

Karbapeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyoloji Açısından Araştırılmasında Üç Farklı Yöntemin Karşılaştırılması

Comparison of Three Different Methods in Investigating the Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates

Gülşen ULUÇAM ATAY¹(ID), Gülçin BAYRAMOĞLU²(ID), İlknur TOSUN²(ID), Ülkü ÜNSAL³(ID)

¹ Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Rize.

¹ Recep Tayyip Erdoğan University, Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, Rize, Türkiye.

² Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

² Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Türkiye.

³ Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Yönetimi Bölümü, Trabzon.

³ Karadeniz Technical University Faculty of Health Sciences, Department of Health Management, Trabzon, Türkiye.

*Bu çalışmanın bir bölümü, 6. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Hibrid Kongresi (20-24 Ekim 2021, Türkiye)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

** Bu çalışmanın bir bölümü, International Health Areas Congress 2021 (18 -19 Eylül 2021, Türkiye)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

*** Bu çalışmanın bir bölümü, XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (4-08 Kasım 2018, Türkiye)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

**** Bu çalışmanın bir bölümü, 10th Balkan Congress of Microbiology (16-18 Kasım 2017, Türkiye)'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

*****Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-5654 sayılı proje numarası ile desteklenmiş olup Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Makale Atfı: Uluçam Atay G, Bayramoğlu G, Tosun İ, Ünsal Ü. Karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarının moleküler epidemiyoloji açısından araştırılmasında üç farklı yöntemin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(2):97-112.

ÖZ

Bu çalışmada, karbapenem dirençli oksasilinaz tipi karbapenemaz genlerini taşıyan *Acinetobacter baumannii* izolatlarının “uluslararası yüksek riskli klonlar” (IC I, II ve III) ile ilişkisinin farklı moleküler epidemiyolojik yöntemlerle değerlendirilmesi ve yöntemlerin uyum ve ayırım gücünün istatistiksel olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yetmiş iki hastanın tekrar etmeyen kan kültürlerinden izole edilen, karbapenem dirençli ve orta duyarlı 72 *A.baumannii* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlarda OXA-tipi karbapenemaz genlerinden *bla*_{OXA-23'}, *bla*_{OXA-24'}, *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58} varlığı polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ile tespit edilip, DNA dizi analizi yöntemiyle doğrulanmıştır. Klinik izolatlarla birlikte IC I, II ve III klonları 'pulsed field' jel elektroforezi [pulsed field gel electrophoresis (PFGE)], multilokus dizi tiplendirmesi [multilocus sequence typing (MLST)] ve matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Gülçin Bayramoğlu, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye. Tel (Phone): +90 532 781 0903, E-posta (E-mail): gulcinbay@hotmail.com

uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] analiziyle tiplendirilmiştir. Yöntemlerin istatistiksel olarak karşılaştırması yapılırken Simpson'un çeşitlilik indeksi [Simpson's index of diversity (SID)] ile ayırım gücünü, "Wallace katsayısı" ile uyumu değerlendirilmiştir. İzolatların tümünde *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} genlerinin bulunduğu saptanmıştır. Dizi analizi için seçilen dört izolatın biyoinformatik analizi sonucunda; *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} genleri seçilen izolatlar da saptanmış olup, *bla*_{OXA-51} geni taşıyan iki izolatın *bla*_{OXA-92} geniyile %99 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. İzolatlar, PFGE ile \geq %85 benzerlik katsayısına göre beş pulsotipe (A, B, C, D ve E) ayrılmıştır. İzolatlar ve sırasıyla ICI, ICII ve ICIII yüksek riskli klonlarına ait RUH 875, RUH 134, LUH 5875 suşları PFGE ile; A (n= 58), B (n= 8), C (n= 4), D (n= 4) ve E (n= 1) olmak üzere beş ana gruba ve bu gruplar da 10 alt gruba (A1, A2, A4, A5, A6, A9, B1, B4, C3, D1) ayrılmıştır. IC klon III (E1) ve yedi izolat özgül (A3, A7, A8, B2, B3, C1, C2) PFGE profili göstermiştir. ICII A5 alt tipinde; ICI C1 alt tipinde ve ICIII E1 alt tipinde yer almıştır. PFGE alt tip grupları ile 18 pulsotip belirlenmiş ve pulsotiplerden rastgele seçilen 20 izolatta, MLST Pasteur şemasına (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, *rpoB*) göre; ST1, ST2, ST81, ST157 ve ST604 sekans tipleri bulunmuştur. MALDI-TOF MS ile 72 *A.baumannii* izolatu ve ICI, ICII ve ICIII klonlarının cihazda oluşturulan spektra ölçümlerinin "temel bileşen analizi (PCA)" yapılmıştır. PCA analizinde kümelene mesafe düzeyi 1.5 olarak hesaplanmış, izolatlar üç kümeye ayrılmıştır. IC klon I, II ve III ile klinik izolatların 70'i bir kümede toplanırken, iki klinik izolat (AB083 ve AB0115) tekli kümeler oluşturmuştur. MALDI-TOF MS, MLST ve PFGE verileri arasında Wallace katsayısına göre anlamlı bir uyum görülmemiştir. PFGE yönteminin SID katsayısı ile ayırım gücü bakımından anlamlı sonuç verdiği, MALDI-TOF MS PCA analizinin ise ayırım gücünün en düşük değere sahip olduğu, PFGE'nin MLST ile Wallace katsayısı sonucunun ise uyumlu olduğu bulunmuştur. Sonuçlarımız, *A.baumannii* türlerinde epidemiyolojik analiz için MALDI-TOF MS'nin, PFGE ve MLST gibi altın standart bir yöntem olarak işlev göremeyeceğini ve MALDI-TOF MS için kullanılan epidemiyolojik tiplendirme protokollerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*; international clonal complex; PFGE; MALDI-TOF MS; MLST.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the relationship between carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates carrying oxacillinase-type carbapenemase genes with "international high-risk clones" (IC I, II, and III) by different molecular epidemiological methods and to statistically compare the concordance and discrimination power of the methods. Carbapenem-resistant and moderately susceptible *A.baumannii* isolates from non-repeating blood cultures of 72 patients were included in the study. The presence of "*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58}" genes within OXA-type carbapenemases was detected by polymerase chain reaction (PCR) method and confirmed by DNA sequence analysis. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analyses were performed to evaluate the clonal relations of IC I, II and III clones together with clinical isolates. In the statistical comparison of the methods, discrimination power was evaluated by Simpson index of diversity (SID) and concordance by "Wallace coefficient". All of the isolates were found to carry *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} genes. As a result of the bioinformatic analysis of the four isolates selected for sequence analysis; *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} genes were detected in the selected isolates, and the analysis of two isolates carrying *bla*_{OXA-51} gene showed 99% similarity with *bla*_{OXA-92} gene. The isolates were clustered into five pulsotypes (A, B, C, D and E) according to \geq 85% similarity coefficient by PFGE. The isolates and RUH 875, RUH 134, LUH 5875 strains belonging to high-risk clones ICI, ICII and ICIII, respectively, were divided into five main groups [A (n= 58), B (n= 8), C (n= 4), D (n= 4) and E (n= 1)] and 10 subgroups (A1, A2, A4, A5, A6, A9, B1, B4, C3, D1) by PFGE. IC clone III (E1) and seven strains showed singleton PFGE profiles (A3, A7, A8, B2, B3, C1, C2). ICII was found in A5 subtype, ICI in C1 subtype and ICIII in E1 subtype. By PFGE subtype groups, 18 pulsotypes were determined and ST1, ST2, ST81, ST157 and ST604 sequence types were found in 20 isolates randomly selected from pulsotypes according to MLST Pasteur scheme (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, *rpoB*). Principal component analysis (PCA) of the spectra of 72 *A. baumannii* isolates and ICI, ICII and ICIII clones was performed by MALDI-TOF MS. In PCA analysis, the cluster distance level was defined as 1.5 and the isolates were divided into three clusters. IC clone I, II and III together with 70 clinical isolates were grouped

