarının hazırlanması.....	46
3.2.5.3.2.	DNA amplifikasyonu	46
3.2.5.3.3.	Jel elektroforezi	47
3.2.5.3.4.	Validasyon çalışmaları	48
3.2.6.	Örnekleme büyüklüğünün hesaplanması	48
<u>4.</u>	<u>BULGULAR</u>	49

4.1.	Çalışmaya Dahil Hastaların Demografik Özellikleri	49
4.2.	İzolatların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	50
4.3.	Sefiderokol Duyarlılık Sonuçları	51
4.3.1.	Disk difüzyon ve gradient test sonuçları	51
4.3.2.	SMD yöntemiyle sefiderokol duyarlılık sonuçları	53
4.4.	Eravasiklin Duyarlılık Sonuçları.....	56
4.4.1.	Eravasiklin ve tigesiklin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırması	58
4.5.	İmipenem-Relebaktam Duyarlılık Sonuçları	60
4.6.	Kolistin Duyarlılık Sonuçları	61
4.7.	PCR Sonuçları.....	63
5.	TARTIŞMA	67
	KAYNAKLAR.....	84
	İNTİHAL RAPORUNUN İLK SAYFASI.....	103

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: <i>A. baumannii</i> 'nin bazı biyokimyasal ve fenotipik özellikleri (15).....	5
Tablo 3.1: Kullanılan primerler	32
Tablo 3.2: Çalışmada yer verilen antibiyotiklerin CLSI ve EUCAST rehberlerindeki klinik sınır değerleri	39
Tablo 3.3: PCR deneylerinde kullanılan primer çiftleri.....	45
Tablo 3.4: Multipleks-1 (mPCR-1) PCR programı	46
Tablo 3.5: Monopleks 2 (PCR-2) PCR programı.....	47
Tablo 3.6: Monopleks 3 (PCR-3) PCR programı.....	47
Tablo 4.1: Yatan hastaların servislere göre dağılımı	49
Tablo 4.2: <i>A. baumannii</i> suşlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı	50
Tablo 4.3: <i>A. baumannii</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	51
Tablo 4.4: CLSI ve EUCAST kriterlerine göre sefidrokol direnç oranları	53
Tablo 4.5: Sefidrokol disk zon çapı ile MİK sonuçlarının dağılımı*	55
Tablo 4.6: Sefidrokolle uyumsuz sonuç alınan suşların dağılımı.....	56
Tablo 4.7: Eravasiklin (ERV) zon çapı ve MİK değerlerinin dağılımı.....	57
Tablo 4.8: Eravasiklin (ERV MİK - zon çapı dağılımı ile tigesiklin (TGC) MİK sonuçlarının karşılaştırması	59
Tablo 4.9: İmipenem-relebaktam için saptanan zon çapları ve MİK değerlerinin dağılımı	61
Tablo 4.10: Kolistin MİK değerlerinin dağılımı	61
Tablo 4.11: Çalışmada yer alan antibiyotiklerin MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri ile MİK aralıkları	62
Tablo 4.12: <i>A. baumannii</i> suşlarında direnç genlerinin dağılımı	65
Tablo 4.13: Sefidrokol (FDC) MİK $\geq$ 2 mg/l değerine göre direnç gen bölgeleri	65
Tablo 4.14: Sefidrokolün saptanan OXA beta-laktamaz genotiplerine göre in-vitro aktivitesi.....	66
Tablo 4.15: Yatan hastalarda saptanan OXA beta-laktamaz genlerinin kliniklere göre dağılımı	66
Tablo 5.1: Sefidrokol ile yapılan SMD ve disk difüzyon çalışmalarına ait bazı veriler.....	75

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1: Katyon ayarlı MHA’da disk difüzyon testinin görüntüsü.....	52
Resim 4.2: Sefiderokolün disk difüzyon testi ile saptanan farklı şekillerdeki zon içi mikro üreme görüntüleri	53
Resim 4.3: Demiri azaltılmış katyon ayarlı MHB besiyerinde sefiderokol mikrodilüsyon deneyinin örnek mikropalak görüntüsü	54
Resim 4.4: Demiri azaltılmış katyon ayarlı MHB besiyerinde sefiderokol mikrodilüsyon deneyinin örnek mikropalak görüntüsü	54
Resim 4.5: Katyon ayarlı MHA’da eravasiklin disk difüzyon ve gradient testi sonuçlarının görüntüsü	58
Resim 4.6: Katyon ayarlı MHA’da imipenem-relebaktam gradient test ve disk difüzyon testi sonuçlarının görüntüsü.....	60
Resim 4.7: Kolistin SMD deneyinin mikropalak görüntüsü	62
Resim 4.8: OXA23 ve OXA51 pozitif hastalara ait PCR jel görüntüsü	63
Resim 4.9: OXA24 pozitif hastalara ait PCR jel görüntüsü	63
Resim 4.10: <i>tetA</i> araştırması için yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü	64
Resim 4.11: IMP araştırması için yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>A. baumannii</i> 'nin virülans faktörleri (36. kaynaktan değiştirilerek).....	9
Şekil 2-2: Antibiyotik direnç mekanizmaları (Biorender ile oluşturulmuştur.).....	13
Şekil 2-3: <i>A. baumannii</i> 'deki OXA tipi enzimlerin dağılımı ve genetik yapısının özeti (13)	16
Şekil 2-4: Florokinolon direnç mekanizması (56)	19
Şekil 2-5: Sentetik siderofor beta-laktamlar ve sefalosporinlerin yapıları (76).....	26
Şekil 2-6: Sefiderokolün molekül yapısı (77).....	27
Şekil 2-7: Eravasiklinin moleküler yapısı (84).....	28
Şekil 2-8: İmipenem, relebaktam ve silastatinin moleküler yapısı (89).....	29
Şekil 3-1: Sefiderokol çalışmasında kullanılan SMD plaklarının organizasyonu	41
Şekil 3-2: Kolistin çalışmasında kullanılan SMD plaklarının organizasyonu	43
Şekil 3-3: Kullanılan 100bp DNA marker'ın jeldeki görüntüsü	48

KISALTMALAR/SEMBOLLER

EUCAST: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlık Testleri Komitesi (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

CLSI: Amerika ‘Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü’ (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*)

MDR: Çoklu ilaca dirençli (*multi-drug resistance*)

XDR: Aşırı ilaca dirençli (*extremely-drug resistance*)

PDR: Pan ilaca dirençli / Pan-rezistan (*Pandrug-resistant*)

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*Food and Drug Administration*)

EMA: Avrupa İlaç Ajansı (*European Medicines Agency*)

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization*)

CRAB: Karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii*

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu

DD: Disk difüzyon

SMD: Sıvı mikrodilüsyon

GN: Gram negatif

AST: Antibiyotik duyarlık testi (*Antibiotic susceptibility testing*)

ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (*American Type Culture Collection*)

CFU: Koloni oluşturan birim (*Colony forming unit*)

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (*Polimeraz chain reaction*)

atm: Atmosferik basınç birimi

rpm: *revolutions per minute*

mm: milimetre

cm: santimetre

µg: mikrogram

µl: mikrolitre

µm: mikrometre

ml: mililitre

mg: miligram

l: litre

g: gram

sa: saat

sn: saniye
dk: dakika
n: sayı
Ca: Kalsiyum
Mg: Magnezyum
Zn: Çinko
TBE: Tris-borik asit-etilendiamin
 μ M: mikromolar
Tm: sıcaklık
F: *forward*
R: *reverse*
mcr-1: *The mobilized colistin resistance-1*
OXA: oksasilinaz
IMP: imipenemaz
FDC: sefiderokol
ERV: eravasiklin
COL: kolistin
TGC: tigesiklin
S: duyarlı
I: artmış dozda duyarlı
R: dirençli
°C: derece (celsius)

ÖZET

Bölükbaşı Y. (2024). Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* spp. suşlarında antibiyotik direnç profili ve yeni nesil antibiyotiklerin in vitro etkinliklerinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul.

Acinetobacter spp. ve özellikle *A. baumannii* yaşamı tehdit eden hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu bakterilerdir. Son yıllarda, çoklu ve yaygın ilaca dirençli suşlardaki artış, mortalite ve morbidite açısından endişe kaynağı olmuş ve yeterli tedavi sağlayan yeni antibiyotiklerin acilen tedavi protokollerine dâhil edilmesi gündeme gelmiştir.

Hastanemizin farklı kliniklerinden gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter* suşları çalışma kapsamına alınmış ve suşların tanımlama ve antibiyotiklere duyarlılığı VITEK-2 sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Yeni antibiyotiklerden eravasiklin, sefiderokol ve imipenem relebaktam duyarlılıkları hem disk difüzyon (DD) hem de gradiyent strip yöntemleriyle, kolistin duyarlılığı standart sıvı mikrodilüsyon (SMD), sefiderokol duyarlılığı ise demiri azaltılmış ortamda SMD yöntemiyle test edilmiştir. Duyarlılık testleri EUCAST önerileri doğrultusunda gerçekleştirilip, yorumlanmıştır. Sefiderokol için ayrıca CLSI kriterleri ile karşılaştırılmıştır. Fenotipik olarak karbapenem direnci belirlenen tüm suşlarda *A. baumannii*'ye özgü kromozomal *bla_{OXA51}* ayrıca karbapenem direncinden sorumlu *bla_{OXA23}*, *bla_{OXA58}* ve optimize edilmiş PCR ile *bla_{OXA24}* varlığı araştırılmıştır. Ayrıca dışa atım pompasını kodlayan ve tetrasiklinlere dirençte rol alan *tetA* ve karbapenem direncinde rol oynayan *bla_{IMP}* araştırılmıştır.

A. baumannii olarak tanımlanan 80 izolatın tamamı karbapeneme dirençli bulunmuştur. SMD yöntemiyle kolistin direnci %7,5 (n:6) olarak saptanmıştır. Sefiderokol direnci DD ve SMD yöntemiyle sırasıyla %18,75 (n:15) ve %22,5 (n:18) belirlenmiştir. Sefiderokol için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,25 mg/l, 128 mg/l ve MİK aralığı <0,03 – 256 mg/l olarak saptanmıştır. Eravasiklin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,25 mg/l, 0,75 mg/l ve MİK aralığı 0,016-0,75 mg/l olarak saptanmıştır. İmipenem-relebaktam ise tüm suşlarda dirençli bulunmuştur. *bla_{OXA51}* tüm suşlarda pozitif bulunmuştur. İzolatların %82,5 (n:66)'inde *bla_{OXA23}*, %17,5 (n:14)'inde *bla_{OXA24}* saptanmıştır. Hiçbir suшта *bla_{OXA58}*, *tetA* ve *bla_{IMP}* genlerine rastlanmamıştır.

Antibiyotik direnci sorununu aşmak için yeni antibiyotik arayışları devam

etmektedir. Karbapenem dirençli suşlarda, imipenem-relebaktam gibi beta-laktam inhibitörlerinin eklenmesinin ana karbapenem direnci üzerinde bir etkinliğinin olmadığı gözlenmiştir. Eravasiklin, *A. baumannii* suşlarına karşı in-vitro olarak kayda değer sonuçlar göstermiştir. Sefiderekol ise en umut verici ilaç olmasına rağmen henüz Türkiye'de kullanılmamaktadır ve sadece bu çalışmada MİK ile tespit edilen %22,5 direnç oranı, ülkemiz genelinde heterojen bir direnç olabileceğini ve klinik korelasyon için tedavi edilen hasta grubunda yeterli sayıda gözleme ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte sefiderokol ve eravasiklin için saptanan düşük MİK değerleri olumlu in-vitro sonuçlar olarak değerlendirilmiş ve dirençli enfeksiyonların tedavisi için umut vadettiği görülmüştür.

Anahtar kelime: *Acinetobacter baumannii*, çoklu ilaç direnci, sefiderokol, eravasiklin, imipenem-relebaktam.

Bu proje, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 39385

ABSTRACT

Bölükbaşı Y. (2024). Antibiotic resistance profile in *Acinetobacter* spp. strains isolated from clinical samples and investigation of in vitro activities of new generation antibiotics. Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology Medical Speciality Thesis. Istanbul.

Acinetobacter spp. and especially *A. baumannii* are bacteria responsible for life-threatening nosocomial infections. In recent years, the increase in multidrug-resistant and extensively drug-resistant strains has been a source of concern in terms of mortality and morbidity, and the urgent inclusion of new antibiotics that provide adequate treatment in treatment protocols has come to the fore.

Multidrug-resistant *Acinetobacter* strains isolated from various clinical samples sent from different clinics of our hospital were included in the study and identification and antibiotic susceptibility of the strains were performed by VITEK-2 system. Among the new antibiotics, eravacycline, cefiderocol and imipenem relebactam susceptibilities were tested by both disc diffusion (DD) and gradient strip methods, colistin susceptibility was tested by broth microdilution (BMD) and cefiderocol susceptibility was tested by BMD method in iron reduced medium. The susceptibility tests were performed and interpreted according to EUCAST recommendations and also compared with CLSI criteria for cefiderocol. The presence of *A. baumannii*-specific chromosomal *bla*_{OXA51} and *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA58} and *bla*_{OXA24} responsible for carbapenem resistance by optimised PCR were investigated in all strains phenotypically determined to be carbapenem resistant. In addition, *tetA*, which encodes the efflux pump and is involved in resistance to tetracyclines, and *bla*_{IMP}, which is involved in carbapenem resistance, were investigated. All 80 isolates identified as *A. baumannii* were carbapenem resistant. Colistin resistance was found 7.5% (n:6) by BMD method. Cefiderocol resistance was determined as 18.75% (n:15) and 22.5% (n:18) by DD and BMD methods, respectively. MIC₅₀ and MIC₉₀ values for cefiderocol were 0.25 mg/l, 128 mg/l and MIC range <0.03 - 256 mg/l, respectively. MIC₅₀ and MIC₉₀ values for eravacycline were 0.25 mg/l, 0.75 mg/l and MIC range was 0.016 - 0.75 mg/l, respectively. Imipenem-relebactam was resistant in all strains. *bla*_{OXA51} was positive in all isolates. *bla*_{OXA23} was detected in 82.5% (n:66) and *bla*_{OXA24} in 17.5% (n:14) of the isolates. No *bla*_{OXA58}, *tetA* and *bla*_{IMP} genes were detected in any of the isolates.

The search for new antibiotics to overcome the problem of antibiotic resistance continues. In carbapenem-resistant strains, it was observed that the addition of beta-lactam inhibitors such as imipenem-relebactam had no effect on main carbapenem resistance. Eravacycline showed remarkable results against *A. baumannii* strains in vitro. Although cefiderocol is the most promising drug, it is not yet used in Turkey, and the 22.5% resistance rate detected by MIC only in this study suggests that there may be heterogeneous resistance throughout our country and that sufficient number of observations in the treated patient group are needed for clinical correlation. However, the low MIC values determined for cefiderocol and eravacycline were considered as favourable in-vitro results and promising for the treatment of resistant infections.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, multidrug resistance, cefiderocol, eravacycline, imipenem-relebactam.

This project was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit. Project No: 39385

1. GİRİŞ-AMAÇ

Dünya genelinde antimikrobiyal direnç (AMR), küresel sağlığa yönelik en büyük 10 tehditten biridir (1). Duyarlı *Acinetobacter* izolatları genellikle beta-laktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler, beta-laktam / beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları veya karbapenemler ile tedavi edilmektedir. Bu ajanlar çoğunlukla bir aminoglikozit ile kombine edilmektedir. Özellikle dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenemler ilk seçenek olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda pek çok *A. baumannii* klinik izolatu karbapenemler de dahil olmak üzere tüm konvansiyonel antibiyotiklere direnç kazanmıştır.

Acinetobacter türleri arasında *A. baumannii* klinik öneme sahip en önemli tür olarak ortaya çıkmaktadır. Hastane kaynaklı izolatlar, genellikle antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençlidir. Bu nedenle direnç sorunu klinisyenleri çeşitli çözüm arayışlarına zorlamaktadır. Birçok çalışmada klinik izolatlarda gittikçe daha yüksek oranda karbapeneme dirençli *Acinetobacter* spp. bildirilmesi ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 'öncelikli patojenler' listesinde *A. baumannii*'nin ilk sırada yer alması, yeni antibiyotiklerin ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine acilen ihtiyaç olduğunu göstermektedir (2-6).

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar içerisinde son yıllarda özellikle Sars-Cov-2 enfeksiyonu ile birlikte uzun süreli yoğun bakım yatışları ayrıca MDR-*Acinetobacter* enfeksiyonlarında güncel olarak uygulanmakta olan tedavi rejimlerine yanıtızlığa sık rastlanmasıyla beraber yeni antibiyotiklere olan ilgi artmış ve çalışmalar hız kazanmaya başlamıştır.

Son yıllarda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA)'ndan onay alan imipenem-relebaktam, eravasiklin ve sefidierokol gibi yeni nesil ilaçların in-vitro koşullarda yapılacak duyarlılık çalışmaları ve bu çalışmaların in-vivo çalışmalar ile desteklenmesi sonucunda ümit verici birer tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir. Ancak, *Acinetobacter* spp'de eravasiklin duyarlılığı için DD yönteminin standardizasyonunun olmaması ve MİK saptanması gerekliliği, sefidierokol için standart SMD yönteminin uygulanamaması, demiri azaltılmış özel besiyerinde çalışma zorunluluğu gibi nedenlerle literatürde bu antibiyotiklerle yapılan çalışmaların sayısı sınırlıdır.

Bu nedenle bu çalışmada henüz Türkiye’de tedavi protokollerine alınmamış ve dünya genelinde de sınırlı kullanımı olan sefiderokol, eravasiklin ve imipenem-relebaktam antibiyotiklerinin çoklu ilaca dirençli bakterilerdeki in-vitro etkinlikleri araştırılarak in-vivo çalışmalar için yol gösterici veriler oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma *A. baumannii* suşlarında sefiderokol için altın standart olan demiri azaltılmış katyon ayarlı Müeller Hinton buyyon (KA-MHB) kullanılarak SMD yöntemiyle minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)’nun belirlenmesi için uygulanan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Bu nedenle bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların ülkemiz verilerine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter baumannii*

2.1.1. Tarihçe

Karmaşık bir taksonomik geçmişe sahip olan mikroorganizma ilk kez Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck'in 1911'de kalsiyum asetatla zenginleştirilmiş bir besiyeri kullanarak topraktan izole etmesiyle *Micrococcus calco-aceticus* olarak isimlendirilmiştir. Sonraki yıllarda benzer mikroorganizmalar *Achromobacter anitratus* (Brisou, 1953), *Achromobacter mucosus* (Mannheim and Stenzel, 1962), *Alcaligenes haemolysans* (Henriksen, 1973), *Bacterium anitratum* (Schaub and Hauber, 1948), *Diplococcus mucosus* (von Lingelsheim, 1908), *Herellea vaginicola* (DeBord, 1942), *Mima polymorpha* (DeBord, 1939), *Moraxella lwoffii* (Audureau, 1940), *Neisseria winogradskyi* (Lemoigne ve ark., 1952) gibi çok sayıda farklı cins ve türe ayrılmıştır. Brisou ve Prevot tarafından 1954 yılında bu bakteriler için *Achromobacter* cinsi hareketli mikroorganizmalardan ayırt etmek amacıyla Yunancada hareketsiz anlamına gelen ve "akinetos" kelimesinden köken alan *Acinetobacter* cins adı önerilmiştir. 1968 yılında Baumann ve ark.'nın *Micrococcus calco-aceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola* ve *Bacterium anitratum* gibi mikroorganizmalar üzerine geniş çaplı bir araştırma yayımlayarak fenotipik özelliklerine göre bu türlerin tek bir cinse ait olduğunu bildirmelerinin ardından bu isim yaygın kabul görmüştür. 'Moraxalle ve ilişkili bakterilerin taksonomisi alt grubu' tarafından Baumann ve ark.'nın bulguları dikkate alınarak 1971'de *Acinetobacter* cins adı kabul görmüştür. Daha sonra Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji kitabının 1974 baskısına dahil edilmiş ve tek türü *Acinetobacter calcoaceticus* olarak listelenmiştir (Bergey ve ark., 1975) (7).

Acinetobacter cinsini ve türünü belirlemek için fenotipik testlerin uygulanmasında tutarsızlıklar gözlemleyen Bouvet ve Grimont, 1986 yılında yayımladıkları bir çalışmada DNA-DNA hibridizasyon analizi ile 12 genotür belirlemişlerdir. Ayrıca *A. calcoaceticus* ve *Acinetobacter lwoffii*'nin tanımlarını düzeltmişler, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter johnsonii* ve *Acinetobacter junii* olmak üzere üç yeni tür önermişlerdir (8). Son yayımlanan çalışmalarda Pasteur MLST (Multilocus sequence typing) şeması ile *Acinetobacter* cinsi için 72 tür tanımlanabilmiştir (9).

Bu konuda çalışmalar devam etmekte olup tür sayısının her geçen gün daha da artmakta olduğu bilinmektedir (10).

2.1.2. Taksonomi

Acinetobacter baumannii prokaryot canlılar içerisinde, bakteriler aleminde, *Proteobacteria* şubesinde, *Gammaproteobacteria* sınıfında, *Moraxellaceae* ailesinde, *Acinetobacter* cinsi içerisinde sınıflandırılır (11). Ancak türlerin benzer fenotipik özelliklere sahip olması nedeniyle tür ayrımının yapılması zordur. *A. pittii*, *A. seifertii*, *A. lactucae* ve *A. nosocomialis* fenotipik ve genotipik olarak *A. baumannii* ile benzerlik gösterdiklerinden dolayı *A. baumannii* kompleks olarak tanımlanmışlardır (9).

Acinetobacter türlerinin sadece bir kısmı klinik olarak anlamlı enfeksiyonlara yol açmaktadır. Hastane enfeksiyonlarında en yaygın ve önemli tür *A. baumannii*'dir. Bu patojen, global olarak nozokomiyal enfeksiyonlar ve salgınlarla ilişkilendirilmiştir (10-12).

2.1.3. Genel zellikler

Acinetobacter türleri zorunlu aerop, nonfermentatif, hareketsiz, kapsülsüz, katalaz pozitif, oksidaz negatif, Gram negatif boyanan ve pleomorfik özellik gösteren kokobasil şeklinde bakterilerdir. Kısa, tombul, Gram negatif kokobasil morfolojileri ve boyayı (kristal viyole) zor bırakmaları nedeniyle *Neisseria* veya *Moraxella*'ya benzetilerek Gram negatif kok ya da Gram pozitif kok olarak yanlış tanımlanabilirler (13). *Acinetobacter* hareketsiz olmasına rağmen, *A. baumannii* suşlarının birçoğu yüzeyle ilişkili ve seğirmeli hareketlilik yeteneğine sahiptir (14). *A. baumannii*'nin bazı biyokimyasal zellikleri Tablo 2.1 'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 *A. baumannii*'nin bazı biyokimyasal ve fenotipik özellikleri (15).

<i>A. baumannii</i>	
Oksidaz	-
Piyosiyenin	-
Glukoz	+
Ksiloz	+
Mannitol	-
Laktoz	+
Maltoz	-
42°C'de üreme	+
Eskülin	-
Üreaz	-/+
DNaz	-/+
ONPG	-
İndol	-
Hareket	-
H ₂ S	-
Nitrat redüksiyonu	-
Pigment	-
McConkey agarda üreme	+

A. baumannii'nin genomu tek dairesel bir kromozom ve plazmitlerden oluşmaktadır (16).

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında; API 20NE, Vitek 2, Phoenix, MicroScan WalkAway ve matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) sistemleri gibi yarı ve tam otomatize tanımlama sistemleri kullanılmaktadır (17). Fenotipik benzerlik nedeniyle *Acinetobacter* türleri, bu sistemlerle tam olarak tanımlanamamaktadır. Bu bağlamda, MALDI-TOF MS, bakteri cinsini tanımlamak için kullanılan uygun bir tekniktir ve farklı türler arasında ayırım yapılmasına yardımcı olabilmektedir. *A. baumannii*'nin tanımlanmasında MALDI-TOF'un duyarlılık ve özgüllük oranlarının sırasıyla %100 ve %91,7-%99 olduğu bildirilmektedir (18). Bu yöntem, *A. baumannii* kompleks de dahil olmak üzere *Acinetobacter* türlerini basit ve doğru bir şekilde bir saatten daha kısa sürede tanımlamasıyla öne çıkmakla birlikte *Acinetobacter dijkschoorniae* ve *Acinetobacter seifertii* gibi bazı türlerin tanımlamasında zorluklar yaşandığı bilinmektedir. Ayrıca

MALDITOF için pahalı ekipman ve geniş bir veri tabanı gerekmektedir (19, 20). *Acinetobacter*'i tür düzeyinde tanımlamak için kullanılan moleküler yöntemler arasında DNA-DNA hibridizasyonu (DDH) ve *rpoB*, 16S rRNA ve 16S-23S intergenik spacer (ITS) çalışmasına dayanan DNA dizisi tabanlı analizler yer almaktadır. Yapılan çalışmalar *Acinetobacter*'in tür düzeyinde tanımlanmasında *bla*_{OXA51} benzeri genlerin saptanmasına yönelik PCR ve *rpoB* sekanslamasının birlikte yapılmasının uygulanabilecek en iyi yöntem olduğunu göstermiştir. Ancak, moleküler yöntemlerin yüksek maliyeti, uygulanmasının zorluğu ve çeşitli ekipman ile deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle *Acinetobacter* türlerinin tanımlanmasında rutin laboratuvarlarda kullanımları sınırlıdır.

2.1.4. Epidemiyoloji

Acinetobacter'ler, çoğunlukla çevresel etkenlerle ilişkilendirilen neredeyse her yerde bulunabilen özellikle serbest saprofit yaşayan oldukça heterojen bir gruptur (21). Dolayısıyla enfeksiyonlarının epidemiyolojisi de geniş kapsamlıdır; savaşlar, doğal afetler, tropikal ortamlar ve hastane kaynaklı salgınlarla ilişkilendirilmiştir. Su ve toprak gibi çevresel örneklerde bulunmakla beraber olası rezervuarlarından kuşlar, balıklar gibi evcil hayvanlar ve eklem bacaklılarda da yaşayabilmektedirler (22). *Acinetobacter*'ler insanlarda ise normal deri florasında, mukozal membranlarda, solunum sistemi ve gastrointestinal sistemde kolonize olarak bulunabilmektedir (23).

Seifert ve ark. (24) 1997'de yaptıkları çalışmada, *Acinetobacter* spp.'nin sağlıklı bireylerin vücudunda, alın, burun, kulak, boğaz, trakea, konjunktiva, el, vajina ve perine gibi çeşitli bölgelerde, ayrıca koltuk altı, kasık ve ayak parmakları gibi nemli bölgelerde bile yaşayabildiğini göstermişlerdir. Bu sebeple deri florası, çeşitli *Acinetobacter* türlerini bulundurması nedeniyle potansiyel enfeksiyon kaynağı olarak doğal bir rezervuar olarak gösterilmektedir. Yine aynı epidemiyolojik araştırma verilerine göre, *Acinetobacter* spp.'nin yüksek taşıyıcılık oranları rapor edilmiştir; yatan hastalarda %75 ve hastaneye yatırılmayan kontrol hastalarında %43 oranında deride ve mukozal membranlarda kolonizasyon saptanmıştır. Bu çalışmada en sık izole edilen türler *A. lwoffii* (%47) ve *A. johnsonii* (%21) olarak belirlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, klinik açıdan önemli olan *A. baumannii* (%0,5) ve *A. nosocomialis* (%1) türlerinin deri florasında yaygın olarak bulunmadığı tespit edilmiştir (24). Avrupa'da yapılan bir başka çalışmada ise yine benzer sonuçlar elde edilmiş, sağlıklı bireylerde %44 oranında *A. lwoffii* saptanmıştır (25). Diğer

taftan Hongkong'da yapılan bir çalışmada Avrupa'daki dağılımdan farklı olarak deri ve mukozal yüzeylerde saptanan türlerin sırasıyla *A. pittii* (%32), *A. nosocomialis* (%14) ve *A. baumannii* (%4) olduğu bulunmuştur (26). 2005 yılında Hollanda'da yapılan bir diğer çalışmada ise sağlıklı bireylerden alınan dışkı örneklerinde taşıyıcılık araştırması yapılmış ve %25 taşıyıcılık oranı bildirilmiştir. Çalışmada en sık saptanan tür *A. johnsonii* (%17,5) olurken, bunu *A. guillouiae* (%4) izlemiş, sadece bir örnekte (%0,8) *A. baumannii* izolatı bulunmuştur. Buna göre, insan bağırsağının klinik açıdan önemi olan *A. baumannii* türü için dikkate değer bir rezervuar olmadığı görüşü ileri sürülmüştür (27). Diğer taraftan İspanya'da bir yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan alınan dışkı örneklerinde çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* kolonizasyon oranı %41 iken, İngiltere ve Hollanda'da hastaneye yatırılmayan kişilerden alınan dışkı örneklerinde %1 veya daha düşük oranda bulunmuştur (27, 28). Dolayısıyla bu sonuçlara göre İspanya'daki çalışmada, çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* ile dışkı kolonizasyonunun esas olarak yoğun bakım ünitesinde yatışlar sırasında edinildiği öne sürülmüştür (25-28). Sağlık çalışanlarının ellerinde de kolonize olabilen *Acinetobacter* suşlarının virülansındaki en önemli özelliklerden biri uzun süreler boyunca kuru yüzeylerde yaşayabilme potansiyelidir. Dolayısıyla, *Acinetobacter* türleri hastane ortamında endotrakeal tüp, mekanik ventilasyon cihazları, intravenöz ve üriner kateterlerde kolaylıkla kolonize olup yapılan invazif işlemler sonucunda enfeksiyon ya da kolonizasyona neden olabilmektedir. Temas izolasyonu, tıbbi cihazların dekontaminasyonu, birimlerde düzenli dezenfeksiyon uygulamaları ve el yıkama, enfeksiyon ve salgınlardan korunmada etkili önlemler olarak belirlenmiştir (29).

Hijyen kurallarına uyulmaması halinde çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonları hastanelerde özellikle yoğun bakım servisleri başta olmak üzere immün düşkün hastaların yoğun olduğu birimlerde salgınlara neden olabilmektedir. Bu durum özellikle 2019 yılında tüm dünyayı sarsan COVID-19 pandemisi sırasında yoğun bakımdaki yatış ve ventilasyon sürelerinin artmış olmasına bağlı olarak başta karbapeneme dirençli Gram negatif bakterilerin rol oynadığı sekonder bakteriyel enfeksiyonlarda artışa yol açarak klinisyenler için ikinci bir mücadele alanı oluşturmuştur. ECDC (Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi)'nin 2022 yılında yayımladığı rapora göre, 2020-2021 yılları arasında bildirilen genel patojen sayısında artış olmakla birlikte en çok artış %43 oranı ile *Acinetobacter* spp.'de gözlenmiştir. Yine aynı raporda, 2021'de üç antimikrobiyal grubun (karbapenemler, florokinolonlar ve

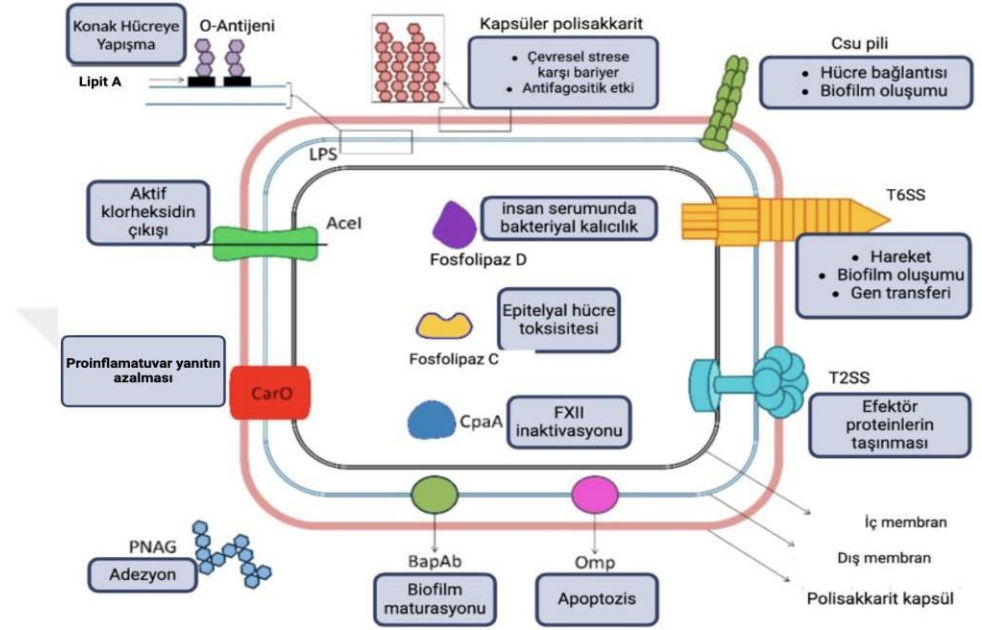
aminoglikozitler) her birine direnç rapor edilen vaka sayısı 2018-2019 ortalamasının iki katından fazla olduğu bildirilmiştir (30).

