

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDE KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN
KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* COMPLEX
İZOLATLARINDA KOLİSTİN HETEROJEN DİRENCİNİN VE BUNA ETKİ
EDEN BAZI FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. DENİZ GAZEL

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. MÜŞERREF TATMAN OTKUN

Çanakkale/2013

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDE KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN
KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* COMPLEX
İZOLATLARINDA KOLİSTİN HETEROJEN DİRENCİNİN VE BUNA ETKİ
EDEN BAZI FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI.

UZMANLIK TEZİ
DR. DENİZ GAZEL

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. MÜŞERREF TATMAN OTKUN

Çanakkale/2013

Bu araştırma ÇOMÜ-BAP tarafından 2012/028 sayı ile desteklenmiştir.

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlık çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28 / 10 / 2013

TEZ KONU BAŞLIĞI

Yoğun bakım ünitelerinde kan kültürlerinden izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii* complex izolatlarında kolistin heterojen direncinin ve buna etki eden bazı faktörlerin araştırılması.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Müşerref TATMAN-OTKUN

Tez Jürisi Üyeleri:
Adı Soyadı

İmzası

Doç. Dr. Ahmet UNVER

.....

Doç. Dr. Alper AKÇALI

.....

ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulunun...../...../..... tarih ve /...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.....

Dekan

TEŞEKKÜR

Uzmanlık ve tıp fakültesi eğitimimde emeği geçen, asistanlığım boyunca gerekli tüm bilgi ve becerileri yorulmadan özveri ile şahsıma aktaran hocam sayın Doç. Dr. Müşerref TATMAN-OTKUN'a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve deneyimleri ile her zaman desteğini gördüğüm değerli hocam Doç. Dr. Alper AKÇALI'ya, sayın hocalarım Doç. Dr. Ahmet ÜNVER'e, Yrd. Doç. Ahmet VURAL'a, asistan arkadaşlarım Dr. Arif AKSU ve Dr. Nilgün ÖZBEY'e, her zaman yardımlarını gördüğüm laboratuvarımız çalışanları Biyolog Ümit KARADELİ, Teknisyenler Hüseyin Resül AY ve Mehmet GÜLEÇ'e çok teşekkür ederim.

Rotasyonlarım sırasında ve diğer uzmanlık eğitim sürecinde bilgi ve becerilerinden yararlandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Metin OTKUN'a, Prof. Dr. Can Duman'a, Yrd. Doç. Dr. Alper ŞENER'e, Doç. Dr. Suzan SAÇAR'a, Doç. Dr. Coşkun BAKAR'a, Yrd. Doç. Dr. Sibel CEVİZCİ'ye teşekkür ederim.

Her zaman arkamda destek olarak hissettiğim, eşim Özlem'e, beni bugünlere getiren anne ve babama teşekkür ederim.

Özgür bir ülkede, çağdaş bir birey olarak yaşamamı sağlayan, bilimi yegane yol gösterici olarak kabul eden, cesareti ve kararlılığı ile bana mücadele etme gücü veren, her şeyimi borçlu olduğum, ulusumuzun kurtarıcısına ayrıca minnetlerimi sunarım.

Dr. Deniz GAZEL

ÖZET

YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *A. BAUMANNII* COMPLEX İZOLATLARINDA KOLİSTİN HETEROJEN DİRENCİNİN VE BUNA ETKİ EDEN BAZI FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

Acinetobacter baumannii complex (ABC) hastane enfeksiyonlarında en önemli etkenlerdendir. Çoklu ilaç dirençli ABC enfeksiyonlarında kullanılan karbapenemlere karşı direnç gelişmeye başlamıştır. Kolistin, karbapenem dirençli ABC (CR-ABC) enfeksiyonlu hastalarda kullanılabilir seçeneklerdendir, ancak son zamanlarda kolistin için de heterodirenç/direnç bildirilmeye başlanmıştır.

Amaç: Hastanemizde izole edilen CR-ABC suşlarında, kolistin heterojen direnç oranını ve antimikrobiyal kullanımı ile heterojen direnç seçilimi ve/veya direnç gelişimi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Standart ABC suşu ve yoğun bakımda kan kültüründen izole edilen bir suşu kullanarak, kolistin ile rifampisin, tigesiklin, gentamisin ve flukonazol ikili kombinasyonlarının heterodirenç/direnç oranı üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Yöntem-Bulgular: Yoğun bakım ünitelerinde kan kültürlerinden izole edilen otuzbir CR-ABC izolatu ve ATCC 19606 ABC suşu üzerinde heterojen direnç analizi yapıldı, hiçbir suşta heterodirenç saptanmadı. Seçilen bir CR-ABC suşunda ve standart suşta yapılan populasyon analizi sonuçları önceki heterodirenç araştırması sonuçlarını doğruladı.

Gizli heterodirenç/direnci ortaya çıkarabilmek için, izolatlar sub-inhibitör konsantrasyonlarda kolistine maruz bırakıldığında tüm izolatlarda kolistine direnç gelişti.

Standart suş ve seçilmiş izolat üzerinde kolistin için time-kill çalışmaları yapıldığında her iki suşta tüm konsantrasyonlarda 6. saatten sonra yeniden üreme gözlemlendi.

Kombinasyon denemelerinden kolistin-rifampisin, kolistin-tigesiklin kombinasyonları sub-inhibitör dozda bile kolistin dirençli alt populasyonların üremesini engelledi. Kolistin-gentamisin kombinasyonu ATCC suşu için etkili iken, klinik izolat için 64xMİK dozuna kadar etkili olamadı. Sadece kolistin ve kolistin-flukonazol kombinasyonu etkisiz bulundu ve her iki suş da kolistin dirençli klonlara dönüştü.

Sonuç: Uygunsuz kolistin kullanımı ile bu antibiyotiğe karşı direnç kolaylıkla gelişebilir. Bunu engellemek için kolistin, önerilen antibiyotikler ile kombine olarak uygun dozda kullanılmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, karbapenem direnci, heterodirenç, kombinasyon, kolistin

SUMMARY

INVESTIGATION OF COLISTIN HETERORESISTANCE AND SOME FACTORS EFFECTING ON HETERORESISTANCE AMONG THE CARBAPENEM RESISTANT *A. BAUMANNII* STRAINS ISOLATED FROM THE INTENSIVE CARE UNITS

A.baumannii complex (ABC) is one of the significant agents at nosocomial infections. Resistance has begun to develop against carbapenem group which was a choice for treatment of multiple resistant ABC infections. Colistin can be used at the patients infected by carbapenem resistant ABC (CR-ABC), but recently resistance and heteroresistance have been reported for colistin

Aim: In this study, we aimed to investigate the colistin heteroresistance rates among the CR-ABC strains in our hospital, search the relation between the use of antimicrobials and heteroresistance selection and/or resistance development. We also aimed to find the effects of colistin and its combinations with rifampicin, tigecycline, gentamicin, and fluconazole, on the rate of heteroresistance/resistance using standart *A. baumannii* strain and a clinical blood culture isolate from our ICUs.

Method and results: Heteroresistance analysis was performed on the thirty-one CR-ABC isolates from ICUs and a standart ATCC 19606 ABC strain. None of the strains were found heteroresistant after analysis. The population analysis studies on the standart strain and chosen clinical isolate, confirmed the previous heteroresistance investigation results.

To search out the hidden heteroresistance-resistance, all of the isolates were exposed to colistin at sub-inhibitor concentrations. Colistin resistance developed at all of these isolates.

A rapid re-growth was observed after 6th hour on both the standart strain and chosen clinical isolate during colistin time-kill studies.

Colistin-rifampicin, colistin- tigecycline combinations were found effective and prevented growth of the colistin resistant sub-populations even at sub-inhibitory doses. Gentamicin-colistin combination was also effective on ATCC strain, but this combination wasn't found effective for the clinical isolate until 64xMIC colistin concentration. Colistin alone and colistin-fluconasole combination were ineffective, so all the strains transformed to resistant clones.

Conclusion: Resistance to colistin can easily develop because of inappropriate use of this antibiotic. So to prevent this, colistin should be used combined with suggested antibiotics.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, carbapenem resistance, heteroresistance, combination, colistin.

İÇİNDEKİLER

İç kapak	i
Kabul-onay sayfası	ii
Teşekkür	iii
Özet ve anahtar sözcükler	iv
Summary ve key words	vi
İçindekiler	viii
Kısaltmalar ve simgeler dizini	xi
Şekiller dizini	xiii
Tablolar dizini	xiv
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	3
2.1. Acinetobacter Cinsi	3
2.1.1. Sınıflandırma ve Tarihçe	3
2.1.2. Mikrobiyolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri	3
2.1.3. Patogenez ve Virülans	5
2.1.4. Epidemiyoloji	6
2.1.5. Hastane Kaynaklı Acinetobacter Enfeksiyonları	7
2.1.6. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Tedavi	9
2.1.7. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Çoklu İlaç Direnci ve Kombine Tedavi	11
2.1.8. Acinetobacter Suşlarında Kolistine Karşı Direnç- Heterodirenç Mekanizması, Morfolojik Kanıtlar ve Epidemiyoloji	13
2.1.9. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Kullanılan Diğer Antibiyotikler ve Bunlara Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları	15
2.1.9.1. Beta-laktam antibiyotikler	15