in one cluster, while two clinical isolates (AB083 and AB0115) formed singleton clusters. There was no significant agreement between MALDI-TOF MS; MLST and PFGE data according to Wallace coefficient. It was found that PFGE method gave significant results in terms of discrimination power with SID coefficient, MALDI-TOF MS PCA analysis had the lowest discrimination power value, and the Wallace coefficient result of PFGE and MLST was concordant. In conclusion, MALDI-TOF MS may not function as a gold standard method like PFGE and MLST for epidemiological analysis in *A.baumannii* species and the epidemiological typing protocols used for MALDI-TOF MS need to be improved and developed.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; international clonal complex; PFGE, MALDI-TOF MS, MLST

GİRİŞ

Acinetobacter türleri arasında *Acinetobacter baumannii*, dünya çapında sağlık hizmetiyle ilişki enfeksiyonlara yol açan en önemli türdür¹. Salgınlarla ilişkili olmasındaki en büyük etken hastane ortamında uzun süre varlığını koruyabilmesidir. Salgınlarla birlikte çok ilaca dirençli [multi-drug resistant (MDR)] *A.baumannii* suşlarının yayılması çok önemli bir sorun kaynağıdır^{2,3}.

A.baumannii'nin sebep olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en etkili antimikrobiyal ilaç olarak bilinen karbapenemlere karşı direnç son yıllarda artan oranlarda bildirilmektedir². Karbapenem direncinden sıklıkla sorumlu olan OXA tipi karbapenemazlar, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-58-like} genleri aracılığıyla sentezlenmektedir¹. *A.baumannii* izolatlarının multilokus dizi tiplendirmesi [multilocus sequence typing (MLST)] ve diğer moleküler tiplendirme yöntemleriyle saptanan "uluslararası yüksek riskli klonlar (ICI, ICII, ICIII)" ve/veya "Avrupa klonları (EUI-III)" olarak tanımlanan dünya çapında dağılmış üç soyunun, ulusal ve uluslararası düzeyde salgınlardan izole edilmiş klonal soylar olduğu bilinmektedir⁴. MLST Pasteur şemasında *A.baumannii* için sekans tip (ST)'leri ve ait oldukları klonal kompleksler (IC) belirtilmiştir. Sekans tiplerinin dahil olduğu klonal kompleksler sırasıyla ST1 için IC1, ST2 için IC2, ST3 için IC3 ve ST15 için IC4 eBURST algoritmasıyla verilmiştir. Özellikle Avrupa'da ve dünyadaki salgınlarda görülen bu klonlardan köken alan suşların hastanelerdeki yayılımının artması enfeksiyon kontrol önlemleri açısından büyük önem taşımaktadır^{4,5}.

OXA-tipi karbapenemaz üreten *A.baumannii*'nin sebep olduğu salgınlara epidemiyolojik değerlendirmeleri farklı yöntemlerle yapılabilmektedir. En sık kullanılan, 'pulsed field' jel elektroforezi [pulsed field gel electrophoresis (PFGE)] ve MLST yöntemleri mikroorganizmanın genomik yapısını epidemiyolojik olarak değerlendirmektedir. Bakteri genomunun kesim enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen bantların karşılaştırılmaları esasına dayanan PFGE, altın standart yöntem olarak kullanılmaktadır. MLST yöntemi ise bakterilerin temel metabolik fonksiyonlarını yöneten genlerinin allelerini temsil eden nükleotit dizilimlerinin, PubMed MLST veri tabanlarıyla değerlendirilmesi sonucunda sekans tiplerinin belirlendiği bir epidemiyolojik tiplendirme yöntemidir⁴. Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrofotometrisi [matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] ise rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımı giderek artan bir tanımlama yöntemi olup

bakterilerin başta ribozomal proteinler olmak üzere iyonları kütle/yük oranlarına (m/z) göre ayırarak tanımlama yapan bir tekniktir. Hızlı sonuç veren ve diğer yöntemlere göre düşük maliyetli, uygulaması kolay bir yöntemdir. MALDI-TOF MS bakteri tiplendirme tekniğiyle epidemik klonlar arasından spesifik patojenite gösteren izolatları tanımlayabilmekte ve tanımlanan izolatların alt gruplarının epidemik yayılımlarını takip etmek için klinik ve çevresel kökenli suşları belirleyebilmektedir. Olası salgın şüphesi durumunda çok ilaca dirençli patojenlerin, suş kümelerini ve olası bulaşma yolunu bulmak ve tanımlamak için MALDI-TOF MS tekniği, dendrogram analiziyle hızlı sonuç almanın gerekli olduğu durumlarda uygulanabilmektedir⁶.

Bu çalışmada, OXA-tipi karbapenemaz üreten *A.baumannii* izolatlarının “uluslararası yüksek riskli klonlar (ICI, ICII, ICIII)” ile klonal ilişkisinin; PFGE pulsotip ve alt tipleri, MLST sekans tipi ve goeBURST analizi, MALDI-TOF MS “temel bileşen analizi (PCA)” analizi ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu üç yöntemin; Simpson’ın çeşitlilik indeksi [Simpson’s index of diversity (SID)] ile ayırım gücünün ve Wallace katsayısı ile uyumunun istatistiksel olarak karşılaştırarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 22.12.2015 ve Karar no: 2015/142).

İzolatların Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen 72 hastanın tekrar etmeyen kan kültürlerinden Ocak 2014 ve Ağustos 2015 tarihleri arasında izole edilen, karbapenem dirençli veya orta duyarlı 72 adet *A.baumannii* izolatu dahil edildi. Tüm izolatlar BD Phoenix Otomatize Mikrobiyoloji Sistemi (Becton-Dickinson, Sparks, MD, ABD) ile üretici firmanın talimatlarına göre tanımlandı. İzolatların on iki antibiyotiğe (imipenem, piperasilin/tazobaktam, levofloksasin, seftazidim, seftriakson, siprofloksasin, amikasin, ampisilin/sulbaktam, sefepim, gentamisin, trimetoprim/sülfametoksazol, meropenem) karşı antimikrobiyal duyarlılığı, BD Phoenix otomatize sistemi ve disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı. Sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)] kriterlerine göre değerlendirildi⁷.