Doğal afetler ve savaşlar toplumları kitleler halinde etkilemekte ve enfeksiyon hastalıkları açısından ciddi salgınlar ortaya çıkabilmektedir. Yapılan literatür çalışmalarında doğal afetleri doğrudan bulaşıcı hastalıklarla ilişkilendiren bilimsel kanıtlar bulunamamış olsa da doğal afetlerin ardından bulaşıcı hastalıkların yayılması ve salgınlardaki artışlar, afetin uzun süreli artçı etkileriyle ilişkilidir. Bu artçı etkiler; yerinden edilmiş nüfuslar (ülke içinde yerinden edilmiş kişiler ve mülteciler), çevresel değişiklikler, vektörlerin üreyebileceği alanların artması, vektörlerin (kemirgenler, sivrisinekler) çoğalması ve yüksek oranda maruz kalma, plansız ve aşırı kalabalık barınaklar, kötü su ve sanitasyon koşulları, kötü beslenme, kötü kişisel hijyen ve bu koşullarda edinilen sekonder enfeksiyonlardır. *Acinetobacter* enfeksiyonlarının da bu zorlu durumlar içerisinde prevalansı yüksek bulunmuştur (31).

2015 yılında Çin’de meydana gelen Lushan depreminden sonra bölgenin en büyük hastanesinde yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinde en sık rastlanan patojenin *A. baumannii* olduğu bildirilmiştir (32). 2008 yılında Çin’in Wenchuan kentinde meydana gelen depremde sonra ise enfeksiyonlara neden olan baskın patojenin *A. baumannii* olduğu bildirilmiş; tek merkezli çalışmada *Acinetobacter* izolatlarının %65’inden fazlasının imipenem hariç çeşitli antimikrobiyal ilaçlara dirençli olduğu ve izolatların %24,6’sının pan-rezistan olduğu saptanmıştır (33). Güney Asya kıyısında 2004’de meydana gelen tsunami felaketinde yumuşak doku yaralanmaları ve fraktür gelişen kritik 17 hastanın %20’sinin yara örneklerinden, kan ve solunum sekresyonlarından MDR *Acinetobacter* suşları izole edilmiştir (34). Türkiye’de ise daha öncesinde nadir olarak izole edilmekte iken 1999 yılından meydana gelen deprem sonrası yoğun bakım ünitesi (YBÜ)’nde en sık izole elde edilen patojen olarak tespit edilmiştir (35).

2.1.5. Virülans faktörleri

A. baumannii çeşitli virülans faktörlerini kullanarak konak hücrede enfeksiyona yol açar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *A. baumannii*'nin virülans faktörleri (36. kaynaktan değiştirilerek).

AceI: *Acinetobacter* klorheksidin eflüks protein; CpaA: Glikan spesifik adamalizin benzeri proteaz; Csu: Şaperon/ usher pilus sistemi; LPS: Lipopolisakkarit; Omp: Dış membran proteini; PNAG: Poli-beta-1,6-N-asetilglukozamin; T2SS: Tip II sekresyon sistemi; T6SS: Tip VI sekresyon sistemi

2.1.5.1. Porinler

Porinler, hücresel geçirgenliği düzenleyen dış membran protein (OMP)'leridir. *A. baumannii*'nin Omp'leri virülans ve çevre ile etkileşimde kilit rol oynamaktadır. OmpA, *A. baumannii*'nin konak hücrenin fibronektin molekülünü kullanarak epitel hücrelerine yapışmasından sorumludur ve apoptozisi indükleyerek hücre ölüm sürecinde rol alır. Ayrıca plastik yüzeylerde biyofilm oluşumunda sınırlı bir rol oynar (18). OmpA, insan serumundaki H faktörüne bağlanarak bakterinin kompleman aracılı öldürülmesini engeller. *A. baumannii*'nin diğer bir dış membran proteini Omp33-36 proteinidir. Bu protein bir su kanalı gibi görev yapar ve ekspresyonu karbapenem antibiyotiklerine dirençle ilişkilidir. Virülans açısından önemi olan bu proteinin eksikliğinde ayrıca *A. baumannii*'nin yapışma kapasitesinde, invazyonunda ve sitotoksitesinde azalma olduğu saptanmıştır.

Diğer bir dış membran proteini CarO'dur ve bu protein de karbapenem direncinde rol oynar. CarO ekspresyonundaki artışın trakea ve akciğerlerdeki proinflatuar yanıtın zayıflaması yoluyla nötrofillerin infiltrasyonunu geciktirdiği, bakteriyel çoğalmaya zemin hazırlayıp şiddetli pnömoniye neden olduğu gösterilmiştir (36).

2.1.5.2. Hücre duvarı faktörleri (Lipopolisakkaritler / kapsüler polisakkaritler)

Hücre duvar polisakkaritleri (Lipopolisakkaritler-LPS) Gram negatif patojenlerin enfeksiyon sürecinde birden fazla role sahip olan en önemli virülans faktörlerinden birisidir. LPS'nin antijenik özellikteki O-polisakkaridi, pili ile birlikte kolonizasyonun ilk adımı olarak konak hücrelere yapışmayı kolaylaştırabilmektedir (36).

LPS'nin dışında, *A. baumannii*'nin virülansında önemli faktörlerden biri bakteri yüzeyinin etrafında yer alan kapsülün varlığıdır. Kapsülün tekrarlayan ve birbirine bağlı şeker üniteleri; kuruluk ve dezenfeksiyon gibi çevresel koşullara ve fagositoz gibi bağışıklık sistemi reaksiyonlarına karşı bir bariyer oluşturur, ayrıca bazı antimikrobiyallere karşı da koruma sağlar (36).

2.1.5.3. Fosfolipazlar

Fosfolipazlar *A. baumannii*'nin bilinen ek virülans faktörleridir. *A. baumannii*'nin genomu fosfatidilkolin adı verilen ökaryotik bir membran bileşenine karşı spesifik hidrolitik özelliklere sahip iki fosfolipaz C (PLC) ve üç fosfolipaz D (PLD) enzimini kodlar (37). Çok önemli hidrolitik enzimlerdir ve insan hücre membranlarının fosfolipitlerine karşı lipolitik bir aktiviteye sahiplerdir. Fosfolipaz D enzimi, *A. baumannii*'nin insan serumunda kalıcı olmasına yardımcı olurken başka bir enzim olan fosfolipaz C, epitel hücreleri için hemolitik ve sitolitik aktivitede rol almaktadır (36).

2.1.5.4. Demir kazanım mekanizmaları

Demir, bakterilerin canlı kalması için gerekli bir metal iyonudur ve konak, demirin bakteriyel patojenlere ulaşmasını kısıtlamak için mümkün olan her mekanizmayı kullanır. Demirin çoğu hemoglobine bağlanır; konak kalan serbest demiri tutmak için transferrin, laktoferrin veya ferritin gibi diğer proteinleri devreye sokar (38). *A. baumannii*, demirin sınırlı olduğu (hem ile bağlantılı olduğu için) konak ortamına uyum sağlamak amacıyla

demir edinme sistemleri geliştirmiştir. *A. baumannii*'de demir ediniminde işlev gören en az sekiz gen kümesi tanımlanmıştır. Bu gen kümelerinden biri demir alımında, ikisi hem alımında ve beşi siderofor biyosentezi ve kullanımında rol oynar. Sideroforlar, yüksek afiniteli demir şelatör proteinleri olup, demir için konak hücrelerle rekabet ederler. *A. baumannii*'de on adet yapısal olarak farklı siderofor bulunmaktadır. *A. baumannii* tarafından üretilen ana siderofor asinetobaktin olmakla birlikte yapısal olarak farklı sideroforlar olan baumannoferrin ve fimsbaktinler de bulunmaktadır. *Acinetobacter* klinik izolatları arasında kodlama lokusu yüksek derecede korunmuş olan asinetobaktinin kritik önemi, farklı fizyolojik koşullar altında demir bağlama kabiliyeti ile açıklanmaktadır. Transferrin ve laktoferrinin tek demir kaynağı olarak etkin kullanımı için asinetobaktin biyosentezi gerektiğinden, bu sideroforun demir için baumannoferrinler ve fimsbaktinlerden daha yüksek bir afiniteye sahip olması ve dolayısıyla konaktan daha iyi demir alabilmesi de mümkündür (39).

2.1.5.5. Biyofilm oluşturma

Biyofilmler, genellikle bir katı yzeeye bağlanmış ve bir sakkarit matrisi tarafından vrelenmiş bakteri hücrelerinin yoğun bir şekilde bir araya gelmesi ile tanımlanan yapısal komplekslerdir. Ekzopolisakkaritler (EPS'ler), bakteriyel biyofilm matrisinin temel bileşenleridir (40).

A. baumannii, biyotik ve abiyotik yüzeylerde kolonizasyon yeteneği ve biyofilm oluşturma kabiliyetiyle bilinen bir bakteri türüdür. Bu zellikleri, kronik enfeksiyonlara, antibiyotiklere direnç geliştirme ve hastane ortamlarında hayatta kalma gibi özelliklerle ilişkilendirilir. Özellikle ventilatörle ilişkili pnömoni ve kateterle ilişkili enfeksiyonlar gibi biyofilmle ilişkili enfeksiyonlara yol açar. Bu enfeksiyonlar, genellikle antibiyotik tedavisine karşı dirençlidir ve *A. baumannii* ile ilişkilendirilen biyofilm enfeksiyonlarının klinik yönetimi önemli ölçüde zorlayıcı olabilmektedir (41).

2.1.5.6. Dışa atım (efluks) pompa mekanizması

A. baumannii'nin dış membranının geçirgenliğinin düşük olması büyük boyutlu antibiyotiklerin hücre içine girmesini zorlaştırır. Buna ek olarak, antibiyotikleri dışarı atan farklı sınıflardan efluks pompaları da bulunmaktadır. ABC (*ATP binding cassette*) taşıyıcı, MFS (*major facilitator superfamily*), RND (*resistance nodulation division*),

MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), PACE (*proteobacterial antimicrobial compound efflux*) ve SMR (*small multidrug resistance*) ailesi olmak üzere altı sınıf efluks pompası vardır. ABC taşıyıcıları enerji kaynağı olarak ATP'nin hidrolizine bağımlıdır, diğerleri ise antimikrobialleri hücre dışına taşımak için hidrojen iyon gradyanını kullanır. *A. baumannii*'de dışa atıma bağlı direnç, büyük ölçüde RND ve MFS ailesi taşıyıcıları ile ilişkilendirilmektedir (38).

2.2. Antimikrobiyal Direnç Tanımları

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre antimikrobiyal direnç (AMR); bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler dahil olmak üzere mikroorganizmaların önceden kendilerini etkileyen ilaçlara artık yanıt vermediğinde ortaya çıkmaktadır.

ECDC ve ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC)'nin ortak girişimi ile aşağıdaki üç direnç kategorisi için tanım oluşturulmuştur (42).

Çoklu ilaca dirençli (MDR): Üç veya daha fazla antimikrobiyal grup içerisinde yer alan her kategorideki en az bir ajana karşı kazanılmış direnç. (Aminoglikozitler, florokinolonlar, sefalosporinler, karbapenemler vb. gibi antibiyotik grupları içerisindeki antibiyotikler belirtilmektedir.)

Aşırı ilaca dirençli (XDR): İki veya daha az antimikrobiyal grup hariç tümünde en az bir ajana karşı kazanılmış direnç (yani bakteri izolatlarının yalnızca bir veya iki antimikrobiyal gruba karşı duyarlı kalması).

Pan ilaca dirençli / Pan-rezistan (PDR): Tüm antimikrobiyal sınıflarında yer alan tüm ajanlara karşı direnç.

2.2.1 Antibiyotik direnç mekanizmaları

Antibiyotik direnci çeşitli süreçlerle ortaya çıkabilir (Şekil 2.2). Bu süreçlerde rol oynayan başlıca mekanizmalar (43, 44):

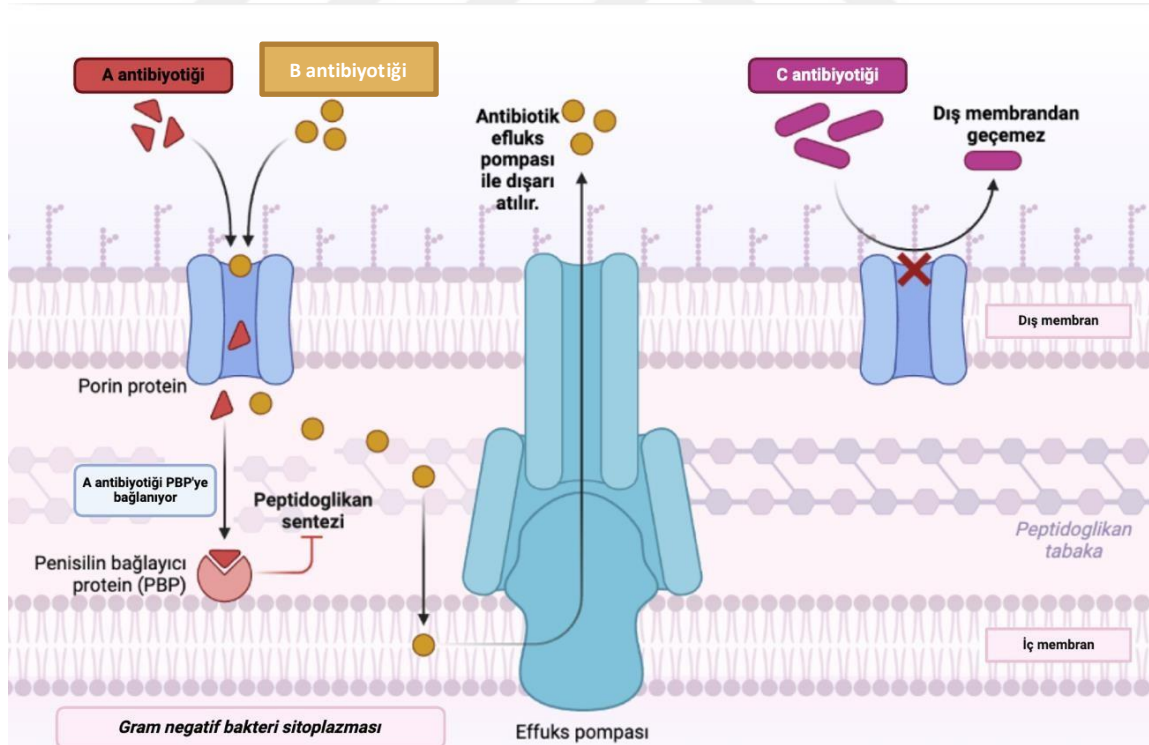
1. Dışa atım (Efluks) pompası: Efluks pompası proteinleri, antibiyotikleri hücre dışına çıkarabilen taşıma proteinleridir. Bakteriler, bu proteinlerin aşırı salınımı sonucunda

antibiyotik direnci kazanabilir ve antibiyotiğin hücre içi konsantrasyonunu toksik seviyelerin altında tutabilir.

2. Antibiyotiğin inaktivasyonu: Bakteriler antibiyotikleri etkisiz hale getirecek çeşitli enzimler üretebilirler. Bu enzimler, antibiyotiklerin etkisini doğrudan engelleyerek direnç oluşumuna yol açarlar, bunu antibiyotiğin yapısını değiştirerek veya bozarak gerçekleştirmektedirler.

3. Antibiyotik hedefinin modifikasyonu: Bakteri hücresinde antibiyotiklerin hedefi olabilecek bileşenler bulunmaktadır. Bakteriler bu antibiyotik hedeflerini; genetik mutasyon, alternatif özellikte penisilin bağlayıcı protein (PBP)'lerin ekspresyonu ya da translasyon sonrası modifikasyon yoluyla değiştirebilir ve sonuçta antibiyotik direncine zemin hazırlar.

4. Antibiyotik geçirgenliğinin azalması: Antibiyotikler porin kanalları yardımıyla hücre içerisine girerler. Porin sayısının azalması veya porin kanalının seçiciliğini değiştiren mutasyonlar, hücre zarının antibiyotiklere karşı geçirgenliğini azaltarak direnç gelişiminde rol oynar.



Şekil 2.2. Antibiyotik direnç mekanizmaları (Biorender ile oluşturulmuştur.)

2.2.2. *A. baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları

1970'lerden önce *Acinetobacter* enfeksiyonlarını beta-laktamlar, aminoglikozitler ve tetrasiklinler gibi geniş bir yelpazedeki antibiyotikle tedavi etmek mümkündü. Günümüzde ise hem doğal direnç hem de kazanılmış direnç mekanizmaları nedeniyle *A. baumannii*'nin bilinen tüm antibiyotiklere direnç geliştirmesi, *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisini oldukça zorlaştırmıştır (13).

Sıklıkla görülen antibiyotiklere dirençli (MDR) altı bakteriyel patojen ESKAPE kısaltması altında gruplandırılmıştır: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* spp.

ESKAPE patojenleri, hastane enfeksiyonlarının çoğundan sorumludur ve antimikrobiyal ajanların biyosidal etkilerinden kaçabilme yeteneğine sahiptir (45). 2017 yılında DSÖ, acil küresel eyleme ihtiyaç duyulan patojenlerin bir listesini yayımlamış ve karbapeneme dirençli *A. baumannii*'yi (CRAB), ilaç araştırma ve geliştirmesine rehberlik edecek antibiyotiğe dirençli bakteriler listesinde kritik öncelikli (öncelik 1) patojen olarak sıralamıştır (6).

A. baumannii'nin antimikrobiyallere karşı direnç geliştirmesini sağlayan başlıca mekanizmalar aşağıda açıklanmaktadır.

2.2.2.2. Beta-laktam direnci

Beta-laktam antibiyotikler; penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar ve beta-laktamaz inhibitörlerini içerir. Beta-laktam antibiyotiklere direnç çeşitli mekanizmalar yoluyla sağlanabilir (46). *A. baumannii*'de beta-laktam direncinin ana mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir:

Beta-laktam antibiyotiklere karşı enzim aracılı direnç: Bu tür direnç, beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilen bakteriler tarafından üretilen enzimler olan beta-laktamazların aktivitesinden kaynaklanır. Beta-laktamazlar dizi motiflerine ve hidrolitik mekanizmadaki farklılıklara göre dört sınıfa (A, B, C ve D) ayrılabilir (41). A, C ve D sınıfında, serin beta-laktamaz (SBL)'lar adı verilen ve aktif bölgesinde serin bulunan

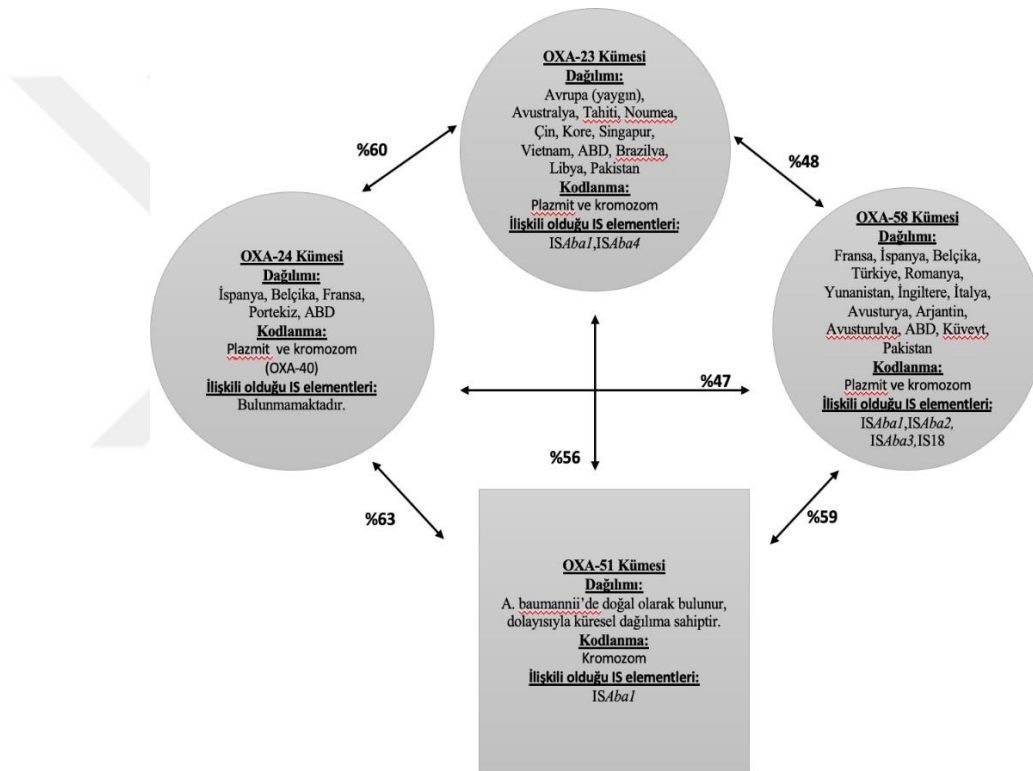
enzimler, B sınıfında ise metalo-beta-laktamaz (MBL)'lar adı verilen çinkoya bağımlı enzimler bulunur (47).

A sınıfı beta-laktamazlar penisilin, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemlere karşı dirence aracılık eder. Beta-laktamazlar dar spektrumlu olabilir ya da nokta mutasyonları yoluyla geniş spektrumlu antibiyotik aktivitesi kazanabilirler. Dar spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, SHV-1 gibi) çoğunlukla penisilinlere karşı aktiftir ve klavulanik asit tarafından inhibe edilebilirken, geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'lar (örn. CTX-M) seftazidim, seftriakson, sefotaksim ve aztreonam gibi geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilir. Ayrıca, plazmitler ve diğer hareketli genetik elemanlar yardımıyla Gram negatif bakteriler arasında yayılım gösterirler. GSBL üreten suşların periyodik olarak izlenmesi ve ilgili genlerin (örneğin *blaTEM-92*, *blaSHV*, *blaGES-11*, *blaGES-14*, *blaPER-1*, *blaPER-7* ve *blaVEB-1*) saptanmasının direnç yayılımı açısından klinik önemi vardır (46,48).

B sınıfı enzimler veya metalo-beta-laktamaz (MBL)'lar hareketli DNA elemanları (plazmitler, integronlar) tarafından kodlanır ve neredeyse tüm beta-laktamların (karbapenemler dahil) hidrolizini katalize ederek çoklu ilaç direnci sağlar, ancak monobaktamları katalize etmez. *A. baumannii*'de IMP, VIM, NDM ve SIM olmak üzere 4 tip MBL tanımlanmıştır (43-46).

C sınıfı beta-laktamazlar kromozomal olarak kodlanan sefalosporinazlardır (46). Klinik önemi olan C sınıfı enzimlerin başında *blaADC* (eski adıyla *blaAmpC*) tarafından kodlanan AmpC gelmektedir (AmpC aynı zamanda plazmit tarafından da kodlanabilmektedir) (48). *A. baumannii* klinik izolatlarının çoğu, üçüncü nesil (örn. seftazidim) ve dördüncü nesil (örn. sefepim) ajanlar da dahil olmak üzere sefalosporinlere dirençlidir. *A. baumannii* doğal olarak AmpC beta-laktamaz [ADC (*Acinetobacter*-derived cephalosporinase) olarak adlandırılır] üretir. AmpC üretiminin indüklenemediği veya kalıcı olarak baskılanabildiği diğer Gram negatif bakterilerin aksine, *A. baumannii*'deki ADC beta-laktamaz indüklenabilir olarak kabul edilmez. Bununla birlikte, ADC beta-laktamazın ekspresyonu, genin yukarı akışında belirli insersiyon sekanslarının transpozisyonu ile güçlü bir promotör aktivitesi sağlandığında artar ve klinik açıdan anlamlı bir direnç seviyesine yol açar (49).

D Sınıfı beta-laktamazlara oksasilineazlar veya karbapenem hidrolize edici sınıf D beta-laktamaz (CHDL)'lar da denir. Tüm beta-laktamları etkisiz hale getirebilirler ve karbapenem direncinin ana mekanizmasını oluşturdukları düşünülmektedir (50). Genel olarak D sınıfı beta-laktamazlar klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam tarafından inhibe edilmezler. Bu grupta yer alan OXA51, OXA23, OXA24, OXA143 ve OXA235 enzimleri; *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA58}, *bla*_{OXA143} ve *bla*_{OXA235} genleri tarafından kodlanmaktadır (Şekil 2.3). Bu enzimleri kodlayan genler hem kromozom hem de plazmitler üzerinde bulunabilir (46).



Şekil 2.3. *A. baumannii*'deki OXA tipi enzimlerin dağılımı ve genetik yapısının özeti (13).

Dış membran proteini (OmpA) ve imipenem direnci: OmpA, negatif yüklü monomerik bir proteindir ve *A. baumannii*'de en yaygın bulunan dış membran proteinlerinden biridir. Araştırmalar, OmpA'nın negatif yüklü beta-laktam antibiyotiklerinin daha yavaş difüzyonuna neden olarak *A. baumannii*'nin ilaçlara direnç geliştirmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. OmpA'yı aşırı üreten *A. baumannii* klinik izolatları, hastalarda daha yüksek morbidite ve hatta mortalite ile ilişkilendirilmiştir (51).

CarO ilk olarak 29 kDa OMP'nin kaybı üzerine imipenem direnci kazanan mutant *A. baumannii* izolatında bulunmuştur (52). *carO* genindeki mutasyonların; CarO'nun ekspresyonunu azaltarak ya da durdurarak, porinin yapısal modifikasyonuna neden olarak ve sonuçta antibiyotiğin bakteriye girişini azaltarak *A. baumannii*'de antibiyotik direncine neden olabileceği bildirilmektedir (53).

2.2.2.3. Aminoglikozit direnci

Aminoglikozit (AG)'ler, bakteri hücre duvarını geçtikten sonra 30S ribozomal alt biriminde peptit uzamasını bozarak etkilerini gösteren protein sentezi inhibitörleridir. Direnç sağlayan genler; çeşitli hareketli DNA elemanları (integronlar, gen kasetleri, transpozonlar, plazmitler, integratif ve konjugatif elementler) aracılığıyla taşınabilir ve hücreler arasında konjugasyon, doğal transformasyon veya transdüksiyon yoluyla aktarılabilir.

A. baumannii'de aminoglikozitlere direnç üç farklı mekanizma ile ortaya çıkabilir:

i. AG bağlanma kapasitesini zayıflatan **aminoglikozit modifiye edici enzim (AME)'ler**. AG modifikasyon bölgesine bağlı olarak (sırasıyla N-asetilasyon, O-nükleotidilasyon ve O-fosforilasyon yoluyla) asetil-, adenil- ve fosfo-transferazlar olarak sınıflandırılır. ii. **16S rRNA metiltransferazlar** (*armA*, *rmtB* ve *rmtB1*, *rmtE*) tarafından hedef bölgenin değiştirilmesi ve son olarak, iii. **membran geçirgenlik kaybı veya efluks pompalarının aşırı aktivitesini** takiben sınırlı ilaç alımı.

AME'ler, *A. baumannii*'nin AG'lere karşı kullandığı başlıca yol olmakla birlikte antibiyotiğin dışa atımı da AG kullanımında önemli bir sorun oluşturmaktadır. Efluks pompası aktivasyonundan sorumlu yedi farklı genin (*amvA*, *adeC*, *adeD*, *adeE*, *adeR*, *adeS*, *emrE*) ürünü olan pompalar, permeazlar, periplazmik adaptörler ve iki bileşenli sistemler AG'lerin etkili bir şekilde dışarı atılmasına neden olur. Gentamisin ve netilmisin AdeABC ve AbeM pompaları tarafından etkili bir şekilde uzaklaştırılırken, amikasin ve kanamisin gibi daha hidrofilik AG'ler için efluks önemli ölçüde zayıf kalmaktadır (46).

2.2.2.4. Tetrasiklin direnci

Tetrasiklin antibiyotikleri 30S ribozomal alt birimine bağlanır ve böylece translasyonun başlamasını engelleyerek protein sentezini inhibe eder. Tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direnç üç ana mekanizma ile ilişkilendirilmektedir: **i.** ATP'ye bağlı dışa atım, **ii.** tetrasiklinlerin enzimler tarafından inaktivasyonu ve **iii.** ribozomal koruma proteinleri (RPP'ler)

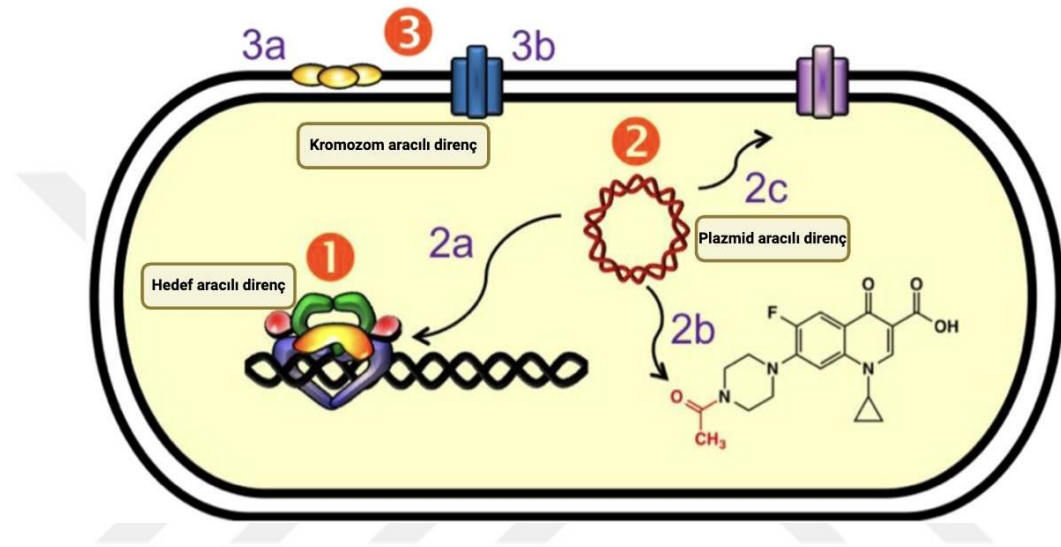
A. baumannii'de tetrasiklin direncinden enerji gerektiren iki tip efluks pompası sorumludur. İlki RND tipi pompalar, sırasıyla periplazmik adaptör alt birimleri, permeaz alt birimleri ve dış membran pompa elemanlarını kodlayan *adeA*, *adeB* ve *adeC* genlerinden kaynaklanan konstitütif spesifik olmayan pompalardır. RND pompaları ve ağırlıklı olarak AdeABC, tetrasiklinleri etkili bir şekilde ortadan kaldırabilirken, tigesiklin, minosiklin ve tetrasiklin için MİK'in önemli ölçüde yükselmesine aracılık eder. Diğerleri, MFS ailesinden ve *tet(A)* ve *tet(B)* genleri tarafından kodlanan *tetA* ve *tetB* pompalarıdır. *tetA*, tigesiklinin periplazmaya atılmasına yol açıyor gibi görünmekte ve daha sonra RND pompaları dış membran yoluyla eliminasyona gitmektedir (46-54). Bu şekilde RND ve *tetA*'nın çalışma sinerjisinin bilinmesi, efluks sistemlerinin aracılık ettiği tigesiklin direncinin daha iyi anlaşılması için önemlidir (55). Sadece tetrasiklin direncine yol açan *tetA*'nın aksine, TetBminosikline de dirençte rol oynamaktadır (54).