2.1.9.2. Tetrasiklinler	16
2.1.9.3. Aminoglikozidler	17
2.1.9.4. Kinolonlar	18
2.1.9.5. Sülfonamidler ve trimetoprim	18
2.1.9.6 Yeni peptidler ve standart Gram pozitif etkili ajanlar	18
Gereç ve Yöntem	20
3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Kimyasallar ve Ayıraçların Hazırlanması	20
3.1.1. Besiyerleri	20
3.1.2. Kimyasallar ve Ayıraçlar	22
3.2. Örneklerin Toplanması	23
3.3. Bakterilerin Kültürü ve İdentifikasyonu	23
3.3.1. Katalaz testi	23
3.3.2. Oksidaz testi	24
3.3.3. DNaz ekimi ve değerlendirilmesi	24
3.3.4. TSİ agar besiyerinin ekim yöntemi ve değerlendirilmesi	24
3.3.5. Jelatinaz besiyeri ekimi ve değerlendirilmesi	24
3.3.6. Glukoz O-F besiyeri ekimi ve değerlendirilmesi	24
3.3.7. Çukur lamda hareket bakılması	24
3.3.8. 44°C'de üreme	25
3.4. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	25
3.4.1. Karbapenem MİK değerlendirilmesi	25
3.4.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kolistin için MİK hesaplanması	26
3.5. Heterojen Direnç Araştırılması	27
3.5.1. Direkt kolistinli agara inokulasyon ile heterodirenç araştırması	27
3.5.2. Sub-inhibitör düzeyde kolistin ile muamele edilerek suşların	

heterodirençlerinin ortaya çıkarılması	27
3.5.3. Populasyon analiz profili	28
3.5.4 Time-kill eğrisi yöntemi	28
3.6. Değişik Antibiyotik Kombinasyonlarının Heterojen Direnç Oranına Olan Etkisinin Araştırılması	29
3.6.1. Kombinasyonda kullanılacak antibiyotikler için MİK değeri hesaplanması	29
3.6.2. Seri Pasajlar	29
3.7. İstatistiksel Analiz	30
Bulgular	31
4.1. Antibiyogram Sonuçları	32
4.2. Heterojen Direnç Araştırması	32
4.3. Time-kill Eğrisi Sonuçları	34
4.4. Değişik Antibiyotik Kombinasyonları ve Konsantrasyonlarında Seri Pasaj Sonuçları	37
Tartışma	40
Sonuç ve Öneriler	48
Kaynaklar	50

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABC	: Acinetobacter baumannii complex
ATCC	: American Type Culture Collection
BHI	: Beyin kalp infüzyon buyyonu
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
COL	: Kolistin
CR-ABC	: Karbapenem dirençli Acinetobacter baumannii complex
ÇİD	: Çoklu ilaca dirençli
ÇOMÜ	: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
Dnaz	: Deoxyribonuclease
DYB	: Dahili Yoğun Bakım
EMB	: Eozin metilen blue
Flu	: Flukanozol
Gen	: Gentamisin
Glukoz O-F	: %1 glukozlu oksidasyon fermentasyon besiyeri
GYB	: Genel Yoğun Bakım
HE	: Hastane enfeksiyonları
İMP	: İmipenem
KAMHB	: Katyon ayarlı Mueller Hinton II buyyon
KKA	: %5 koyun kanlı agar

MEM	: Meropenem
MHA	: Mueller Hinton agar
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton buyyon
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NA	: Nutrient Agar
PABA	: Para-aminobenzoik asit
PBP	: Penisilin bağlayan protein
Rif	: Rifampisin
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
SUAM	: Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi
Tig	: Tigesiklin
tRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
TSI	: Üç şekerli demirli besiyeri
VAN	: Vankomisin
VİP	: Ventilatör ilişkili pnömoni
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi

ŞEKİLLER

Şekil 4.1. Populasyon analiz profili grafiği	34
Şekil 4.2. <i>A.baumannii</i> 21 no'lu izolat time-kill eğrisi	35
Şekil 4.3. <i>A.baumannii</i> ATCC 19606 time-kill eğrisi	36

TABLULAR

Tablo 3.1 MİK testinin yorumlanmasında sınır değerler ($\mu\text{g/ml}$) (82)	26
Tablo 3.2 Kolistin MİK testinin yorumlanmasında sınır değerler ($\mu\text{g/ml}$) (82)	27
Tablo 4.1 Klinik izolatların yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı	31
Tablo 4.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen suşların kolistin için MİK değerleri	33
Tablo 4.3 Populasyon analiz profili tablosu	34
Tablo 4.4 Kombine denenecek antibiyotikler için saptanan MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$)	37
Tablo 4.5 Standart ATCC <i>A.baumannii</i> suşu için değişik ilaç konsantrasyonları ve kombinasyonlarında seri pasaj sonuçları (CFU/ml)	38
Tablo 4.6 <i>A.baumannii</i> 21 nolu izolat için, değişik ilaç konsantrasyonları ve kombinasyonlarında seri pasaj sonuçları (CFU/ml)	38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

A. baumannii complex (ABC) özellikle yoğun bakım ünitelerinde dünya çapında hastane salgınları yapabilen önemli bir fırsatçı patojendir ve hastane enfeksiyonlarında mortalite ve morbiditenin yüksek olmasından sorumlu olan önemli etkenlerden birisidir. Yıllar içinde bu mikroorganizmalar birçok antibiyotiğe dirençli hale gelmiştir ve kısıtlı antibiyotik duyarlılığı olduğu için son 10 yılda tedavisi en problemlilerden biri haline gelmiştir (1, 2).

Daha önce çoklu dirençli ABC enfeksiyonlarının tedavisinde bir seçenek olan karbapenemlere karşı son yıllarda değişik mekanizmalarla direnç gelişmeye başlamıştır (1, 2). Karbapenem dirençli ABC (CR-ABC) ile enfekte olan hastaların tedavisinde kullanılacak son seçeneklerden birisi kolistin olup buna karşı da son yıllarda direnç ve heterojen direnç bildirilmeye başlamıştır (3, 6).

Heterojen direnç için resmi bir tanım olmasa da heterojen direnç bir klinik izolatta, bir antibiyotiğe dirençli ve duyarlı popülasyonların karışık olarak bulunması olarak anlaşılabilir. Bu dirençli altpopülasyonlar tek başına doğal mutasyonlar ile açıklanamaz. Heterodirenç aslında genetik olarak homojen bir suşun fenotipik manifestasyonudur (7). ABC özelinde heterojen direnç tanımı, bakterinin kolistin MİK değeri $<2 \mu\text{g/ml}$ olmasına karşın, $>2 \mu\text{g/ml}$ colistin varlığında 48 saat enkübasyon sonunda hala altpopülasyonlarının saptanabilmesidir.(3, 4) Bu heterodirencin özellikle mikroorganizmanın kolistin'e maruziyeti ile indüklendiği düşünülmektedir.(3, 8). Ayrıca devam eden maruziyet ile heterodirençli popülasyonların zaman içerisinde dirençli hale geldikleri gösterilmiştir (3, 9). Kolistin heterodirenci rutinde yapılan antibiyotik duyarlılık testleri ile tespit edilememektedir. Bu yüzden son yıllarda CR-ABC enfeksiyonlarındaki tedavi başarısızlıklarının nedeni olarak kolistin heterodirenci suçlanmaktadır. Kolistin monoterapisinin de zaman içinde direnç ve heterodirenç gelişimi açısından problem yaratabileceği bildirilmiştir (10). Yine kolistin diğer bazı antibiyotikler ile kombine edilmesinin kolistin dirençli mutantların gelişmesini önlediği bildirilmiştir (11).

Çalışmamızda 04/01/2010 tarihinden itibaren Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜ SUAM) Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)'nde yatan hastalardan izole edilen karbapenem dirençli *A.baumannii* suşlarında kolistine karşı heterojen direnç oranı araştırılacak olup heterojen dirençli izolatlarda heterojenite oranına etkisi olabileceği düşünülen kemoterapötik ajanların tekli veya kombine kullanımdaki etkisi seçilen suşlarda ve standart suşta araştırılacaktır.

Bu çalışma sonucunda hastanemizde ABC ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde soruna neden olabilecek kolistin heterodirençli bakterin varlığı araştırılacak, Türkiye'de kolistin heterodirenci varlığı açısından veri elde edilmiş olacaktır. Ek olarak heterodirençli bakteri varsa bunlarda heterodirenç oranının artış veya azalmasına etki edebilecek bazı antibiyotiklerin ve/veya kombinasyonlarının etkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Acinetobacter cinsi

2.1.1 Sınıflandırma ve Tarihçe

Acinetobacter ilk defa 1911 yılında Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calco-aceticus* olarak isimlendirilmiş, 18 yıl sonra da DeBord'un gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesiyle tanımlanmıştır (12, 13, 14). O günden bugüne kadar birkaç adı olmuş, yapısal özellikleri ve biyokimyasal özellikleri ile tanımlanmaları ve sınıflanmaları birçok karmaşık süreçlerden geçmiştir (12). Deoksi Ribonükleik Asit (DNA) - DNA hibridizasyon çalışmaları ile *Acinetobacter calcoaceticus*, *A.baumannii*, *A.haemolyticus*, *A.junii*, *A.johnsonii*, *A.lwoffii*, *A.radiorezistens*, *A.schindleri*, *A.ursingii* ile birlikte 25 adet genom tür belirlenmiştir (13, 14).

Fenotipik özellikler temelinde laboratuvar ortamında *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis* türlerini ayırt etmek zor olduğundan, bunlar *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* kompleksi olarak tanımlanmıştır (12, 13). *A.baumannii*, *A.calcoaceticus* ve *A.lwoffii*, klinik literatürde en sık rapor edilen Acinetobacter türleridir (12). Tüm bu türler arasında en sık ve önemli klinik tablolara yol açan tür *A. baumannii*'dir (13, 15).

2.1.2. Mikrobiyolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri

Acinetobacter cinsi bakteriler 1-1,5 µm x 1,5-2,5 µm boyutlarında, 35-37°C'de üremeyi seven, nonfermentatif, oksidaz- Deoxyribonuclease (DNAaz)-jelatinaz negatif, katalaz pozitif, indol negatif, hareketsiz, nitratları redükte etmeyen, zorunlu aerob üreyen gram negatif mikroorganizmalardır (13). Flajellaları yoktur, fimbriaları vardır. Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif

fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar (15, 16). Kolistine duyarlı ve kolistine maruz bırakılmış heterodirençli suşlar ayrı ayrı incelendiğinde; suşların fimbrialarının boyları ve suşların küresel topoğrafik özellikleri arasında farklar olduğu gösterilmiştir (17).

Bu bakteriler üremenin logaritmik fazında basil, üreme dışında ise kok şeklinde, daha çok kokobasil, ikişerli, küme halinde veya kısa zincirsel görülürler. Bu yüzden Gram boyalı preparatların incelenmesinde Haemophylus ve Neisseria türleri ile karışabilirler. Üreme saptanmış kan kültür tüplerinden hazırlanan preparatlarda kristal violeyi tutmaya yatkındırlar ve böylece yanlış olarak Gram pozitif kok olarak tanımlanırlar (13, 14). Acinetobacter kolonileri genellikle 1-2 mm çapında, opak bazen mukoid, pigmentsiz, kubbesel, yüzeyleri oyuk veya düz olabilirler.