Oksasilinaz Genlerinin Analizi

OXA-tipi karbapenemaz genleri olan “*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like} ve *bla*_{OXA-58-like}” gen bölgelerine spesifik primerler (Tablo I) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yöntemiyle araştırıldı^{8,9}. PCR koşulları 94 °C’de 5 dakika denatürasyon sonrası, her döngü 94 °C’de 25 saniye denatürasyon, 53 °C’de 40 saniye primer birleşmesi, 72 °C’de 50 saniye uzama işlemlerinden oluşan 30 döngü olarak uygulandı. Son olarak 72 °C’de 6 dakika uzama süresi eklendi. PCR ürünleri %2 agaroz jel içinde 90 V’de bir saat yürütüldü^{8,9}. DNA dizi analizi için rastgele seçilen AB076, AB114, AB118 ve AB138 kodlu dört izolatta sekans verilerinin biyoinformatik analizi yapıldı.

Tablo 1. OXA Direnç Genlerinin Araştırılmasında Kullanılan Primerler

Primer	Dizi (5'-3')	Gen bölgesi uzunluğu (bp)	Referans
OXA 23-like F	GAT CCG ATT GGA GAA CCA GA	501	8
OXA 23-like R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT		
OXA 24-like F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246	8
OXA 24-like R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT		
OXA 51-like F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353	8
OXA 51-like R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		
OXA 58-like F	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599	8
OXA 58-like R	CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC		

F: Forward, R: Revers, bp: Baz çifti (base pair).

“Pulsed Field” Jel Elektrofrezisi ile Farklı Klonların Belirlenmesi

Oksasilinaz genlerini taşıyan 72 *A.baumannii* izolatu ve RUH 875, RUH 134, LUH 5875 suşları (sırasıyla ICI, ICII ve ICIII klonlarına ait) arasındaki klonal yakınlık, Apal kesim enzimi (Promega, ABD) kullanılarak PFGE yöntemi ile araştırıldı¹⁰. CHEF-DR III sistemi (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, ABD) kullanılarak 14 °C’de ve 6 V/cm²’de 19 saatlik protokol uygulanarak kesilen kalıp DNA’lar %1’lik agaroz jelde yürütüldü^{11,12}. Bant profilleri, pulstotiplerin belirlenmesi ve dendrogram oluşturulması için analizler “GelCompar II version (version 6.6.11; Applied Maths, Belçika)” yazılım programı ile yapıldı. PFGE profilleri “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” metodu ve Dice benzerlik katsayısı (Dice similarity coefficient) kullanılarak ve tolerans %1 olarak alınarak belirlendi. Her jel görüntüsünde üç adet standart marker (1., 8. ve 15. kuyucuklarda) yardımıyla görüntüler arası normalizasyon yapıldı. Her jelde izolatlar ile birlikte ICI, ICII ve ICIII (RUH 875, RUH 134, LUH 5875) ve Lambda ladder PFGE moleküler ağırlık belirteci (Promega, Amerika) kuyucuklarda çalışıldı. Dendrogramda klonal ilişki değerlendirilmesinde Tenover ve arkadaşları tarafından belirlenen ilkeler esas alındı. %90-100 uyum gösteren suşlar aynı, %80-89 arası uyum gösterenler yakın ilişkili, %70-79 muhtemel ilişkili, < %70’in altında uyum ise ilişkisiz olarak kabul edildi¹³.

MLST ve goeBURST Analizi

MLST analizi için Pasteur şeması kullanıldı. PUBMED (<https://pubmlst.org/organisms/Acinetobacter-baumannii>) adresinde belirtilen çalışma protokolleri ve koşullar uygulandı. PFGE pulstotiplerinin her birinden rastgele bir ya da iki izolat seçildi ve 20 izolat MLST çalışmasına dahil edildi. *A.baumannii* izolatları arasından seçilen örneklerin Pasteur şemasında belirtilen yedi “housekeeping” gen bölgesi (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rpIB* ve *rpoB*) amplifiye edildi. Sekans analiz işlemleri “3130 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Dizi analizi sonucunda alınan veriler PubMed’in MLST web sitesinde yer alan *A.baumannii* MLST veri tabanında değerlendirildi. İlgili ST kümeleri (ICs; uluslararası klonal kompleksleri olarak da tanımlanır), Phyloviz 2.0 yazılımı (<https://www.phyloviz.net/goeburst>) kullanılarak analiz edildi. Klonal kompleks analizi, tek lokus varyantı (SLV) ve çift lokus varyantı (DVL) düzeyinde gerçekleştirildi.

MALDI-TOF MS Yöntemi, Bakteri Ekstraksiyonu ve PCA Analizi

İzolatların kanlı agarda 37 °C'de 24 saat inkübasyonundan sonra elde edilen saf kolonileri çalışmaya alındı. Tüm izolatlar, kütle spektrumundaki değişiklikleri kontrol etmek için aynı zaman diliminde çalışmaya alındı. Elde edilen spektrum kalitesini arttırabilmek için etanol ile yıkama ve formik asit (%70) kullanılarak izolatlardan tam protein ekstraksiyonu yapıldı. Tekrarlanabilirliği değerlendirmek için tüm aşamalar bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. İzolatlara ait ekstraksiyonlar metal plak (polish target) üzerine sürülüp HCCA matriks solüsyonu ile kaplandıktan sonra cihaza yerleştirildi¹⁴. Dendrogram analizi için hazırlanan bakteriyel ekstraktların ilk olarak cihazda identifikasyonu yapıldı. Cihazın voltaj ayarları, reflektör, spektrometre ve iyon kaynağı için lens protokolü Egli ve arkadaşlarının¹⁴ protokolüne göre uygulandı. Spektrumlar 2 ile 20 kDa aralığında kaydedildi. Ölçülen spektrumlar Flex Control yazılım programı kullanılarak cihaza kaydedildi. İdentifikasyon verileri MALDI Biotyper 3 yazılımı (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak kütle spektrum veri tabanı ile karşılaştırılarak doğrulandı. Piklerin en uygun referans spektrumunun logaritmik skor değer tablosu, tanımlamanın doğruluğu belirlenirken temel alındı. Öklid mesafe ölçüm algoritmaları kullanılarak PCA dendrogramı oluşturuldu. MALDI-TOF MS spektrumlarının üç boyutlu PCA analizi yapıldı¹⁴.