2.2.2.5. Florokinolon direnci

Florokinolonlar için hücresel hedefler bakteriyel tip II topoizomerazlar, giraz ve topoizomeraz IV'tür. Kritik fizyolojik işlevlerini yerine getirmek için, giraz ve topoizomeraz IV, bakteriyel kromozomdaki bölünme-uzama bölgelerine non-kovalent olarak bağlanarak ve çift sarmal yapısında kırıklar oluşturarak bakterisidal etki gösterirler. Bu şekilde nesilden nesile vertikal olarak aktarılan hedef aracılı direncin aksine, plazmit aracılı kinolon direnci horizontal olarak da (bakteriyel konjugasyon yoluyla) aktarılabilir (Şekil 2.4). Bu mekanizmada görev yapan üç gen ailesi bulunmaktadır. Bunlar sırası ile *qnr*, *aac (6')-Ib-cr* ile *qepA1* ve *qepA2*'dir.

Florokinolonlar için bir diğer direnç mekanizması ise özellikle Gram negatif bakterilerin dış membranının ilaçların aşması gereken ek bir bariyer oluşturması

sebebiyle porin ve efluks pompası adı verilen protein kanalları yolunu kullandığı mekanizmadır. Kromozom aracılı direnç yolu ile bu porinlerin ekspresyonunun azalması ya da efluks pompalarının aşırı ekspresyonu sonucunda farklı seviyelerde kinolon direnci ortaya çıkmaktadır (56). Florokinolonlar, *A. baumannii* tedavisinde uygulanabilir alternatifler olarak görülmekle birlikte florokinolon direncinin klinik insidansının her geçen yıl artmasıyla kullanımları zorlaşmıştır (57).



Şekil 2.4 Florokinolon direnç mekanizması (56).

2.2.2.5. Polimiksin direnci

Polimiksinler, çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında karbapenemlerin ve aminoglikozitlerin etkisiz kaldığı durumlarda sıklıkla kurtarma tedavisi olarak son basamak tedavi seçeneği şeklinde kullanılmaktadır. Polimiksinler katyonik amfipatik bileşiklerdir ve doğrusal bir tripeptit ile bir yağlı açıl kuyruğuna bağlanmış heptapeptit halkası içerirler. Polimiksinlerin bu amfipatik fizikokimyasal özellikleri (hidrofobik ve hidrofilik özelliğini aynı andan bulundurabilmesi), bakterinin dış membranındaki lipopolisakkaritin (LPS) negatif yüklü kısımları ve lipit A'nın hidrofobik bölgeleri ile ilk etkileşimlere girerek dış membranın destabilizasyonuna, polimiksinlerin periplazmaya alınmasına ve hem dış hem de iç membranların bütünlüğünü bozarak geçirgenliğin artmasına neden olur (46,58).

Polimiksinlerin nihai bakterisidal etkileri için gerekli olan lipit A ve polimiksinler arasındaki etkileşim iyi tanımlanmış olsa da dış zar yapısının bozulmasını takiben

polimiksinlerin öldürme mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bugüne kadar *A. baumannii*'de iki polimiksin direnci mekanizması tanımlanmıştır: lipit A'nın fosfoetanolin ve/veya galaktozamin ile modifikasyonu ve LPS'nin dış membrandan tamamen kaybolması. Yapılan çalışmalar, her iki direnç mekanizmasının da polimiksinlerin dış membran ile etkileşimini önleyerek polimiksin kaynaklı bakteri ölümünü engellediğini ve bunda pmrCAB operonu ve mcr genleri (fosfoetanolin ile lipit A modifikasyonu için), naxD20 (galaktozamin ile modifikasyon için) veya lpx (LPS kaybı için) gibi lipit A biyosentezinde görev alan genlerdeki mutasyonların aracılık ettiğini göstermektedir. Mevcut durumda, kolistin ve polimiksin B'nin klinik kullanımdaki dozaj rejimlerine yanıt olarak direncin ortaya çıkışı ve mekanizma(lar)ı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (58).

2.3. *A. baumannii* Enfeksiyonları

Hastanede yatan hastaların solunum sekresyonu ve idrar örneklerinden izole edilen *A. baumannii* suşlarının çoğu, enfeksiyondan ziyade bu bölgelerde kolonize olmaktadır (59). Genellikle steril olan (kan ve beyin omurilik sıvısı) bir klinik örnekten *A. baumannii* izole edildiğinde ilişkili enfeksiyon belirtileri ve klinik bulguların olması ile enfeksiyon tanımlanır. Bunun aksine *A. baumannii*'nin bir hastada tipik olarak steril olmayan bir örnekten, klinik ve/veya biyolojik enfeksiyon bulgusu olmadan izolasyonu, kolonizasyon olarak tanımlanır (60). İzolasyon kolonizasyon ayrımının yapılması süreç içerisinde oldukça zorlu olmaktadır (22).

A. baumannii enfeksiyonu için zemin oluşturan risk faktörleri şu şekildedir (59):

- Yoğun bakım ünitesinde yatış, uzun süreli servis yatışı ve antibiyotik tedavisi (3.kuşak sefalosporin, florokinolon veya karbapenem) alma
- Büyük cerrahi operasyon geçirme
- Malignite
- Yanık, açık kırık gibi enfeksiyona açık yüzey bölgelerinin varlığı
- İmmünsüpresif tedavi altında olma
- Yaşlılık
- Santral venöz katater, üriner sistem kateterizasyon varlığı, enteral beslenme
- Trakeostomi, mekanik ventilasyona bağlı olma

A. baumannii enfeksiyonunun en yaygın klinik belirtileri, hastane kaynaklı pnömoniler (özellikle ventilatörle ilişkili pnömoniler) ve bakteriyemilerdir (22).

2.3.1. Pnömoni

A. baumannii'nin neden olduğu pnömoni tablosunu hastane kaynaklı ve toplum kökenli olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Çoğu merkezde *A. baumannii* izolatlarının büyük bir kısmı hastanede yatan hastaların solunum yollarından izole edilmektedir. Çoğunlukla gerçek pnömoni ile üst solunum yolunda kolonizasyon olduğunun ayrımını yapmak zordur. Ancak yadsınamaz bir gerçek de gerçek ventilatör ilişkili pnömoninin *A. baumannii* enfeksiyonu ile ilişkili olmasıdır (21). ABD'de 2022 yılında yapılan çok merkezli çalışmada solunum yolu örneklerinin %56'sı enfeksiyon ile ilişkili bulunmuştur. Enfeksiyona bağlı ölüm oranı ise %26 olarak saptanmıştır. Bu veriler ışığında özellikle karbapeneme dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlar yüksek morbidite ve mortalite oranlarından dolayı ciddi olarak hayatı tehdit eden enfeksiyonlar arasındadır (61).

Toplum kökenli pnömoni ise çoğunlukla sıcak, nemli, tropikal ortamlarda, özellikle Avustralya, Çin, Tayvan ve Tayland dahil olmak üzere Asya'nın bazı bölgelerinde görülmektedir. Bu bireylerde genellikle diyabet, böbrek hastalığı, kanser veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi altta yatan sağlık sorunları bulunmaktadır. Hızla başlayan ve septik şoka ilerleyen fulminan seyirli pnömoni vakalarında, artan mortalite oranları, uygun olmayan başlangıç antimikrobiyal tedavileri ile ilişkilendirilmiştir (62).

2.3.2. Bakteriyemi ve sepsis

Kan dolaşımı enfeksiyon (KDİ)'leri, potansiyel sonuçları nedeniyle dünya çapında giderek artan bir endişe kaynağıdır. *A. baumannii*'ye bağlı KDİ'lerin (AB-KDİ) toplam KDİ vakalarının %9-35'ini oluşturduğu bildirilmiştir (63).

DSÖ'nün önderliğinde yürütülen 'Küresel Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (GLASS)' projesinin 2015 yılında paylaşılan verilerine göre *A. baumannii* hastane kaynaklı bakteriyemiler içerisindeki en sık etkenlerden birisidir. Bakteriyemi oranı %56,3'dur. Ayrıca hastane içi mortalite, antibiyotığe dirençli bakteriyemisi olan

hastalarda %40,5 bulunmuşken antibiyotiğe dirençli olmayan bakteriyemisi olan hastalarda bu oran %28,5 bulunarak dirençli ve duyarlı bakteri enfeksiyonlarının mortalite oranları arasında anlamlı derece fark saptanmıştır (64).

A. baumannii bakteriyemisi genel olarak alt solunum enfeksiyonu başta olmak üzere vasküler kateterizasyon ile ilişkilendirilmektedir (65).

COVID -19 pandemisi döneminde başlanan, 52 ülkenin 333 yoğun bakımındaki hastane ilişkili KDI vakalarının incelendiği prospektif kohort çalışması verilerine göre; enfeksiyon kaynağı olarak en sık solunum yolları [(pnömoni) %26,7], intravenöz kateterizasyon (%26,4) ve ardından ise abdominal bölge (%15,1) gösterilmiştir. Kültürlerin %88,8'inde monobakteriyel üreme görülürken Gram negatifler en sık izole edilen patojen olarak saptanmış ve bunların da %20,3'ünden *Acinetobacter* spp. sorumlu bulunmuştur (66).

2.3.3. Travma, yara yeri, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

Son yıllarda doğal afetler (deprem, sel, yangınlar, vb.) ve ülke içi ve ülkeler arası savaşlar gibi koşulların, kişilerde çok ciddi deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına önemli ölçüde zemin hazırlayacak sıklıkla meydana gelmesinden dolayı MDR *A. baumannii* deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (DYDE) ile de sıklıkla ilişkilendirilmektedir (16). Bu durum kronik enfeksiyonlara neden olabilmekte ve bu da genellikle gecikmiş yara iyileşmesi, piyoderma, nekrotizan yumuşak doku, deri-greft yetmezliği, nekrotizan fasiit ve sepsise katkıda bulunmaktadır (67).

Acinetobacter yanık ünitelerinin sıklıkla rastlanan bir patojenidir ve ciddi yanıkları olan hastalarda tedavisi oldukça güçtür. *Acinetobacter*, hastaneye yatışın 1. gününde yaralardan izole edilen en yaygın Gram negatif çomaklardan biridir (68). Amerikan-Irak savaşında her iki ülke askerlerine ait sonuçların değerlendirildiği retrospektif bir incelemede DYDE'li 57 hastanın, sekizinin *Acinetobacter* ile enfekte olduğu ortaya konulmuştur. Bu sekiz hastanın benzer kliniği olup tamamında tipik selülit tablosu ve deri yüzeyinde bül ile seyreden şiddetli enfeksiyon görülmüştür (1).

1999 yılında meydana gelen Marmara depreminde 220 kişinin yatışı olduğu bir hastaneye ait verilere göre bu hastaların %18,6'sında hastane enfeksiyonu geliştiği,

izolatların %31,2'sinin *A. baumannii* olduğu bunların arasında iki pan-rezistan izolatın bulunduğu, ayrıca depremden önce, aynı hastanenin YBÜ'sünde *Acinetobacter* enfeksiyonu prevalansının %7,3 olduğu ve çoklu dirençli suşların tespit edilmediği bildirilmiştir. Vietnam, İran-Irak ve Körfez savaşlarından bildirilen raporlar ise çoklu dirençli *Acinetobacter*'i hem kolonize eden hem de yaralıları enfekte eden savaş bölgesi için toplum kaynaklı bir patojen olarak tanımlamıştır (68).

2.3.4. Menenjit

A. baumannii'nin nozokomiyal menenjit tablosu çok nadirdir, ancak cerrahi sonrası gelişen menenjit açısından kritik öneme sahiptir. Beyin cerrahi operasyonları, kafa travması, beyin omurilik sıvısı (BOS) kaçağı, yara yeri enfeksiyonu, yabancı cisim enfeksiyonu (ventrikülo-peritoneal şantlar vb.) risk faktörleri arasındadır. *A. baumannii* menenjitinin ölüm oranı ise %15-71'e kadar çıkmaktadır. Kan-beyin bariyerini geçen tedavilerin sınırlı olması ve nörolojik sekel oranlarının yüksek olması nedeniyle ciddi klinik zorluk yaşanmaktadır (69).

Ülkemizde 2008-2016 yılları arasında yapılan tek merkezli retrospektif bir çalışmada postoperatif menenjit oranları %3,3 olarak bulunmuş ve vakaların %45'inde *Acinetobacter* spp. izole edilmiştir. Önceki çalışmalarda, ülkeden ülkeye değişmekle birlikte hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerin baskın olduğu gösterilmiş ancak son otuz yılda Gram negatif etkenlerin görülme sıklığı artış göstermiştir. Son çalışmalarda ise menenjit vakalarının %30 kadarında *Acinetobacter* etken olarak bildirilmektedir. *Acinetobacter*'in deri florasında da bulunabileceği iyi bilinmekte olup bu durum klinik olarak etken olup olmadığını değerlendirirken hatalara neden olabilir. Ancak hastaneye yatıştan birkaç gün sonra flora bakterilerinin yerini endojen veya ekzojen dirençli bakteriler almaya başlayacağından preoperatif dönemde hastaneye yatış ile menenjit arasında bir ilişki varlığının ayrıca araştırılması gerekebilir (70).

2.3.5. İdrar yolu enfeksiyonları

A. baumannii, seyrek görülen bir idrar yolu enfeksiyonu (İYE) nedenidir; yapılan bir çalışmada YBÜ kaynaklı İYE'lerin yalnızca %1,6'sında etken olduğu bildirilmiştir. Genellikle kateterle ilişkili enfeksiyon ve/veya kolonizasyonla ilişkilendirilmektedir (21).

2.3.6. Diğer enfeksiyonlar

İnfektif endokardit (İE), kalbin endokardiyal yüzeyini tutan ve yaşamı tehdit eden, uygun antibiyotik tedavisi ve cerrahi müdahale ile bile mortalitesi yüksek bir enfeksiyondur (71, 72). İnvaziv prosedürler uygulanan, predispozan faktörleri olan, hastanede yatan hastalarda az sayıda *A. baumannii* İE vakası bildirilmiş olmakla birlikte vakaların çoğunluğu protez kapaklarla ilgili bulunmuştur (21).

Acinetobacter enfeksiyonları, nadir olmasına rağmen, oftalmik operasyonlardan veya kontakt lens kullanımından kaynaklanabilecek izole enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiş ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Bu komplikasyonlar, korneanın perforasyonuna kadar uzanan geniş bir enfeksiyon spektrumunu içerebilir (69-73).

2.4. Tedavi Seçenekleri

Steril olmayan bir bölgeden alınan pozitif bir kültürün gerçek enfeksiyonu temsil edip etmediğini belirlemek için hastanın klinik değerlendirmesi gereklidir. Kolonizasyon tedavi edilmemelidir, çünkü uygunsuz antibiyotik kullanımı ek yan etkilere katkıda bulunur ve dirençli mikroorganizmalar için seleksiyona neden olur. Pnömonide radyolojik infiltrasyonlar, oksijen ihtiyacı, ateş ve lökositoz varlığı kültürdeki üremenin kontaminasyondan çok enfeksiyon lehine olduğunu klinik kanıttır. Asemptomatik bakteriüri kateterizasyon ile ilişkili olsa dahi tedavi edilmemelidir. Steril olmayan bölgelerden alınan (deri ve yara yeri gibi) örnekler için klinik kanıt olarak lökosit varlığı, ateş, pürülan akıntı, lokalize enfeksiyon bulgularının varlığı enfeksiyon açısından önemlidir; bu tür klinik göstergeler mevcut değilse kolonizasyon olma ihtimali daha yüksektir (74).

Genellikle antibiyotik tedavisi iki gruba ayrılabilir:

Birinci basamak ilaçlar; geniş spektrumlu sefalosporinler (seftazidim ve sefepim), piperasilin-tazobaktam, ampisilin-sulbaktam, karbapenemler [meropenem veya imipenem-silastatin (*Acinetobacter*'lerde çok az intrinsik aktivitesi olduğu için ertapenem kullanılmamaktadır)] ve florokinolonlardır. Aminoglikozitler ve trimetoprim-sülfametoksazol üriner sistem enfeksiyonu ise birinci basamak ilaçlar arasında yer almaktadır. Tedavi sırasında, özellikle tek ajan

olarak kullanıldığında, birinci basamak ajanlara karşı direnç geliştiği gözlenmiştir. Bu nedenle, bu ajanlar bazen ciddi enfeksiyonlar için kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Birinci basamak ilaçlara direnç geliştiğinde terapötik seçenekler kısıtlıdır.

İkinci basamak ilaçlar ise polimiksinler (polimiksin B) ve tetrasiklin (minosiklin, tigesiklin vb.) grubudur; XDR suşlarda ana tedavi seçenekleri olarak kullanılırlar. Polimiksinler yan etkileri ve karmaşık dozajları nedeniyle ikinci basamak ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Tetrasiklin bazlı antibiyotiklerin yan etkileri daha azdır ancak belirli dokularda dağılımları sınırlıdır.

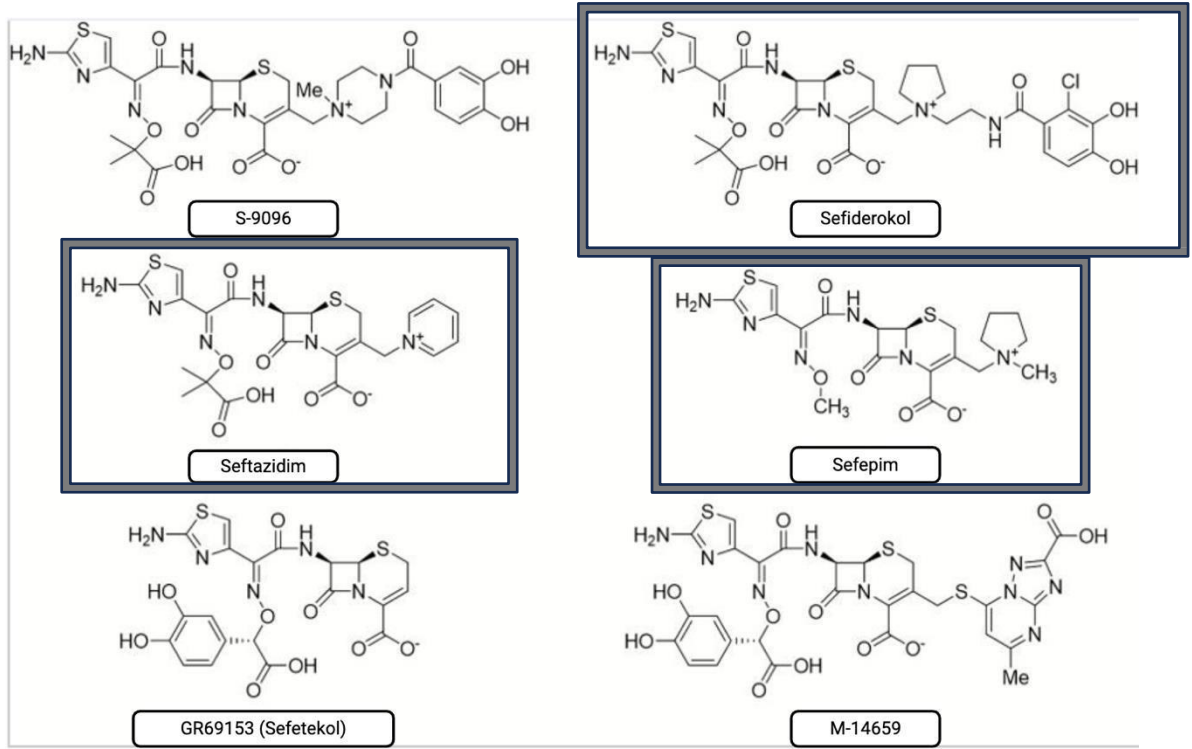
2.5. Çalışmada Kullanılan Yeni Nesil Antibiyotikler ile İlgili Genel Bilgiler

2.5.1. Sefiderokol (FDC)

Sefiderokol, MDR, XDR suşlar ve MBL üreten Gram negatif bakteriler için iyi aktivite gösteren yeni siderofor içerikli bir sefalosporindir. Bu durum, siderofor kısmı ve FDC'nin serin ve MBL'ler tarafından parçalanmaya karşı direnci nedeniyle Truva atı benzeri bir mekanizma ile açıklanmaktadır (75).

Molekül, demiri bağlayan ve ilacın bakteriyel periplazmik boşluğa girişi için aktif demir transfer sistemini kullanan bir siderofor bileşeninden oluşmaktadır. Sefalosporin kısmı aktif antimikrobiyal bileşendir ve yapısal olarak seftazidim ve sefepim moleküllerinin yapısına çok benzemektedir (Şekil 2.5) (76). Yedinci karbon atomunun yan zincirinde seftazidiminkine benzer bir karboksipropanoksimino grubuna sahiptir ve bu da dış membran boyunca transportu kolaylaştırmaktadır. Ancak sefepim veya seftazidimden farklı olarak sefiderokolde 3. karbon atomunun yan zincirinin sonunda siderofor aktivitesi sağlayan bir klorokatekol grubu bulunmaktadır (Şekil 2.6) (77).

Diğer beta-laktam ajanlar gibi, FDC'nin ana bakterisidal aktivitesi, PBP'lere bağlanarak peptidoglikan sentezinin inhibisyonu yoluyla bakteriyel hücre duvarı sentezinin inhibisyonuna ve hücre ölümüne yol açmasıyla ortaya çıkar (78). Ayrıca dış membran tabakasında bulunan porinler aracılığıyla pasif difüzyon ile de hücre içine geçiş söz konusudur (79).

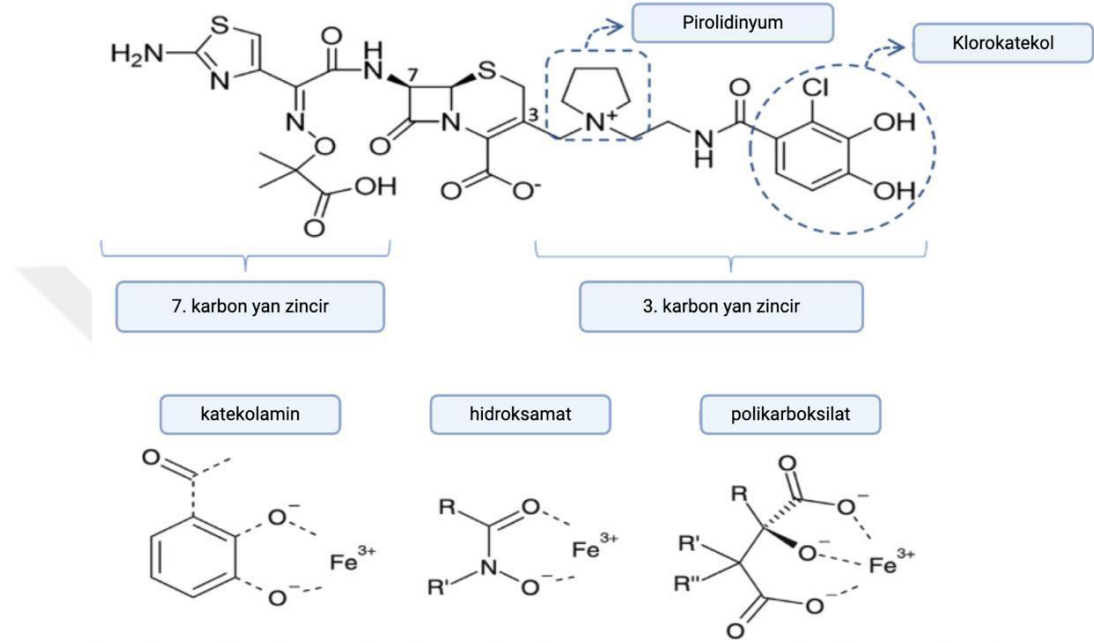


Şekil 2.5 Sentetik siderofor beta-laktamlar ve sefalosporinlerin yapıları (76).

Kimyasal olarak insan vücudunda demir süreci incelendiğinde demir, çözünmeyen ferrik formunda (Fe^{+3}) solunum ve DNA replikasyonu gibi çeşitli hücresel süreçler için temel bir besindir. İnsanlarda fizyolojik koşullar altında, demir metabolizması ve dağılımı oldukça düzenli bir süreçtir. Demirin büyük kısmı eritrositler içinde hemoglobin ile kompleks halindedir. Herhangi bir hücre dışı demir, transferrin gibi proteinlere sıkıca bağlanır veya transferrinin bağlama kapasitesi aşıldığında albümin, sitrat ve aminoasitlere daha düşük bir afinite ile bağlanır. Enfeksiyon meydana geldiğinde ise asidik ortamlarda demir bağlama kapasitesini koruyan bir protein olan laktoferrinin yanı sıra hepsidin gibi peptitler ve interferon gama, tümör nekroz faktörü alfa, interlökin-1 ve interlökin-6 gibi sitokinler demir sekestrasyonunu daha da artırır (80).

İnsanlara benzer şekilde, mikroorganizmalar da önemli hücresel redoks süreçleri için demire ihtiyaç duymaktadır. Patojenler, insan konaklarında demir eksikliği koşullarında hayatta kalabilmek için hem alımı ve hem dışı demir edinim mekanizmaları için çeşitli yollara başvurmaktadır. Bu mekanizmalardan biri, serbest ferrik demiri temizleyen ve demir taşıyıcı kanalları aracılığıyla bir siderofor demir kompleksi olarak hücre içine geri alınan siderofor adı verilen moleküllerin üretimi ve ardından hücre dışına

salınmasıdır. Üç çeşit siderofor tipi bulunmaktadır (Şekil 2.6): Hidroksamat ve karboksilat tip sideroforlar genellikle mantar ve bazı bakterilerde bulunurken katekolat sideroforlar primer olarak bakterilerde bulunmaktadır. Örneğin *Acinetobacter*'de bulunan asinetobaktin bir katekolattır (80).



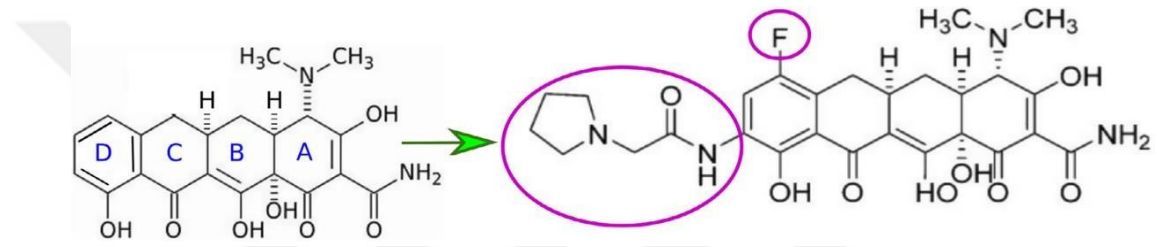
Şekil 2.6 Sefiderokolün molekül yapısı (77).

Sefiderokol, yetişkin hastalarda komplike idrar yolu enfeksiyonu tedavisi için 2019 yılında FDA'dan onay almıştır. Çok sayıda ülkenin dahil olduğu iki ayrı çok merkezli, faz üç çalışmalarının sonuçlarını takiben 2020 yılında yetişkin hastalarda hastane kaynaklı bakteriyel pnömoni ve ventilatörle ilişkili bakteriyel pnömoni (HABP/VABP) için kullanımı onaylanmıştır. Pediatrik hastalarda kullanım için ise FDA'dan onaylı değildir, ancak iki ayrı faz 2 çalışması devam etmektedir (81, 82).

2.5.2. Eravasiklin (ERV)

Tetrasiklik D halkasında 7. karbon atomuna flor atomunun eklenmesi ve 9. karbon atomuna da pirolidinoasetamo grubunun eklenmesiyle oluşan iki benzersiz modifikasyon pozisyon ile tetrasiklik çekirdek iskeletinden oluşan bir tetrasiklin türevidir (Şekil 2.7). Doğal olarak oluşan veya sentetik tetrasiklinlerde bulunmayan 7. ve 9. karbondaki bu sübstitüsyonların bir sonucu olarak eravasiklin, tetrasikline özgü edinilmiş belirli direnç mekanizmalarına sahip Gram pozitif ve negatif bakteri suşlarına karşı *in vitro* aktivite göstermektedir (83). Tamamen sentetik olarak oluşturulmuştur (84). Diğer tetrasiklinler

gibi eravasiklin de bakteri ribozomunun 30S alt birimine geri dönüşümlü bağlanarak protein sentezinin bozulmasına yol açar. Eravasiklin tetrasiklinlere göre 10 kat daha yüksek afinite ile bağlanır ve protein translasyonunu tetrasiklinlere göre 4 kat daha düşük ilaç konsantrasyonlarında inhibe etmektedir. Bu etkilerinden dolayı eravasiklin de dahil olmak üzere tetrasiklinler bakteriyostatik etkilidir. Ancak eravasiklin in vitro olarak bazı *A. baumannii*, *E. coli* ve *K.pneumoniae* suşlarına karşı bakterisidal aktivite göstermektedir (83).



Şekil 2.7 Eravasiklinin moleküler yapısı (84).

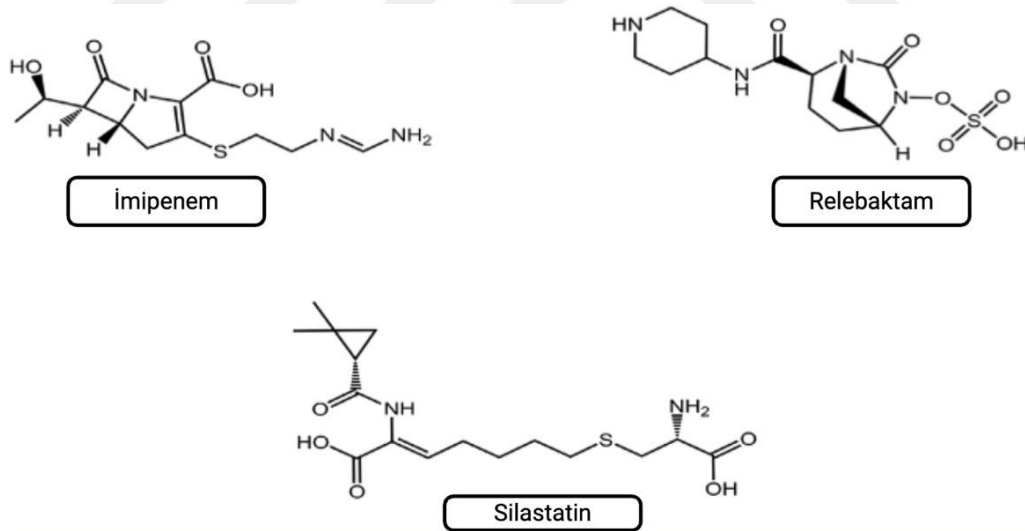
Eravasiklin, komplike karın içi enfeksiyonları (apandisit perforasyonu, periapandisit absesi, divertikülit absesi, akut gastrik ve duodenal perforasyon veya karaciğer ve dalak hariç diğer intraabdominal apseler) ve komplike idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için ideal antimikrobiyallerin birçok özelliğine sahip olsa da enfeksiyon hastalıklarının tedavisindeki rolünü tam olarak belirlemek için daha fazla klinik etkinlik ve güvenlik verisine ihtiyaç vardır (85).