Tür düzeyinde ayırmada; *A.baumannii* hemoliz yapmama, glukozu oksitleme ve 44°C'de üreyebilme yeteneği ile diğerlerinden ayırt edilebilir. Glukoz negatif kökenlerden hemoliz yapmayan *A.lwoffii*, hemoliz yapan *A.haemolyticus* olarak adlandırılır. *A.johnsonii* 37°C'de üreyememesi nedeni ile diğer türlerden ayırtedilebilir (14, 15).

Eozin metilen blue (EMB) ve kanlı agar gibi pek çok besiyerlerinde Acinetobacter cinsi bakteriler kolaylıkla ürerler. Ayrıca birçok seçici ve ayırt edici besiyerleri geliştirilmiştir. Bu amaçla diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe eden bromkrezol moru, safra tuzları, bazı şekerleri içeren Herellea agar, antibiyotik içeren Leeds Acinetobacter Medium ve Holton's agar kullanılmaktadır (14, 15).

Yakın zamanlarda birçok tipleme yöntemleri geliştirilmiştir. Serolojik reaksiyonlar, faj tipleme, bakteriyosin, protein profiller, antibiyotik duyarlılık paternleri, multilocus enzim elektroforez, polimeraz zincir reaksiyonu, pulsed-field jel elektroforez ve ribotiplendirme bu amaçla kullanılmaktadır. Klasik biyokimyasal metotlar, türler arasında ayırım yapmak için yeterli olmamaktadır.

Bu amaçla birçok karbon kaynağının kullanılması temeline dayanan hazır ticari kitler kullanılmaktadır. Ticari sistemlerden; API 20 NE (bioMerieux, Fransa) beş, Biolog GN2 Microplate (Biolog, Hayward ABD) 15 tür identifiye edebilmektedir (15, 18).

2.1.3. Patogenez ve virülans

Acinetobacter cinsi bakterilerin virülans potansiyelleri düşük olduğundan konak savunma mekanizması normal olan kişilerde ancak sınırlı düzeyde enfeksiyon oluşturabilirler. Genellikle fırsatçı hastane enfeksiyonlarına neden olurlar (13). Bu bakterinin antimikrobiyal çoğul direnç kazanma özelliği ve dış ortamda birçok yüzeyde canlı kalma kapasitesi hastane enfeksiyonları açısından önemini arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların sindirim sisteminin hastane salgını etkeni çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları gelişimi için önemli bir epidemiyolojik rezervuar olduğunu göstermiştir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar, sıklıkla endotrakeal tüp, trakeostomilere bağlı olarak solunum sistemi, üriner sistem, yara yerini tutmakta ve sepsise kadar ilerlemektedir. Risk faktörleri antibiyotik tedavisi, cerrahi girişim, yabancı cisim uygulamaları, mekanik ventilasyon, yoğun bakımda yatıştır (13). Hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritin insan için endotoksijenik potansiyeli çok az bilinmektedir. Kapsül içermesi, bakteriosin üretimi, kuru ortamda uzun süre yaşaması gibi özellikler Acinetobacter'lerin yaşam süresini artıran ilave faktörlerdir. Kapsül anti-fagositiktir ve kompleman eksikliği olan bireylerde enfeksiyona yatkınlık yaratabilir (14, 19).

Virülanstan sorumlu olduğu saptanan bazı faktörler şunlardır (14,15).

i) Polisakkarit kapsül: L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşur. Bakteri yüzeyinin hidrofilik özelliğini sağlar ve fagositozdan korur. Damar içi kateter, trakeal kanül gibi yüzeylere tutunmayı kolaylaştırır.

ii) Fimbria ve/veya kapsüler polisakkarit: Epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar.

iii) Lipopolisakkarit, Lipid A: hücre duvarında bulunan lipid A potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırır.

iv) Dokulardaki lipidleri yıkan enzimler üretirler.

v) Aerobaktin gibi siderofor ve demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilir.

Ayrıca yapılan çalışmalarda antibiyotik direnci sağlayan PER-1 geninin virülansı arttırdığı ve klinik olarak daha ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (20).

2.1.4. Epidemiyoloji

Acinetobacter cinsi bakteriler, doğada toprak, su ve gıda maddelerinde çürükçül olarak serbest yaşayabilirler. Kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH ortamlarında canlı kalabilmeleri nedeniyle, cansız yüzeylerde günlerce canlı kalabilmektedirler. Hazır sütlerden, donmuş yiyeceklerden, hastane havasından, camdan, musluklardan, peritoneal diyaliz maddelerinden, anjiyografi kateterinden, laringoskoplardan, ventilatörlerden, solunum tedavi solüsyonlarından, tansiyon aletinden, kontamine eldivenlerden, pamuktan, kullanılmış enjektörlerden, hasta yastıklarından ve filtrelerden izole edilmiştir (14, 15, 21). Sağlam bireylerde ise özellikle kasık, koltuk altı gibi nemli bölgeler başta olmak üzere deride, ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistem florasında da bulunabilir (15, 22).

Sağlık kurumlarında yatan hastalarda enfeksiyonların yanı sıra kolonizasyon nedeniyle de mikroorganizma klinik örneklerden izole edilmektedir. Yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hasta dışkılarından çoklu ilaç direnci olan *Acinetobacter spp.* izole edilmiş ve trakeostomili hastaların %45'inde

kolonizasyon saptanmıştır. Deri yoluyla taşıyıcılık oranlarının yüksek olması hasta bakımı sırasında sağlık personelinin kontamine olmasına ve etkenin sürekli etrafa yayılmasına neden olmaktadır (15, 23).

Bir çalışmada sağlıklı gönüllüler ve yatan hastalar üzerinde yapılan karşılaştırmada, hastalarda *Acinetobacter* türleri ile kolonizasyon oranı %75, kontrol grubunda ise %42 olarak bulunmuştur (24).

2.1.5. Hastane kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonları (HE) hasta sağlık kuruluşuna başvurduğu sırada var olmayan veya kuluçka döneminde olmayan, ancak hastaneye yatıştan 48-72 saat sonra gelişen, veya taburcu olduktan sonra da 10 gün içinde ortaya çıkabilen enfeksiyonlardır (25, 26). Hastane enfeksiyonları oluşturduğu yüksek maliyet, morbidite ve mortalite nedeniyle tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. *Acinetobacter baumannii* türleri hastane kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu olan türdür (27).

Dünya çapında hastane enfeksiyonları oranları coğrafik olarak değişmekle birlikte genellikle %3-17 arasında bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün dört bölgesini temsil eden (Avrupa, Doğu Akdeniz, Güney Doğu Asya ve Batı Pasifik) 14 ülkede, 55 hastanede yapmış olduğu bir prevalans çalışmasında yatan hastaların ortalama %9'unda hastane enfeksiyonu geliştiği saptanmıştır. En yüksek hastane enfeksiyonu sıklığı Doğu Akdeniz ile Güney Doğu Asya Bölgelerinde sırasıyla %12 ve 10 olarak tespit edilmiştir. Bu değer Avrupa'da %8, Batı Pasifik'de %9 olarak saptanmıştır (28). Yoğun bakım ve yanık üniteleri gibi birimlerde bu oran %20-40'lara çıkmaktadır. Gelişmemiş ülkelerde sağlık kuruluşuna başvuran hastalarda hastane enfeksiyonları gelişme riskinin gelişmiş ülkelere göre 2-20 kat artmış olduğu raporlanmıştır (29).

Sağlık hizmetiyle ilişkili *Acinetobacter* enfeksiyonları hakkındaki bilgilerin çoğu salgın araştırmalarına dayanmaktadır (12). *A.baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlar daha çok yoğun bakım ünitelerindeki immun sistemi zayıf düşmüş hastalarda görülme eğilimindedir. Uzun süreli bakım merkezlerinde, özellikle de ventilatöre bağlı hastaların bakımının yapıldığı merkezlerde bulunan hastalarda risk daha fazladır. Yoğun bakım ünitesinde kalmaya ek olarak, kolonizasyon ve enfeksiyona ilişkin risk faktörleri arasında, yakın zamanda geçirilmiş cerrahi operasyon, santral damar içi kateterizasyon, trakeostomi, mekanik ventilasyon, enteral beslenme ve üçüncü grup sefalosporin, florokinolon veya karbapenem antibiyotikleriyle tedavi de yer almaktadır (30, 31).

Lolans ve ark. (32) 2006 yılında Chicago'da ve hemen yakınındaki Indiana civarında karbapenamaz üreten *Acinetobacter*'e ilişkin bir salgın nedeniyle yaptıkları çalışmada moleküler sınıflandırma sonucu salgının monoklonal olduğunu göstermişlerdir. 2005 yılından beri en az beş hastane, üç uzun süreli bakım merkezi ve 200'den fazla hasta bu salgından etkilenmiştir. Fransa'da birden çok şehirde, çoğul ilaca dirençli monoklonal *A.baumannii* salgınında, Nisan 2003 ile Haziran 2004 tarihleri arasında 53 hastanede 290 izolat toplanmıştır. Epidemik suş, geniş spektrumlu bir beta-laktamaz içermektedir. En fazla etkilenen hastalar, yoğun bakım ünitelerinde, tıbbi servislerde veya uzun süreli bakım merkezlerinde bulunan hastalar olmuştur (33). Irak ve Afganistan'da yaralanan Amerikan askeri birliklerinde çoğul dirençli *A.baumannii* nedeniyle gelişen ciddi yara yeri enfeksiyonları ve osteomyelit bildirilmiştir (34).