İstatiksel Analiz

Çalışmada kullanılan tiplendirme yöntemlerinin ayırt edici gücü, %95 güven aralığı ile SID kullanılarak değerlendirildi. Tiplendirme yöntemleri arasındaki kantitatif uyum, ayarlanmış Wallace katsayıları (Adjusted Wallace katsayısı: AW) kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan *A.baumannii* izolatlarının anestezi yoğun bakım ünitesi (YBÜ) (17/72, %23.6), nöroloji YBÜ (14/72, %19.4), nöroşirurji YBÜ (12/72, %16.6), koroner YBÜ (7/72, %9.7), pediatri YBÜ (4/72, %5.5), dahiliye YBÜ (3/72, %4.1), göğüs hastalıkları YBÜ (3/72, %4.1) olmak üzere %83.3 (57/72)'ü yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan; genel cerrahi servisi (4/72, %5.5), enfeksiyon hastalıkları servisi (2/72, %2.7), dahiliye-onkoloji servisi (1/72, %1.3), göğüs hastalıkları servisi (1/72, %1.3), kardiyoloji servisi (1/72, %1.3), kardiyovasküler servisi (1/72, %1.3) ve ortopedi servisi (1/72, %1.3) olmak üzere %16.7 (12/72)'si servislerde yatan hastalardan izole edilmiştir. İmipenem, piperasilin/tazobaktam, levofloksasin, seftazidim, seftriakson, siprofloksasine izolatların tümü dirençli bulunurken amikasine (%13.9), ampisilin/sulbaktama (%5.6), sefepime (%1.4), gentamisine (%23.6), trimetoprim/sülfametoksazole (%5.6), meropeneme (%1.4) belirtilen oranlarda duyarlı bulunmuştur.

PCR yöntemiyle izolatlarda *bla*_{OXA-24-like} ve *bla*_{OXA-58-like} genleri saptanmazken, izolatların tümünde *bla*_{OXA-23-like} geni ve *bla*_{OXA-51-like} geni saptanmıştır. DNA dizi analizi sonucunda AB076, AB114, AB118 ve AB138 kodlu izolatların *bla*_{OXA-23-like} ve *bla*_{OXA-51-like} genlerini taşıdığı doğrulanmıştır (Tablo II).

Tablo II. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'ne Göre Eşleşen OXA Dizilerinin Gen Erişim Numaraları ve Yüzdeleri

İzolot Kodları	Genler, benzerlik yüzdesi ve erişim numaraları	
	<i>bla</i> _{OXA23-like}	<i>bla</i> _{OXA-51-like}
AB076	%98 JQ409995.1	%99 NG_049833.1 * varyant <i>bla</i> _{OXA-92}
AB114	%99 LC369767.1	%99 EU255288
AB118	%99 LC096086.1	%98 MF594745.1
AB138	%99 LC369767.1	%99 NG_049833.1 * varyant <i>bla</i> _{OXA-92}

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) veri tabanında mevcut olan nükleotit dizileriyle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında AB076 ve AB138 kodlu izolatların biyoformatik analiz sonucunda *bla*_{OXA-51-like} dizi analizinde *bla*_{OXA-51-like} geninin varyantı olan *bla*_{OXA-92} geniyle %99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Tablo III'te OXA-92 geni için NCBI referans dizi gen bölgesi ve AB076 izolatının *bla*_{OXA-51-like} gen bölgesinin eşleşme tablosu verilmiştir.

Tablo III. OXA-92 Geni için NCBI Referans Dizisi: NG_049833.1 ve AB076 İzolatının Dizi Eşleşme Tablosu

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
569 bits (308)	1e-158	314/315 (%99)	1/315 (%0)	Plus/Plus
Query 1	TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAATGGGA	60		
Sbjct 255	TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAATGGGA	314		
Query 61	TGGGGAAAAAGGCTATCCCAGAATGGGAAAAGAACATGACCCTAGGCGATGCTATGAA	120		
Sbjct 315	TGGGGAAAAAGGCTATCCCAGAATGGGAAAAGAACATGACCCTAGGCGATGCTATGAA	374		
Query 121	AGCTCCGCTATTCCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGTC	180		
Sbjct 375	AGCTCCGCTATTCCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGTC	434		
Query 181	TAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATT	240		
Sbjct 435	TAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATT	494		
Query 241	TTGGCTGGTGGTCTCTAAAAATACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCT	299		
Sbjct 495	TTGGCTGGTGGTCTCTAAAAATACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCT	554		
Query 300	AGCTAATAAA-CGCT	314		
Sbjct 555	AGCTAATAAAACGCT	569		

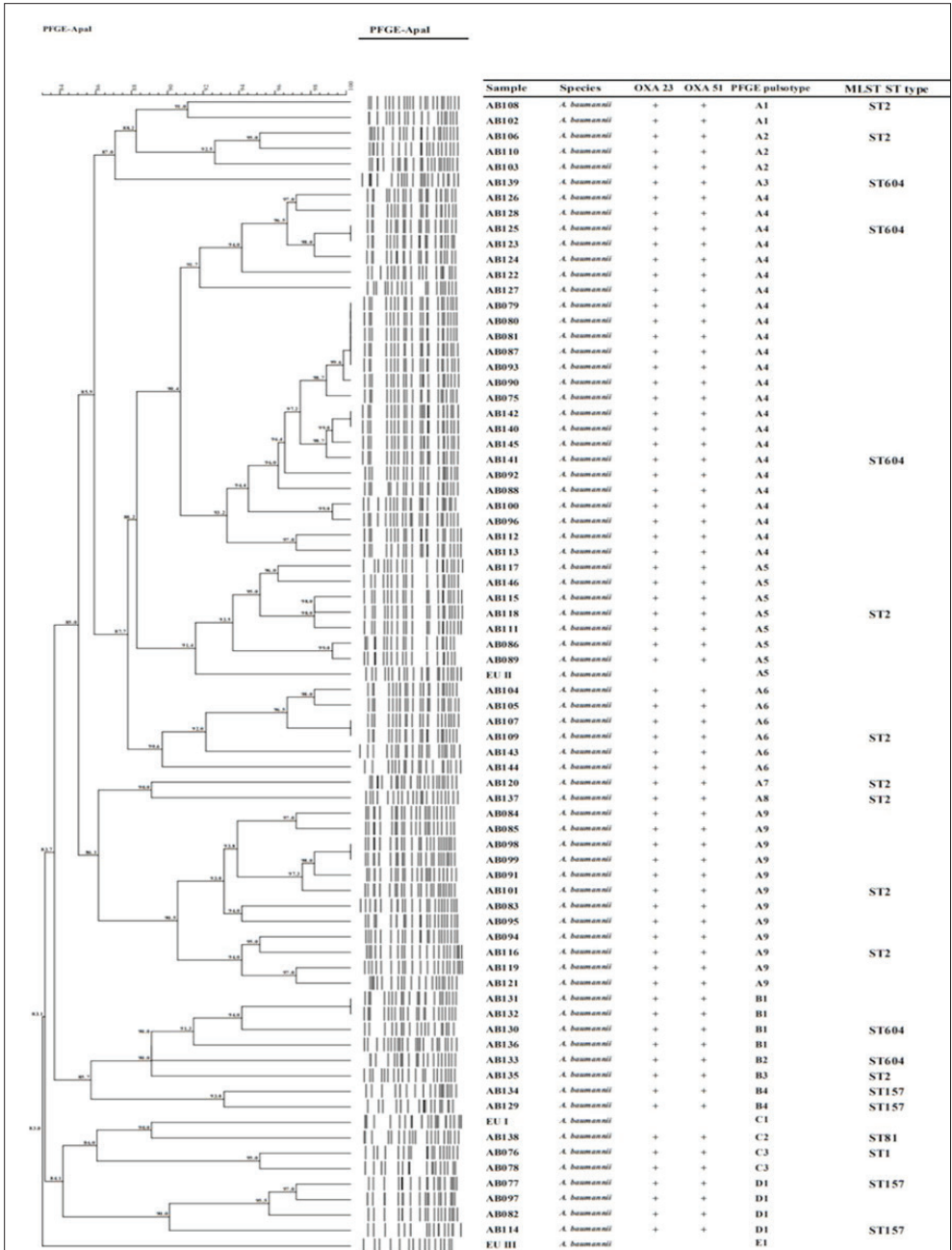
PFGE tiplendirilmesi ile kümeler arası benzerlik %83 olarak bulunmuştur. PFGE ile tüm izolatlar ve IC klonları; A (n= 58), B (n= 8), C (n= 4), D (n= 4) ve E (n= 1) olmak üzere beş ana pulstotipe ve ana pusotipler de 10 alt tipe (A1, A2, A4, A5, A6, A9, B1, B4, C3, D1) ayrılmıştır. En büyük kümeyi pulstotip A oluşturmuş ve bu pulstotipteki izolatlar arasında %85.2 ile yakın ilişkili bulunmuştur. İzolatların yedisi (A3, A7, A8, B2, B3, C1, C2) ve IC klon III (E1) özgül (singleton) PFGE alt tipi olarak tanımlanmıştır. Tiplendirmeye alınan izolatlar ana pulstotipler, alttipler ve özgül tipler ile toplamda 18 tip olarak belirlenmiştir. İzolatların ve RUH 875, RUH 134, LUH 5875 suşlarının (sırasıyla ICI, ICII ve ICIII klonları) PFGE profillerinin dendrogram görüntüsü Şekil 1’de verilmiştir.