2.5.3. İmipenem-relebaktam (IMI-REL)

İmipenem, diğer beta-laktam antibakteriyeller gibi, penisilin bağlayıcı proteinleri inaktive ederek hücre duvarı sentezi sırasında peptidoglikanın çapraz bağlanmasını engelleyen ve sonuçta bakteriyel hücre lizisine ve ölümüne yol açan bir karbapenemdir (Şekil 2.8) (86). Relebaktam, imipenemin A ve C sınıfı beta-laktamaz üreten ancak B ve D sınıfı β -laktamaz üretmeyen Gram negatif izolatlara karşı aktivitesini geri kazanmak için geliştirilen, yakın zamanda sentezlenmiş bir beta-laktamaz inhibitörüdür (87).

Relebaktamın antibakteriyel aktivitesi yoktur. İmipenemin, Ambler'in A sınıfı ve C sınıfı beta-laktamazlarına karşı korunmasını sağlamaktadır (81). Dolayısıyla IMI-REL kombinasyonu, KPC, TEM, SHV ve CTX-M gibi A sınıfı ve AmpC, CMY gibi C sınıfı beta-laktamazlara karşı etkili in vitro aktivite göstermiştir. Öteyandan relebaktam, B sınıfı MBL'ye (NDM, VIM ve IMP) karşı aktif değildir ve D sınıfı (OXA-48 benzeri) karbapenemaza karşı sınırlı aktiviteye sahiptir (88).

Klinik kullanım alanı; çoklu dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu tedavi seçeneği sınırlı veya hiç alternatif tedavi seçeneği olmayan komplike idrar yolu enfeksiyonu, komplike intraabdominal enfeksiyonlar, hastane kaynaklı pnömoni ve ventilatör ilişkili pnömonilerin tedavisi için uygun görülmüştür. *A. baumannii* açısından değerlendirildiğinde IMI-REL duyarlılığı diğer birçok Gram negatif patojene kıyasla düşüktür ve izolatların yalnızca %23'ü duyarlılık göstermiştir. İmipenem duyarlılığı IMI-REL duyarlılığının önemli bir belirleyicisidir, çünkü bilinen imipenem direncine sahip izolatların yalnızca %8'i IMI-REL'e duyarlılık göstermiştir (89).



Şekil 2.8 İmipenem, relebaktam ve silastatinin moleküler yapısı (89).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışma grubu seçimi

Çalışma kapsamında Nisan 2019 - Ekim 2023 tarihleri arasında İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi hastanesine başvurmuş ve özellikle yoğun bakım servislerinde yatmakta olan, bunun dışında çeşitli dahili ve cerrahi servis ve polikliniklerdeki çocuk ve yetişkin hastalara ait çeşitli klinik örneklerden (kan, trakeal aspirat, balgam, steril vücut sıvısı, abse, doku, idrar) izole edilen çoklu ilaca dirençli 80 *Acinetobacter* spp. suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastaya ait birden fazla izolat olduğunda sadece ilk izolat çalışma kapsamına alınmıştır.

3.1.2. Etik Kurul onayı

Bu çalışma, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından (Dosya No: 1219177, Tarih: 15.09.2022) onaylanmıştır.

3.1.3. Kullanılan malzemeler

3.1.3.1. Besiyerleri

- **Triptik Soy Agar (TSA) (Becton Dickson, ABD)**
Pepton 20 g/l
Glukoz 2,5 g/l
Sodyum klorit..... 5 g/l
Tampon..... 2,5 g/l
Agar 15 g/l
- **Mueller Hinton II Agar (MHA) (Becton Dickson, ABD)**
Et özütü..... 2 g/l
Kazeinli asit hidroksilat..... 17,5 g/l
Nişasta 1,5 g/l
Agar 17
- **Kasyon ayarlı Mueller Hinton II Buyyonu (MHB) (Becton Dickson, ABD)**
Et özütü..... 3 g/l
Kazeinli asit hidroksilat..... 17,5 g/l
Nişasta 1,5 g/l

3.1.3.2. Antibiyotikler

İmipenem-relebaktam disk [35(10/25) µg] (LiofilChelm, İtalya)

İmipenem-relebaktam 0.002/4-32/4 MİK test (LiofilChelm, İtalya)

Eravasiklin disk (20 µg) (LiofilChelm, İtalya)

Eravasiklin 0.002-32 MİK test (LiofilChelm, İtalya)

Sefiderokol disk (30 µg) (LiofilChelm, İtalya)

Sefiderokol toz (2mg) (Sigma, Aldrich)

3.1.3.3. Primerler (Sentromer-Türkiye)

Çalışmada beş ayrı direnç gen bölgesine ait primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerler Tablo 3.1 gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan primerler

Hedef gen bölgesi	Primerler (5' – 3')
<i>bla_{oxa23}</i>	F: GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA R: ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT
<i>bla_{oxa24}</i>	F: GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA R: AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT
<i>bla_{oxa51}</i>	F: TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG R: TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG
<i>bla_{oxa28}</i>	F: AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG R: CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC
<i>bla_{IMP}</i>	F: CAT GGT TTG GTG GTT CTT GT R: ATA ATT TGG CGG ACT TTG GC
<i>tet-A</i>	F: GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC R: CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG

3.1.3.4. Standart referans suşlar

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* NCTC 13846 (mcr-1 +)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü sırasında kullanılan gen bölgelerini içeren pozitif kontrol suşları Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Banu SANCAK'tan temin edilmiştir.

3.1.3.5. Kimyasal malzemeler

Chelex 100 Resin (Bio-Rad, ABD)
MgCl₂ • 6H₂O (Merck, Almanya)
CaCl₂ • 2H₂O (Merck, Almanya)
ZnSO₄ • 7H₂O (Sigma, Almanya)
Gliserol çözeltisi (Sigma, Almanya)
Serum fizyolojik (Polifarma, Türkiye)
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) disodyum (Wisent, Kanada)
Etidyum bromür (Sigma, Almanya)
Agaroz (Prona, Avrupa Ekonomik Topluluğu)
Bromfenol mavisi (Biomatik, Kanada)
Yükleme tamponu (Biomatik, Kanada)
Deiyonize su
DNaz RNaz free su (Genaxxon, Almanya)
Master mix 200 rxn (ThermoFisher, İngiltere)
Softec Taq DNA polymerase (Recombinant) (5 U/□L) (Zet Medikal, Türkiye)
DNA marker (ladder); 100 bp (GENAXXON bioscience, Almanya)

3.1.3.6. Ticari kitler

Colistin (COL) MIC plate kit (Diagnostics, Slovakya)
VİTEK 2 GN 21341 tanımlama kiti (BioMérieux, Fransa)
VİTEK 2 AST-420 antibiyogram kiti (BioMérieux, Fransa)

3.1.3.7. Plastik ve sarf malzemeler

0,2 ml ve 1,5 ml Ependorf tüpleri (Axygen Scientific Inc., ABD)
Filtreli pipet uçları (10 µl -1000 µl) (Microcult, Çin)
Steril olmayan pipet uçları (10 µl) (Microcult, Çin)
Disposable steril plastik öze (10 µl) (Microcult, Çin)
Steril petri kabı (90mm) (3K, Türkiye)
0.45 µm'lık membran filtre (GVS, ABD)
0.22 µm'lık membran filtre (Aısımo, İngiltere)
Steril kapaklı 96 kuyucuklu mikropalak (Laborant, Türkiye)

3.1.3.8. Cam malzemeler

100 ml ve 250 ml'lik steril cam balonlar

10 ml'lik cam deney tüpleri

250 ml Erlenmeyer (Isotherm, Türkiye)

3.1.3.9. Cihaz ve ekipmanlar

Biyolojik Güvenlik Kabini (Thermo Fisher, ABD)

Otoklav (Hirayama, Japonya)

Etüv (İnkübatör) (Heraeus, Fransa)

-80°C derin dondurucu (Sanyo, Japonya)

+4°C soğutucu (Altus, Türkiye)

Hassas terazi (RADWAG, Polonya)

Isıtıcılı Manyetik karıştırıcı (IKA Labortechnik, Almanya)

pH metre (WTW, Almanya)

Vorteks (Dragonlab, ABD)

Kuru ısı bloğu (Biosan, Letonya)

Mikrosantrifüj (Nüve, Türkiye)

Mini santrifüj (Spin) (Biosan, Letonya)

Soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter, ABD)

Termal Döngü Cihazı (Takara, Japonya)

Mikrodalga fırın (White Westinghouse, ABD)

UV Transillüminatör (jel görüntüleme) cihazı (Vilber Lourmat, Almanya)

Elektroforez cihazı (E-C Apparatus Corporation, ABD)

Mikropipet (10 µl) (Biohit, Almanya)

Mikropipet (20 µl- 200 µl) (Discovery, İsviçre)

8 kanallı Mikropipet (50 µl-100 µl) (Accumax, Almanya)

Mikropipet (1000 µl) (Gilson, ABD)

VİTEK-2 Compact sistem (BioMérieux, Fransa)

Mikroskop (Olympus, Japonya)

Dansitometre (bioMérieux, Fransa)

İyon Spektrofotometri (Aligent technologies, ABD)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Suşların izolasyonu ve saklanması

Bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen rutin klinik örneklerden izole edilerek toplanan suşlar çalışma gününe kadar 1.5 ml'lik ependorflar içinde bulunan gliserollü saklama besiyerine alınarak -80°C'de dondurulmuştur.

3.2.2. Besiyerleri ve stok çözeltilerinin hazırlanması

3.2.2.1. Triptik Soy Agar

Hazır toz halindeki besiyerinden 45 g tartılmış, 1000 ml distile su ile çözündürülerek pH değeri $7.3 \pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dk steril edildikten sonra 45-50°C'ye soğutulup 90 mm'lik Petri kutularına 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülmüş ve katılaştıktan sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Mueller Hinton Agar

Hazır toz halindeki besiyerinden 18 g tartılmış, 1000 ml distile suda çözündürülerek pH $7.3 \pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dk steril edildikten sonra steril tüplere dağıtılmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.3. Katyon-ayarlı Mueller Hinton II Buyyonu (MHB)

Hazır toz halindeki besiyerinden 22 g tartılmış, 1000 ml distile suda çözündürülerek pH $7.3 \pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dk steril edildikten sonra steril tüplere dağıtılmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.4. %20 gliserollü buyyon

Hazır toz halindeki beyin kalp infüzyon buyyonundan 37 g tartılmış, 800 ml distile suda çözündürülmüş ve içerisine 200 ml gliserin eklenmiştir. pH $7,2 \pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besiyeri 100 cc'lik steril tüplere dağıtılmış ve 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dk steril edildikten sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.5. Mg⁺² stok çözeltilerinin hazırlanması

Magnezyum stok çözeltisi hazırlamak için, 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dk steril edilen 100 ml deiyonize suda 8,36 g MgCl₂.6H₂O çözündürülmüştür. Böylelikle çözelti 10 mg Mg⁺²/ml içermektedir. Çözeltiler membran filtreden (0,22 µm) geçirilerek

steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2.6. Ca⁺² stok çözeltilerinin hazırlanması

Kalsiyum stok çözeltisi hazırlamak için, 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dk steril edilen 100 ml deiyonize suda 3,68 g CaCl₂.2H₂O çözündürülmüştür. Böylelikle çözelti 10 mg Ca⁺²/ml içermektedir. Çözeltiler membran filtreden (0,22 µm) geçirilerek steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2.7. Zn⁺² stok çözeltilerinin hazırlanması

Çinko stok çözeltisi hazırlamak için, 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dk steril edilen 100 ml deiyonize suda 0,29 g ZnSO₄.7H₂O çözündürülmüştür. Böylelikle çözelti 10 mg Zn⁺²/ml içermektedir. Çözeltiler membran filtreden (0,22 µm) geçirilerek steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

3.2.3. Dondurulan suşların üretilmesi

Acinetobacter spp. olarak tanımlanmış ve %20 gliserollü buyyonda -80 °C'de dondurulmuş olan toplam 80 izolat TSA besiyerine ekilmiş ve 37 °C'lik etüvde 18-24 saat inkübe edilerek saf kültür halinde çoğaltılmıştır. Dondurulan suşlar deneylerde kullanılmadan önce bu işlem iki kez tekrar edilmiştir.

3.2.4. Bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık deneyleri

3.2.4.1 Otomatize sistemle tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testi

Bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri Vitek-2 Compact (Biomeriux, Fransa) otomatize sistemiyle yapılmıştır. Tür düzeyinde tanımlama için GN kartı, antibiyotik duyarlılığı için AST-N420 kartları kullanılmıştır. Taze pasajlardan çalışılmak üzere TSA besiyerine ekim yapılmış, üreyen izolatlardan dansitometre yardımıyla 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan AST kartı için 0,125 ml pipetlenerek ayrı bir tüpte bulunan serum fizyolojik içerisine aktararak AST kartı için gerekli inokülüm oluşturulmuştur. Daha sonra kartlarla birlikte süspansiyonlar cihaza yerleştirilmiştir. Süspansiyonların kartlara inoküle edilmesi, okuma, değerlendirme ve raporlama cihaz tarafından otomatik olarak yapılmıştır. Duyarlılık testlerinin sonuçları sistem tarafından EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) standartlarına göre duyarlı (S), yüksek dozda duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak kategorize edilmiştir.

Kolistin duyarlılığı için otomatize sistemin güvenilirliğinin henüz netlik kazanmaması nedeniyle altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle çalışılmıştır (90).

3.2.4.2 Disk difüzyon ve gradiyent test yöntemi

Taze pasajdan alınan saf kültür halindeki bakterilerden dansitometre yardımıyla 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanarak MHA besiyeri üzerine yayılmış ve daha sonra eravasiklin (20 µg), imipenem-relebactam [35(10/25) µg] ve sefidierokol (30 µg) diskleri aralarında en az 10 mm olacak şekilde besiyeri yüzeyine steril penset yardımıyla yerleştirilmiştir.

Eravasiklin ve imipenem-relebactam gradiyent testleri için zon çaplarının okumayı zorlaştırmaması için striplerin baş ve son kısımları birbirinin tersi yönde ve aralarındaki mesafe 2-3 cm olacak şekilde konumlandırılarak steril penset yardımıyla ikinci bir MHA besiyeri yüzeyine yerleştirilmiştir.

Hem disk difüzyon hem de gradiyent testleri için besiyerleri 35±1°C'lik etüvde 18±2 sa inkübe edilmiştir. Disk difüzyon yönteminde inkübasyon sonrasında agar üzerinde oluşan zon çapları cetvel yardımıyla ölçülerek mm olarak, gradiyent test yönteminde ise elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği nokta MİK değeri-olarak kaydedilmiştir.

Sonuçlar, EUCAST ve CLSI kriterlerine göre duyarlı veya dirençli olarak değerlendirilmiştir (91, 92). Çalışmamızda kullanılan zon çapı sınır değerleri, Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada yer verilen antibiyotiklerin CLSI ve EUCAST rehberlerindeki klinik sınır değerleri

<i>A. baumannii</i>		CLSI Sınır Değerleri		EUCAST Sınır Değerleri	
		MİK (mg/l)	Disk zon çapı (mm)	MİK (mg/l)	Disk zon çapı (mm)
Sefiderokol	S	□4	□15	□2	□17 ^a
	I	8	11-14	-	-
	R	□16	□10	>2	-
Eravasiklin	S	NA ^b	NA	IE ^c	IE
	I	-	-	-	-
	R	NA	NA	IE	IE
İmipenem-relebaktam	S	NA	NA	Not ^d	Not
	I	-	-	-	-
	R	NA	NA	Not	Not

a: Sefiderokol 30 µg disk için ≥17 mm’lik zon çapları, S ≤2 mg/l PK-PD sınır noktasının altındaki MİK değerlerine karşılık gelir.

b: NA: veri yok

c: IE: Bu antibiyotik için yeterli düzeyde kanıt bulunmamaktadır. Yorum ile S, I, R içermeyen MİK sonucu bildirilebilir.

d: Mikroorganizmalar tarafından üretilen beta-laktamazlar ya ana karbapenemi değiştirmemekte ya da inhibitör tarafından yeterince inhibe edilmektedir. Bu nedenle beta-laktamaz inhibitörünün eklenmesi klinik fayda sağlamaz.

3.2.4.3. Sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle sefiderokol duyarlılığının saptanması

SMD yöntemi CLSI ve EUCAST'ın sefiderokol için önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (91, 92).

3.2.4.3.1. MHB'nin şelasyon işlemi

1. Besiyeri içeriğinde bulunan katyonların, özellikle demir iyonlarının şelasyonu için 100 ml'lik steril cam balonlardaki MHB içerisine 10g chelex resin eklenmiştir.
2. Yaklaşık 2 sa süre ile manyetik karıştırma çubuğu ile karıştırılmıştır.
3. Karıştırma işleminden sonra 0,22 µm'lik membran filtreler yardımıyla MHB içerisindeki chelex resin uzaklaştırılmıştır.
4. pHmetre ile pH 7.3'e ayarlanmıştır.
5. Erlenmeyerde hazırlanan ve şelasyona uğramış 100 ml besiyerine iki değerlikli katyonlar olan Ca²⁺, Mg²⁺ ve Zn²⁺ tuzlarının steril distile sudaki stok çözeltilerinden son konstrasyonları sırasıyla 20-25 mg/l, 10-12,5 mg/l, 0,5-1 mg/l olacak şekilde Mg²⁺ iyonlarını içeren stok çözeltiden 100 µl, Ca²⁺ iyonlarını içeren stok çözeltiden 200 µl ve Zn²⁺ iyonlarını içeren stok çözeltiden 5 µl olacak şekilde ilave edilmiştir.
6. pHmetre ile pH kontrolü yapıldıktan sonra tekrar 0,22 µm'lik filtreler yardımıyla sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.2.4.3.2. Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması

Çalışmada potensi 980 µg/mg olan toz sefiderokol kullanılmıştır. Antibiyotik stok çözeltilisinin hazırlanması için $w = V \times C / P$ [w: Tartılan antibiyotik miktarı (mg), V: Çözücünün hacmi (ml), C: İstenen konsantrasyon (mg/l), P: Antibiyotiğin aktivitesi (µg/mg)] formülünden yararlanılmıştır.

2 mg toz sefiderokol 15,3 ml'lik serum fizyolojik içinde çözülerek 1280 mg/l konsantrasyonda çözelti elde edilmiş, bu çözeltiden 1,5 ml'lik steril ependorflar içerisine 400 µl olacak şekilde dağıtılarak çalışma solüsyonları hazırlanmış ve sonraki kullanımlar için -80°C'de saklanmıştır. Antibiyotik miktarının gramajı düşük olduğundan 1/10 oranında dilüsyon işlemi ilk başta gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3.3. Bakteri inokulümünün hazırlanması

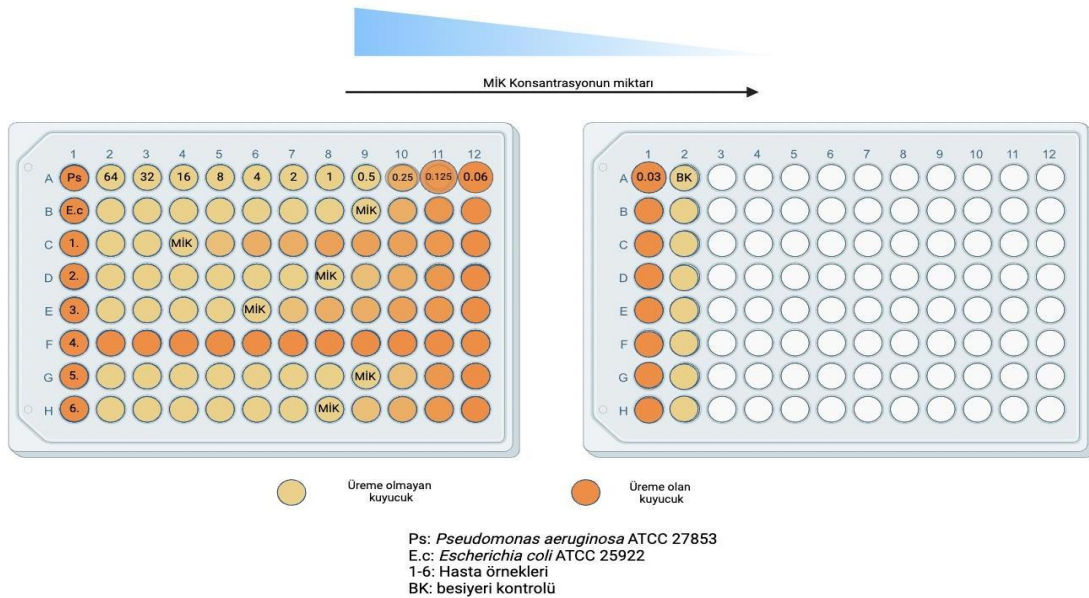
TSA’da üretilen taze saf kültürden alınan koloniler serum fizyolojik içeren bir tüp içerisinde homojenize edildikten sonra dansitometre kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.

Bu süspansiyondan, içerisinde 950 µl serum fizyolojik bulunan diğer bir cam tüp içerisine 50 µl inoküle edilerek bakteri süspansiyonu 1/20 oranında dilüe edilmiştir.

3.2.4.3.4. Deneyin yapılışı

Sıvı mikrodilüsyon uygulanan 96 kuyucuklu mikroplaklarda 64 mg/l-0.03 mg/l arasında 2 kat azalan dilüsyonlar test edilmiştir. Bunun için her seferinde 2 mikroplak kullanılmıştır. İkinci mikroplakta yer alan 1. kuyucuk deneyde 13. kuyucuk olarak; 2. kuyucuk ise 14. kuyucuk olarak ifade edilmiştir.

Yatay düzlemde 1. kuyucuk sadece bakteri süspansiyonu içeren üreme kontrol kuyucuğu, 14. kuyucuk antibiyotik içeren fakat bakteri süspansiyonu içermeyen sterilite kontrol kuyucuğu olarak belirlenmiştir. Dikey olan düzlemde ise A-B sütununda standart suşlar, C-H’ye kadar olan altı sütunda ise hastalardan elde edilen suşlar test edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1- Sefiderokol çalışmasında kullanılan SMD plaklarının organizasyonu

1. Hazırlanan demiri azaltılmış MHB besiyerinden mikropiaktaki tüm kuyucuklara 50 µl dağıtılmıştır.
2. Daha önceden hazırladığımız ependorf içerisindeki 128 mg/l konsantrasyonundaki sefiderokol süspansiyonundan her sıradaki 2. kuyucuğa 50 µl dağıtılmıştır. Böylelikle tüm ikinci kuyucuklardaki son antibiyotik konsantrasyonu 64 mg/l olarak belirlenmiştir.
3. Çoklu mikropipet yardımıyla her sıradaki ikinci kuyucuktan 50 µl alınıp, 13. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapılmıştır. 13. kuyucuktaki son konsantrasyon 0,03 mg/l olarak belirlenmiştir. En son pipete çekilen 50 µl sıvı dışarı atılmıştır.
5. Sterilite kontrol kuyucuğu olan 14. kuyucuk dışındaki tüm kuyucuklara 1/20 dilüsyon olacak şekilde hazırlanan bakteri inokulumundan 5 µl alınarak dağıtılmıştır. Böylece yaklaşık 5×10^5 CFU/ml olan son bakteri inokulumu elde edilmiştir.
6. Mikroplağın kapağı kapatılmış ve $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 'lik etüvde 18 ± 2 sa inkübasyona bırakılmıştır.

Her çalışmada kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşları kullanılmıştır (91).

3.2.4.3.5. MİK değerlerinin belirlenmesi

İnkübasyon sonrası yapılan değerlendirmede, kuyucuklarda bulanıklık olup olmadığı incelenmiştir. Bulanıklık görülmeyen ilk kuyucuk o izolatin MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Plakları değerlendirme sırasında, besiyeri sterilite kontrol kuyucuğunda bakteri ürememesi, üreme kontrol kuyucuğunda üremenin görülmesi ve referans (kontrol) suşların MİK değerlerinin beklenen sınır değerlerde olması halinde testler geçerli kabul edilerek değerlendirilmiştir. Üreme kontrol kuyucuğunda üreme gözlenmeyen plaklar ile besiyeri sterilite kuyucuğunda üreme saptanan plaklarda test tekrarına gidilmiştir.

3.2.4.3.6. Sonuçların değerlendirilmesi

Duyarlılık kategorileri, EUCAST sınır değerler tablosu versiyon 14.0 ve CLSI M100-Ed33'e göre belirlenmiştir.

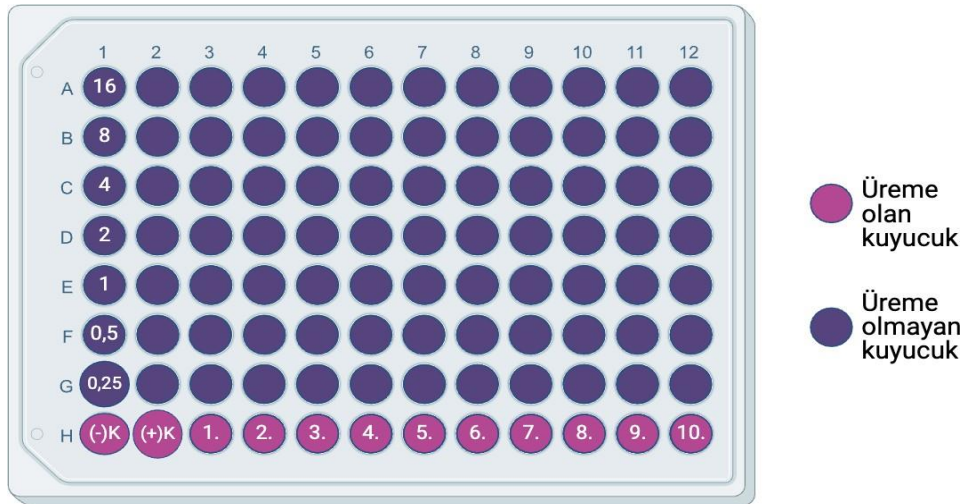
3.2.4.4. SMD yöntemiyle kolistin duyarlılığının saptanması

Kolistin MİK değerlerinin SMD yöntemiyle belirlenmesi için yedi farklı kolistin konsantrasyonunu (0,25-16 mg/l) içeren kuyucukları bulunan MIC COL testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır. Yöntemde 18-24 saatlik saf kültürden steril serum fizyolojik içeren bir tüp içerisinde dansitometre kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan 60 µl

alınarak kit içeriğinde yer alan katyon ayarlı MHB içerisine inoküle edilmiş ve karışım hafifçe 2-3 kere ters-yüz edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanmış olan son süspansiyondan kiti içerisindeki ayrılabilir 8'li sıra halindeki test pleytlerinin her kuyucuğuna 100 µl bakteri süspansiyonu inoküle edilmiş ve mikrodilüsyon plağı kilitli bir poşet içerisine yerleştirilerek 35±1°C'lik etüvde 18±2 sa inkübe edilmiştir. MIC COL testinin şematik görüntüsü Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Sonuçlar CLSI ve EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

3.2.4.4.1. MİK değerinin belirlenmesi

İlk olarak kontrol kuyucuğundaki bakteri üremesi kontrol edilmiş [pembe renk: üreme (+); mavi/mor renk: üreme (-)] ve üremenin olmadığı durumda test tekrar edilmiştir. Deney sonucunda kontrol kuyucuğundan belirgin olarak farklı renkte olan ilk kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir. MİK değerinin $\square$ 16 mg/l olduğu gözlenen suşlarda kontaminasyon olma ihtimaline karşı deney tekrar edilmiştir. Çalışmada pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla *Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr*-1 +) ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları EUCAST duyarlılık sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir.



1. kuyucuk A'dan H'ye doğru negatif kontrol
2. kuyucuk A'dan H'ye doğru pozitif kontrol
3. kuyucuktan 12. kuyucuğa kadar izole edilen suşlar test edilmiştir.

Şekil 3.2- Kolistin çalışmasında kullanılan SMD plaklarının organizasyonu

3.2.5. Moleküler analiz

3.2.6. PCR deneyi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Etilendiamintetraasetik (EDTA) asit

EDTA çözeltisi, 0,5 M konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla, 18,61 gram EDTA manyetik karıştırıcı kullanılarak 80 ml steril distile su içinde çözülmüş, çözeltinin hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve pH değeri 8'e ayarlanmıştır (93).

Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon çözeltisi

TBE çözeltisi 10X konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bu amaçla, 55 g borik asit, 108 g tris 800 ml distile suya eklenmiş ve manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 40 ml 0,5 M EDTA ilave edilerek distile su ile toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır (93).

Etidyum bromür

Etidyum bromür çözeltisi, 10 mg/ml konsantrasyonunda manyetik karıştırıcı kullanılarak distile su içinde çözülmüş ve ışıktan korunacak şekilde oda sıcaklığında saklanmıştır (93).

%1'lik Agaroz jel

100 ml 10X stok TBE çözeltisi üzerine 900 ml steril distile su eklenerek 1X TBE çözeltisi hazırlanmıştır. 50 ml 1X TBE çözeltisine 0,5 g agaroz eklenmiş ve mikrodalga fırında tamamen eriyip jelimsi kıvama gelinceye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra, 55°C su banyosunda bekletilen jelin içerisine 5 µl etidyum bromür çözeltisi eklenmiştir (94). Hazırlanan jel, kenarları kapalı bir kaset içine dökülmüş, kuyucuk oluşumu için bir tarak yerleştirilmiş ve 45-60 dakika bekletilerek donması sağlanmıştır.

Yükleme tamponu

Yükleme tamponu, 6X konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bu amaçla, bir tüp içerisine 3 ml gliserol ve 0,025 mg bromfenol mavisi eklenmiş ve steril deiyonize su ile hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır (95). Oluşturulan karışım vortekslendikten sonra 2 ml'lik ependorf tüplere dağıtılarak +4 °C'de saklanmıştır.

dNTP karışımı

Her biri 100 mM konsantrasyonunda olan hazır dATP, dCTP, dTTP ve dGTP çözeltileri kullanılmıştır. Nükleotit çözeltilerinin her birinden 10 µl alınmış ve bu karışıma 60 µl DNaz RNaz içermeyen su eklenerek karışımın son konsantrasyonunun 10 mM olması sağlanmıştır.

Primerler

Çalışmada *A. baumannii* de bulunan altı direnç gen bölgesinin primer çiftleri üç ayrı multipleks ve monopleks PCR setinde kullanılmıştır. PCR deneylerinde kullanılan, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58}, *bla*_{IMP} ve *tetA* direnç gen bölgelerine spesifik primer çiftleri Tablo 3.1 ve Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

100µM/µl konsantrasyonda stok primer çözeltilerinin hazırlanması amacıyla üretici firmanın önerileri doğrultusunda liyofilize halde bulunan *OXA23* forward ve *OXA23* reverse primerleri sırasıyla 727 ve 756 µl, *OXA24* forward ve *OXA24* reverse primerleri sırasıyla 735 ve 718 µl, *OXA51* forward ve *OXA51* reverse primerleri sırasıyla 617 ve 656 µl, *OXA58* forward ve *OXA58* reverse primerleri 728 ve 617 µl, *IMP* forward ve *IMP* reverse sırasıyla 802 ve 788 µl, *tetA* forward ve *tetA* reverse primerleri sırasıyla 751 ve 724 µl DNaz-RNaz free su ile sulandırılmıştır. Her primerin stok çözeltileri 12.5 pmol/µL olacak şekilde 87,5 µl DNaz-RNaz free su ile sulandırılmıştır.