Sağlıklı verilere ulaşılmasında karşılaşılan zorluklarla beraber Türkiye' de günümüzde hastane enfeksiyonları oranının % 5-15 arasında değiştiği kabul edilmektedir (25, 35). Karahocagil ve ark. (36) yaptıkları çalışmada Ocak 2009-Mart 2010 tarihleri arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Araştırma Uygulama Hastanesi'nde HE oranını %3,5 bulmuşlardır. Neden olan

mikroorganizmalar arasında ise *A. baumannii* %23,2 oranı ile ilk sırada yer almıştır. Araştırma hastanemizde yapılan bir çalışmada 1 Mayıs 2009 - 1 Mayıs 2010 tarihleri arasında izole edilen *A. baumannii* suşlarında çoklu direnç gözlenmiş, tüm suşlarda sadece tobramisin ve kolistin duyarlı bulunmuştur (16). Batman Bölge Hastanesinde 2011 yılında yapılan bir araştırmada ise *Acinetobacter* için karbapenem direnç oranı % 75 iken, kolistine direnç saptanmamıştır (37). Gözütok ve arkadaşlarının (38) 2013 yılında yayınladıkları, Kayseri'de yaptıkları bir araştırmada *A. baumannii* karbapenem direnç oranları %91 bulunmuş iken kolistine dirençli suş saptanmamıştır.

Tek odaklı salgınların birden fazla hastanede görülmesi, muhtemelen hastaların veya personelin hareketlerinden, yiyecek veya ekipmana ilişkin ortak kaynaklı kontaminasyona maruziyetten kaynaklanan kurumlar arası yayılmayı ifade etmektedir. Bu tür salgınlar, devam eden gözetim, kurumlar arasındaki iletişim ve *Acinetobacter*'in bakım evlerine girmesinin ve buralardan yayılmasının önlenmesine yönelik önlemlerin önemini vurgulamaktadır (12).

2.1.6. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarında Tedavi

Antibiyotiğe duyarlı *Acinetobacter* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar, genelde geniş spektrumlu sefalosporinler, beta-laktam\beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları veya tek başına ya da aminoglikozidle kombinasyon halinde kullanılan karbapenemlerle tedavi edilmektedir (15).

İzole edilen *Acinetobacter* izolatlarının birçok antibiyotiğe dirençli olması durumunda tedavisi oldukça güçtür. Antibiyotik seçenekleri oldukça sınırlı olabilmekle birlikte karbapenemler, sulbaktam ve kolistin en etkili antibiyotikler olarak görülmektedir (39, 40).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda tedavide kullanılan, etkin antibiyotik olan kolistine karşı direnç bildirilmesi üzerine alternatif ilaç olarak netilmisin ve polimiksin B'nin duyarlılığı araştırılmaktadır. Çalışmalarda bu

antibiyotikler *A. baumannii*'ye karşı yüksek oranda etkin olarak raporlanmaktadır. Ayrıca duyarlı bildirilen tobramisın tedavide alternatif olarak görölse de bu antibiyotik ülkemizde bulunmamaktadır (41).

Çoğul ilaca dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu ventilatör ilişkili pnömonide (VİP) ampisilin-sulbaktam ile aminoglikozid kombinasyonu veya tek başına kolistin tedavisi in vitro duyarlılık sonuçlarına göre önerilen tedavi seçeneklerindedir. Sadece tetrasiklinlere duyarlı *A. baumannii*'nin neden olduğu VİP'te intravenöz yoldan doksisisiklin veya minosiklin tedavisinin etkili olduğu bildirilmiştir (42).

Acinetobacter enfeksiyonlarında en sık kullanılan kombinasyon; düşük direnç oranları ve in vitro sinerjik etki göstermesinden dolayı imipenem ile amikasinidir (39). Seftazidim ile aminoglikozid veya florokinolon kombinasyonları da kullanılabilir. Beta-laktam antibiyotikle kombine edilmiş sulbaktam (sefoperazon + sulbaktam, ampisilin + sulbaktam) tedavide iyi bir alternatiftir. Sulbaktam, Acinetobacter türleri üzerine bakterisidal etkilidir (43).

Tigesiklinin geniş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan gram negatif bakterilere ve çoğul ilaca dirençli Acinetobacter cinsi bakterilere in vitro etkinliğinin oldukça iyi olduğu gösterilmiştir. Fakat tigesikline karşı da direnç geliştiği rapor edilmiştir (6, 44, 45).

Türkiyede Dizbay ve arkadaşları (46) 2008'de VİP olgularından izole edilen çoklu ilaca dirençli (ÇİD) ABC suşlarında tigesikline karşı %25 direnç ve kolistine karşı sıfır direnç bulmuşlardır. Ancak yine Aygencel, Dizbay ve arkadaşları (47) 2010 yılında raporladıkları olgu sunumunda bir VİP olgusunda kolistine karşı direnç gelişimine rastlamışlardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında, artık kolistin monoterapisi yerine, heterodirenç ve direnç gelişimini önlemek için çeşitli antibiyotikler ile kombinasyon önerilmektedir (4,48, 49).

2.1.7. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Çoklu İlaç Direnci ve Kombine Tedavi

Çoklu dirençli bakteriler daha çok VİP olgularında karşımıza çıkmaktadır. Çoklu direnç konusunda literatürde birçok tanımlama mevcuttur. Çoklu direnç, antibiyotik gruplarından en azından ikisi, üçü, dördü veya sekizine dirençlilik durumu olarak tanımlanmıştır. Ancak bu tanımlamalar oldukça tartışmalıdır (39). “Panrezistan” terimi ise daha çok test edilen tüm standart antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olan Acinetobacter suşlarını açıklamak için kullanılmaktadır (12, 50).

Acinetobacter türleri beta-laktam, tetrasiklin, aminoglikozid ve florokinolon gibi farklı antibiyotik gruplarına karşı hızla direnç geliştirebilmektedir. ÇİD Acinetobacter spp. enfeksiyonları 1980’li yıllardan bu yana artmaktadır ve bazen panrezistan kökenler ciddi sorunlar oluşturmaktadır (5, 6, 50, 51).

Çoklu dirençli *A.baumannii* için yapılan in-vitro çalışmalarda polimiksin B veya kolistin+imipenem veya rifampisin veya azitromisin; polimiksin veya kolistin+imipenem+rifampisin; rifampisin+azitromisin; sulbaktam+rifampisin veya azitromisin veya kinolon kombinasyonlarının artmış etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Klinik çalışmalarda ise polimiksin B veya kolistinin; karbapenem, aminoglikozid, kinolon veya florokinolonu içeren antibiyotiklerden biri veya daha fazlasının kombinasyonları ile tedavi edilmiş olgular bildirilmiştir (39, 52).

Daha önceleri, çoğul ilaca dirençli *A. baumannii*’nin neden olduğu VİP’te ampicilin-sulbaktam ile aminoglikozid kombinasyonu veya tek başına kolistin tedavisi in vitro duyarlılık sonuçlarına göre önerilen tedavi seçeneklerinden biriydi (42). Son çalışmalar artık kombine tedavi önermektedir.

İn-vitro çalışmalarda sulbaktamın aminoglikozit, rifampisin veya azitromisin ile kombinasyonlarının imipeneme duyarlı Acinetobacter kökenlerine karşı sinerjik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ancak sulbaktamın

sefolosporinlerle veya diğer beta-laktamlarla kombinasyonu etkinlik artışı sağlamamıştır. Kinolonlar ile beta-laktam antibiyotikler veya imipenem ile azitromisin kombinasyonları da imipeneme duyarlı *Acinetobacter* kökenlerine karşı sinerjik bulunmuştur. Polimiksin ile imipenem, imipenem ile rifampisin ve polimiksin, imipenem, rifampisin üçlü kombinasyonlarının metallo-beta-laktamaz negatif, imipeneme dirençli *Acinetobacter* türleri için sinerjik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (53). Yapılan çalışmalarda yeni kullanıma giren tigesiklinin genişlemiş spektrumlu beta laktamaz salgılayan gram negatif bakterilere ve çoğul ilaç dirençli *A. baumannii* cinslerine in vitro etkinliğinin iyi olduğunu göstermiştir. Ancak yakın zamanda tigesikline karşı da direnç raporlanmıştır (45).

Rodriguez ve arkadaşları (11) yaptıkları bir çalışmada kolistin (COL)+rifampisin (RİF) ve COL+imipenem (İMP) kombinasyonlarının ÇİD ABC üzerine oldukça etkili olduğunu ve heterodirençli mutantların seçilimini engellediğini bildirmişlerdir (54). Yine Rodriguez (11) daha önceki bir çalışmasında kolistin tedavisi alan menenjitli bir hastanın BOS örneğinden COL dirençli hale gelmiş ABC izole etmiş ve bu etkeni COL + RİF kombinasyonu ile tedavi etmiştir.

Gordon ve arkadaşları (48) Vankomisin (VAN) + COL kombinasyonlarının ilginç bir şekilde ÇİD ABC suşlarında sinerjik olduğunu ve heterodirenç seçilimini engellediğini göstermişlerdir. Yine Li ve arkadaşları (55) ana suştan elde ettikleri kolistine karşı heterodireçli suşlarda normalde Gram pozitif etkinliği olan bazı antibiyotiklere karşı da duyarlılık geliştirdiğini bulmuşlardır.

Metallo-beta-laktamaz negatif, karbapenem direnci olan *Acinetobacter* kökenlerine bağlı enfeksiyonlarda kolistin ile rifampisin veya kolistin ile imipenem kombinasyonu değerlendirilmelidir. Metallo-beta-laktamaz pozitif, karbapenem dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında ise kolistin ile rifampisin ve/veya tigesiklin kombinasyonu düşünölmelidir. Eğer VİP varsa nebölike kolistin

tedavisi kombinasyona eklenebilir. Kùltür sonuçları, antibiyotik duyarlılık sonuçları ve MİK düzeyleri dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir (39, 56).

2.1.8 Acinetobacter Suşlarında Kolistine Karşı Direnç-Heterodirenç Mekanizması, Morfolojik Kanıtlar ve Epidemiyoloji

Kolistin hücre zarına etki eden polimiksin grubu bir antibiyotiktir. (Polimiksin E). Katyonik bir peptid olan kolistin, Gram negatif bakteri hücre zarı ile ilişkiye geçip dış membrandaki anyonik lipopolisakkarid molekülleri ile ilişkiye girer ve sonuçta hücre zarında düzensizlik ortaya çıkar. Kolistin, LPS moleküllerini stabil halde tutan magnezyum ve kalsiyumun yerini değiştirerek dış membranda bozulmaya ve oluşan permeabilite bozukluğu bakterinin ölümüne neden olur. Kolistin konsantrasyona bağımlı olarak etki göstermektedir. Gram-negatif bakterilerde mutasyon ya da adaptasyon yolu ile kolistine karşı direnç gelişebilmektedir. Böbrek fonksiyonu normal hastalar için intravenöz yoldan 2,5-5 mg/kg/gün, 2-4 eşit dozda kullanılması önerilmektedir (57).