PFGE ile belirlenen her kümeden bir ya da iki temsilci izolat seçilerek 20 izolatın MLST analizi yapılmıştır. MLST analizi yapılan izolatlarda “ST1, ST2, ST81, ST157 ve ST604” olmak üzere beş farklı sekans tipi bulunmuştur. Sekiz izolatın ST2, altı izolatın ST604, dört izolatın ST157, bir izolatın ST1 ve bir izolatın ST81 sekans tipi olduğu saptanmıştır. Test edilen izolatların PFGE pulstotiplerine karşılık gelen gen dizisi ile oluşturulan allelik profilleri, ST ve ilişkili olduğu “uluslararası yüksek riskli klonlar” (ICI-III) Tablo IV’te gösterilmiştir.

PHYLOVİZ yazılımı ile goeBURST algoritması kullanılarak oluşturulan ve ST’ler arasındaki benzerliği gösteren diyagram Şekil 2’de verilmiştir. Diyagrama göre ST604, ICII (ST2)’nin bulunduğu kümede yer almıştır. ICI’in olduğu kümede ise ST81 yer almıştır. ST157’nin Avrupa klonları ile ilişkili olan kümelerde olmadığı tespit edilmiştir.

İzolatların tümü MALDI-TOF MS ile tanımlanmış cut-off değeri > 2 değeri ile *A.baumannii* olarak tanımlanmıştır. Bakteri ekstraksiyonu ile tanımlama verilerine göre klinik izolatların ve IC I, II, III klon izolatlarının spectra ölçümlerinin PCA dendrogram analizi yapılmıştır. Analiz yapılırken kümelenme 1.5 distance level olarak belirlenmiştir. İzolatlar ve IC klonları üç kümeye ayrılmıştır. En büyük kümede 73 izolat ve IC klon I, II ve III yer alırken kalan iki izolat özgül iki kümede (A083 ve AB0115) yer almıştır. MALDI-TOF MS ile yapılan üç boyutlu PCA analizinde de “A083 ve AB115” izolatlarının diğer izolatlardan ayrı sınıflandığı görülmüştür. Temel bileşen analizinin (PCA) üç boyutlu ifadesi PC1, PC2 ve PC3 boyutları ile gösterilmiştir. Cihazın yüksek çözünürlüğü sayesinde PC1 ve PC2 iki boyutlu kümeleme analizinin grafik bulguları birbiriyle ilgisi olmayan izolatların ayrımını yapmıştır. Şekil 3’te iki boyutlu küme analizinin bulguları özetlenmiştir.

Yöntemlerin istatistiksel yöntemlerle ayırıcı özellikleri SID’le ve benzerlikleri Wallace katsayısıyla (AW) değerlendirilmiştir. SID değeri 0 ile 1 arasında değer almakta; değerinin büyük olması, ayırıcı özelliğinin fazla olduğunu göstermektedir. İki sınıflandırma yönteminin birbirine ne kadar benzer olduğu ise AW katsayısı ile belirlenmiştir. En düşük SID değerine sahip yöntem MALDI-TOF MS PCA analizidir. PFGE yöntemi ile MLST, AW katsayı değerlerine göre uyumlu bulunurken MALDI-TOF MS yöntemiyle MLST ve PFGE verileri uyumlu sonuçlar vermemiştir. Yöntemlerin SID ile ayırım gücü ve Adjusted Wallace katsayısı (%95 güven aralığı) ile uyum değerleri Tablo V’te verilmiştir.



Şekil 1. *A. baumannii* izolatlarının PFGE profillerinin dendrogramı.

Tablo IV. İzolatların gen alelleri, sekans tipleri ve PFGE pulsotipleri

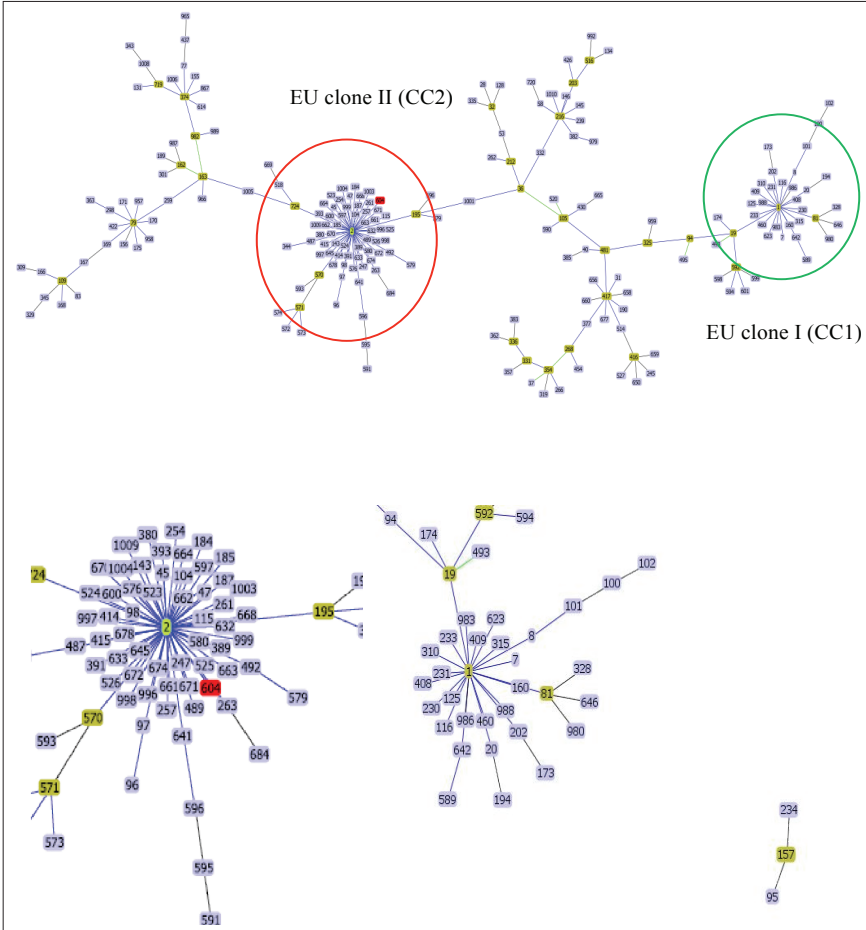
PFGE pulsotipleri	İzolat kodu	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>	ST	IC
A1	AB108	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A2	AB106	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A3	AB139	2	2	2	55	2	2	2	604	2**
A4	AB125	2	2	2	55	2	2	2	604	2**
A4	AB141	2	2	2	55	2	2	2	604	2**
A5	AB118	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A6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