Tablo 3.3. PCR deneylerinde kullanılan primer çiftleri

mPCR-1 primerleri			
Suş	Hedef gen	PCR ürünü (bp)	Kaynak
<i>Acinetobacter</i>	<i>bla</i> _{OXA23}	501	(96)
	<i>bla</i> _{OXA51}	353	(96)
	<i>bla</i> _{OXA58}	599	(97)
	<i>tetA</i>	210	(98)
PCR-2 primeri			
Suş	Hedef gen	Baz sayısı (bp)	Kaynak
<i>Acinetobacter</i>	<i>bla</i> _{OXA24}	246	(97)
PCR-3 primeri			
Suş	Hedef gen	Baz sayısı (bp)	Kaynak
<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{IMP}	236	(99)

3.2.6.1. DNA ekstraksiyonu

DNA izolasyonu için kaynatma yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla TSA besiyerinde üretilmiş 24 saatlik taze pasajlardan bir öze dolusu bakteri iç erisinde 100 µl steril distile su bulunan ependorf tüplere alınmış, homojen hale gelene kadar süspanse edilmiş ve vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Süspansiyon kuru ısı bloğunda 100°C’de 10 dk ısıtıldıktan sonra 1-2 dk +4 °C’de bekletilmiş ve 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernantant kalıp DNA olarak kullanılmak üzere ayrı bir steril ependorf tüp içerisine alınmış ve çalışma vaktine kadar -20°C’de saklanmıştır (100).

3.2.6.2. PCR yöntemi

3.2.5.3.1. PCR karışımlarının hazırlanması

PCR karışımları hazırlanırken iki farklı ticari firmanın PCR ürünleri kullanılmıştır. Çalışmamızda optimize edilen protokole göre Mutlipleks-1 (mPCR-1) ve PCR-2 protokollerinde toplam hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlanan miks içerisine 12.5 nM ThermoFisher DreamTaq PCR master mix ve validasyon çalışmaları (3.2.5.3.4) ile belirlenen oranlarda primerler eklenmiştir. Karışıma her örneğe ait ekstarkte edilmiş kalıp DNA’dan 3 µl konulmuştur.

PCR-3 protokolünde ise sadece OXA24’ü kodlayan gen bölgesi monopleks olarak optimize edilerek çalışılmıştır. Toplam hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlanan miks içerisinde 0,5 µl Softec Taq DNA polimeraz, 2,5 µl KCl buffer, 1,5 µl MgCl₂, 2 mM konsantrasyonundaki dNTP karışımından 0,5 µl, primer süspansiyonundan 0,6 µL ve 3 µL kalıp DNA eklenmiştir.

3.2.5.3.2. DNA amplifikasyonu

Deneylerde bir multipleks (mPCR-1), iki monopleks (PCR-2, PCR-3) olmak üzere üç ayrı PCR protokolü uygulanmıştır. Buna göre, mPCR-1 ile *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58}, *tetA* genleri, PCR-2 ile *bla*_{IMP} ve PCR-3 ile *bla*_{OXA24} genleri araştırılmış ve PCR cihazı Tablo 3-4 – 3.6’da gösterildiği şekilde programlanmıştır (101-103).

Tablo 3.4 Multipleks-1 (mPCR-1) PCR programı

Aşama	Sıcaklık°C	Zaman	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	25 sn	
Bağlanma	52	40 sn	35
Uzama	72	50 sn	
Son uzama	72	6 dk	1
Bekleme	+4		

Tablo 3.5 Monopleks 2 (PCR-2) PCR programı

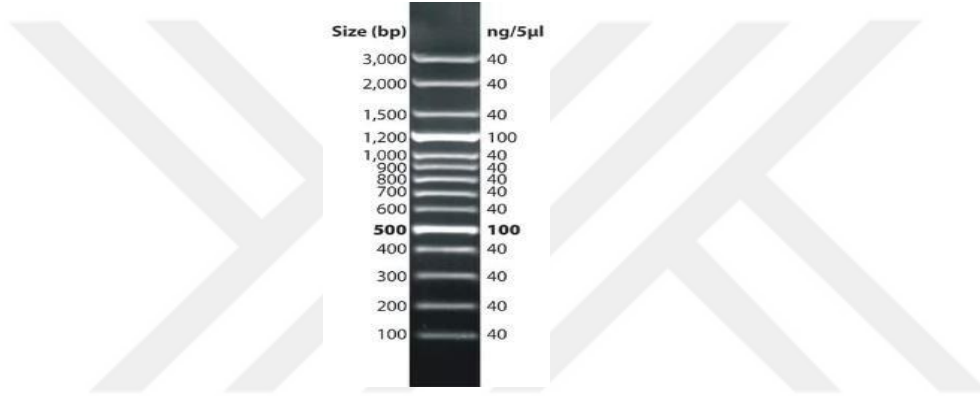
Aşama	Sıcaklık°C	Zaman	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	25 sn	
Bağlanma	50.2	40 sn	35
Uzama	72	50 sn	
Son uzama	72	6 dk	1
Bekleme	+4		

Tablo 3.6 Monopleks 3 (PCR-3) PCR programı

Aşama	Sıcaklık°C	Zaman	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	25 sn	
Bağlanma	56.3	40 sn	35
Uzama	72	50 sn	
Son uzama	72	6 dk	1
Bekleme	+4		

3.2.5.3.3. Jel elektroforezi

Hazırlanan agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankının haznesine yerleştirilmiştir. PCR işlemi sonucunda oluşan amplifikasyon ürünlerinden 10 µl alınarak 2 µl yükleme boyası ile karıştırılıp etidyum bromür ile boyanmış agaroz jel yüzeyindeki kuyucuklara pipet yardımıyla yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 120 W 25 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonrasında oluşan bantlar UV ışığı altında transillüminatörde incelenmiştir. Amplikonların büyüklüklerini karşılaştırmak için 100 bp DNA marker (ladder) kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Kullanılan 100bp DNA marker'ın jeldeki görüntüsü

3.2.5.3.4. Validasyon çalışmaları

Çalışmamızda PCR karışımı hazırlanırken referansta belirtildiği gibi primer konsantrasyonları empirik olarak belirlenmiştir (104). mPCR-1 protokolünde 25 µl miks içerisinde primer konsantrasyonları sırasıyla OXA-23, OXA-51, OXA-58 için 0,4 µM; PCR-2 için IMP 0,6 µM; PCR-3'te ise OXA-24 0,6 µM olacak şekilde belirlenmiştir. Referans kaynakta belirtilen işlemler başta olmak üzere yapılan tüm optimizasyon işlemleri neticesinde ThermoFisher Dream-Taq master mix ile hazırlanan multipleks PCR yönteminde OXA-24 için jel elektroforezinde bant elde edilememiştir. Bu sebeple Softec-Taq DNA polimeraz ile primerler konsantrasyonu 0,6 µM olacak şekilde ve sıcaklık primerin forward ve revers T_m derecesi ortalaması alınarak yeniden bir protokol oluşturulup valide ederek monopleks olarak çalışılıp jel elektroforezde bant elde edilmiştir.

PCR protokolünün optimizasyonu yapılırken referans değerlerinden farklı olarak bağlanma sıcaklığı PCR-2 ve PCR-3 çalışmalarında kullanılan gen bölgeleri için araştırdığımız protokollerde sırasıyla 50.2°C; 56.3°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Primerlerin daha iyi bant oluşturmaları ve araştırdığımız suşlardaki PCR ürünlerinin primer ile daha iyi bağlandığı gözlemlenmiştir.

3.2.7. Örneklem büyüklüğünün hesaplanması

Literatür araştırması yapılmış ve çalışılacak yöntemlere ilişkin değerler baz alınarak 0,38 etki büyüklüğü, %95 güç ve 0,5 hata payı ile G-POWER programı kullanılarak toplam örneklem büyüklüğü n:77 olarak hesaplanmıştır. Hesaplamanın temelinde tek grup ile çalışma gerçekleştirileceği için One-Sample Case test yöntemi ile örneklem sayısı belirlenmiştir. Çalışmamıza 80 izolat dahil edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Demografik Özellikleri

Çalışma kapsamında yer alan çoklu ilaca dirençli 80 *Acinetobacter baumannii* suşunun izole edildiği hastaların %36,2'sinin kadın, %63,8'inin erkek olduğu belirlenmiştir. Hastaların yaş ortalaması 46,6 bulunurken medyan yaş 79 olarak saptanmıştır.

Hastaların 71 (%88,75)'inin yatan; 9 (%11,25)'unun poliklinik hastası olduğu saptanmıştır. Hastaların 37 (%46,25)'si yoğun bakım servislerinde yatan hasta olup hastaların kliniklere göre dağılımı ve *Acinetobacter* suşlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı sırasıyla Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Yatan hastaların servislere göre dağılımı

Gönderen Birim	Suş sayısı	%
Çocuk hastalıkları YBÜ*	11	15,4
Kalp-Damar Cerrahisi YBÜ	9	12,6
Acil Travma YBÜ	9	12,6
Pandemi YBÜ	7	8,75
Pandemi Servisi	5	6,25
Ortopedi -Travmatoloji Servisi	5	6,25
Acil Travma Servisi	3	3,75
Plastik-Rekonstrüksiyon Cerrahi Servisi	3	3,75
Genel Cerrahi Servisi	3	3,75
Beyin Cerrahi Servisi	2	2,5
Dahiliye Servisi	2	2,5
Nöroloji Servisi	2	2,5
Göğüs Hastalıkları Servisi	2	2,5
Beyin Cerrahi YBÜ	1	1,25
Geriatric Servisi	1	1,25
Hematoloji Servisi	1	1,25
Su altı Hekimliği Servisi	1	1,25
Beslenme-Metabolizma Servisi	1	1,25
Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisi	1	1,25
Üroloji Servisi	1	1,25
Kulak-Burun-Boğaz Servisi	1	1,25

*YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

Tablo 4.2 A. baumannii suşlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı

Örnek türü	n (sayı)	%
Balgam	30	37,5
Kan	13	16,25
Doku	10	12,5
Trakeal aspirat	9	11,25
İdrar	8	10
Plevra sıvısı	2	2,5
Safra sıvısı	2	2,5
Kronik yara	2	2,5
Abse	1	1,25
Derin enfeksiyon	1	1,25
Yüzeyel enfeksiyon	1	1,25
Kateter	1	1,25

4.2. İzolatların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Tüm izole edilen suşlar VİTEK-2 otomatize sistemi ile *A. baumannii* olarak tanımlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları da otomatize sistem ile ve son güncel EUCAST sınır değer tablosundaki *Acinetobacter* için kabul gören antibiyotikler olan meropenem, imipenem, siprofloksasin, amikasin, trimetoprim-sülfametoksazol, piperasilin-tazobaktam antibiyotiklerinin yanısıra tigesiklin sonuçları değerlendirilmiştir.

Tüm suşlar imipenem ve meropeneme dirençli saptanmıştır. Suşların %98,75'i siprofloksasine, %98,75'i piperasilin-tazobaktama %90'ı trimetoprim-sülfametoksazole ve %88,75'i amikasine dirençli bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 *A. baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Duyarlı (n)	Yüksek dozda duyarlı (I) (n)	Dirençli n (%)
Meropenem	-	-	80 (100)
İmipenem	-	-	80 (100)
Siprofloksasin	-	1	79 (98,75)
Piperasilin-tazobaktam	1	-	79 (98,75)
Trimetoprim-sülfametoksazol	8	-	72 (90)
Amikasin	7	-	71 (88,75)
Tigesiklin*	N/A**	N/A	N/A
Kolistin	74	-	6

*Tigesiklin: EUCAST V13.0'da yer alan PK/PD değerine göre değerlendirilmiştir. ** N/A: veri yok

Tigesiklin; EUCAST v.13' de yer alan PK/PD değerine göre değerlendirilmiştir. MİK'i 0,5 mg/l'nin üstünde olan dilüsyonlar değerlendirildiğinde MİK;19 hastada 1 mg/l; 19 hastada 2 mg/l; 27 hastada 4 mg/l ve 2 hastada >4 mg/l olarak belirlenmiştir. On üç hastada ise MİK <0,5 mg/l olarak saptanmıştır.

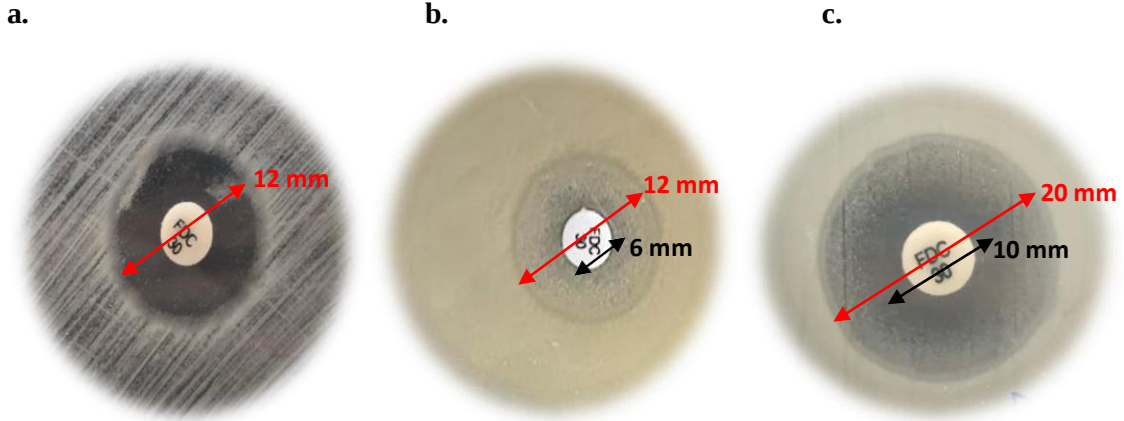
4.3 Sefiderokol Duyarlılık Sonuçları

4.3.1. Disk difüzyon ve gradiyent test sonuçları

Gradiyent test yöntemi ile yapılan validasyon çalışmaları neticesinde *Acinetobacter* spp. suşlarının sefiderokol duyarlılığının belirlenmesinde gradiyent test yönteminin uygun olmadığı bulunmuştur. Bu gerekçe ile çalışmamızda sefiderokol için gradiyent testi kullanılmamıştır.

EUCAST v.14.0 dokümanında *A. baumannii* suşlarında sefiderokol (30 µg disk) için ≥ 17 mm'lik zon çaplarının, PK-PD kırılma noktası olan $S \leq 2$ mg/l'nin altındaki MİK değerlerine karşılık geldiği ifade edilmektedir. Bu doğrultuda disk difüzyon testinde 17 mm ve üzerinde zon çapı oluşturan 65 suş (%81,25) duyarlı saptanmıştır.

İnhibisyon zon çapı <17 mm olan 15 suş (%18,75) disk difüzyon (DD) ile dirençli saptanmış ve bu suşların MİK değerleri >256 mg/l (n:5), 128 mg/l (n:4), 16 mg/l (n:1), 8 mg/l (n:2), 2 mg/l (n:1), 0,5 mg/l (n:2) olarak bulunmuştur.



Resim 4.2 Sefiderokolün disk difüzyon testi ile saptanan farklı şekillerdeki zon içi mikro üreme görüntüleri

FDC: sefiderokol (30 µg) diski

4.3.2. SMD yöntemiyle sefiderokol duyarlılık sonuçları

SMD yöntemi ile çalışılan ve EUCAST kriterlerine göre değerlendirilen 80 *A. baumannii* suşunun %77,5'i (n:62) sefiderokole duyarlı saptanırken MİK değeri >2 mg/l olan 18 suş (%22,5) dirençli bulunmuştur. MİK değerlerinin dağılımı sırasıyla; >256 mg/l (n:7), 128 mg/l (n:6), 16 mg/l (n:1), 8 mg/l (n:2) ve 4 mg/l (n:2) olarak saptanmıştır. SMD yöntemine ait görüntü Resim 4.3 ve Resim 4.4'de verilmiştir.

CLSI klinik sınır değerlerine göre ise 14 suş (%17,5) dirençli, 2 (%2,5) suş yüksek dozda duyarlı, 64 (%80) suş duyarlı bulunmuştur. Dirençli saptanan suşların MİK değerleri sırasıyla; >256 mg/l (n:7), 128 mg/l (n:6), 16 mg/l (n:1) olarak saptanmıştır.

Rehberlere (CLSI ve EUCAST) göre antibiyotik duyarlılık yüzdelerinin dağılımı Tablo 4.4'de gösterilmiştir. EUCAST sınır değerlerine göre tüm suşlardaki sefiderokolün zon çapı ve MİK sonuçlarının karşılaştırılmalı grafiği Tablo 4.5 gösterilmiştir.

Sefiderokol için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 0,25 mg/l, 128 mg/l olarak bulunmuştur. MİK aralığı ise 0,06 – 256 mg/l olarak saptanmıştır.

Tablo 4.4 CLSI ve EUCAST kriterlerine göre sefiderokol direnç oranları

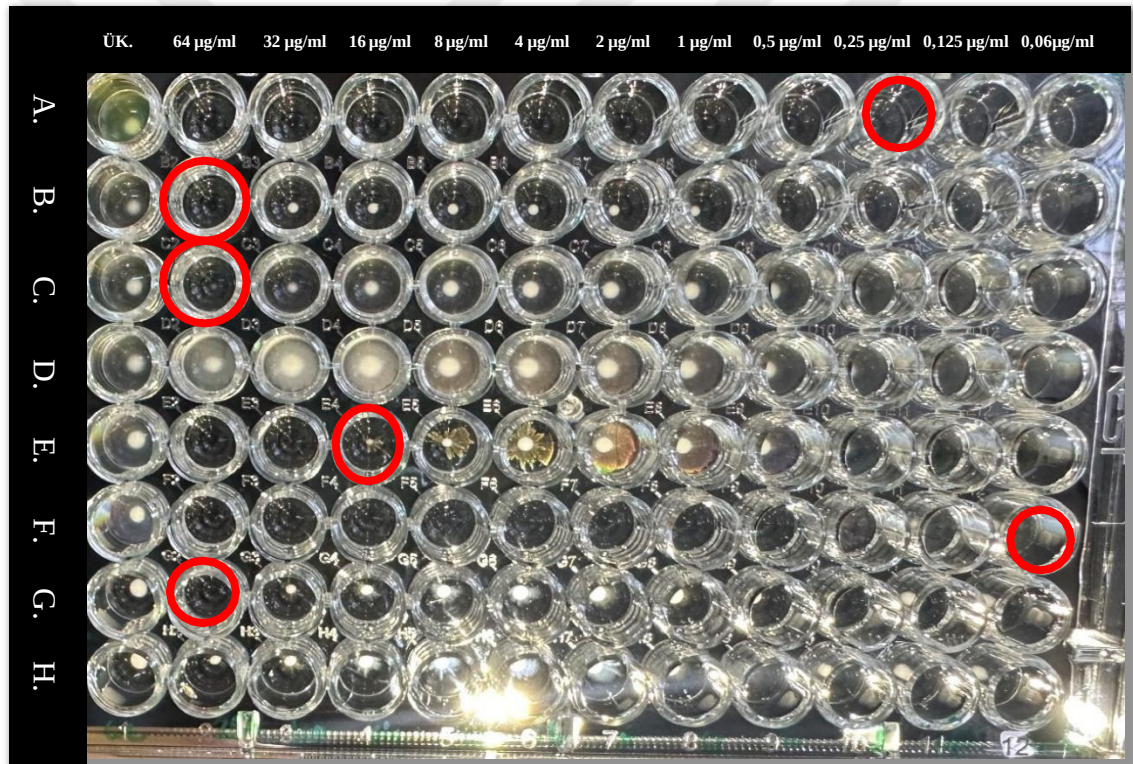
		CLSI			EUCAST	
		S	I	R	S	R
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
FDC	SMD	64 (80)	2 (2,5)	14 (17,5)	62 (77,5)	18 (22,5)
	DD	68 (85)	-	12 (15)	65 (81,25)	15 (18,75)

FDC: sefiderokol SMD: sıvı mikrodilüsyon DD: disk difüzyon



Resim 4.3 Demiri azaltılmış katyon ayarlı MHB besiyerinde sefiderokol mikrodilüsyon deneyinin örnek mikropalak görüntüsü.

A: *P. aeruginosa* ATCC 27853; B: *E. coli* ATCC 25922; C-D- E- F- G-H: Hasta örnekleri BK: besiyeri kontrolü

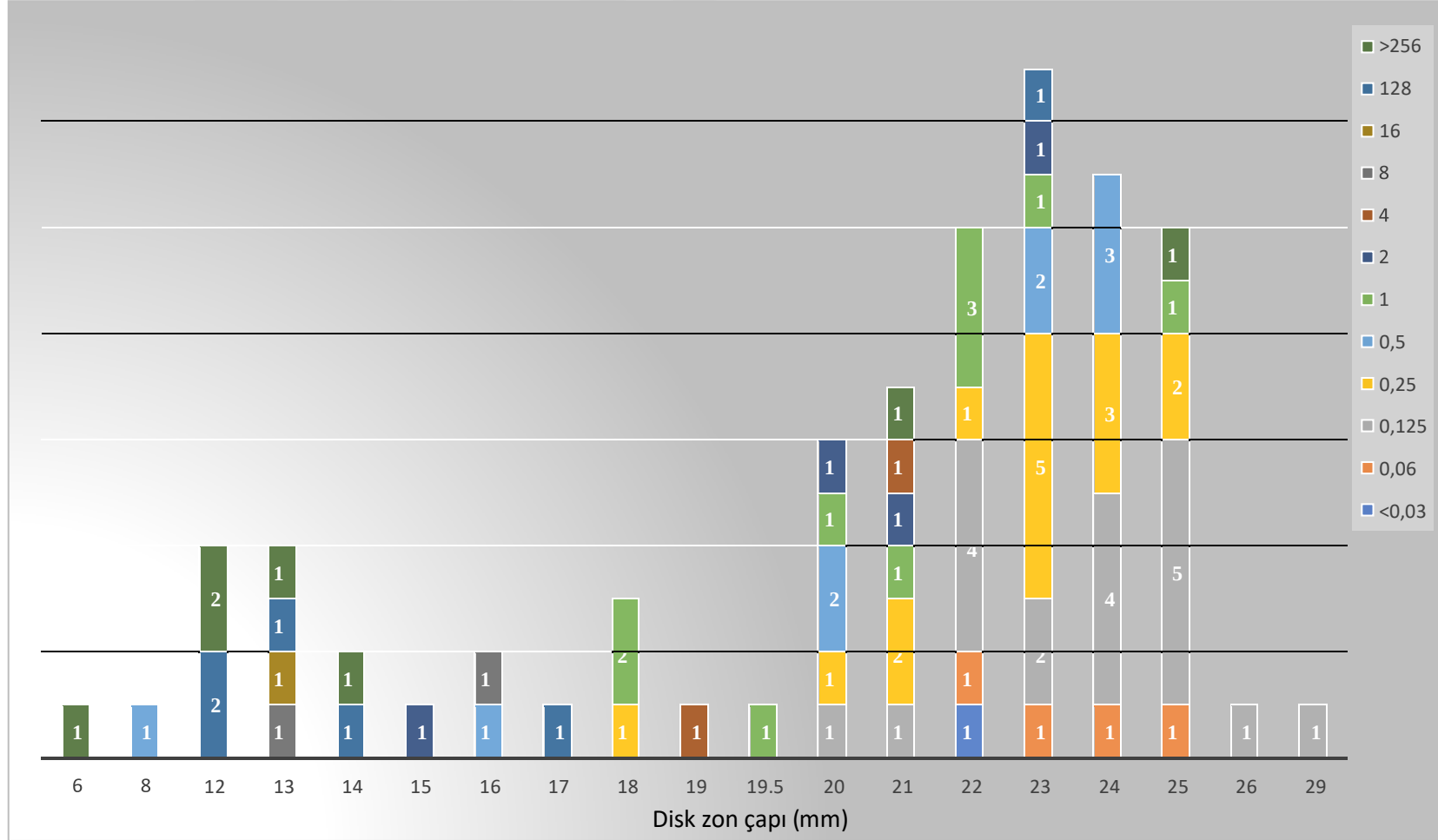


Resim 4.4 Demiri azaltılmış katyon ayarlı MHB besiyerinde sefiderokol mikrodilüsyon deneyinin örnek mikropalak görüntüsü*

A: *P. aeruginosa* ATCC 27853; B: *E. coli* ATCC 25922; C-D- E- F- G-H: Hasta örnekleri.

*2-12 (soldan sağa) iki kat azalan seri dilüsyonlar. D ve H sırasında yer alan suşlarda duyarlılık tespit edilemediği için daha yüksek antibiyotik konsantrasyonu ile test tekrarlanmıştır.

Tablo 4.5 Sefiderokol disk zon çapı ile MİK sonuçlarının dağılımı*



*EUCAST v.14.0 sınır değerlerine göre hazırlanmıştır.

Zon aplarıyla MİK değerleri arasında genel olarak korelasyon görülmekle beraber bazı uyumsuz sonuçlar tespit edilmiştir. Zon apı 17 mm altında olup MİK değeri 2 mg/l'den küçük ve eşit olan 3 suş; tam tersi olarak zon çapı 17 mm üzerinde ve eşit olup MİK değeri 2 mg/l'den büyük olan 6 suş saptanmıştır. Bu sonuçlar karşılaştırmalı olarak Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6 Sefiderokolle uyumsuz sonuç alınan suşların dağılımı*

Suş numarası	FDC zon çapı (mm)	FDC MİK sonucu (mg/l)
8	16	0,5
39	21	4
46	21	>256
56	15	2
67	25	>256
70	19	4
79	8	0,5
113	23	128
116	17	128

*Kırmızı: dirençli klinik sınır değer içerisinde yer alan değerler; Mavi: duyarlı klinik sınır değer içerisinde yer alan değerler

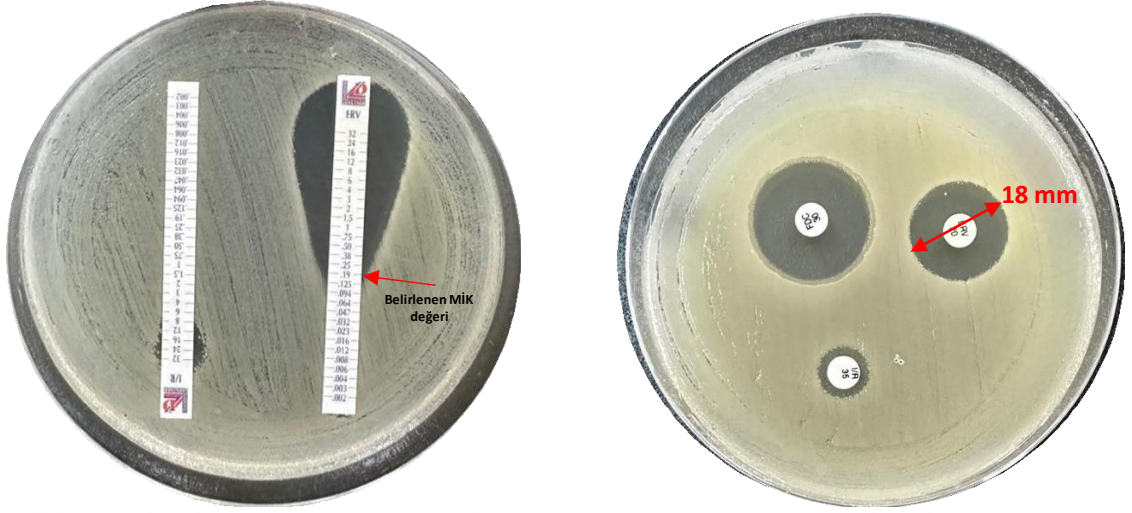
4.4 Eravasiklin Duyarlılık Sonuçları

EUCAST, eravasiklinin tedavide kullanılabilmesi yönünde henüz yeterli kanıt olmadığı görüşündedir. Bu nedenle duyarlılık sonuçlarının S, I veya R şeklinde kategorize edilmeden doğrudan MİK değerlerinin raporlanmasını önermektedir. Bu çalışmada da bu kriter göz önünde bulundurularak tespit edilen zon çapları ve MİK değerleri kategorize edilmeden kaydedilmiş ve değerlendirilmiştir.

Eravasiklin disk difüzyon testi ile saptanan en kk zon çapı 13 mm, en büyük zon çapı ise 27 mm olarak bulunmuştur. Gradiyent test ile saptanan en düşük MİK değeri 0,016 mg/l, en yüksek MİK değeri ise 0,75 mg/l olarak bulunmuştur (Resim 4.5). Suşların MİK değerleri ve MİK değerlerine karşılık gelen zon çapları Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7 Eravasiklin (ERV) zon çapı ve MİK değerlerinin dağılımı

ERV zon çapı (mm)	ERV MİK (mg/l)										
	0,016	0,023	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5	0,75
13									1		
14										1	
15								1		1	1
16							1	1	1	10	3
17						1	2	4	6	4	
18							7	9	2	2	
19						3	2	3	1		
20					1		3				
21					1						
22			1		1						
23		1		1	1		1				
24					1						
27	1										



Resim 4.5 Katyon ayarlı MHA’da eravasiklin disk difüzyon ve gradient testi sonuçlarının görüntüsü

Eravasiklin için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 0,25 mg/l, 0,75 mg/l bulunmuş, $MİK_{Karligh}$ ise 0,016-0,75 mg/l olarak saptanmıştır.

4.4.1 Eravasiklin ve tigesiklin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Çalışmamızda tigesiklin (TGC) için $MİK_{50}$ değeri 2 μ g/ml olarak belirlenmiştir. $MİK$ ’i 2 mg/l olan 19 suş saptanmıştır. Bu suşların ERV $MİK$ sonuçları sırasıyla 0,125 mg/l (n:2); 0,19 mg/l (n:2); 0,25 mg/l (n:8); 0,38 mg/l (n:2); 0,50 mg/l (n:5) olarak bulunmuştur. TGC’in $MİK_{90}$ değeri ise 4 μ g/ml saptanırken $MİK$ ’i 4 mg/l olan 27 suş saptanmıştır. Bu suşların ERV için $MİK$ sonuçları ise sırasıyla 0,19 mg/l (n:4); 0,25 mg/l (n:2); 0,38 mg/l (n:6); 0,50 mg/l (n:12); 0,75 mg/l (n:3) olarak bulunmuştur. Her iki antibiyotik için $MİK$ dağılımları Tablo 4.8’de detaylı olarak gösterilmiştir.