Kolistine karşı heterojen direnç ilk olarak Li (3) tarafından bildirilmiş ve daha sonra bu konuda çalışmalar hızlanmıştır. Hawley (8) kolistin heterodirencinin önceki kolistin tedavisi ile ilişkisini raporlamıştır. Tan (9) uygulama rejiminden bağımsız olarak kolistine maruziyet sonrası direnç gelişimini deneysel olarak raporlamıştır. Rodriguez (11) bir çalışmasında kolistin tedavisi alan menenjitli bir hastanın BOS örneğinden COL dirençli hale gelmiş ABC izole etmiş ve etkeni COL + RİF kombinasyonu ile tedavi etmiştir.

Yau ve arkadaşları (4) araştırdıkları 30 izolat içinde %23 heterodirenç ve %3.3 kolistine karşı direnç bulmuşlardır. Ko ve arkadaşları (5) iki Kore hastanesinden 265 klinik izolat çalışmış ve kolistine karşı direnç oranını %27.9 bulmuşlardır. Souli ve arkadaşları (6) Atina civarındaki 17 hastaneden izole edilen Acinetobacter'lerde kolistine karşı direnç oranını %3 olarak bulmuşlardır. Yine 2011 yılında Tayvan ve Kuveyt'de devlet hastanelerinde klinik örneklerden

izole edilen ABC suşlarında yapılan araştırmalarda kolistine karşı direnç oranı %10 ve %12 civarında bulunmuştur (58, 59).

Türkiye'den Aycengel ve Dizbay (47) 2010 yılında kolistin dirençli ABC raporlamışlardır. Eser ve arkadaşları. (eser) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran hastalardan izole edilen *Acinetobacter* suşlarında %11.3 kolistin direnci saptamışlardır. Biz de 2011 yılında ÇOMÜ SUAM yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan bir hastanın BOS örneğinden kolistin dirençli ABC suşu izole ettik.

Yapılan araştırmalar duyarlı ve dirençli hale gelmiş aynı ABC suşlarında belirgin morfolojik değişiklikler oluştuğunu göstermiştir. Soon ve arkadaşları (17) ya ptıkları bir çalışmada, kolistin duyarlı ABC ve kolistin dirençli hale getirilmiş aynı kökenli ABC suşlarındaki morfolojik farklılıkları raporlamışlardır. Buna göre kolistin duyarlı suşlar; elektron mikroskopunda tüm üreme fazlarında çomak şeklinde ve duraklama fazında uzamış hücreler şeklinde gözlenmiş iken, kolistin dirençli suşlar; erken ve orta logaritmik fazda küresel, duraklama fazında ise kok, çomak, uzamış tipler bir arada olacak şekilde gözlenmiştir. Ayrıca yine dirençli suşlarda dış yüzeyde artmış oluklu yapılar görülmüş, pililerde sayı ve uzunluk azalması saptanmış, yüzey dokuları daha ince görüntülenmiştir.

Gordon ve arkadaşları (48) ise yaptıkları benzer bir çalışmada kolistine maruz kalmış suşlarda, artmış şekilsel varyasyonlar, oyuklar, hücrelerin etrafında birikintiler ve pürtüklü bir morfoloji raporlamışlardır.

Şu anda ABC kolistin direnci hakkında göreceli olarak az çalışma bulunmakla beraber, kolistin-lipid A etkileşimini açıklamaya çalışan iki ana hipotez dikkat çekmektedir (60).

Birinci hipotez Moffat, Henry ve arkadaşları (61 - 63) tarafından öngörölmüş LPS kaybı hipotezidir. Başlangıç olarak bu çalışmacılar lipid A biyosentez geninin inaktivasyonunu bulmuşlardır. Sonuçta *lpxA*, *lpxC* ve *lpxD* üzerinden ABC'de LPS üretiminin tamamen kaybının meydana geldiğini

saptamışlardır. Bu LPS kaybına uğramış olan suşlar kolistine karşı dirençli hale gelir (61). Yine çalışmacılar *lpxA* ya da *lpxC*'de *ISAb11* insersiyon sekansı bulmuşlardır. Bu değişikliğin de LPS üretiminin tamamen kaybına ve yüksek düzey kolistin direncine yol açtığını bulmuşlardır (62). LPS kaybına uğrayan kolistin dirençli ABC suşunda oluşan daha az negatif yük, kolistine karşı affinite kaybının sebebi olabilir (64).

İkinci hipotez ise Adams ve arkadaşları (65) tarafından geliştirilen PmrAB iki bileşenli sistem ilişkili hipotezdir. Kolistin dirençli ve kolistin duyarlı suşlarda PmrA ve PmrB kodlayan genleri karşılaştıran bu çalışmacılar, *pmrA* ve *pmrB* genlerindeki mutasyonun ABC kolistin direnci ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki hipotez şu an için en geçerli hipotezlerdir.

2.1.9. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Kullanılan Diğer Antibiyotikler ve Bunlara Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları

2.1.9.1. Beta-laktam Antibiyotikler: Beta-laktamlar bakteri hücresinin, peptidoglikan sentezinde görevli olan karboksipeptidaz ve transpeptidazlarını inhibe edip, hücre duvarı sentezini durdurarak bakterisidal etki gösterirler. Bu tip enzimler penisilin bağlayan protein (PBP) olarak adlandırılır. Bir bakteride çok sayıda PBP bulunur. Beta-laktam antibiyotikler hücre duvarı sentezi sırasında çoğalmakta olan bakterilere etki ederler. Beta-laktam antibiyotikler penisilinler, beta-laktamaz inhibitörleri, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler olmak üzere 5 ana grupta sınıflandırılır (66).

Beta-laktamlara direnç gelişimine neden olan genel mekanizmalar;

1) Penisilin bağlayan proteinlerde oluşan değişiklikler ile antibiyotiğin hedefine bağlanmasının engellenmesi: PBP'in aşırı sentezi, beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin edinilmesi, duyarlı bir PBP'in daha dirençli PBP ile kombinasyon yapması, PBP'lerdeki nokta mutasyonları sonucu beta-laktam antibiyotiklere afinitelerinin azalması sonucu

oluşabilmektedir. Bu tip direnç esas olarak gram-pozitif türlerde görülmekle beraber Acinetobacter türlerinde de tanımlanmıştır (67).

2) Dış membran porin proteinlerinde azalma veya atım pompaları ile antibiyotiğin hücre duvarından geçişinin ve hücre içine girişinin önlenmesi: Beta-laktamların çoğu suda eriyebilen moleküllerdir. Bu nedenle lipid yapıdaki gram-negatif bakteri dış membranını geçemezler. Bu geçiş ancak dış membrandaki porin proteinlerinin oluşturduğu, içleri su dolu kanalcıklar aracılığıyla gerçekleşir (67).

Bakterilerdeki porinlerin özellikleri ve sayısı, antibiyotiğin yük, çözünürlük, büyüklük gibi bazı özellikleri antibiyotiğin bakteri içine giriş hızını belirler. Antibiyotiklerin bakteri hücrelerinden atılması, bakterilerin antibiyotiklerin hücre içi yoğunluğunu azaltmak için kullandıkları enerjiye bağımlı bir mekanizmadır. Atım pompaları antibiyotiklere duyarlı ve dirençli tüm mikroorganizmalarda bulunmakta, mutasyonlar sonucunda oluşan değişiklikler ile antibiyotiklere direnç oluşmaktadır (68).

3) Beta-laktamaz enzimleri ile beta-laktam antibiyotiğinin inaktive edilmesi: Bu yol bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı dirençte en sık kullandıkları mekanizmadır. Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz enzimleri gram-pozitif bakterilere göre daha çok daha yaygın ve çeşitlidir. Bunun sebebi birçoğunun plazmid ve transpozon kontrolünde olması ve direnç genlerini duyarlı bakterilere geçirilebilmesidir. Bu enzimler moleküler yapılarına ya da substrat ve inhibitör profilleri ile belirlenen işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılabilir. En yaygın olarak 1995'den beri Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından önerilen sınıflama güncellenmiş şekli ile kullanılmaya devam edilmektedir (68).

2.1.9.2. Tetrasiklinler: Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere, anaeroplara, spiroket, riketsiya, klamidya ve mikoplazma türlerine etkili olan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Gram-negatif bakterilerin içine dış

duvarlarındaki porin kanallarından pasif difüzyonla girip, protein sentezi yapmakta olan 70S ribozomun 30S alt ünitesinde yeni taşıyıcı ribonükleik asit (tRNA) molekülünün yerleşeceği bölge ile birleşirler. Sonuçta tRNA ribozomdaki yerini alamaz, tRNA'nın getirdiği aminoasit sentezlenen polipeptide bağlanmaz ve protein sentezi duraklar (69).

Yine geniş bir etkinliği olan tigesiklin, karbapenemaz üreten *Acinetobacter* suşlarına karşı etkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda tetrasiklin direnç genlerini taşıyan birçok bakterinin tigesikline karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir. Yapılan klinik çalışmalarda komplike olmuş deri, yumuşak doku enfeksiyonları ve komplike karın içi enfeksiyonlarda tigesiklin monoterapisi etkili bulunmuştur. İdrarla atılımı düşük olduğu için üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılması önerilmemektedir (70, 71).

Tetrasiklinlere dirençte, bakteri sitoplazmik membranındaki proteinler ile ilacın enerjiye bağımlı olarak hücre dışına pompalanması, enzimatik yoldan tetrasiklinin inaktive edilmesi, ribozomal ribonükleik asit (rRNA)'daki mutasyonlar ve ribozomun sitozolik proteinleri ile korunması rol oynar (72).