ST: Sekans tipi, IC: International clonal complex, *NR: ilişkili değil, **SLV: Single locus variable.

TARTIŞMA

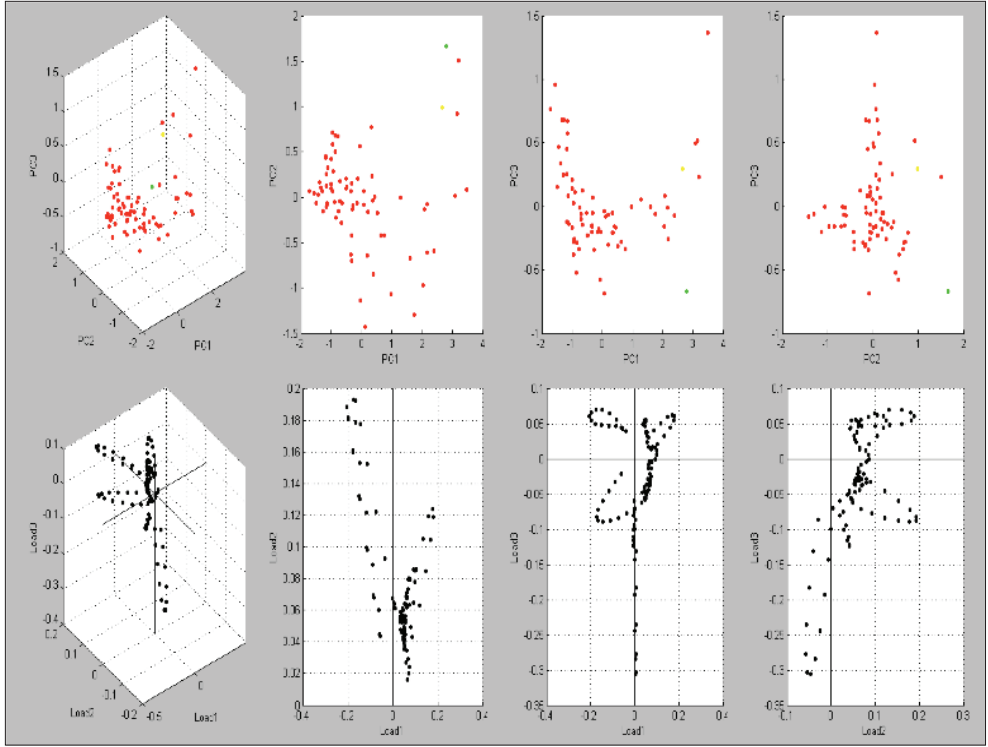
Karbapenemaz üreten *A.baumannii* suşlarının klonal soylarla ilişkisi ve moleküler epidemiyolojik yöntemlerle karakterizasyonunun değerlendirildiği bu çalışma, ülkemizde *A.baumannii* için MALDI-TOF MS yönteminin epidemiyolojik tiplendirmede değerlendirilmeye alındığı ilk çalışmadır.

A.baumannii'de karbapenem grubu antibiyotiklere direnç sıklıkla OXA-tipi karbapenemaz enzim üretimiyle olmaktadır. Dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalar OXA-tipi karbapenemaz genlerinden OXA-23'ün aşırı ekspresyonunu, *A.baumannii* izolatlarında en yaygın karbapenem direnci mekanizması olarak göstermektedir^{1,3}. *bla*_{OXA-23} geni taşıyan *A.baumannii* suşları, karbapenem dirençli suşlarla ilişkili salgınların en yaygın kaynağı olarak belirtilmektedir¹⁵. Ülkemizde yapılan çalışmalarda karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarında *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} genlerinin bulunma oranı *bla*_{OXA-24} ve *bla*_{OXA-58} genlerine göre daha yüksektir¹⁶⁻¹⁸. Dünyadaki ve ülkemizde elde edilen verilere paralel olarak bu çalışmada da *A.baumannii* izolatlarında OXA-23 gen prevalansının arttığı söylenebilir.



Şekil 2. *A.baumannii* izolatlarının goeBURST PHYLOVIZ diyagram görüntüsü.

Yunanistan'da yapılan çalışmada¹⁹, YBÜ'de yatan bir hastanın kan kültüründen izole edilmiş *A.baumannii* izolatında, OXA-51 geninin DNA dizi analiz sonuçlarına göre yeni bir varyantı olan OXA-92 geni tanımlanmıştır. Dünyada yapılan çalışmalarda OXA-51 geni varyantı olan OXA-92 geni *A.baumannii* suşlarında tanımlanmış olup ICI (ST1) klonuyla ilişkili bulunduğu MLST, DNA dizi analizi ve tüm genom sekanslama (WGS) gibi yöntemlerle tespit edilmiştir^{20,21}. Türkiye'den *A.baumannii* izolatlarında, OXA-92 geniyle ilgili bildirilen veri bulunmamaktadır. Çalışmamızdaki OXA-92 taşıyan bir izolatın ICI'yi temsil eden ST1, diğer izolatın ise ST1'in tek lokus varyantı [single locus variable (SLV)] ST81'i temsil ettiği MLST Pasteur şemasına göre doğrulanmıştır. Türkiye'deki karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarındaki sekans verilerine bakıldığında bu çalışma *bla*-OXA-92 geninin bildirildiği ve OXA-92 geni taşıyan iki izolatın aynı zamanda OXA-23 genini taşıdığı belirtilen ilk çalışmadır.



Şekil 3. *A.baumannii* izolatlarının MALDI-TOF MS ile elde edilen spektrumlarının üç boyutlu temel bileşen analizi. Farklılık potansiyeli PC1 ve PC2 tarafından gösterilmiş ve bir izolat kümesi ortaya çıkmıştır ve ilişkili 73 izolat kırmızı renkli noktalarla, tekil izolatlar (A083 ve AB0115) ise yeşil ve sarı renkli noktalarla gösterilmiştir.