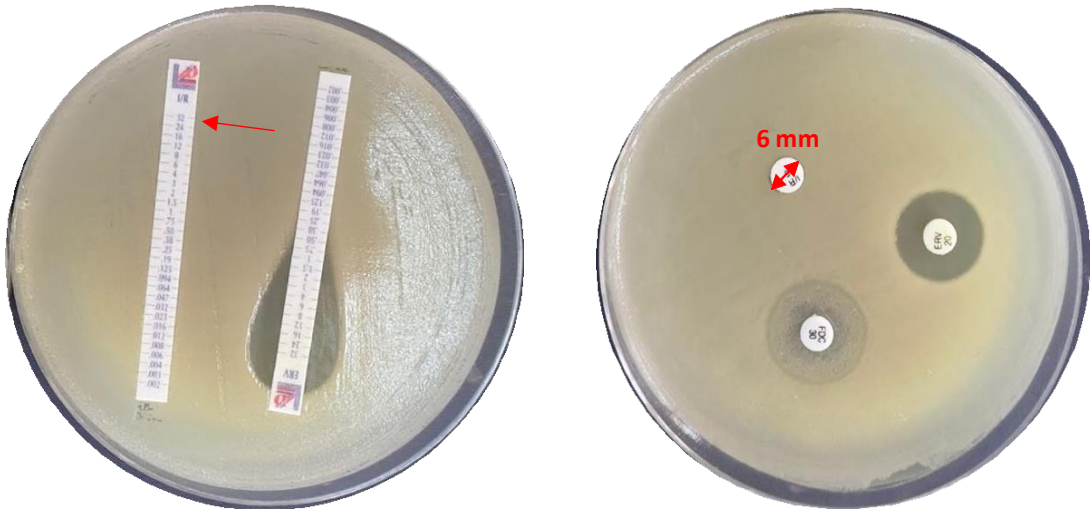
Tablo 4.8 Eravasiklin (ERV) MİK - zon çapı dağılımı ile tigesiklin (TGC) MİK sonuçlarının karşılaştırması

		ERV zon çapı (mm/n)													Total (n)
TGC MİK	ERV MİK	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	27	
<0.5															13
	0.023											1			1
	0.064											1			1
	0.094											1			1
	0.125							2							2
	0.19						1	1				1			3
	0.25						3	1							4
	0.94												1		1
1															19
	0.016													1	1
	0.032										1				1
	0.094								1	1					2
	0.19				1		3		3						7
	0.25					2	1	1							4
	0.38					3									3
	0.50				1										1
2															19
	0.125					1		1							2
	0.19					1	1								2
	0.25			1	1	2	3	1							8
	0.38					2									2
	0.50				3	2									5
4															27
	0.19					1	2	1							4
	0.25						2								2
	0.38	1			1	1	2	1							6
	0.50		1	1	6	2	2								12
	0.75			1	2										3
>4															2
	0.094										1				1
	0.75				1										1
Total (n)		1	1	3	16	17	20	9	4	1	2	4	1	1	80

4.5 İmipenem-relebaktam Duyarlılık Sonuçları

İmipenem-relebaktamın *A. baumannii* açısından değerlendirilmesi için CLSI tarafından bilgi verilmemektedir. EUCAST ise beta-laktamazların ya ana karbapenemi modifiye etmeyeceğini ya da inhibitör tarafından yeterince inhibe edilmeyeceğini bu nedenle beta-laktamaz inhibitörünün eklenmesinin klinik fayda sağlamayacağını belirterek imipenem-relebaktam için herhangi bir klinik sınır değer bildirmemektedir. Budoğrultuda imipenem-relebaktam için tespit edilen zon çapları ve MİK değerleri kategorize edilmeden kaydedilmiş ve değerlendirilmiştir.

DD deneylerinde 64 suşta imipenem-relebaktam diskinin dibine kadar (6 mm) üreme gözlenirken, bu suşların MİK değerleri $>32 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (Resim 4.6). Zon çapları sırasıyla 11 mm ve 14 mm olan iki suşun MİK'i 12 mg/l olarak saptanırken, zon çapı 10 mm ölçülen bir suşun MİK'i 32 mg/l olarak bulunmuştur. Saptanan zon çapları ve MİK değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 4.9'da gösterilmiştir.



Resim 4.6 Katyon ayarlı MHA'da imipenem-relebaktam gradiyent test ve disk difüzyon testi sonuçlarının görüntüsü

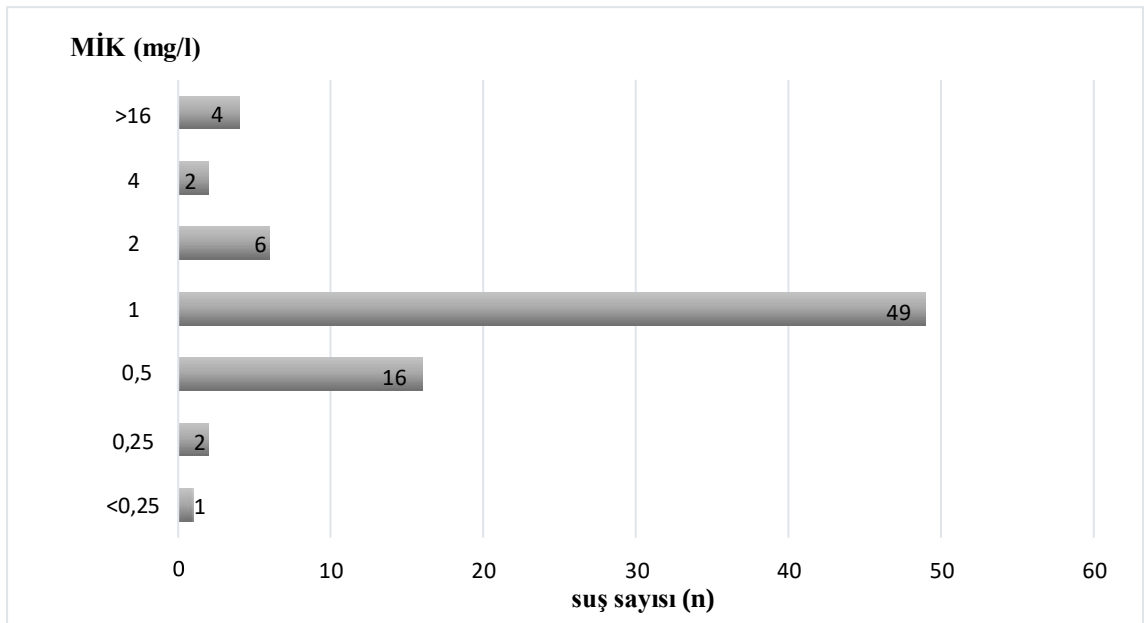
Tablo 4.9 İmipenem-relebaktam için saptanan zon çapları ve MİK değerlerinin dağılımı

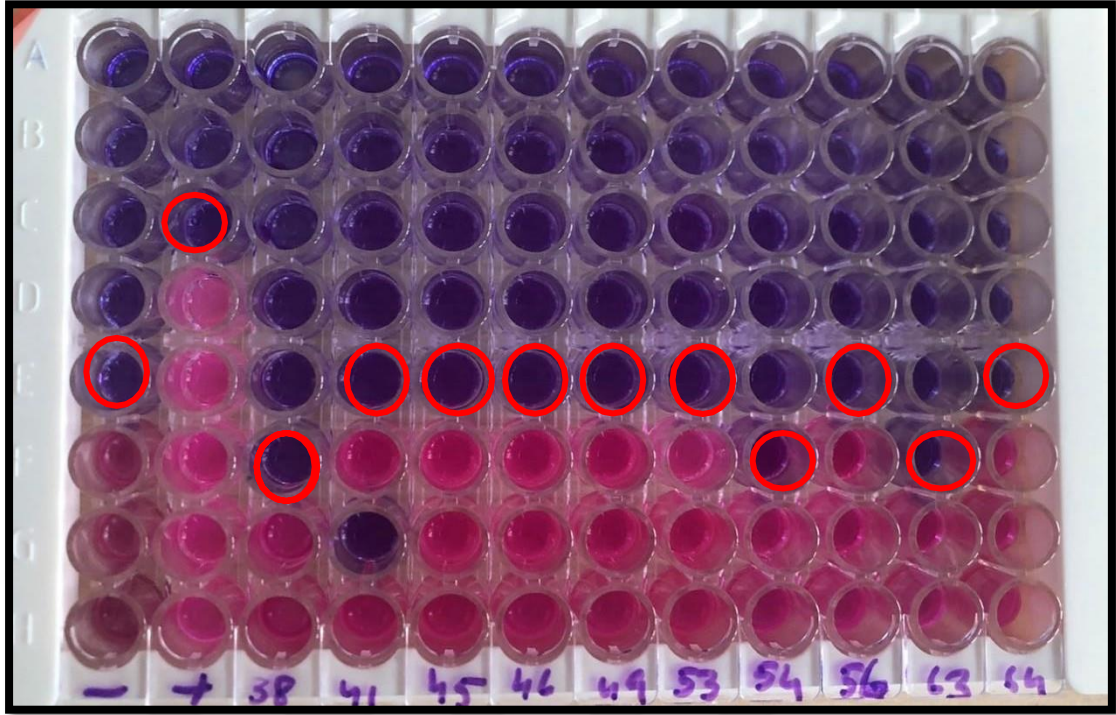
İmipenem-relebaktam	MİK (mg/l)		
	12	32	>32
Zon çapı (mm)	n		
6			64
8			4
9			8
10		1	1
11	1		
14	1		

4.6 Kolistin Duyarlılık Sonuçları

Kolistin direnci %7,5 (6/80) olarak saptanmıştır. MİK saptama aralıkları 0,25- >16 mg/l olan ticari kit kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde üç kere tekrar edilmesine rağmen sadece bir suşta MİK değeri belirlenememiş ve bu suşun MİK değeri <0,25 mg/l olarak kabul edilmiştir. Kolistin SMD deneyinin mikropalak görüntüsü Resim 4.7’de, kolistin MİK değerlerinin dağılımı Tablo 4.10’da gösterilmiştir.

Tablo 4.10 Kolistin MİK değerlerinin dağılımı





Resim 4.7 Kolistin SMD deneyinin mikropalak görüntüsü

(-): Negatif kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853); (+): Pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 13846 - mcr pozitif); No:38-64 hasta örnekleri; Kırmızı çemberler ile gösterilen yerler suşların MİK değerlerini vermektedir.

Çalışmamızda yer alan yeni antibiyotikler ile klinikte MDR tedavisinde en sık tercih edilen ilaçların MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerinin karşılaştırmalı sonuçları Tablo-4.11’de gösterilmiştir.

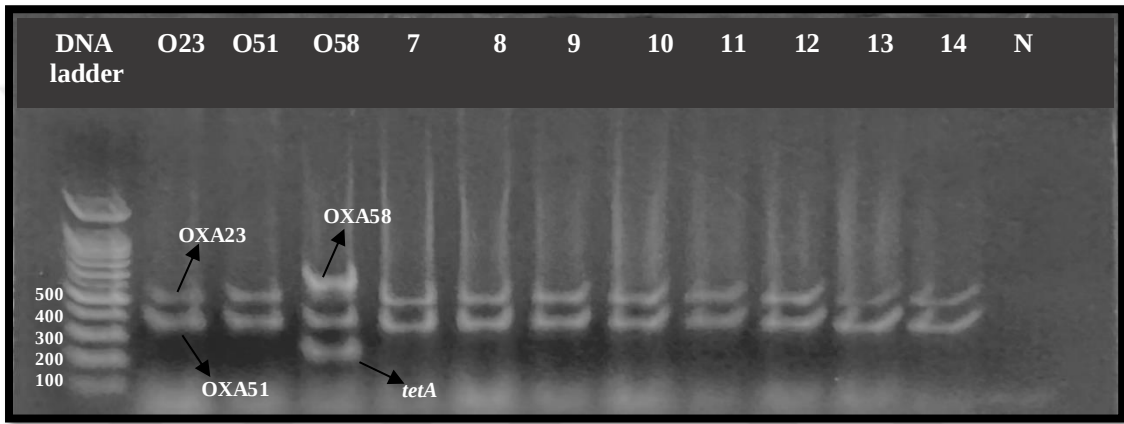
Tablo 4.11 Çalışmada yer alan antibiyotiklerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile MİK aralıkları

Antibiyotik	MİK ₅₀ (mg/l)	MİK ₉₀ (mg/l)	MİK Aralığı (mg/l)
Kolisitin	1	2	<0,25 – >16
Sefiderokol	0,25	128	0,06 – 256
Eravasiklin	0,25	0,75	0,016 – 0,75
Tigesiklin	2	4	0,5 – >4

4.7 PCR Sonuçları

VİTEK-2 otomatize sistemi ile tanımlanıp fenotipik olarak karbapenem direnci belirlenmiş olan tüm suşlara *A. baumannii*'ye özgü kromozomal gen grubu olan *bla*_{OXA51}'in yanı sıra, literatürde karbapenem direncinden sorumlu olduğu belirtilen *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA58} ve optimize edilmiş PCR ile *bla*_{OXA24} gen gruplarının varlığı araştırılmıştır.

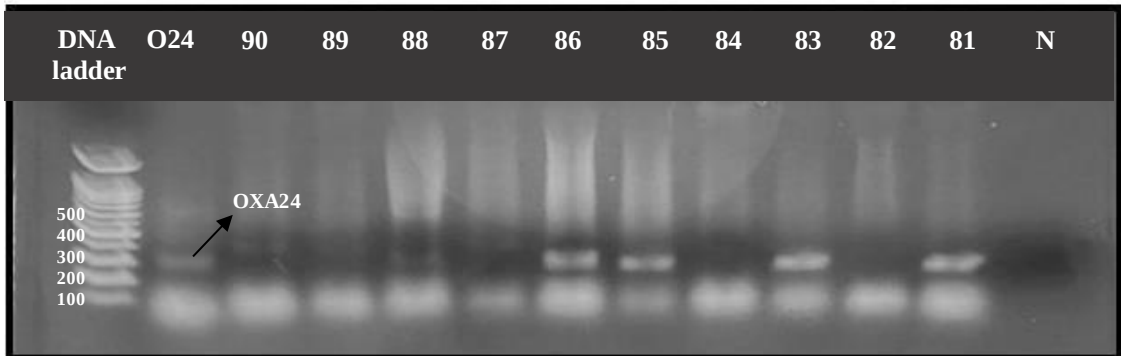
A.baumannii'nin yapısal gen bölgesi olan *bla*_{OXA51} ile tür düzeyinde doğrulama yapıp tüm suşlarda tespit edilmiştir. *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58} gen gruplarına ait jel elektroforez görüntüsü Resim 4.8'de verilmiştir.



Resim 4.8 OXA-23 ve OXA-51 pozitif hastalara ait PCR jel görüntüsü.

O23: *bla*_{OXA23} pozitif kontrol (501 bp); O51: *bla*_{OXA51} pozitif kontrol (353 bp); O58: *bla*_{OXA58} (599 bp) ve *tetA* (210 bp) pozitif kontrol; N: negatif kontrol; 7-14: OXA-23 ve OXA-51 pozitif hasta örnekleri.

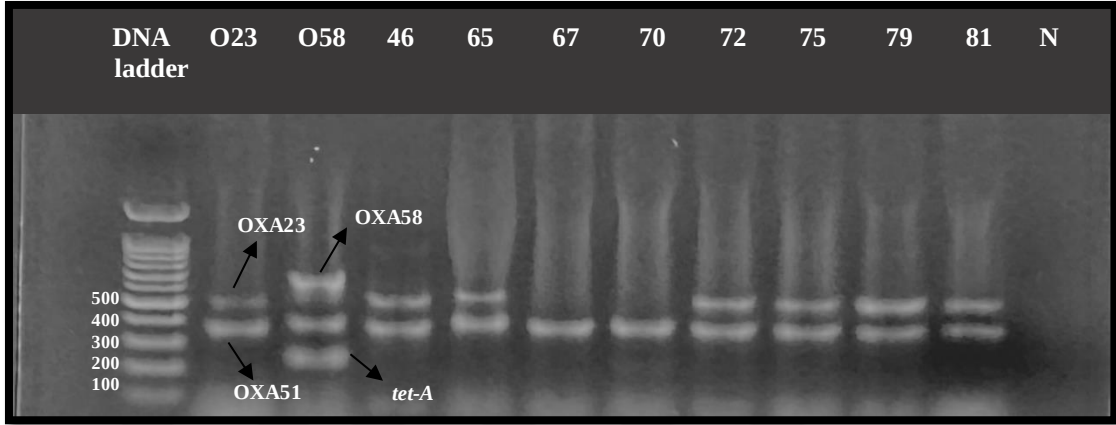
İzolatların 66'sında (%82,5) *bla*_{OXA23} gen bölgesi pozitifliği; 14'ünde (%17,5) *bla*_{OXA24} gen bölgesi pozitifliği saptanmıştır. *bla*_{OXA24} gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü Resim 4.9'da verilmiştir.



Resim 4.9 OXA-24 pozitif hastalara ait PCR jel görüntüsü.

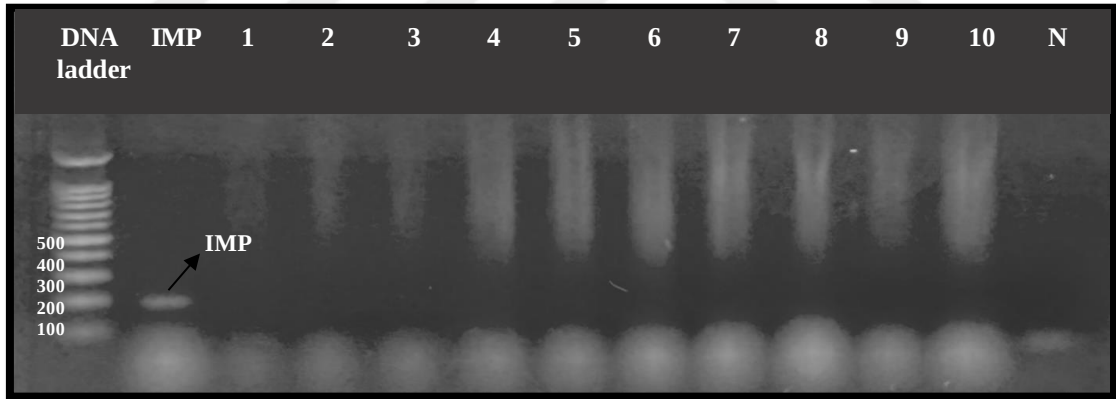
O24: *bla*_{OXA24} pozitif kontrol (246 bp) N: negatif kontrol. 86, 85, 83, 81: OXA-24 pozitif hasta örnekleri.

Dışa akış pompasını kodlayan ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerdeki direncin saptanmasında rol alan *tetA* gen bölgesini tanımlamak için yapılan jel elektroforez görüntüsü Resim 4.10’da verilmiştir. Karbapenem direnci için IMP’yi kodlayan gen bölgesi araştırılmıştır. Resim 4.11’de çalışmadan bir örnek gösterilmiştir.



Resim 4.10 *tetA* araştırması için yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

O23: *bla*_{OXA23} pozitif kontrol (501 bp), **O58:** *bla*_{OXA58} ve *tetA* pozitif kontrol (599 bp) (*bla*_{tet-A}: 210 bp), N: negatif kontrol 46, 65, 72, 75, 81: OXA-23 ve OXA-51 pozitif hasta örnekleri; 67 ve 70: OXA-51 pozitif hasta örnekleri.



Resim 4.11 IMP araştırması için yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

IMP: *bla*_{IMP} pozitif kontrol (236 bp); N: negatif kontrol; 1-10 negatif hasta örnekleri.

Suşların hiçbirinde *bla*_{OXA58}, *tetA* ve *bla*_{IMP} gen bölgelerine rastlanılmamıştır. *A. baumannii* suşlarında saptanan direnç genleri Tablo 4.12’de gösterilmiştir.

Tablo 4.12 *A. baumannii* suşlarında direnç genlerinin dağılımı

Gen bölgeleri	Pozitif (n)	Negatif (n)
<i>bla</i> _{OXA23}	66	14
<i>bla</i> _{OXA24}	29	51
<i>bla</i> _{OXA51}	80	-
<i>bla</i> _{OXA58}	-	80
<i>tetA</i>	-	80
<i>bla</i> _{IMP}	-	80

OXA-24 pozitif(+) saptanan 29 suş incelendiğinde; 18 tanesi OXA-23 de (+) bulunmuştur.

Her iki gen bölgesi (+) saptanan 18 suşun içinde yer alan 4 suşa ait sefiderokol MİK sonuçları; >256 mg/l (n:3), 128 mg/l (n:1) olarak saptanmıştır (Tablo 4.13). Disk difüzyon zon çapları ise <17 mm'dır.

Tablo 4.13 Sefiderokol (FDC) MİK $\geq$ 2 mg/l değerine göre direnç gen bölgeleri

Suş numarası	FDC MİK (mg/l)	OXA-23	OXA-24
25	16	POZ ^a	NEG ^b
27	128	POZ	NEG
39	4	POZ	NEG
46	>256	POZ	NEG
67	>256	NEG	POZ
70	4	NEG	POZ
75	>256	POZ	POZ
82	>256	POZ	NEG
83	>256	POZ	POZ
85	>256	POZ	POZ
86	128	POZ	POZ
88	8	POZ	NEG
98	128	POZ	NEG
99	>256	POZ	NEG
109	8	POZ	NEG
111	128	POZ	NEG
113	128	POZ	NEG
116	128	POZ	NEG

^aPOZ: Pozitif; ^bNEG: Negatif

OXA-23 (+) saptanan suşlardaki sefiderokol, eravasiklin ve kolistin MİK₉₀ değerleri sırasıyla; 128 mg/l, 0,5 mg/l ve 2 mg/l saptanmıştır. OXA-24 (+) saptanan suşlardaki dağılımda ise tek fark sefiderokolde olup MİK₉₀ sonucu >256 mg/l olarak gözlemlenmiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.14 Sefiderokolün saptanan OXA beta-laktamaz genotiplerine göre in-vitro aktivitesi

Etken/betalaktamaz genotip	MİK ₉₀ (mg/l)		
	FDC	ERV	COL
<i>A. baumannii</i> (n)			
OXA-23 (66)	128	0,5	2
OXA-24 (29)	>256	0,5	2

FDC: sefiderokol, ERV: eravasiklin, COL: kolistin

Yatan hastalardan izole edilen suşlardaki genotipik dağılımı incelediğimizde yoğun bakım servisleri ve diğer yataklı servislerde OXA-23 pozitifliği daha yüksek gözlemlenmiştir. Tablo 4.15'te OXA-23 ve OXA-24 dağılım oranları gösterilmiştir.

Tablo 4.15 Yatan hastalarda saptanan OXA beta-laktamaz genlerinin kliniklere göre dağılımı

Gönderilen birim (n)	OXA-23 n (%)	OXA-24 n (%)
Yoğun bakım Üniteleri (37)	29 (78,4)	18 (48,6)
Servisler (29)	24 (82,7)	10 (34,5)

5. TARTIŞMA

A. baumannii; pnömoni, kan dolaşımı, idrar yolu ve yara enfeksiyonları gibi sağlık hizmetleriyle ilişkili çeşitli enfeksiyonlarda kilit rol oynayan klinik öneme sahip baskın tür olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, daha az oranda da olsa toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Salgınlara yol açan *A. baumannii* izolatları genellikle karbapenemlere direnç göstermekte ve tigesikline karşı orta düzeyde direnç sergilemektedir. Çoklu ilaca dirençli (MDR) ya da aşırı ilaca dirençli (XDR) olan bu *A. baumannii* suşları (MDR-AB ve XDR-AB) tipik olarak kolistin duyarlılığını korumaktadır. Neticede, *A. baumannii* enfeksiyonlarına yönelik tedavi seçenekleri kısıtlanmakta ve bu durum özellikle kritik hastalarda yüksek ölüm oranlarına yol açmaktadır. DSÖ, 2017 yılında yayımladığı raporda, karbapeneme dirençli *A. baumannii*'yi (CRAB) "kritik öneme sahip 1. öncelikli" patojen olarak belirlemiş ve yenisentibiyotiklerin geliştirilmesini gerektiren küresel olarak öncelikli antibiyotiğe dirençli bakteriler arasında ilk sırada olduğunu vurgulamıştır (1, 105).

Son yıllarda, *A. baumannii*'de özellikle son basamak antibiyotik tedavisine karşı antimikrobiyal direncin yaygınlaşması alarm vermiştir. Bu nedenle, yeni tedavi stratejileri sağlamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Dirençli enfeksiyonların tedavisi için hızlı, uygun maliyetli ve cazip bir yöntem olarak öncelikle mevcut antimikrobiyal ajanların yeni terapötik amaçlar için değerlendirilmesi (ilacı yeniden işlevlendirme) yoluna gidilmiştir (18).

Avrupa ülkelerinin tamamının katıldığı 16 ülkenin verilerinin değerlendirildiği CAESAR (Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance) çalışması ve Avrupa Ekonomik Alanı (AEA)'nda (İrlanda ve Norveç dahil) 29 ülkenin katıldığı EARS-NET (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) çalışmalarının 2021 raporlarında elde edilen veriler, DSÖ Avrupa Bölgesi'nde antibiyotik direncinin hala yaygın bir sorun olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (30, 106).

CAESAR ve EAR-NET verilerine göre *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de saptanan üçüncü nesil sefalosporinlere karşı yüksek direnç yüzdeleri ile özellikle karbapeneme dirençli *Acinetobacter* türlerinin gösterdiği yüksek direnç oranları endişe vericidir (30, 106).

CAESAR çalışmasına veri gönderen 13 ülkenin 2021 verileri 2020 yılı verileriyle karşılaştırıldığında izolat direnç dağılımında; *Acinetobacter* spp.'de %50, *E. coli*'de %26, *K. pneumoniae*'de %36 oranında artış saptanmıştır. Çoğunlukla *A. baumannii* kompleksi olmak üzere *Acinetobacter* spp. izolatlarındaki bu direnç artışının, 2021 yılında Avrupa Birliği/AEA'daki en çarpıcı bulgulardan birisi olduğu gösterilmiştir (106).

EARIS-NET'e bildirilen *Acinetobacter* spp. izolatlarının neredeyse dörtte üçü (%74,5) gözetim altındaki antimikrobiyal gruplardan (florokinolonlar, aminoglikozidler ve karbapenemler) en az birine dirençli bulunmuştur. Yine aynı raporda invazif izolatlardaki karbapenem direnci %93,3 oranında bildirilirken %84,8 oranında çoklu ilaç direnci bildirilmiştir (30). MDR-AB ve XDR-AB enfeksiyonlarının tedavileri için oluşturulmuş en iyi rejim hala net bir şekilde oluşturulamamıştır. Kolistin, karbapenem dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında son çare antibiyotik olarak yaygın kullanılmaktadır. Ancak nefrotoksisite gibi ciddi yan etkileri, heterojen direnç gelişimi ve azalmış penetrasyon problemleri söz konusudur (107). Ve özellikle son yıllarda dünyanın farklı bölgelerinden kolistin kullanımına bağlı dirençli suşlar da bildirilmektedir. Çin'de üç merkeze ait örneklerin değerlendirildiği Shandog Üniversitesinde yapılan çalışmada 25 XDR-AB izolatları içerisinde üç suşta (%12) kolistin direnci saptanmıştır (108). Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada çoğunluğu yoğun bakım ünitesinden olmak üzere izole edilen karbapenem dirençli nonfermentatif Gram negatif çomakların %32,9'u *Acinetobacter* spp. olarak bulunmuş ve bu suşlarda kolistin direnci ise %6,8 olarak saptanmıştır (109). Maraki ve ark. (110) 2010-2014 yılları arasında *A. baumannii* izolatlarını yıllara göre incelediklerinde %3,4-%7,9 arasında değişen kolistin direnci saptamışlardır. Marcos Eduardo ve ark. (111) çalışmalarında kolistin direncini %3,1, Gao ve ark. %3 (112) ile Gales ve ark. (113) ise %1,2 olarak tespit etmişlerdir. Genel olarak dünya geneline bakıldığında kolistin direncinin %7'nin altında bulunduğu görülmekle birlikte Güney Kore ve İspanya gibi bazı ülkelerde bu oran sırasıyla %40,6 ve %30,6'lara kadar çıkmaktadır (114).

Türkiye, kolistin direnci bakımından yüksek riske sahip ülkeler arasındadır ancak, Asya ülkelerindeki kadar yüksek bir direnç oranı beklenmemektedir. Bu doğrultuda yapılan literatür taramasında Türkiye'ye ait verilerde kolistin direncinin yaklaşık %1-7 arasında olduğu gözlenmiştir. Çok merkezli yapılan bir çalışmada ülkemizdeki kolistin direnci %6,2 olarak rapor edilmiştir (114). Yolbaş ve ark.

(115)'nın, 2010-2011 yılları arasında yaptıkları çalışmada %6 oranında kolistin direnci saptanmıştır. On farklı merkezin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Acinetobacter* spp. suşlarının dahil edildiği bir başka çalışmada ise kolistin direnci %1,2 oranında bulunurken (116), Çetinkol ve ark. (117)'nin gerçekleştirdiği çalışmada kolistin direncine rastlanmamıştır. Gür ve ark. (118)'nin 2019 yılında yaptığı çalışmada ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile %28 oranında direnç saptanırken gradyan test yöntemi ile bu oran %4 olarak bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında gradyan testlerinin yapılması daha kolay olması nedeniyle önerilmektedir, ancak Gür ve ark. (118)'nin çalışmasında görüldüğü gibi dirençli suşları gözden kaçırma ihtimali nedeniyle kolistin tedavisinde klinisyen için yanıltıcı sonuçlara neden olabilmektedir. EUCAST kolistin duyarlılığı için altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılmasını önermektedir.

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 80 *A. baumannii* suşunun VİTEK otomatize sistemi ile tam identifikasyonu yapıp kolistin duyarlılığı için referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış ve kolistine direnç oranı %7,5 olarak belirlenmiştir. Dünya literatüründeki verilerle karşılaştırıldığında ise bu sonuç özellikle bölgesel komşuluğunda yer aldığımız Yunanistan ile oldukça benzerlik göstermektedir. Kolistin halen MDR ve pan-rezistan suşlarla gelişen enfeksiyon vakalarında başka alternatif olmadığı gerekçesi ile tedavi protokolü içerisinde yer almakta ve ancak özellikle pan-rezistan suşlarda yüksek dozlarda verilmesiyle süreç yönetilmektedir. Bu da klinisyenin ciddi yanetkilere karşı ilaç tedavisini düzenlemek zorunda kalmasına neden olmaktadır. Bu kısır döngüyü kırabilmek için yeni tedavi rejimleri geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmamızda pan-rezistan olarak saptanan 6 suşun bu amaç doğrultusunda geliştirilen yeni antibiyotiklerden sefiderokol, eravasiklin ve imipenem-relebaktama duyarlılıkları incelendiğinde sefiderokol MİK ve zon çapları duyarlı kategoride saptanmıştır. Eravasiklin için klinik sınır değer verisi henüz bulunmadığından değerlendirmeler MİK₉₀ üzerinden gerçekleştirilmiş ve tüm suşların MİK₉₀ değeri 0,75 µg/ml bulunmuştur. Kolistine dirençli olan izolatlarda ise eravasiklin MİK değerleri MİK₉₀ değerinin altında saptanmıştır. Bunun aksine tüm suşlar imipenem-relebaktama dirençli tespit edilmiştir.

ESKAPE grubu içerisinde yer alan *A. baumannii*; birçok antibiyotiğe karşı kromozomal ve kazanılmış direnci ve farklı vücut bölgelerini enfekte etme yeteneği

nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Sefiderokol, Gram negatif bakterilere karşı ve özellikle *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı kayda değer etkinlik gösteren yeni geliştirilmiş bir sefalosporindir. Diğer siderofor-içerikli moleküllerden yapısal olarak farklı olan ve çeşitli serin tipi ve metallo tipi karbapenemazlara ayrıca ESBL'lere karşı yüksek stabilite gösteren yeni bir katekol subüniti içeren siderofor özelliğindedir (119). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda bakteri suşları duyarlı olsa bile tedavi başarısızlığı bildirilen vakalar mevcuttur (78). Ekim 2019'da idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi için FDA tarafından onaylanmış olup, bunu takiben Eylül 2020'de hastane kökenli ve ventilatör ilişkili bakteriyel pnömoni tedavisi için de onay almıştır (119). Ayrıca EMA tarafından onaylanan, sınırlı tedavi seçenekleri olan Gram negatif aerobik patojenlere bağlı enfeksiyonları olan hastalarda kullanılmaktadır. Bu kullanım kararı, farmakokinetik ve farmakodinamik analizler ile 80 hastanın sefiderokol (Fetroja) ile ve 38 hastanın karbapeneme dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar için mevcut antibiyotiklerle tedavi edildiği randomize bir klinik çalışmanın sınırlı verilerine dayanmaktadır (120).