2.1.9.3 Aminoglikozidler: Öncelikle *Pseudomonas*'lar olmak üzere gram-negatif aerop basiller üzerine etkilidirler. Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kombine tedavide etkilidirler. Gram-pozitif bakterilere etkinlikleri kısıtlıdır. Etki mekanizması olarak, mesajcı ribonükleik asit (mRNA)'daki genetik bilginin yanlış okunmasına yol açarak bakteri ribozomundaki protein sentezini inhibe ederler ve böylece bakteri hücrelerine hızlı bakterisidal etkinlik gösterirler. Aminoglikozidlerin konsantrasyona bağlı bakterisidal ve postantibiyotik etkilerinden yararlanılarak tek ve yüksek doz uygulamalarıyla başarılı tedavi sonuçları elde edilmiştir (73).

Aminoglikozidlere karşı ribozomal, enzimatik (asetiltransferaz, fosfotransferaz ve nükleotidil transferaz enzimine bağlı) ve membranda azalan geçirgenlik mekanizması ile direnç söz konusudur (74). Amikasin ve netilmisin

bakterilerin salgıladığı inaktive edici enzimlerin çoğuna karşı dayanıklıdır; sadece asetilazlar tarafından inaktive edilirler. Bu direnç sayesinde grup içinde en geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahiptirler (75).

2.1.9.4. Kinolonlar: DNA sentezini direkt olarak inhibe eden antimikrobiyal gruptur. Kinolonlar bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan DNA-giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV enzimleri ile etkileşime girip, DNA'nın replikasyonu ve RNA-polimeraz enziminin DNA'ya bağlanarak mRNA oluşturmasını engeller, sonuçta nükleik asit sentezi durur. Etkileri konsantrasyona bağımlı bakterisidaldir. Ofloksasin, levofloksasin ve siprofloksasin, *Acinetobacter spp.* türlerine etki gösterir. Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kombine tedavide siprofloksasin sıklıkla kullanılan ajanlardan biridir. Fakat günümüzde dirençli kökenler ön plandadır. Kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerindeki mutasyonlara, geçirgenlikte azalmaya veya antibiyotiğin dışarı atımına bağlı olarak gelişmektedir (76).

2.1.9.5. Sülfonamidler ve trimetoprim: Bakteriler folik asidi dışardan alamadıklarından, kendileri para-aminobenzoik asit (PABA)'ten sentezlerler. Sülfonamidler, PABA analoglarıdır ve dihidropteroat sentetaz enzimi için onunla yarışarak folik asit sentezine girerler ve folik asit sentezini inhibe ederler. Sonuçta bakterilerde RNA ve DNA yapımı bozulur. Bakteriyostatik etkilidirler. Trimetoprim, bu sentez yolu üzerinde dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder. Sülfonamid+trimetoprim kombinasyonu, folik asit sentez yolağında ardışık inhibisyonla bakterisid etki yapar (77). Sülfonamidlere karşı direnç, sıklıkla kromozomal mutasyonlar sonucu PABA'nın aşırı sentezi ya da sülfonamidlere düşük afinite gösteren değişik bir dihidropteroat sentetaz enziminin sentezlenmesi ile gelişir. *A. baumannii* izolatları trimetoprim-sülfametoksazole karşı yüksek düzeyde direnç göstermektedirler (78).

2.1.9.6. Yeni peptidler ve standart Gram pozitif etkili ajanlar: Yapılan son araştırmalarda, doğal bazı ürünler ve kimyasal yoldan sentezlenmiş bazı

moleküller dahil bir seri yeni kimsiyal maddenin ABC'e etkileri üzerine ümit verici sonuçlar alınmıştır. Bunlardan en önemlileri Alyteserin-1c, Buforin II ve Human Beta Defensin 2 peptidleridir (49). Noradrenalin uyarısı ile ciltte salınan 23 aminoasitlik bir peptid olan Alyteserin-1c, yapılan bir araştırmada ÇİD ABC suşları için bakterisidal bulunmuştur (79). Bir Asya kurbağasının midesinden izole edilen Buforin II peptidi ile yapılan çalışmalarda in-vivo ve in-vitro olarak, mono ve RİF ile kombine terapi simülasyonlarında olumlu sonuçlar alınmıştır (80). Human Beta defensin de yapılan çalışmalarda ABC ve ÇİD ABC suşlarına etkili bulunan başka bir peptiddir (81).

Yapılan araştırmalar normalde Gram negatif etkinliği olmayan fusidik asit, eritromisin, vankomisin, teikoplanin gibi bazı antibiyotiklerin, kolistine karşı duyarlı halden dirençli hale geçmiş ABC suşlarına nispeten etkili olduğunu ve direnç gelişimi sonrasında, bunlara karşı bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin düştüğünü göstermiştir (55). Gordon ve arkadaşları (48) kolistin direnci geliştirilmiş ABC suşunda vankomisine karşı MİK değerinin anlamlı derecede düştüğünü ve kolistin-vankomisin kombinasyonun sinerjik etkili olduğunu raporlamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2012-028 numaralı proje ile desteklendi. Çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜ-SUAM) Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, Ocak 2010 – Eylül 2012 tarihleri arasında, yoğun bakım ünitelerinde kan kültürlerinden izole edilen karbapenem dirençli 31 *A.baumannii* complex suşu ile gerçekleştirildi. Klinik izolatların 14'ü erkek, 17'si kadın hastaya aitti. İzolatlar toplam 25 hastadan toplandı, ancak 6 hastada birden fazla kan kültüründe üreme olduğundan, bu hastalar için kronolojik olarak kültürde üreyen hem ilk hem de son izolat çalışmaya alındı. Tüm suşlar izole, genel ve dahiliye yoğun bakım ünitelerinden izole edildi.

3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Kimyasallar ve Ayıraçların Hazırlanması

3.1.1. Besiyerleri:

Eosin Methylene Blue (EMB), %5 koyun kanlı agar (KKA), triple sugar iron (TSİ) agar, Mueller Hinton agar (MHA) ve deoxyribonuclease (DNaz) besiyerleri (Salubris, Türkiye) hazır alınmıştır. Laboratuvarda hazırlanan besiyerleri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

Mueller Hinton buyyon (MHB): Toz MHB (Merck, Almanya)'dan 22 gr alınarak, hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda (Wisd WiseStir MSH-20D, Almanya) eritildikten sonra deney tüplerine 10'ar ml dağıtıldı. Otoklavda (Hırayama Hiclave HG-80, Japonya) 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı.

Kasyon ayarlı Mueller Hinton II buyyon (KAMHB): Toz KAMHB (Becton Dickinson and Company, ABD)'dan 22 gr alınarak, hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda (Wisd WiseStir MSH-20D, Almanya) eritildikten sonra, otoklavda (Hirayama Hiclave HG-80, Japonya) 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı.

Beyin kalp infüzyon (BHI) buyyonu: Toz BHI (Oxoid, İngiltere)'den 37 gr alınarak hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda eritildikten sonra deney tüplerine 5'er ml dağıtıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı.

Jelatinaz besiyeri: 120 gr jelatinin (Riédel de haën, Almanya) hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp su banyosunda (Memmert, Almanya) eritildi. İçine 8 gr nutrient broth (Merck, Almanya) ilave edilip tekrar su banyosunda eritildikten sonra deney tüplerine 5'er ml dağıtıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı.

%1 glukozlu oksidasyon fermentasyon (Glukoz O-F) besiyeri: O-F basal mediumun (BBL/ABD) hacmi distile su ile 11 g/litre olacak şekilde, 150 ml hazırlanıp karıştırılıp kaynatıldı. Su banyosunda 56°C'ye kadar soğutulup deney tüplerine 5'er ml dağıtıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı. Sonrasında su banyosunda 50°C'ye kadar soğutuldu. Üzerlerine %10'luk glukoz solüsyonundan 0,5 ml eklendi.

Mueller Hinton Agar (MHA): Toz MHA (Merck, Almanya)'dan 34 gr alınarak, hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda (Wisd WiseStir MSH-20D, Almanya) eritildikten sonra deney tüplerine dağıtıldı. Otoklavda (Hirayama, Hiclave HG-80, Japonya) 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı.

Nutrient Agar (NA): Toz NA (Merck, Almanya)'dan 20 gr alınarak, hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda (Wisd WiseStir

MSH-20D, Almanya) eritildikten sonra otoklavda (Hirayama, Hiclave HG-80, Japonya) 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı. Plaklara döküldü.

3.1.2. Kimyasallar ve Ayıraçlar

Katalaz ayıracı: 1 ml %30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) (Sigma, ABD), 9 ml distile su ile karıştırılarak %3'lük H₂O₂ hazırlandı.

Oksidaz ayıracı: N, N, N, N-Tetrametil-p-fenilenediamin hidroklorürün (Sigma, ABD) distile sudaki %1'lik eriyiği hazırlandı.

DNaz ayıracı: 97,2 ml distile su ile 2,8 ml %37'lik hidrojen klorür (HCl) (Riédel de haën, Almanya) karıştırılarak hazırlandı.

%10'luk glukoz solüsyonu: 10 gr glukoz (Merck, Almanya) hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 0,2 µm'lik filtre kullanılarak süzüldü.

0,5 McFarland bulanıklık tüpü: 2012 Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstütüsü (Clinical and Laboratory Standarts Institute-CLSI) önerilerine göre hazırlandı (82).

Aşağıdaki toz antibiyotiklerin her birinin potensleri standart bakteriler (ATCC *P.aeruginosa* 27853, *E.coli* 25922) kullanılarak ayarlandı ve sulandırımalarında potenslerine uygun miktar tartıldı (82 - 85).

Kolistin sülfat: Toz olarak alındı (Sigma Aldrich, ABD). 5 mg toz uygun miktarda steril distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

Rifampisin: Toz olarak alındı (Sigma Aldrich, ABD). 5 mg toz uygun miktarda steril distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

Gentamisin sülfat: Toz olarak alındı (Sigma Aldrich, ABD). 5 mg toz uygun miktarda steril distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

Tigesiklin hidrat: Toz olarak alındı (Sigma Aldrich, ABD). 5 mg toz uygun miktarda steril distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

Flukanazol: Toz olarak alındı (Sigma Aldrich, ABD). 50 mg toz uygun miktarda steril distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

3.2. Örneklerin Toplanması

Çalışmada ÇOMÜ SUAM'da yatan hastaların kültürlerinden hastane enfeksiyonu (HE) etkeni olarak 2010–2012 tarihleri arasında yoğun bakım ünitelerinde kan kültürlerinden izole edilen, karbapenemler de dahil olmak üzere çoğul ilaca dirençli *A.baumannii* kökenleri kullanıldı. Aynı hastaya ait birden fazla klinik örnekte karbapenem dirençli *A.baumannii* üremesi olduğunda tarih olarak hastanın yatışından sonraki ilk örneğinden ve son örneğinden izole edilen bakteriler çalışmaya alındı.