Dünyada birçok ülkede salgınlardan sorumlu IC klonlarıyla bu çalışmadaki PFGE alt tiplerin ilişkisi, karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarında yayılımın olduğu ve gerekli kontrol önlemlerinin alınması gerektiğini vurgulamaktadır^{1,3,4}. Çalışmada 72 *A.baumannii* izolatı ve IC I ve II klonu PFGE ile tiplendirildiğinde yakın ilişkili bulunmuştur. Yakın ilişkili bulunan suşlardan yapılan MLST analizi ile pulsotiplerin alt tiplerinde ST1 ve ST2'nin SLV goeBURST PHYLOVİZ algoritması ile sırasıyla ST81 ve ST604 olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada farklı olarak dört izolatın ST157 sekans tipi olduğu bulunmuştur. ST157 tipi ise, ST10 sekans tipinin SLV'si olarak tanımlanmıştır²². ICI ve ICII klonlarını ifade eden ST1, ST2 ve tek lokus varyantları, klonların bulunduğu pulsotip kümelerinde MLST analizi yapılan izolatlarda tespit edilmiştir.

Tablo V. Epidemiyolojik Yöntemlerin SID ve AW Katsayısı ile İstatiksel Değerlendirme Sonuçları

Yöntem	Simpson's ID (%95 CI)			Adjusted Wallace (AW) (%95 CI)		
	PCA	MLST	PFGE	PFGE-MLST	PFGE-PCA	MLST-PCA
	0.053	0.630	0.855	1.000	0.157	0.025

A.baumannii'nin klonal popülasyon yapısı birçok ülke ve kıtada hastanede yatan hastalardan izole edilen farklı suşların MLST tiplendirilmesiyle veri tabanına tanımlanması sonucu elde edilmektedir. Dünyada baskın ve yaygın olan IC I, II ve III klonlarıyla birlikte dokuz *A.baumannii* uluslararası klonu olduğu gösterilmiştir. Karbapenem dirençli suşların ise en yaygın ST2 sekans tipinde yer aldığı belirtilmiştir^{4,5}. Türkiye'de *A.baumannii* izolatlarıyla yapılan çalışmalarda ST1 ve ST2 tiplerine ek olarak farklı sekans tipleri (ST15, ST84, ST157, ST158, ST604, ST1235-ST1250) de bulunmaktadır^{4,16,22}. *A.baumannii* ST81 sekans tipi IC I (ST1) ile ilişkili olup OXA-51 enzimi varyantları olan izolatlarda tespit edilmiştir⁴. Çalışmada ST81 sekans tipi, OXA-51 varyantı olan OXA-92 geni taşıdığı DNA dizileme yöntemiyle tespit edilen AB138 kodlu izolatta bulunmuştur. Mısır'da yapılan çalışmada ilk kez tanımlanmış olan ST604 sekans tipi ülkemizde Gözalan ve arkadaşlarının çalışmasında da bulunmuştur^{16,23}. Dünyada ülkemizden verilerin dahil edildiği çalışmalarda görüldüğü üzere ICII ülkemizde daha yaygın olarak görülmektedir^{16,17,22,23}. Bu çalışma bölgesel verileri yansıtmakta olup *A.baumannii* suşları arasında ICII klonunun suşlar arasında baskın olduğunu göstermektedir.

MALDI-TOF MS tekniği, altın standart dördüncü nesil bakteri tiplendirmesinin dahil olduğu jel temelli yöntemlerden farklı olarak WGS gibi proteomik tiplendirme teknikleri arasında yer almaktadır²⁴. MALDI-TOF MS tekniğinin rutin laboratuvarlarda, bakterilerin identifikasyonu için mikroorganizmaların proteinlerinin doğrudan analizini yaparken kullanımının basit, hızlı, otomatik ve ucuz olması mikrobiyologlar için kullanım kolaylığı sağlamaktadır⁶.

A.baumannii için tiplendirme yöntemlerinin istatistiksel olarak MALDI-TOF MS'nin benzerlik ve ayırım gücü bakımından karşılaştırıldığı çalışmalarda, kıyaslanan yöntemler arasında farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir²⁵⁻²⁷. Rim ve arkadaşları²⁶ MALDI-TOF MS yönteminin, salgınların gerçek-eş zamanlı tespitinin, DNA bazlı epidemiyoloji tekniklerinden alınan sonuçların elde edilmesinden önce kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Sousa ve arkadaşları MALDI-TOF MS ile klonal ilişkiyi değerlendirdikleri çalışmalarında, ribozomal peptitler ve/veya proteinler gibi temel moleküllerin yapısı değişmediğinden dolayı, *A.baumannii* izolatlarında klonal değerlendirme için metodun uygunsuz ve yetersiz olduğunu belirtmişlerdir²⁷. Jiang ve arkadaşları²⁸ ise farklı olarak 44 karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatını dahil ettikleri çalışmada MALDI-TOF MS'nin PFGE'den daha zayıf ayırım gücüne sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, MALDI-TOF MS yazılımında kullanılan yöntemlerin tekrarlanabilirliğini etkileyen ve tiplendirme yöntemi olarak güvenilirliğini sınırlayan ölçüm değişkenlik parametrelerinin olduğunu saptamışlardır²⁹. Çalışmalarda da belirtildiği üzere protein temelli yöntemlerin genomik yöntemlerle karşılaştırılmasındaki en temel sorun, genotipteki ifadenin her zaman fenotip ile doğrusal olarak ilişkili olmamasından kaynaklanmaktadır^{25-27,30}.

Bu çalışmada MALDI-TOF MS yöntemi ile MLST ve PFGE yöntem verileri analizinde uyumlu sonuçlar alınmadığı görülmüştür. MALDI-TOF MS yöntemi kullanarak yapılan ve klonal ilişkileri değerlendiren çalışmalarda bakteri türüne ve sayısına bağlı olarak değişken