Sefiderokol, hücre içerisine aktif demir taşıyıcı özelliğe sahip siderofor kısmı ile giriş yapmaktadır. Bu benzersiz özelliğinin in-vitro çalışmalardaki antibiyotik duyarlılık testi için de bir dezavantaj olabileceği düşünülmektedir. Bu durum ayrıca EUCAST ve CLSI tarafından oluşturulan yorumlayıcı kriterlerdeki farklılıkları da beraberinde getirmiştir. İn-vitro koşullarda AST'nin doğru yorumlanabilmesi ve siderofor aracılı mekanizmadan etkilenmemesi için demiri azaltılmış bir ortama ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ortamın sağlanması için gereken işlemlerin karmaşıklığı ve MİK'lerin okunmasında yaşanabilecek zorluklara rağmen SMD'nin altın standart yöntem olduğuna dair fikir birliğine varılmıştır. SMD yönteminin önemli ölçüde emek ve zaman gerektiren bir yöntem olması nedeniyle disk difüzyon ve gradient test yöntemleri birçok laboratuvar da daha hızlı ve basit bir alternatif yöntem olarak görülmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla rehberlerde bu görüş doğrultusunda, disk difüzyon yöntemiyle de testlerin uygulanabileceği ancak, yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre optimum sonuçların elde edilebilmesi için önerilen belirli ticari marka disk ve katyon ayarlı MHA besiyerlerinin kullanılması gerektiği belirtilmektedir (121).

Çalışmamızda hem referans yöntem olan SMD hem de disk difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu iki yöntemin avantaj ve dezavantajları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Öncelikle SMD yönteminde kullanılması gereken demiri

azaltılmış katyon ayarlı-MHB besiyerinin hazırlanması oldukça zahmetli ve neredeyse bir çalışma mesaisi kadar süre gerektiren işlemler içermesi sebebiyle rutin laboratuvarlarda uygulanmasının zor olduğu görülmüştür. Ayrıca besiyeri elde edildikten sonra demirin istenilen düzeyde azaldığının ve eklenen iyonların istenen oranlarda olduğunun anlaşılabilmesi için genellikle biyokimya laboratuvarında aktif olarak kullanılan iyon spektrofotometri cihazı ile doğrulama yapılması gerekmektedir. SMD yöntemi ile ilgili bir diğer zorluk ise sefiderokol tozunun ticari olarak düşük gramajda sağlanabilmesi ve cam şişe içinde antibiyotiğin yüzeye fiks olması sebebiyle çözündürme işleminin oldukça dikkatli yapılması ve vorteks yardımıyla uzunca bir çalkalama işlemine tabi tutulmasını gerektirmesidir. Deney hazırlık aşamasında yaşanabilecek herhangi bir aksiliğin deneyin yapılışını ve değerlendirmesini de etkileyeceği açıktır. Disk difüzyon yönteminde ise deney hazırlık aşamasında ve deneyin gerçekleştirilmesinde herhangi bir olumsuzluk yaşanmamıştır.

Sefiderokol ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlara göre EUCAST rehberi dikkate alındığında SMD yöntemiyle suşların %77,5'i, DD yöntemiyle ise %81,25'i duyarlı saptanmıştır. CLSI rehberi esas alındığında ise oranlar sırasıyla %80 ve %85 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda olduğu gibi neredeyse diğer tüm çalışmalarda referans yöntemin esas alındığı ve beraberinde DD ile değerlendirmeye tabi tutulduğu görülmüştür. Sadece Mayo Kliniğe ait bir çalışmada SMD yöntemi, agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır (122). Diğer çalışmalardaki sonuçlar değerlendirildiğinde referans olarak EUCAST kriterlerinin dikkate alınması durumunda duyarlılık oranlarının CLSI kriterlerine göre daha düşük saptandığı ve bu sonucun çalışmamızla benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Genel olarak sefiderokol duyarlılığı %50 ila %99 aralığında değişen geniş bir dağılım göstermektedir. Tablo 5.1'de farklı ülkelerde yürütülmüş çalışmalara ait duyarlılık yüzdeleri ve bu sonuçların elde edildiği yöntemler detaylı olarak verilmiştir. DD yöntemiyle değerlendirilen antibiyotik duyarlılık sonuçları görece SMD'den daha duyarlı bulunmuştur. Bu durumda gerçekte MİK değeri yüksek olan suşların DD ile test edilmesi durumunda gözden kaçabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak sadece John Hopkins hastanesinde yapılan çalışmadan paylaşılan verilerde klinik sınır değer CLSI kriterlerine göre belirlendiğinde SMD yöntemi DD'den daha duyarlı saptanırken EUCAST referans alındığında hem bizim sonuçlarımızla hem de diğer çalışmaların sonuçlarıyla korelasyon göstererek DD

yöntemi daha duyarlı saptanmıştır (123). Ayrıca bu tabloda göze çarpan diğer bir sonuç, Mayo klinikte yapılan agar dilüsyon ve SMD yönteminin karşılaştırıldığı ve SMD yönteminin agar dilüsyona göre daha duyarlı saptandığı sonuçtur (122). Ancak literatürde bu sonucu destekleyen henüz yeterli çalışma olmadığı için tek merkezli yapılan bir çalışma ile kesin bir çıkarımda bulunulamayacağı bilinmektedir.

SMD ile sonuçların daha dirençli saptanmasının sebebinin sefiderokol MİK'lerinin okunması esnasında yaşanabilecek sorunlardan dolayı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü sefiderokol için SMD yöntemiyle değerlendirmede EUCAST'egöre suşa ait MİK değerinin, üreme azalmasının <1mm'lik bir "end-point" noktasının veya hafif/silik bulanıklık gözlemlenen ilk kuyucuk olarak tespit edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Ancak SMD yönteminde "end-point" noktasını takip eden üreme kontrolüne göre zayıf üreme gösteren birden fazla kuyucuğun gözlemlenmesi olarak tanımlanan farklı uç noktalar gözlemlenebilmektedir (123). Dolayısıyla bu durumun MİK okunmasında zorluğa neden olabileceğini düşünmekteyiz. Yaşanan bu zorluk nedeniyle yanlış okuma sonucu, dolaylı olarak MİK değerinin olması gereken değerden daha yüksek kabul edilmesine neden olabilmektedir (124). Bu durumu açıklayabilecek diğer bir nokta ise in-vitro olarak sonucun doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için (sefiderokolün demir mekanizması üzerinden gerçekleştirdiği biyostatik etkisi nedeniyle) demiri azaltılmış katyon ayarlı MHB besiyerinin hazırlanması sırasındaki demir şelasyon işleminin optimum seviyede yapılması gerekliliğidir. Demirin yeterince uzaklaştırılamaması halinde ortamda istenen miktardan daha fazla +2 değerlikli iyonların bulunmasının, SMD'de MİK'lerin yüksek çıkmasında rol oynayabileceğini düşünmekteyiz. Ito ve ark. (125)'nın yaptığı çalışmada da sefiderokolün non-fermantatif Gram negatif bakterilerde in-vitro antibakteriyel aktivitesinin, demirden yoksun ortamda arttığı ve antibiyotiğin katekol kısmının demir ile şelasyona uğratılmasının gerekli olduğu belirtilmiştir.

Sefiderokolün DD yöntemiyle değerlendirilmesinde dikkati çeken bir gözlem ise zon içi mikro üremelerdir. Çalışmamızda 12 şuşta zon içi üreme tespit edilmiştir. Dış zon çapı ölçüldüğünde EUCAST'a göre dokuz suş (CLSI'a göre sekiz suş) dirençli olarak saptanmıştır. Diğer bir ifadeyle, zon içi üreme gözlemlenen EUCAST'a göre üç suş, CLSI göre ise dört suş duyarlı saptanmıştır. EUCAST'a göre duyarlı saptanan üç suşun aynı rehber göre MİK değerleri incelendiğinde biri dirençli (MİK: 128 mg/l), diğer ikisi duyarlı (MİK: 2 mg/l ve 1 mg/l) kategorisinde

bulunmuştur. Liu ve ark. (126) da yaptıkları çalışmada dört suşta inhibisyon bölgesi içinde tek tek veya kumsal benzeri (“beach-like”) koloniler gözlemlemişlerdir. Zon içinde üreme olan suşların MİK değerlerini ise düşük saptamışlardır. Fransa’da Jeannot ve ark. (127) tarafından yapılan diğer bir çalışmada bizim sonuçlarımıza benzer şekilde sekizi dirençli, ikisi duyarlı olan toplam 10 suşta zon içi üreme tespit edilmiş ancak MİK değerlerine dair bir bilgi verilmemiştir.

Disk difüzyon yöntemi sefiderokole duyarlı suşları doğru bir şekilde kategorize ederken, dirençli izolatların yanlış sınıflandırılmasına neden olabilmektedir. Yine Jeannot ve ark. (127)’nin çalışmasında üç farklı üretici firmanın diskleri test edilerek değerlendirmiş ve yanlış kategorize edilen dirençli izolatların oranı şaşırtıcı derece yüksek bulunmuştur. Bu oran; Mast, Liofilchem ve Oxoid diskleri için sırasıyla %42,9,

%50 ve %64,3 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu hataların beta-laktam direnç mekanizması, disk okuma zorlukları veya aynı genetik geçmişe sahip olan suşların alt popülasyonu ile ilişkili olmadığını vurgulamışlardır (127). Morris ve ark. (123)’da DD yöntemiyle belirtilen kategorik uyumsuzluğun genellikle dirençli ve orta duyarlı izolatlarda tespit edildiğini ve bu durumun özellikle non-fermentatif bakteriler içinde *A. baumannii* kompleks türlerinde görüldüğünü belirtmişlerdir (123).

Elde edilen en güncel veri olarak CLSI’da yayımlanan 2023 güncelleme notunda disk difüzyon testleri için FDA’dan onay alan Becton Dickinson, Hardy Diagnostics ve Oxoid disklerinden söz edilmektedir. Liofilchem’e ise sadece araştırmada kullanılmak üzere onay verilmiştir (128). Bunun aksine, EUCAST Geliştirme Laboratuvarı (EDL)’nin Şubat 2022 tarihinde yayımlanan geniş kapsamlı çalışmasında sefiderokol için DD yönteminin, diğer beta-laktam ajanlarındaki kadar güvenilir olduğu belirtilmiştir. Özel bir okuma zorluğunun olmaması ayrıca, yaptıkları çalışmada kullanılan farklı üreticilerin diskleri ve besiyerleri arasındaki farklılıkların DD sonuçlarını hiçbir şekilde etkilemediği bildirilmiştir (129). Ancak, EUCAST’ın Ağustos 2022 tarihinde Liofilchem, Mast ve Oxoid marka sefiderokol 30 µg diskleri ile ilgili yaptığı güncellemede, Oxoid marka disklerin hem standart hem de klinik suşlarda kabul edilen zon çaplarına göre daha geniş zon oluşturduğu belirtilmiştir (130).

Çalışmamızda zon çapları ve MİK değerleri arasında da bazı uyumsuzluklar saptanmıştır. EUCAST’da zon çapı 17 mm’nin altında saptanan suşların PK/PD’ye göre 2 mg/l üzerindeki MİK değerlerine karşılık geldiği belirtilmektedir.

Araştırmamızda bu kurala uymayan 3 suş saptanmıştır. Bununla ilgili İtalya’da Stracquademia ve ark. (78)’ninyaptığı çalışmada, sonuçlar DD ve MİK değerlerine ait klinik sınır değerlerinden (sırasıyla 17 mm ve 2 mg/L) uzak olduğunda DD sonuçlarıyla MİK sonuçlarının daha iyi korelasyon gösterdiği bunun aksine, bu değerler çakıştığında veya klinik sınır değere çok yakın olduğunda iki yöntem arasındaki uyumsuzluk oranının daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. Aynı uyumsuzluğun, EUCAST MİK-zon çapı korelasyonlarında *A. baumannii* suşlarında DD zon çapları 16 ila 18 mm [teknik belirsizlik alanı (ATU)] arasında olan suşlar için de gözlemlenebileceği belirtilmektedir. Kuşkusuz, her iki yöntemin de *A. baumannii* için sınırlamaları olmasına rağmen, SMD yöntemiyle MİK belirlenmesinin referans standart yöntem özelliğini halen korumasından dolayı *A. baumannii* kompleksinde duyarlılık testi için DD yöntemi yerine SMD kullanılması önerilmektedir (24, 123).

Sefiderokolün dirençli *A. baumannii* suşlarına karşı duyarlılığı, SIDERO-WT, SENTRY ve Çin antimikrobiyal sürveyans verilerinin analiz edildiği çok merkezli ve kapsamlı çalışmalarda incelenmiştir. Bu analizlerde, özellikle Çin'in sürveyans çalışmasında neredeyse tüm suşlarda %95'in üzerinde bir duyarlılık oranı belirlenmiş ve bu da umut verici bir bulgu olarak değerlendirilmiştir (126,131,132). Oldukça olumlu in- vitro duyarlılık sonuçlarına ve şaşırtıcı vaka raporlarına rağmen, sefiderokolün CR-AB enfeksiyonları için etkinliği hala belirsizliğini korumaktadır. Günümüzde CR-AB için var olan tedavi rejimlerinde dahi bir standardizasyon oluşturulamamışken, en "iyi" ajan(lar)ın belirlenebilmesi için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (20).

Tablo 5.1 Sefiderokol ile yapılan SMD ve disk difüzyon çalışmalarına ait bazı veriler

Çalışmanın yapıldığı yer	Çalışma yılı	Suş sayısı	Kullanılan yöntem	Kullanılan rehber	Sefiderokol duyarlılık sonucu n (%)	MİK ₅₀ /MİK ₉₀	Kaynak
Mayo Klinik, ABD	2019	97	Sıvı mikrodilüsyon	CLSI	55 (57)	8/32	(122)
			Agar dilüsyon	CLSI	44 (45)	8/64	
John Hopkins Üniversitesi Tıp Fakültesi, ABD	2019	14	Disk difüzyon	CLSI EUCAST	8 (57) 6(43)	-	(123)
			Sıvı mikrodilüsyon	CLSI EUCAST	12 (86) 5 (36)	4/8	
Zürich Üniversitesi, İsviçre	2014-2022	100	Disk difüzyon	CLSI EUCAST	90 (90) 87 (87)	-	(121)
			Sıvı mikrodilüsyon	CLSI EUCAST	83 (83) 76 (76)	1/4	
Çin Antimikrobiyal Surveyansı, Çin	2020-2022	468	Disk difüzyon	CLSI EUCAST	457 (99,4) 463 (98,9)	-	(126)
			Sıvı mikrodilüsyon	CLSI EUCAST	462 (98,7) 457 (97,6)	0,25/1	
Fransa Ulusal Referans Laboratuvarı, Fransa	2012-2022	97	Disk difüzyon	CLSI EUCAST	- 76 (78,4) ^a	-	(133)
			Sıvı mikrodilüsyon	CLSI EUCAST	- 55 (56,7)	2/>16	

Tablo 5.1 devamı

Çalışmanın yapıldığı yer	Çalışma yılı	Suş sayısı	Kullanılan yöntem	Kullanılan rehber	Sefiderekol duyarlılığı n (%)	MİK ₅₀ /MİK ₉₀	Kaynak
AIIMS (All India Institute of Medical Sciences), Hindistan	2020-2021	137	Disk difüzyon	CLSI	123 (89,8)	2/8	(134)
			Sıvı mikrodilüsyon	CLSI	112 (81,7)		
Dowstate Medical Center, ABD	2017 2013-2014	78	Sıvı mikrodilüsyon	CLSI	%88	0,5/8	(135)
SİDERO-WT Çalışması, ABD-Japonya	2014-2019	2.810	Sıvı mikrodilüsyon	CLSI	%94,2	0,25/2	(131)
Pekin Üniversite Hastanesi, Çin	2012-2018	126	Sıvı mikrodilüsyon	CLSI	%62,7	0,5/128	(136)
Bölge Hastaneleri, Yunanistan	2020-2021	271	Disk difüzyon	CLSI EUCAST	%93,4 %86	-	(137)
SENTRY Süveyans Çalışması, ABD	2020	306	Sıvı mikrodilüsyon	CLSI	%95,8	0,5/2	(132)

a: Kategorik uyum sonucu verilmiştir.

A. baumannii'nin dahil olduğu salgınlarnın sayısı son yıllarda hızla artmaktadır ve çoklu ilaç direnci mevcut tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır (37). Özellikle kolistin direnci; *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'de karbapenemlere yaygın direnç görülen ülkelerde kolistin kullanımı arttığı için dikkat çekici olmaktadır (139). Tigesiklin; çeşitli yan etkileri, direnç gelişimi ve tedavi seçenekleri içerisinde tek ilaç olarak uygulanma sorunlarına rağmen *Acinetobacter*'e karşı etkinlik gösteren ve klinik kullanımı olan birkaç ilaçtan birisidir.

Tigesikline benzer bir etki mekanizmasına sahip yeni bir sentetik florosiklin antibiyotik olan eravasiklin (ERV), MDR ve XDR- *A. baumannii* dahil olmak üzere Gramnegatif, Gram pozitif aerobik ve anaerobik bakterilere karşı aktiftir. Tigesiklin ile karşılaştırıldığında, hem Gram pozitif koklara [yaklaşık 2 ila 4 kat daha düşük MİK hem de *A. baumannii* dâhil olmak üzere Gram negatif çomaklara (yaklaşık 2 ila 8 kat daha düşük MİK) karşı daha yüksek in vitro aktivite gösterdiği belirtilmiştir (140). Livemore ve ark. (141)'da benzer şekilde eravasiklinin *A. baumannii* suşlarına karşı tigesiklinden 2 ila 4 kat daha aktif olduklarını gözlemlemişlerdir. Özger ve ark. (142) ise 10 CR-AB suşunda ERV duyarlılığını araştırmışlar ve MİK aralığını 1-4 mg/l olarak saptamışlardır. Solomkin ve ark. (143) 2016 yılında toplam 540 hasta üzerinde randomize, çift kör, çok merkezli iki farklı tedavi protokolü uyguladıkları bir çalışma yayımlamışlardır. Bu çalışmada çeşitli enfeksiyonlardan ötürü tedavi almakta olan ve eravasiklin verilen 270 hastanın bulunduğu grup içerisinde yapılan mikrobiyolojik değerlendirmede 8 hastada *A. baumannii* enfeksiyonu tespit edilmiştir. Mikrobiyolojik olarak eravasiklin için duyarlılık testi sonucuna dair herhangi bir mikrobiyolojik veri paylaşılmamakla birlikte bunların yedisinin MDR olduğu belirtilmiş ve tamamında eravasiklin ile tedavide %100 başarı sağlandığı bildirilmiştir. Morrissey ve ark. (144) 2013-2017 yıllarında 36 merkezin dahil olduğu bir çalışmada sık karşılaşılan klinik Gram negatif çomak izolatlarından (özellikle solunum, intraabdominal ve üriner sistem örnekleri) oluşan küresel bir koleksiyona karşı eravasiklin ve diğer antimikrobiyal ajanların in vitro aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada 2.097 *A. baumannii* suşu SMD yöntemiyle değerlendirmeye alınmıştır. MİK aralığı 0,015-16 mg/l olarak saptanırken MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,5/1 mg/l olarak bulunmuştur. MDR-AB suşlarındaki MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerinde 2 kat sapma saptamışlardır. CLSI ve EUCAST kriterlerine göre ERV için bir klinik sınır değer bulunmadığından çalışmada duyarlılık kategorileri (S, I, R) verilmeden MİK değerleri

karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda ise gradiyent test ile değerlendirme yapmamıza rağmen bu çalışma ile çalışmamızın sonuçları arasında oldukça benzerlik bulunmaktadır. Çalışmamızdaki MİK aralığı 0,016-0,75 mg/l olarak bulunurken MİK_{50/90} değerleri ise 0,25/0,75 mg/l olarak saptanmıştır. İncelediğimiz tüm suşların CR-AB olduğu göz önünde bulundurulduğunda elde edilen MİK sonuçlarının diğer çalışmalara kıyasla oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde ne yazık ki ERV için DD yöntemiyle yapılan yeterli sayıda çalışma bulunamamıştır. Dolayısıyla çalışmamızdan elde edilen veriler etkin bir şekilde örnek çalışmalarla karşılaştırılarak değerlendirilememiştir.

Tigesiklin karbapeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında yüksek dozda kullanımı olan antibiyotiklerdendir. Ancak ciddi hepatotoksik etkisi ve yapılan çalışmalarda *Acinetobacter* spp. üzerinde etkinlik düzeyinin şüpheli olması nedeniyle kombinasyon tedavilerinde alternatif olarak denemeler yapılmıştır. Aynı antibiyotik grubunda olması nedeniyle “eravasiklin, tigesiklin’in alternatifi olabilir mi?” sorusunu akla getirmektedir. Zhao ve ark. (145)’nin 2012-2016 arasında 11 hastanenin katılımıyla gerçekleştirdiği çok merkezli çalışmada 336 suşun 39’u *A. baumannii* olarak saptanmıştır. Duyarlı suşlardaki MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,125/0,25 µg/ml iken TGC’ye dirençli olan suşlarda her iki değer de 2 µg/ml bulunmuştur. Seifert ve ark. (139)’nin 2018 yılında yayımladıkları çalışmada 286 CR-AB suşunda eravasiklinin MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerini 0,5/1 mg/l bulmuşlar; tigesiklin için MİK değeri $\leq$ 2 mg/l olan 79 CR-AB suşunda ise eravasiklin için MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerini 1/2 mg/l olarak saptamışlar ve aradaki bir dilüsyon artışa dikkat çekmişlerdir. Çalışmamızda tigesiklin MİK₅₀ / MİK₉₀ değerleri 2/4 mg/l iken eravasiklin MİK₅₀ / MİK₉₀ değerlerini 0,25/0,75 mg/l olarak saptamış olmamız daha önce söz ettiğimiz in-vitro olarak ERV’nin TGC’den 2 ila 4 kat daha aktif olması gözlemiyle de birleşince ERV’nin potansiyel bir alternatif seçenek olabileceğini düşünmekteyiz.

Beta-laktamlar, Gram pozitif ve Gram negatif patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinin ayrılmaz bir parçası olan geniş bir bakterisidal ajan sınıfıdır. Beta-laktamların bakterisidal aktivitesi, hücre duvarı oluşumu için gerekli olan PBP’lerin inhibisyonu yoluyla gerçekleşmektedir (146). Eski olarak adlandırılan tazobaktam ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerinin karbapenemazlara karşı hiçbir aktivitesi yoktur ve AmpC dahil olmak üzere bazı C sınıfi enzimlere karşı

sınırlı etkisi bulunmaktadır. Dolayısıyla yeni beta-laktamaz inhibitörleri relebaktam ve vaborbaktam, karbapeneme dirençli Gram negatif çomaklara karşı aktiviteye sahip ajanlara duyulan ihtiyacı karşılamak için geliştirilmiştir. Relebaktam ve vaborbaktam karbapenemlerle kombine edilmek üzere geliştirilen ilk beta-laktamaz inhibitörleridir (147). EUCAST’da *Acinetobacter* spp. suşlarında imipenem/relebaktam(IMI/REL) için “Mikroorganizmalar tarafından üretilen beta-laktamazlar, ana karbapenemi genellikle değiştirmez veya yeterince inhibitörle engellenemez. Bu nedenle betalaktamaz inhibitörünün eklenmesi klinik fayda sağlamaz.” şeklinde ifade edilmektedir. FDA tarafından *A. baumannii* kompleksi ve *Haemophilus influenzae* için klinik sınır değerler belirlenmiş olsa da (2 mg/l), relebaktam bu mikroorganizmalara karşı imipeneme ek bir aktivite sağlamaz ve imipenem-relebaktam testi rutin olarak önerilmemektedir (148). *Enterobacterales* ve *P. aeruginosa*’ya oldukça etkin olabilen IMI/REL ne yazık ki, *A. baumannii*, *Chryseobacterium* ve *Stenotrophomonas*’a karşı çok az aktivite göstermektedir (149). İlacın etkinliğindeki bu azalmanın bakterilerin direnç mekanizmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. IMI-REL, A (KPC) ve C (AmpC) sınıfı beta-laktamaz üreten bakterilere karşı etkililikten, *bla_{OXA48}* eksprese eden karbapeneme dirençli *Enterobacterales*’e (CRE) karşı aktivitesi sınırlıdır ve B grubu metallo-betalaktamazları (IMP, VIM ve NDM dâhil) üreten izolatlara karşı aktivitesi gösterilmemiştir. Smith ve ark. (89) imipeneme duyarlılığın IMI-REL duyarlılığının önemli bir belirleyicisi olduğu, çünkü bilinen imipenem direncine sahip izolatların yalnızca %8’inin IMI-REL’e duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların gözlemlerine benzer şekilde çalışmamızda da incelenen karbapeneme dirençli tüm suşların IMI/REL’e de dirençli olduğu görülmüştür. Aynı zamanda genotipik özelliklerini incelediğimiz PCR deneyinde suşların hiçbirinde IMP direnç genine rastlanmamıştır. Direncin *A. baumannii* suşlarının kromozomal olarak sahip oldukları D grubu beta- laktamazlar nedeniyle gelişmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Acinetobacter antimikrobiyal direnç özelliği kazanma kapasitesinin yüksek olmasıyla sonuçlanan olağanüstü bir genetik plastisiteye sahiptir. Özellikle, tedavisi zor dirençli enfeksiyonlarda son çare olarak başvurulmuş antimikrobiyaller arasında yer alan karbapenemlere karşı direnç kazanımı, *A. baumannii* suşları arasında artmakta ve bu patojenin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyon sorununu daha da derinleştirmektedir (150). Geçtiğimiz on yılda, karbapeneme dirençli *A. baumannii*’lerde, esas olarak kromozomal ve edinsel OXA tipi karbapenem hidrolize

edici D sınıfı beta-laktamazların ve daha az sıklıkla metallo-betalaktamazların etkisiyle dramatik bir artış olmuştur (139). *Acinetobacter* türlerinin OXA karbapenemazları filogenetik alt grupları OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA58 olarak ayrılmaktadır (101).

OXA-51 ilk olarak Arjantin'de klinik örnekten izole edilen *A. baumannii* suşunda kromozomal aracılı bir beta-laktamaz olarak bulunmuştur. Daha sonraki çalışmalarla, OXA-51 benzeri enzim grubu olarak adlandırılan bu gruba dahil çok sayıda üyenin varlığı gösterilmiştir. Bu enzim üzerine yapılan çalışmalar da *bla*_{OXA51} genlerinin *A. baumannii* kromozomuna özgü olduğunu göstermiştir (150). Kromozomal *bla*_{OXA51} benzeri alellerin varlığının, konak suşun karbapenem direnci seviyesiyle ilişkili olmayabileceği, ancak az da olsa karbapenem direncinde sinerjistik rolü olabileceği düşünülmektedir (101, 151). Bu doğrultuda çalışmamızda değerlendirilen 80 suş VİTEK-2 otomatize sistemi ile tür düzeyinde *A. baumannii* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca suşların tamamında karbapenem direnci saptanmış ve genotipik olarak tüm suşlarda OXA-51 varlığı gösterilmiştir.

OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 enzimlerini kodlayan aleller dirençle veya en azından azalmış duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (101). İlk olarak İskoçya'da tanımlanan *bla*_{OXA23} geni, dünya çapında giderek daha fazla bildirilmektedir. *Acinetobacter radioresistens bla*_{OXA23} benzeri genlerin öncüsü olarak tanımlanmıştır. Karbapeneme dirençli ve OXA-23 üreten *A. baumannii*'nin klonal salgınları Bulgaristan, Çin Halk Cumhuriyeti, Brezilya, Irak, Afganistan ve Fransız Polinezyası gibi birçok ülkede rapor edilmiştir (152). Salgınlara neden olan OXA-23 üreten *A. baumannii* dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilmiştir (153). İspanya ve Portekiz kaynaklı salgınlarda da OXA-24 sorumlu gösterilmiştir. Bilinen ilk OXA-58 suşu içeren *Acinetobacter* 2003 yılında Fransa'da izole edilmiş, nadir görülmekle birlikte dirençli suşlarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bu enzim bir Fransız hastanesindeki salgın suşunda ve çeşitli Güney ve Doğu Avrupa ülkelerindeki izolatlarda bulunmuştur (154). Tayland'dan yapılan bir çalışmada 300 suşta D grubu karbapenemaz varlığı tespit edilmiş ve oranları sırasıyla; *bla*_{OXA23} %82,6, *bla*_{OXA24} %0,3 ve *bla*_{OXA58} %6,5 olarak bulunmuştur (155). Yang ve ark. (156), 2006-2007 yılları arasında yoğun bakımlarda araştırdıkları karbapeneme dirençli 49 *Acinetobacter* suşunun tamamında OXA-51 saptamışlar ve kazanılmış OXA-23 karbapenemaz kodlayan genleri tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde

OXA-58 saptanmışken bu çalışmada ayrıca OXA-24 karbapenemaz kodlayan enzimler tespit edilmemiştir. SİDERO-WT (2014-2019) süreyans çalışmasında değerlendirmeye dâhil edilen *A. baumannii* suşlarının %71'si OXA-23, %16'sı OXA-24, %2'si ise OXA-58 pozitif bulunmuştur (131). Goldman ve ark. (121) sefidrokol duyarlılığını araştırdıkları çalışmalarında OXA-23'ü %63 ve OXA-58'i %3 oranında saptamışlardır. Türkiye'de 2008-2011 arasında Çiftçi ve ark. (158)'nin gerçekleştirdiği çok merkezli çalışmada ise 834 *A. baumannii* suşunda karbapeneme dirençli izolatların %74,4'ünde OXA-23, %17,3'ünde ise OXA-58 saptanmıştır (157).

Çalışmamızdaki sonuçlar değerlendirildiğinde, OXA-23 oranı %82,5 bulunurken OXA-24 %17,5 oranında saptanmıştır. Çoğu çalışmada da OXA-23 sıklığı OXA-24'ten daha yüksek tespit edilmektedir. Çiftçi ve ark. (157) da çalışmalarında yıllar içinde OXA-23 görülme sıklığında artış gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki direnç oranlarının diğer çalışmalara oranla yüksek bulunmasının bu artışla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca yine aynı çalışmada OXA-24 kodlayan gen bölgesi için gerek NCBI (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) dizileri esas alındığında gerekse sentezlenen ya da literatürde bildirilen primer çiftleri kullanıldığında *bla_{OXA24}* geni için pozitiflik saptanamadığı bildirilmiştir (157). Çalışmamızda yaşanan zorluklardan birisi, OXA-24 kodlayan gen bölgesini tespit etmedeki zorluk olmuştur. Uyguladığımız ilk PCR protokolü olan multipleks çalışmalarında kullandığımız ThermoFisher DreamTaq ile çeşitli validasyon çalışmaları yapmamıza rağmen jel elektroforezinde pozitif kontrol için bir bant elde edilememiştir. En son bu durumun taqDnaz'dan kaynaklanabileceği düşünülerek farklı üreticiden temin edilen SOTEC TaqDnaz ile monopleks PCR çalışılması sonucunda pozitiflik elde edilmiştir.