3.3. Bakterilerin Kültürü ve İdentifikasyonu

Hastanemizde yatan hastalardan HE etkeni olarak izole edilen, VITEK2 cihazı (Biomeriux, Fransa) ile *A.baumannii* kompleks olarak isimlendirilen suşlar boncuklu saklama besiyerinde -80°C'de saklandı. Stoklanmış bakteriler ve (American Type Culture Collection) ATCC *A.baumannii* 19606 suşu çalışma anında iki kez koyun kanlı agara pasajlandı ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde (Mermert, Almanya) 24 saat inkübe edildi.

İzolatların ve ATCC suşunun *A.baumannii* olduklarını doğrulamak için öncelikle Gram boyama yapıp gram negatif kokobasil olarak görülen izolatlar konvansiyonel yöntemlerle tekrar tanımlandı. Bu amaçla katalaz, oksidaz, DNaz enzimlerinin varlığı araştırıldı. TSİ agar, jelatinaz ve glukoz O-F besiyerlerine ekim yapıldı. Çukur lamda hareket ve 44°C'de üreme bakıldı.

3.3.1. Katalaz testi: Bu test, katalaz enzimi bulunduran bakterilerin hidrojen peroksiti katalize ederek, oksijen ve suya ayrılmasını sağlama esasına dayanır. Temiz bir lam üzerine bir damla katalaz ayırıcı damlatılıp, üzerine steril öze ile alınan koloni karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif, görülmemesi ise negatif olarak değerlendirildi (86).

3.3.2. Oksidaz testi: Hazırlanan oksidaz ayırıcı kurutma kağıdına damlatıldı. Koloniden alınıp ayıraçlı kağıda sürüldüğünde 10 saniye içinde mor rengin oluşması pozitif olarak, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi (86).

3.3.3. DNaz ekimi ve değerlendirilmesi: DNaz besiyerinin ortasına nokta ekim yapıldı. 37°C'de bir gece inkübe edildi. Plak yüzeyine tüm yüzeyi kaplayacak şekilde DNaz ayırıcı döküldü. Koloni çevresinde HCl ve DNA birleşmesi sonucu presipitasyon gözlemlendiğinde (besiyeri matlaştığında) DNaz negatif olarak yorumlandı (87).

3.3.4. TSİ agar besiyerinin ekim yöntemi ve değerlendirilmesi: Petride tek düşen koloniye dokundurulan iğne öze ile alınan bakteriler önce besiyerinin dik kısmına batırılarak sonra yatık kısmının yüzeyinde zik zak çizilerek ekim yapıldı. Ekimler 37°C'de 24 saat inkübe edildi, fermantatif veya nonfermantatif olması incelendi (87).

3.3.5. Jelatinaz besiyeri ekimi ve değerlendirilmesi: Petride tek düşen koloniye dokundurulan iğne öze ile alınan bakteriler besiyerine dik batırılarak ekim yapıldı. Ekimler 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Değerlendirme yapılmadan önce tüpler +4°C'de bekletildi Hidroliz oluşumu sonucu jelde erime olup olmadığı gözlemlendi (87).

3.3.6. Glukoz O-F besiyeri ekimi ve değerlendirilmesi: Petride tek düşen koloniye dokundurulan iğne öze ile alınan bakteriler besiyerine dik, yüzeyden 1-1,5 cm derinlikte olacak şekilde iki üç kez batırılarak ekim yapıldı. Ekimler 37°C'de 48 saat inkübe edildi, sadece tüpün üst kısmında görülen renk değişikliği glukozdan oksidasyon varlığı olarak değerlendirildi (87).

3.3.7. Çukur lamda hareket bakılması: BHI buyyona tek koloniden pasaj yapıldı ve 37°C'lik inkübatörde iki saat bekletildi. Çukur lamda hazırlanan asılı damla yöntemi ile hareket araştırıldı (87).

3.3.8. 44°C'de üreme: BHI buyyonunda bir gece 37°C'de üretilmiş bakteri süspansiyonundan, aynı besiyerini içeren tüpe bir damla damlatıldıktan sonra tüp 44°C'lik su banyosuna konuldu, 24 ve 48 saat sonra üremeleri değerlendirildi (87).

3.4. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin ve ATCC *A.baumannii* 19606 suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi; kolistin için katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon ve kolistin sülfat antibiyotik tozu kullanılarak CLSI'ya göre mikrobuyyon dilüsyon test yöntemiyle, karbapenemler için ise MHA ve M.I.C.Evaluator stripleri (Oxoid, İngiltere) kullanılarak CLSI ve M.I.C.Evaluator stripleri üreticisinin önerilerine göre yapılıp, yorumlandı. Kalite kontrol kökeni olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı (82).

3.4.1. Karbapenem MİK değerlendirilmesi

A.baumannii klinik izolatlarına karşı imipenem ve meropenemin MİK değerleri M.I.C.Evaluator strip (Oxoid, İngiltere) ile belirlendi. Elde edilen saf bakteri kolonilerinden MHB'de 0.5 McFarland Standard bulanıklığına eş süspansiyonlar elde edildi. Hazırlanan süspansiyon steril pamuklu eküvyon çubuğu yardımı ile MHA yüzeyine sürülerek ekildi, 3-5 dk kurutulduktan sonra meropenem (MEM, 0,002µg/ml) ve imipenem (IMP, 0,002µg/ml) M.I.C.Evaluator stripleri yerleştirildi. 37°C de ve 24 saat inkübasyon sonucunda elips şeklindeki inhibisyon zonunun striple kesiştiği nokta sayısal MİK değeri olarak kabul edildi. Sonuçlar CLSI'nın sınır değerleri baz alınarak değerlendirildi (82). Testin değerlendirilmesinde kullanılan sınır değerler Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. MİK testinin yorumlanmasında sınır değerler (µg/ml) (82)

Antibiyotik	Dirençli	Orta Duyarlı	Duyarlı
İmipenem	≥ 16	8	≤ 4
Meropenem	≥ 16	8	≤ 4

3.4.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kolistin için MİK hesaplanması

Çalışmaya alınan tüm klinik suşlar ve *A.baumannii* ATCC 19606 standart suşu ile hastanemizde BOS'tan izole edilip kontrol suşu olarak kullanılan kolistin dirençli suş için sıvı mikrodilüsyon tekniği ile kolistin MİK değerleri hesaplandı ve CLSI kriterlerine göre değerlendirildi (82). Sıvı besiyeri olarak KAMHB kullanıldı. Test 96-kuyucuklu U-tabanlı mikrop plaklarda uygulandı. Test edilecek her suş için öncelikle mikroplağın ilk kuyucuğu hariç her kuyucuğuna 50 µl KAMHB dağıtıldı. Daha sonra ilk kuyucuğa ve ikinci kuyucuğa 128 µg/ml kolistin içeren 50 µl distile su eklendi. İkinci kuyucuktan başlamak üzere iki kat dilüsyon olacak şekilde seri aktarım yapıldı ve en son 50 µl sıvı dışarı atıldı. Böylece 128 µg/ml'de başlayıp 0.06 µg/ml ile biten antibiyotik konsantrasyonları elde edildi. Bir adet pozitif, bir adet negatif kontrol kuyucuğu çalışıldı. Bakteri inokulumu 0.5 McFarland standartında (1×10^8 CFU/ml) KAMHB ile hazırlandı. Daha sonra yine KAMHB ile 100 kez dilüe edildi. Bu inokulumdan her kuyucuğa 50'şer µl eklenerek her kuyucukta 5×10^5 CFU/ml bakteri yoğunluğu sağlandı. Plaklar, üstü plastik ile kapatılarak 35°C ısıda 24 saat enkübasyona kaldırıldı. Enkübasyon sonunda üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kaydedildi. Sonuçlar CLSI kriterlerine (82) göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi ve sınır değerleri Tablo 3.2'de gösterildi.

Tablo 3.2. Kolistin MİK testinin yorumlanmasında sınır değerler ($\mu\text{g/ml}$) (82)

Antibiyotik	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Kolistin	≤ 2	-	≥ 4

3.5. Heterojen Direnç Araştırılması

ABC için heterodirenç tanımı bakterinin kolistin MİK değeri $<2 \mu\text{g/ml}$ olmasına karşın, $>2 \mu\text{g/ml}$ colistin varlığında 48 saat enkübasyon sonunda altpopülasyonlarının saptanabilmesidir (3).

3.5.1. Direkt kolistinli agara inokulasyon ile heterodirenç araştırması

Heterojen dirençli suşları bulmak için Li ve arkadaşlarının (3) daha önce önerdiği metoda göre çalışıldı. Bu amaçla her suş için 35°C de bir gece enkübe edilmiş bakteri kültüründen % 0.9'luk tuzlu su içinde 0.5 McFarland standardına uygun süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan 100 μl miktar (10^7 CFU/ml) 4 $\mu\text{g/ml}$ kolistin içeren Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine ve kontrol için %5 koyun kanlı agara pasajlandı. Plaklar 35°C de 48 saat tutuldu ve 48 saat sonrasında üreyen koloniler sayıldı. Dört $\mu\text{g/ml}$ kolistin içeren besiyerinde üreyen koloniler heterojen dirençli *A.baumannii* olarak değerlendirilip, ek olarak buradan yapılacak subkültürdeki bakterilerin MİK değerinin $>2 \mu\text{g/ml}$ olduğu mikro buyyon dilüsyon testi ile doğrulandı.