sonuçlar bildirilmiştir^{14,26,27,30}. Ne yazık ki çalışmalarda izolat sayısındaki artışla birlikte, protein kütle spektrometresine dayalı MALDI-TOF MS yöntemiyle bakteri tiplendirmesi MLST veya PFGE yöntemlerinde olduğu gibi ayırt edici sonuçlar verememektedir. İzolat sayısının 35 ile sınırlı veya daha az olduğu çalışmalarda MALDI-TOF MS verilerinin moleküler epidemiyolojik yöntemlerle benzerliği ve uyumluluğu görülebilmektedir^{14,25,26}. Buradan yola çıkarak izolat sayısının fazla olduğu tiplendirmelerde yöntemin ayırım gücünün zayıfladığı sonucuna varılabilir. Epidemiyolojik değerlendirmeler için PFGE ve MLST yöntemlerinin, bu çalışmada da olduğu gibi izolat sayısı fazla olan çalışmalarda kullanılması uygun yöntemler olduğu söylenebilir. MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak epidemik alt türlerin tanımlanmasının, patojenin yayılmasını önlemek için tanımlamanın kısa sürede olması sebebiyle enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasını hızlandırabileceği beklenmektedir. Son yıllarda Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerine (CDC) göre WGS salgınları daha erken tespit etmek için detaylı ve kesin veriler sağlamaktadır. Çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Çalışmanın yapıldığı zaman aralığı genotipik analizde laboratuvarımızın WGS için mevcut altyapısının olmadığı bir dönemi kapsamaktadır. Sonuç olarak moleküler epidemiyolojik tiplendirme çalışmalarında MALDI-TOF MS yönteminin MLST ve WGS yönteminde olduğu gibi sonuçların ortak bir veri sisteminde değerlendirilmesini mümkün kılan çevrim içi bir platforma ihtiyaç duyulmasından dolayı çözüm odaklı bilgisayar programlarının geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. MALDI-TOF MS tekniğinin epidemiyolojik bir yöntem olarak protokollerinin DNA temelli yöntemlerde olduğu gibi gereken ayırt edici güce ulaşması için MS profilinin kütle hassasiyeti/doğruluğu, veri tabanının zenginliği ve tekrarlanabilirliğinin kalitesinin gelişmesiyle kullanılan protokollerin standardizasyonunu gerektirmektedir. Bahsedilen güncelleme basamaklarıyla birlikte epidemiyolojik tiplendirmede MALDI-TOF MS tekniğinin gelecekte maliyetli ve zaman alan yöntemler yerine kullanılabileceği ve rutin iş akışına entegre edilebileceği öngörülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışmanın, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığından 22.12.2015 tarihli ve 2015/142 sayılı protokol kodu ile onayı alındı.

TEŞEKKÜR

Avrupa klonu (RUH 875, RUH 134 ve LUH 5875) *Acinetobacter baumannii* suşlarının temini ve desteği için Prof. Dr. Alexandr Nemeč'e (Laboratory of Bacterial Genetics, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic) teşekkür ederiz. TDK-2016-5654 sayılı projeyi destekleyerek bu çalışmanın yapılmasına katkı sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ramirez MS, Bonomo RA, Tolmasky ME. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. *Biomolecules* 2020; 10(5): 720. <https://doi.org/10.3390/biom10050720>
2. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16(2): 91-102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
3. Zarrilli R, Bagattini M, Migliaccio A, Esposito EP, Triassi M. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Italy. *Ann Ig* 2021; 33(5): 401-9.
4. Shelenkov A, Akimkin V, Mikhaylova Y. International clones of high risk of *Acinetobacter baumannii*-definitions, history, properties and perspectives. *Microorganisms* 2023; 11(8): 2115. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082115>
5. Hamidian M, Nigro SJ. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genom* 2019; 5(10): e000306. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000306>
6. Wolk DM, Clark AE. Matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry. *Clin Lab Med* 2018; 38(3): 471-86. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2018.05.008>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement, CLSI M100, Wayne, PA, 2013, S23.
8. Keyik S, Arslan U, Türk Dağı H, Seyhan T, Fındık D. Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında OXA tipi beta-laktamazların araştırılması ve PFGE ile genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(4): 556-65. <https://doi.org/10.5578/mb.8274>
9. 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 Antimicrobial Agents* 2006; 27: 351-3. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>
10. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4328-55. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005>
11. Durmaz R, Otlu B, Köksal F, Hoşoğlu S, Öztürk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Inf Dis* 2009; 625: 372-7. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2009.372>
12. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med* 1998; 15: 33-50. <https://doi.org/10.1385/0-89603-498-4:33>
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2233-9. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
14. Egli A, Tschudin-Sutter S, Oberle M, Goldenberger D, Frei R, Widmer AF. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum β -Lactamase producing *E. coli* - A novel tool for real-time outbreak investigation. *PLoS One* 2015; 10(4): e0120624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120624>
15. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. *CID* 2019; 69: S521-8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>
16. Gözalan A, Ünalı O, Güldemir D, Aydoğan S, Kuzucu C, Çakırlar FK, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood culture isolates from three hospitals in Turkey. *JJID* 2021; 74(3): 200-8. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.478>
17. Hansen F, Porsbo LJ, Frandsen TH, Kaygısız ANS, Roer L, Henius AE, et al. Characterization of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from danish patients 2014-2021: Detection of a new international clone- IC11. *Int J Antimicrob Agents* 2023; 62(2): 106866. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106866>
18. Boral B, Ünalı 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. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0319-8>

19. Tsakris A, Ikonomidis A, Spanakis N, Pournaras S, Bethimouti K. Identification of a novel *bla*_{OXA-51} variant, *bla*_{OXA-92'}, from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 348-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01598.x>
20. Hammerum AM, Hansen F, Skov MN, Stegger M, Andersen PS, Holm A, et al. Investigation of a possible outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Odense, Denmark using PFGE, MLST and whole-genome-based SNPs. J Antimicrob Chemother 2015; 70: 1965-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv072>
21. Yusuf E, Tompa M, Strepis N, Klaassen CHW, Goessens WHF. High prevalence of ST502 carrying an OXA-24 carbapenemase gene in carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* calcoaceticus isolates in Romania. Microb Drug Resist 2022; 28(6): 636-4. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0274>
22. Castanheira M, Costello SE, Woosley LN, Deshpande LM, Davies TA, Jones RN. Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex and Enterobacteriaceae isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel β -Lactamases, GES-22 and VIM-35. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(12): 7358-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.03930-14>
23. El-Sayed-Ahmed MA, Amin MA, Tawakol WM, Loucif L, Bakour S, Rolain JM. High prevalence of *bla*NDM-1 carbapenemase-encoding gene and 16S rRNA armA methyltransferase gene among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Egypt. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(6): 3602-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.04412-14>
24. Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. Infect Genet Evol 2019; 74: 103935. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>
25. Steensels D, Deplano A, Denis O, Simon A, Verroken A. MALDI-TOF MS typing of a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit. Acta Clin Belg 2017; 72(4): 219-5. <https://doi.org/10.1080/17843286.2016.1198521>
26. Rim JH, Lee Y, Hong SK, Park Y, Kim M, D'Souza R, et al. Insufficient discriminatory power of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry dendrograms to determine the clonality of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from an intensive care unit. Biomed Res Int 2015; 2015: 535027. <https://doi.org/10.1155/2015/535027>
27. Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. Front Microbiol 2015; 6: 481. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00481>
28. Jiang F, Kong Z, Cheng C, Kang H, Gu B, Ma P. Overestimated discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones. Epidemiol Infect 2019; 147: e324. <https://doi.org/10.1017/S0950268819002097>
29. Busby EJ, Doyle RM, Lebreiro Babe C, Harris KA, Mack D, Méndez-Cervantes G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for molecular typing of *Acinetobacter baumannii* in comparison with orthogonal methods. Microbiol Spectr 2023; 11(3): e0499522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04995-22>
30. Torres-Sangiao E, Leal Rodriguez C, García-Riestra C. Application and perspectives of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories. Microorganisms 2021; 9(7): 1539. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071539>