SİDERO-WT çalışmasında OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 üreten suşlarda sefidrokol için MİK₉₀ değerleri 1 µg/ml olarak bulunmuştur (158). 2013-2014 yıllarında 47'si OXA-23 tipi beta-laktamaz üreten suş olmak üzere 78 karbapeneme dirençli izolat toplanmıştır. Genel olarak, sefidrokol MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri 0.5/ 8 mg/l olup, OXA-23 tipi beta-laktamaz üreten izolatlardaki MİK değerleri aynı bulunmuştur (135). Galani ve ark. (137), 271 *A. baumannii* suşunun incelendiği çok merkezli çalışmalarında tüm suşlarda OXA-51 ve OXA-23 saptadıklarını bildirmişlerdir. Sefidrokol için MİK₅₀/MİK₉₀ değeri bildirilmeyen bu

çalışmada, CLSI'a göre %93,4 ve EUCAST'a göre %86 sefidrokol duyarlılığı saptandığını belirtmişlerdir. Seifert ve ark. (159)'nın yaptıkları çalışmada sefidrokol için MIC_{50}/MIC_{90} değerleri OXA-23 benzeri izolatlar için 0,5/4 mg/l olarak bulunurken NDM-IMP-OXA-58 gibi diğer karbapenemazları üreten suşlardaki sefidrokol MIC_{50}/MIC_{90} değerlerinin 1 ila 32 mg/l arasında değiştiği saptanmıştır. Çalışmamızda ise literatürle korelasyon gösteren sonuç *A. baumannii*'de OXA-24 ve OXA-58'e oranla OXA-23 görülme sıklığının daha fazla olduğu şeklindedir. Ancak karbapenemaz gen bölgelerine göre sefidrokol direnci kıyaslandığında MIC_{50}/MIC_{90} değerlerinde OXA-23 (+) ve OXA-24 (+) suşlardaki MIC_{90} değerlerimiz sırasıyla 128 mg/l ve >256 mg/l olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, literatürdeki çalışmaların sonuçlarına göre oldukça yüksektir. Aynı suşların eravasiklin ve kolistin için MIC değerleri incelendiğinde aynı olup sırasıyla 0,5 mg/l ve 2 mg/l olarak saptanmıştır.

Livemore ve ark. (141) 55 *A. baumannii* izolatı içerisinde OXA-23/51/58 genlerini içeren 39 *A. baumannii* suşunda eravasiklin MIC değerini 1 mg/l olarak saptamışlardır. İkinci olarak, eravasiklin MIC 'leri ile spesifik karbapenem direnç mekanizmaları arasında çok az ilişki olmasına rağmen, eravasiklin ve tigesiklin MIC_{90} değerleri karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* ve *A. baumannii* izolatları için karbapeneme duyarlı kontrollere göre 2 ila 4 kat daha yüksek saptanmış ve eravasiklin için benzer bir MIC_{50} kayması gözlemlenmiştir. Zhao ve ark. (145)'nin eravasiklinin in- vitro aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada OXA-23 (+) suşlarda tigesiklinin MIC_{50}/MIC_{90} değeri 4 mg/l ve eravasiklinin MIC_{50}/MIC_{90} değerleri ise sırasıyla 1/2 mg/l olarak saptanmıştır. Yine aynı çalışmada tigesikline dirençli suşlarda yapılan incelemede ise eravasiklin MIC_{50} ve MIC_{90} değerleri 2 mg/l olarak belirlenmiştir (145).

Son yıllarda artan direnç sorunu yeni antibiyotik arayışlarına hız kazandırmıştır. Çalışmalar bu durumun özellikle yaşamı tehdit eden hastane kaynaklı *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi açısından alarm verdiğini göstermektedir. Bu bağlamda karbapeneme dirençli *A. baumannii* klinik izolatlarında, Türkiye'de henüz tedavi protokollerine girmemiş ve dünya genelinde de sınırlı kullanımı olan sefidrokol, eravasiklin ve imipenem-relebaktamın in-vitro etkinliklerinin araştırıldığı bu çalışmanın sonuçlarının literatüre önemli katkı sağlayacağı açıktır. Çalışmamız özellikle ülkemizde *Acinetobacter* suşlarında sefidrokolün SMD yöntemiyle araştırıldığı ilk çalışmadır. Bununla birlikte bu çalışmanın bazı

kısıtlılıkları da bulunmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen veriler, Türkiye’deki 3. basamak hastaneler içerisinde oldukça yoğun ve geniş birbölgeyi kapsayan bir hasta popülasyonuna sahip olmasına rağmen tek merkeze ait verileriyansıtmaktadır. Bir diğeri ise çoğul ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarının moleküler epidemiyolojisi üzerine katkıda bulunabilecek çok yönlü dizi tiplemesi analizinin eksikliğinden kaynaklanan sınırlamalarla karşılaşmış olmasıdır (160). Bu nedenle bu tür araştırmaların daha geniş kapsamlı ve çok merkezli çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance
Genova, World Health Organization (WHO); 2014.
[<https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748> (Erişim tarihi: 15.02.2023)].
2. Kuo SC, Chang SC, Wang HY, Lai JF, Chen PC, Shiao YR, et al. Emergence of
extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex over 10 years: nationwide
data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) program. *BMC*
Infect Dis 2012; 12: 200.
3. Su CH, Wang JT, Hsiung CA, Chien LJ, Chi CL, Yu HT, et al. Increase of carbapenem-
resistant *Acinetobacter baumannii* infection in acute care hospitals in Taiwan: association
with hospital antimicrobial usage. *PLoS One* 2012; 7(5): e37788.
4. Mendes RE, Farrell DJ, Sader HS, Jones RN. Comprehensive assessment of tigecycline
activity tested against a worldwide collection of *Acinetobacter* spp (2005- 2009). *Diagn*
Microbiol Infect Dis 2010; 68: 307-11.
5. Gordon NC, Wareham DW. A review of clinical and microbiological outcomes
following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*
with tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 775-80.
6. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al.
Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of
antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018; 18(3): 318–27.
7. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator R D. *Acinetobacter baumannii* an
emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 2012; 3(3): 243-50.
8. Bouvet P, Grimont P. 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 descriptions of
Acinetobacter calcoaceticus and *Acinetobacter lwofii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36(2):
228-40.

9. Migliaccio A, Bray J, Intoccia M, Stabile M, Scala G, Jolley KA, et al. Phylogenomics of *Acinetobacter* species and analysis of antimicrobial resistance genes. *Front Microbiol* 2023; 14: 1264030.
10. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Genus *Acinetobacter*. [www.bacterio.net/acinetobacter.html] (Erişim tarihi: 13.02.2024)].
11. Michiels JE, Van den Bergh B, Fauvart M, Michiels J. Draft genome sequence of *Acinetobacter baumannii* strain NCTC 13423, a multidrug-resistant clinical isolate. *Stand Genomic Sci* 2016; 11(1): 57.
12. Pottinger P, Reller LB, Ryan KJ. *Pseudomonas* and other opportunistic Gram-negative bacilli. In: Ryan KJ, Ray CG (eds). *Sherris Medical Microbiology*. 2014, 6th ed. p. 624. McGraw-Hill Education/Medical, New York.
13. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(3): 538-82.
14. Corral J, Pérez-Varela M, Sánchez-Osuna M, Cortés P, Barbé J, Aranda J. Importance of twitching and surface-associated motility in the virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence* 2021; 12(1): 2201-13.
15. Barzani Y. Nonfermenting and miscellaneous gram-negative bacilli. In: Mahon CR, Lehman DC (eds), *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 2023, 7th ed. p.474. St. Louis, Missouri.
16. Salgado-Camargo AD, Castro-Jaimes S, Gutierrez-Rios R-M, Lozano LF, Altamirano-Pacheco L, Silva-Sanchez J, et al. Structure and evolution of *Acinetobacter baumannii* plasmids. *Front Microbiol* 2020; 11: 1283.
17. Uysal A, Kurt Ş, Soylu S, Soylu EM, Kara M. Identification of Microorganism Species in Leafy Vegetables Using MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry) Technique. *YYU J Agr Sci* 2019; 29(4): 595-603.

18. Dehbanipour R, Ghalavand Z. *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, virulence factors, novel therapeutic options and mechanisms of resistance to antimicrobial agents with emphasis on tigecycline. *J Clin Pharm Ther* 2022; 47(11): 1875-84.
19. Wang J, Ruan Z, Feng Y, Fu Y, Jiang Y, Wang H, et al. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. *PLoS One* 2014; 9(8): e104882.
20. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(2): 380-407.
21. Saad B, Almasaudi. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J of Biol Sci* 2018; 25(3): 586-596.
22. Kanafani ZA, KS. *Acinetobacter* infection: Epidemiology, microbiology, pathogenesis, clinical features and diagnosis. Uptodate <https://www.uptodate.com> (Erişim tarihi: 25.02.2024)
23. Albrecht MC, Griffith ME, Murray CK, et al. Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *J Am Coll Surg* 2006; 203: 546.
24. 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* 1997; 35(11): 2819-25.
25. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T: Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(3): 179-83.
26. Chu YW, Leung CM, Houang ET, Ng KC, Leung CB, Leung HY, Cheng AF. Skin carriage of acinetobacters in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9): 2962-67.
27. Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernards AT, Nemec A et al. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(4): 329-32.

28. Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C, Dominguez MA, et al. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1996; 23(2): 329-34.
29. French GL, Phillips I. Antimicrobial resistance in hospital flora and nosocomial infections. In: Mayhall CG (ed). Lippincott Williams & Wilkins. Hospital Epidemiology and Infection Control 1999, 2nd ed. p: 1243-64. Philadelphia, USA.
30. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)-Annual Epidemiological Report 2021. Stockholm, 2022.
31. Kouadio IK, Aljunid S, Kamigaki T, Hammad K, Oshitani H. Infectious diseases following natural disasters: prevention and control measures. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10(1): 95-104.
32. Qu J, Zong Z, Wang X, Zhou G, Feng P, Chen M, et al. Severe infections as the leading complication after the Lushan earthquake. *Intensive Care Med* 2015; 41: 560-61.
33. Rizk A, Fayad AA, Haraoui LP. Antimicrobial-resistant infections after Turkey/Syria earthquakes, 2023. *Emerg Infect Dis* 2023; 29(6):1273-75.
34. Maegele M, Gregor S, Steinhausen E, Bouillon B, Heiss MM, Perbix W, et al. The long-distance tertiary air transfer and care of tsunami victims: injury pattern and microbiological and psychological aspects. *Crit Care Med* 2005; 33(5): 1136-40.
35. Oncül O, Keskin O, Acar HV, Küçükardalı Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM, et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J Hosp Infect* 2002; 51(1): 47-51.
36. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(3): 119.

37. Fiester SE, Arivett BA, Schmidt RE, Beckett AC, Ticak T, Carrier MV, et al. Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2016; 11(11): e0167068.
38. Shadan A, Pathak A, Ma Y, Pathania R and Singh RP. Deciphering the virulence factors, regulation, and immune response to *Acinetobacter baumannii* infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2023; 13: 1053968.
39. Sheldon JR, Skaar EP. *Acinetobacter baumannii* can use multiple siderophores for iron acquisition, but only acinetobactin is required for virulence. *PLoS Pathog* 2020; 16(10): e1008995.
40. Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Di Donato A, Parrilli M. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res* 2006; 341(14): 2456-61.
41. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, et al. *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: A review. *Infect Drug Resist* 2021; 14: 3711-19.
42. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan-drug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 268-81.
43. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13(1): 42-51.
44. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiol* 2018; 4(3): 482.
45. Navidinia M. The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *J Paramed Sci* 2016; 7(3): 43-57.
46. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *J Pathog* 2021; 10(3): 373.

47. Olney KB, Thomas JK, Johnson WM. Review of novel β -lactams and β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations with implications for pediatric use. *Pharmacotherapy* 2023; 43(7):713-31.
48. Munita JM, ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr* 2016; 4(2): 481-511.
49. Doi Y, Murray GL, Peleg AY. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance treatment options. In *Semin Respir Crit Care Med* 2015; 36(1): 85-98.
50. Antunes NT, Fisher JF. Acquired Class D β -Lactamases. *Antibiotics (Basel)* 2014; 3(3): 398- 434.
51. Uppalapati SR, Sett A, Pathania R. The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* confer a two-pronged defense in facilitating its success as a potent human pathogen. *Front Microbiol* 2020; 11: 589234.
52. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4776-8.
53. Li-Jing Zhu, Xiao-Ying Chen, Pan-Fei Hou. Mutation of CarO participates in drug resistance in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Lab Anal* 2019; 33(8): e22976.
54. Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte M, Woodford N, Nemec A, Dijkshoorn L, et al. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res Microbiol* 2005; 156(3): 348-55.
55. Foong WE, Wilhelm J, Tam HK, Pos KM. Tigecycline efflux in *Acinetobacter baumannii* is mediated by TetA in synergy with RND-type efflux transporters. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75(5): 1135-39.

56. Aldred K, Kerns R, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochem* 2014; 53(10): 1565-74.
57. Chopra S, Galande A. A fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii* without the quinolone resistance-determining region mutations. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(11): 2668-70.
58. Cheah SE, Johnson MD, Zhu Y, Tsuji BT, Forrest A, Bulitta JB, et al. Polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*: genetic mutations and transcriptomic changes in response to clinically relevant dosage regimens. *Sci Rep* 2016; 6: 26233.
59. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 692-99.
60. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(2): 105-14.
61. Iovleva A, Mustapha M, Griffith M, Komarow L, Luterbach C, Evans D, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in U.S. hospitals: diversification of circulating lineages and antimicrobial resistance. *mBio* 2022; 13(2): e0275921.
62. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30(1): 409-47.
63. Chen Q, Zheng Z, Shi Q, Wu H, Li Y, Zheng C. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* may cause patients to develop polymicrobial bloodstream infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2022; 2022: 8368578.
64. Sirijatuphat R, Sripanidkulchai K, Boonyasiri A, et al. Implementation of global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) in patients with bacteremia. *PLoS One* 2018; 13: e0190132

65. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ferrándiz-Millón C, Díaz-Martín A, López-Sánchez JM, Gutiérrez-Pizarra A. Optimum treatment strategies for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015; 13(6): 769-77.
66. Tabah A, Buetti N, Staiquly Q, Ruckly S, Akova M, Aslan AT. EUROBACT-2 Study Group, ESICM, ESCMID ESGCIP and the OUTCOMEREA Network. Epidemiology and outcomes of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care unit patients: the EUROBACT-2 international cohort study. *Intensive Care Med* 2023; 49(2): 178-90.
67. Wintachai, P.; Surachat, K.; Singkhamanan, K. Isolation and characterization of a novel autographiviridae phage and its combined effect with tigecycline in controlling multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-associated skin and soft tissue infections. *Viruses* 2022; 14(2): 194.
68. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(11): 868-73.
69. Xiao J, Zhang C, Ye S. *Acinetobacter baumannii* meningitis in children: a case series and literature review. *Infect* 2019; 47(4): 643-49.
70. Senturk GC, Ozay R, Kul G, Altay FA, Kuzi S, Gurbuz Y, et al. Evaluation of post-operative meningitis: comparison of meningitis caused by *Acinetobacter* spp. and other possible causes. *Turk Neurosurg* 2019; 29(6): 804-10.
71. Gradon JD, Chapnick EK, Lutwick LI. Infective endocarditis of a native valve due to *Acinetobacter*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992; 14(5): 1145-8.
72. Lahmidi I, Charmake D 3rd, Elouafi N, Bazid Z. *Acinetobacter baumannii* native valve infective endocarditis: a case report. *Cureus* 2020; 12(11): e11527.
73. Marcovich A, Levartovsky S. *Acinetobacter* exposure keratitis. *Br J Ophthalmol* 1994; 78(6): 489-90.

74. Kanafani ZA, Kanj MS. Acinetobacter infection: Treatment and prevention. 2023. www.uptodate.com (Erişim tarihi: 10.02.2024).
75. Grande Perez C, Maillart E, Miendje Deyi VY, Huang TD, Kamgang P, Dernier Y, et al. Compassionate use of cefiderocol in a pancreatic abscess and emergence of resistance. *Infect Dis Now* 2021; 51(4): 399-401.
76. Sato T, Yamawaki K. Cefiderocol: Discovery, chemistry, and in vivo profiles of a novel siderophore cephalosporin. *Clin Infect Dis* 2019; 69(Suppl 7): S538-43
77. Soriano A, Mensa J. Mechanism of action of cefiderocol. *Rev Esp Quimioter* 2022; 35 (Suppl 2): 16-9.
78. Stracquadanio S, Bonomo C, Marino A, Bongiorno D, Privitera GF, Bivona DA, Mirabile A, Bonacci PG, Stefani S. Acinetobacter baumannii and cefiderocol, between cidalit  and adaptability. *Microbiol Spectr* 2022; 10(5): e0234722.
79. Bovo F, Lazzarotto T, Ambretti S, Gaibani P. Comparison of broth microdilution, disk diffusion and strip test methods for cefiderocol antimicrobial susceptibility testing on KPC-producing Klebsiella pneumoniae. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(3): 614
80. Wu JY, Srinivas P, Pogue JM. Cefiderocol: A Novel agent for the management of multidrug-resistant Gram negative organisms. *Infect Dis Ther* 2020; 9(1): 17-40
81. Wunderink RG, Matsunaga Y, Ariyasu M, Clevenbergh P, Echols R, Kaye KS, et al. Cefiderocol versus high-dose, extended-infusion meropenem for the treatment of Gram negative nosocomial pneumonia (APEKS-NP): a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis* 2021; 21(2): 213-25.
82. Bassetti M, Echols R, Matsunaga Y, Ariyasu M, Doi Y, Ferrer R, et al. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 2021; 21(2): 226-40.

83. Scott LJ. Eravacycline: a review in complicated intra-abdominal infections. *Drugs* 2019; 79(3): 315-24.
84. Alosaimy S, Abdul-Mutakabbir JC, Kebriai R, Jorgensen SCJ, Rybak MJ. Evaluation of eravacycline: a novel fluorocycline. *Pharmacotherapy* 2020; 40(3): 221-38
85. Zhanel GG, Cheung D, Adam H, Zelenitsky S, Golden A, Schweizer F, Gorityala B, Lagacé-Wiens PR, Walkty A, Gin AS, Hoban DJ, Karlowsky JA. Review of eravacycline, a novel fluorocycline antibacterial agent. *Drugs* 2016; 76(5): 567-88.
86. Heo YA. Imipenem/Cilastatin/Relebactam: a review in Gram negative bacterial infections. *Drugs* 2021; 81(3): 377-88.
87. Bassetti M, Magnè F, Giacobbe DR, Bini L, Vena A. New antibiotics for Gram negative pneumonia. *Eur Respir Rev* 2022; 31(166): 220119.
88. Gaibani P, Giani T, Bovo F, Lombardo D, Amadesi S, Lazzarotto T, Coppi M, Rossolini GM, Ambretti S. Resistance to ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam and imipenem/relebactam in Gram negative MDR bacilli: molecular mechanisms and susceptibility testing. *Antibiotics (Basel)* 2022; 11(5): 628.
89. Smith JR, Rybak JM, Claeys KC. Imipenem-cilastatin-relebactam: a novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combination for the treatment of multidrug-resistant Gram negative infections. *Pharmacotherapy* 2020; 40(4): 343-56.
90. Esaúa L, Rodolfoa R, Melissaa H, Adrianaa C, Rodolfob G, Rafaela F. An alternative disk diffusion test in broth and microdilution method for colistin susceptibility in Enterobacteriales. *J Microbiol Methods* 2019; 167: 105765.
91. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2023, 33rd ed. CLSI supplement M100.
92. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Guidance document on broth microdilution testing of cefiderocol. January 2024.

93. Moore DD. Commonly used reagents and equipment. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds). Current Protocols in Molecular Biology Online. 2003. p. A.2.1–A.2.8. John Wiley and Sons.
94. Voytas D. Agarose gel electrophoresis. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, Coico R (eds). Current Protocols in Immunology Online. 2003. p. 10.4.1-10.4.8. John Wiley and Sons.
95. Armstrong JA, Schulz JR. Agarose gel electrophoresis. In: Gallagher S, Wiley EA (eds). Current Protocols Essential Laboratory Techniques Online, 2015p. 10, 7.2.1-7.2.22. John Wiley and Sons.
96. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol 2006; 44(8): 2974-6.
97. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12(9):826-36.
98. Moosavian M, Ahmadi K, Shoja S, Mardaneh J, Shahi F, Afzali M. Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Ahvaz, Southwest Iran. MethodsX 2020; 14 (7): 101031.
99. Ozbey N, Tatman-Otkun M. Molecular typing and investigation of carbapenemases in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Turk Hij Den Biyol Derg 2016; 73(4): 345-54.
100. Abdelhai MH, Hinawi AM, Sun X. Comparative study of rapid DNA extraction methods of pathogenic bacteria. Am J Bio Sci 2016; 4(1): 1-8.
101. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(4): 351-53.

102. Bahador A, Raoofian R, Pourakbari B, Taheri M, Hashemizadeh Z, Hashemi FB. Genotypic and antimicrobial susceptibility of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Analysis of ISAb_a elements and bla OXA-23-like genes including a new variant. *Front Microbiol* 2015; 6: 1249.
103. Wang T, Leu Y, Wang N, Liu C, Yan T. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018; 7: 123.
104. Kamolvit W, Higgins P, Paterson D, Seifert H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 959–963.
105. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. World Health Organization (WHO). 2017. [<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12> (Erişim tarihi: 14 Eylül 2017)]
106. Antimicrobial resistance surveillance in Europe (CAESAR). 2021-2023. WHO, 2023. [<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2023-2021-data> (Erişim tarihi: 14.04.2023)].
107. Liu J, Shu Y, Zhu F, Feng B, Zhang Z, et al. Comparative efficacy and safety of combination therapy with high-dose sulbactam or colistin with additional antibacterial agents for multiple drug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and network meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist* 2021; 24: 136-47.
108. Dong X, Chen F, Zhang Y, Liu H, Liu Y, Ma L. In vitro activities of rifampin, colistin, sulbactam and tigecycline tested alone and in combination against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antibiot (Tokyo)* 2014; 67(9): 677-80.

109. Vasesi D, Gupta V, Gupta P, Singhal L. Risk factor and resistance profile of colistin resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J Med Microbiol* 2023; 47: 100486.
110. Maraki S, Mantadakis E, Mavromanolaki, Kofteridis DP, Samonis G. A 5-year surveillance study on antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a tertiary Greek hospital. *Infect Chemother* 2016; 48(3): 190-98.
111. da Silva MEP, Gomes MADS, Rodrigues RS, Lima NCDS, Carvalho AG, Taborda RLM, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. from hospital intensive care units in Brazilian Amazon. *Braz J Infect Dis* 2023; 27(6): 103687.
112. Gao L, Lyu Y, Li Y. Trends in drug resistance of *Acinetobacter baumannii* over a 10-year period: nationwide data from the china surveillance of antimicrobial resistance program. *Chin Med J (Engl)* 2017; 130(6): 659-64.
113. Gales AC, Seifert H, Gur D, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2016). *Open Forum Infect Dis* 2019; 6 (Suppl1): S34-S46.
114. Nurtop E, Bayındır Bilman F, Menekse S, Kurt Azap O, Gönen M, et al. Promoters of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* infections. *Microb Drug Resist* 2019; 25(7): 997-1002.
115. Yolbaş İ, Tekin R, Güneş A, Kelekçi S, Şen V, Tan İ, et al. Bir üniversite hastanesindeki *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *J Clin Exp Invest* 2013; 4: 318-21.
116. Boral B, Unaldi Ö, Ergin A, Durmaz R, Eser ÖK. *Acinetobacter* Study Group. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2019; 18(1): 19.

117. Çetinkol Y, Telli M, Altunçekiç Yıldırım A, Çalgın MK. Karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında kolistin/sulbaktam kombinasyonu etkinliğinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50: 460-5.
118. Çağlan E, Nigiz Ş, Sancak B, Gür D. Resistance and heteroresistance to colistin among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2019; 67(2): 107-111
119. McCreary EK, Heil EL, Tamma PD. New perspectives on antimicrobial agents: cefiderocol. *Antimicrob Agents Chemother* 2021; 65(8): e0217120.
120. European Medicines Agency Fetcroja 1 g powder for concentrate for solution for infusion: EU summary of product characteristics. 2020. [<https://www.ema.europa.eu/> (Erişim tarihi: 11.05.2021)]
121. Kolesnik-Goldmann N, Seth-Smith HMB, Haldimann K, Imkamp F, Roloff T, Zbinden R, et al. Comparison of disk diffusion, E-test, and broth microdilution methods for testing in vitro activity of cefiderocol in *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(7): 1212.
122. Albano M, Karau MJ, Schuetz AN, Patel R. Comparison of agar dilution to broth microdilution for testing in vitro activity of cefiderocol against Gram negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2020; 59(1): e00966-20.
123. Morris CP, Bergman Y, Tekle T, Fissel JA, Tamma PD, Simner PJ. Cefiderocol antimicrobial susceptibility testing against multidrug-resistant Gram negative bacilli: a comparison of disk diffusion to broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2020; 59(1): e01649-20.
124. Breakpoints for cefiderocol from EUCAST. Addendum (May 2022) to EUCAST breakpoint tables v.10.0. [https://www.eucast.org/eucast_news/news_singleview?tx_ttnews%5Btt_news%5D=374&cHash=839808489fb6fb1033af6d8a1c5e7d07 (Erişim tarihi 30.04.2020)]

125. Ito A, Nishikawa T, Matsumoto S, Yoshizawa H, Sato T, Nakamura R, et al. Siderophore cephalosporin cefiderocol utilizes ferric iron transporter systems for antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(12): 7396-7401.
126. Liu Y, et al. "Assessment of cefiderocol disk diffusion versus broth microdilution results when tested against *Acinetobacter baumannii* complex clinical isolates." *Microbiol Spectr* 2023; 11 (6): e05355-22.
127. Jeannot K, Gaillot S, Triponney P, Portets S, Pourchet V, Fournier D, et al. Performance of the disc diffusion method, MTS gradient tests and two commercially available microdilution tests for the determination of cefiderocol susceptibility in *Acinetobacter* spp. *Microorganisms* 2023; 11(8): 1971.
128. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). AST News Update June 2023: The latest on testing cefiderocol [<https://clsi.org/about/blog/ast-news-update-june-2023-the-latest-on-testing-cefiderocol> (Erişim tarihi: 16.06.2023)].
129. Matuschek E, Longshaw C, Takemura M, Yamano Y, Kahlmeter G. Cefiderocol: EUCAST criteria for disc diffusion and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2022; 77(6): 1662-69.
130. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. [<https://www.eucast.org/ast-of-bacteria/warnings> (Erişim tarihi: 22.08.2022)].
131. Karlowsky JA, Hackel MA, Takemura M, Yamano Y, Echols R, Sahm DF. In vitro susceptibility of Gram negative pathogens to cefiderocol in five consecutive annual multinational SIDERO-WT surveillance studies, 2014 to 2019. *Antimicrob Agents Chemother* 2022; 66(2): e0199021.
132. Shortridge D, Streit JM, Mendes R, Castanheira M. In vitro activity of cefiderocol against U.S. and european Gram negative clinical isolates collected in 2020 as part of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Microbiol Spectr* 2022; 10(2): e0271221.

133. Nayak G, Behera B, Mohanty S, Kar P, Jena J. Analysis of in vitro activity of cefiderocol against carbapenem-resistant Gram negative bacilli by broth microdilution and disk diffusion method: a single-center study in Odisha, India. *Infect Drug Resist* 2022; 15: 5887-97.
134. Iregui A, Khan Z, Landman D, Quale J. Activity of cefiderocol against Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* endemic to medical centers in New York City. *Microb Drug Resist* 2020; 26(7): 722-6.
135. Wang Y, Li Y, Zhao J, Guan J, Ni W, Gao Z. Susceptibility of cefiderocol and other antibiotics against carbapenem-resistant, Gram negative bacteria. *Ann Transl Med* 2022; 10(5): 261.
136. Galani I, Papoutsaki V, Karaikos I, Moustakas N, Galani L, Maraki S, et al. In vitro activities of omadacycline, eravacycline, cefiderocol, apramycin, and comparator antibiotics against *Acinetobacter baumannii* causing bloodstream infections in Greece, 2020-2021: a multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2023; 42(7): 843-52.
137. Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. *PLoS One* 2016; 11(4): e0153014.
138. Seifert H, Stefanik D, Sutcliffe JA, Higgins PG. In-vitro activity of the novel fluorocycline eravacycline against carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 51(1): 62-4.
139. Yin T, Lai JJ, Huang WC, Kuo SC, Chiang TT, Yang YS; ACTION study group. In vitro and in vivo comparison of eravacycline and tigecycline based combination therapies for tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Chemother* 2022; 34(3): 166-72.
140. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Woodford N. In Vitro Activity of Eravacycline against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(6): 3840-4.

141. Ozger HS, Cuhadar T, Yildiz SS, Demirbas Gulmez Z, Dizbay M, Guzel Tunccan O, et al. In vitro activity of eravacycline in combination with colistin against carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates. *J Antibiot (Tokyo)* 2019; 72(8): 600-4.
142. Solomkin J, Evans D, Slepavicius A, Lee P, Marsh A, Tsai L et al. Assessing the efficacy and safety of eravacycline vs ertapenem in complicated intra-abdominal infections in the investigating Gram-negative infections treated with eravacycline (IGNITE 1) trial: a randomized clinical trial. *JAMA Surg* 2017; 152(3): 224-32.
143. Morrissey I, Olesky M, Hawser S, Lob SH, Karlowsky JA, Corey GR, et al. In vitro activity of eravacycline against Gram-negative bacilli isolated in clinical laboratories worldwide from 2013 to 2017. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64(3):e01699-19.
144. Zhao C, Wang X, Zhang Y, Wang R, Wang Q, Li H, et al. In vitro activities of eravacycline against 336 isolates collected from 2012 to 2016 from 11 teaching hospitals in China. *BMC Infect Dis* 2019; 19(1): 508.
145. Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Rev* 2020; 34(1): e00115-20.
146. Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, Lagacé-Wiens PRS, et al. Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: two novel carbapenem- β -lactamase inhibitor combinations. *Drugs* 2018; 78(1): 65-98.
147. Russo C, Humphries R. Approaches to testing novel β -lactam and β -lactam combination agents in the clinical laboratory. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(12): 1700.
148. Karlowsky JA, Lob SH, Young K, Motyl MR, Sahm DF. Activity of imipenem/relebactam against *Pseudomonas aeruginosa* with antimicrobial-resistant phenotypes from seven global regions: SMART 2015-2016. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; 15: 140-7.

149. Chaïbi K, Jaureguy F, Do Rego H, Ruiz P, Mory C, El Helali N, Mrabet S, Mizrahi A, Zahar JR, Pilmis B. What to do with the new antibiotics? *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(4): 654.
150. Ramirez MS, Bonomo RA, Tolmasky ME. Carbapenemases: transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. *Biomolecules* 2020; 10(5): 720.
151. Ciftci İH, Aşık G. *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. *Ankem Derg* 2011; 25(3): 196-207.
152. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(1): 35-40.
153. Vijayakumar S, Mathur P, Kapil A, Das BK, Ray P, Gautam V, et al. Molecular characterization & epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* collected across India. *Indian J Med Res* 2019; 149(2): 240-6.
154. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(2): 756-8.
155. Leungtongkam U, Thummeepak R, Wongprachan S, Thongsuk P, Kitti T, Ketwong K, et al. Dissemination of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-58, and blaNDM-1 genes of *Acinetobacter baumannii* isolates from four tertiary hospitals in thailand. *Microb Drug Resist* 2018; 24(1): 55-62.
156. Yang HY, Lee HJ, Suh JT, Lee KM. Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 beta-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J* 2009; 50(6): 764-70.

157. Çiftçi İH, Aşık G, Karakeçe E, Öksüz L, Yağcı S, Çetin Sesli E, et al. Distribution of blaOXA genes in *Acinetobacter baumannii* strains: a multicenter study. *Microbiol Bul* 2013; 47(4): 592-602.
158. Kazmierczak KM, Tsuji M, Wise MG, Hackel M, Yamano Y, Echols R, et al. In vitro activity of cefiderocol, a siderophore cephalosporin, against a recent collection of clinically relevant carbapenem-non-susceptible Gram-negative bacilli, including serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing isolates (SIDERO-WT-2014 Study). *Int J Antimicrob Agents* 2019; 53(2): 177-84.
159. Seifert H, Müller C, Stefanik D, Higgins PG, Wohlfarth E, Kresken M. In vitro activity of cefiderocol against a global collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(7): 1172.
160. Pagano M, Barin J, Martins AF, Zavascki AP. High endemic rates of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates caused by the persistence of major clones in hospitals in a Brazilian city 5 years after an outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015; 36(7): 860-2.