3.5.2. Sub-inhibitör düzeyde kolistin ile muamele edilerek suşların heterodirençlerinin ortaya çıkarılması

Bu amaçla 0.5 MİK konsantrasyonunda kolistin ve 10 ml KAMHB içeren test tüpleri, test edilecek klinik izolatlardan ve ATCC 19606 suşundan bir öze dolusu koloni ile inokule edildi. Tüpler 37°C çalkalamalı su banyosunda (Mermert WNB14, Almanya) 100 rpm'de 48 saat enkübasyona kaldırıldı. Enkübasyon sonunda her tüpten 100 μl alınarak, 4 $\mu\text{g/ml}$ kolistin içeren Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine ve kontrol için %5 koyun kanlı agara pasajlandı.

Antiyotikli agarda üreyen koloniler kolistine dirençli olarak değerlendirildi ve koloniler manuel olarak sayıldı.

3.5.3. Populasyon analiz profili

Standart *A.baumannii* ATCC 19606 suşu ve heterodirenç araştırması sonucunda seçilen bir klinik izolat üzerinde çalışıldı. Bu amaçla % 0.9'luk tuzlu su ile 24 saatlik kültürden 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bundan alınan 100 mikrolitre sıvı (10^7 CFU/ml), çeşitli konsantrasyonlarda kolistin içeren MHA plakları üzerinde yayıldı. Kolistin-sülfatın 0, 0.25, 1, 2, 4 µg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Petrilerde üreyen dirençli koloniler 35°C'de 48 saat enkübasyon sonrası sayıldı. (Sayma limiti 20 CFU/ml).

3.5.4. Time-kill eğrisi yöntemi

Popülasyon analiz profili yapılan bakterilerde çalışıldı. Bu amaçla birkaç koloni, 10 ml KAMHB içeren test tüpüne inokule edilip 2 saat 35°C'da enkübatörde tutularak logaritmik faza geçirildi. Aynı anda 1 ml KAMHB içeren test tüpüne kolistin antibiyotiği, 128xMİK konsantrasyonda (test edilecek bakteri MİK değeri x 128) olacak şekilde eklendi. Bu tüpten 0.5 ml KAMHB içeren diğer tüplere seri dilüsyon yapılarak, kolistin konsantrasyonları 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128xMİK olan antibiyotik-buyyon karışımları elde edildi. Daha sonra bu tüplerin her birine 0.5 ml logaritmik faza geçirilmiş bakteri süspansiyonu eklendi. Böylece 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64xMİK kolistin içeren ana süspansiyonlar elde edildi. Bu işlemler her iki suş için de uygulandı ve ana süspansiyonları içeren tüpler 35°C'de enkübe edilmek üzere enkübatöre kaldırıldı. Ana süspansiyonlar hazırlandıktan 0, 1, 2, 3, 4, 6 ve 24 saat sonra, koloni sayımına uygun olacak şekilde 50'şer µl alınarak nutrient agar plaklarına ekim yapıldı ve koloniler 35°C'de 48 saat enkübasyon sonrası sayıldı.

3.6. Değişik Antibiyotik Kombinasyonlarının Heterojen Direnç Oranına Olan Etkilerinin Araştırılması

Popülasyon analiz profili yapılan bakterilerde çalışıldı. Kolistinin tek başına etkisi ile kolistinin rifampisin, gentamisin, tigesiklin ve flukanazol ile ikili kombinasyonlarının heterojen direnç gelişimine olan etkileri, standart bakteri ve seçilen *A.baumannii* suşunda aşağıda anlatıldığı şekilde seri pasajlarla incelendi. Bu kombinasyonların, araştırılan suşlarda MİK değerlerinin 0.5, 2, 8 ve 64 katı düzeyindeki heterodirenç-direnç gelişimini önleyici etkileri günden güne kombinasyon antibiyotiklerin dozu arttırılarak incelendi. Li ve arkadaşlarının (3) kullandıkları yöntemden yararlandı.

3.6.1. Kombinasyonda kullanılacak antibiyotikler için MİK değeri hesaplanması

Kolistin-gentamisin, kolistin-rifampisin, kolistin-tigesiklin, kolistin-flukanazol kombinasyonları deneneceğinden, kombine verilecek bu 4 antibiyotik için, çalışılacak olan suşlarda (standart *A.baumannii* ATCC 19606 suşu ve heterodirenç araştırması sonucunda seçilen bir klinik izolat) her antibiyotik için MİK değerleri ayrı ayrı hesaplandı. MİK hesaplanması, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yukarıda daha önce anlatıldığı şekilde yapıldı. Her antibiyotik için saptanan MİK değerlerinin uygun katları seri dilüsyon aşamasında kullanıldı.

3.6.2. Seri Pasajlar:

1.gün: Bir öze dolusu *A.baumannii* kolonisi 0.5xMİK kolistin içeren 10 ml KAMHB'a pasajlandı. 37°C çalkalamalı su banyosunda 48 saat enkübe edildi. (100 rpm).

3.gün: Birinci gün çekilen pasaj tüpünden 0.1 ml kültür 2xMİK kolistin içeren 10 ml KAMHB'ye transfer edilerek ve tekrar bir önceki gibi enkübasyona alındı.

4.gün: Üçüncü gün çekilen pasaj tüpünden 0.1 ml kültür 8xMİK kolistin içeren 10 ml KAMHB'ye transfer edilerek ve tekrar bir önceki gibi enkübasyona

alındı.

5.gün: Dördüncü gün çekilen pasaj tüpünden 0.1 ml kültür 64xMİK kolistin içeren 10 ml KAMHB'ye transfer edilerek ve tekrar bir önceki gibi enkübasyona alındı.

6.gün: Kültürlerden alınan 5 ml örnek 3000 g, 10 dk, +4°C'de santrifüj edildi, 10 ml tuzlu su ile 2 kez yıkandı ve sonra 10 ml antibiyotiksiz KAMHB'ye ekildi. Daha sonraki on gün boyunca 6. günde yapılan işlemler tekrarlandı.

Her pasaj sonunda 50 µl alınarak 4 µg/ml kolistinli MHA içeren petriye ekilip üreyen koloniler sayıldı ve heterojen direnç oluşumu gözlemlendi.

Yukarıdaki işlem öncelikle kolistin tek başına kullanılarak yapıldıktan sonra, kolistin-rifampisin, kolistin-gentamisin, kolistin-tigesiklin ve kolistin-flukonazol kombinasyonları için kombine edilerek antibiyotiğin MİK değerinin uygun katları ayrıca hesaplanarak tekrar edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz:

Gereksinim olmadığı için istatistiksel analiz yapılmamıştır.

4. BULGULAR

Ocak 2010-Eylül 2012 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜ-SUAM) Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan kültürlerinden izole edilen *A.baumannii* complex suşlarından antibiyotik duyarlılık paternleri farklı, karbapenemler de dahil olmak üzere çoğul ilaca dirençli 31 *A.baumannii* klinik izolatu çalışmaya alındı. Klinik izolatların 14'ü erkek, 17'si kadın hastaya aitti. İzolatlar toplam 25 hastadan toplandı, ancak 6 hastada birden fazla kan kültüründe üreme olduğundan bu hastalar için kronolojik olarak kültürde üreyen ilk ve son izolat çalışmaya alındı. Tüm izolatlar yoğun bakım üniterinde kan kültürlerinden izole edildi. Hastalarda birden fazla kan kültüründe üreme olduğunda kronolojik olarak kültürde üreyen ilk ve son izolat çalışmaya alındı. Bu çalışmaya alınan klinik izolatların yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı Tablo 4.1'de sunulmuştur. *A.baumannii*'nin en fazla izole edildiği birim %68 (17/25) ile genel yoğun bakım ünitesi olarak saptanmıştır.

Tablo 4.1. Klinik izolatların yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı

<i>A .baumannii</i> (n=31)	Genel Yoğun Bakım	İzole Yoğun Bakım	Dahili Yoğun Bakım
Sayı	17	3	5
%	68	12	20

Gram boyama yapıp gram negatif kokobasil olarak görülen izolatların *A. baumannii* olduklarını doğrulamak için yapılan fenotipik testlerde tüm suşlar katalaz pozitif, oksidaz negatif, DNaz negatif olarak saptanmıştır. TSİ agarda nonfermenter reaksiyon, glukoz O-F besiyerinde glukozun oksidasyonu gözlenip, jelatinaz negatif olarak tespit edilmiştir. Tüm bakterilerin hareketi negatif, 44°C de üremesi pozitif olarak saptanmıştır.

4.1. Antibiyogram sonuçları:

Karbapenemler için tüm klinik izolatlar, M.I.C.Evaluator strip ile test edilmiş ve tüm suşlar imipenem ve meropeneme dirençli bulunmuştur. Bu izolatların tümünde MİK değerleri $>32 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.

Sıvı mikrodilüsyon testi ile çalışmaya alınan tüm klinik izolatların ve standart ATCC suşlarının kolistin için hesaplanan MİK değerleri Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

4.2. Heterojen direnç araştırması:

Heterojen dirençli suşları bulmak için Li ve arkadaşlarının (3) daha önce önerdiği metoda göre $4 \mu\text{g/ml}$ kolistin içeren Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine pasajlanan suşlarda 48 saat sonunda üreme olmadı. Bunun üzerine kolistin içeren KAMHB içerisinde suşlar daha önce anlatıldığı şekilde sub-inhibitör düzeyde kolistin ile muamele edilerek suşların heterodirençlerinin ortaya çıkarılması planlandı (17). Kolistinle muamele sonrası $4 \mu\text{g/ml}$ kolistin içeren Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine ekilen tüm suşlarda üreme gözlemlendi. Bu suşların subkültürlerinin de, sıvı mikrodilüsyon testi sonucunda kolistine dirençli oldukları doğrulandı.

Bu aşamalarda sonra populasyon analiz profili çalışmasına geçildi. Li ve arkadaşlarının (3) önerdiği yöntem kullanıldı. Klinik izolatlar arasından seçilen 21 nolu izolat ve standart *A.baumannii* ATCC 19606 suşu çalışıldı. Kolistin-sülfatin 0, 0.25, 1, 2, 4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında üreyebilen koloniler daha önce anlatıldığı şekilde sayıldı. Düşük kolistin konsantrasyonlarında üreme saptanır iken, $4 \mu\text{g/ml}$ kolistin içeren Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine yapılan pasajlarda üreme saptanmadı. Populasyon analiz profili sonuçları Tablo 4.3 ve Şekil 4.1'de özetlendi.

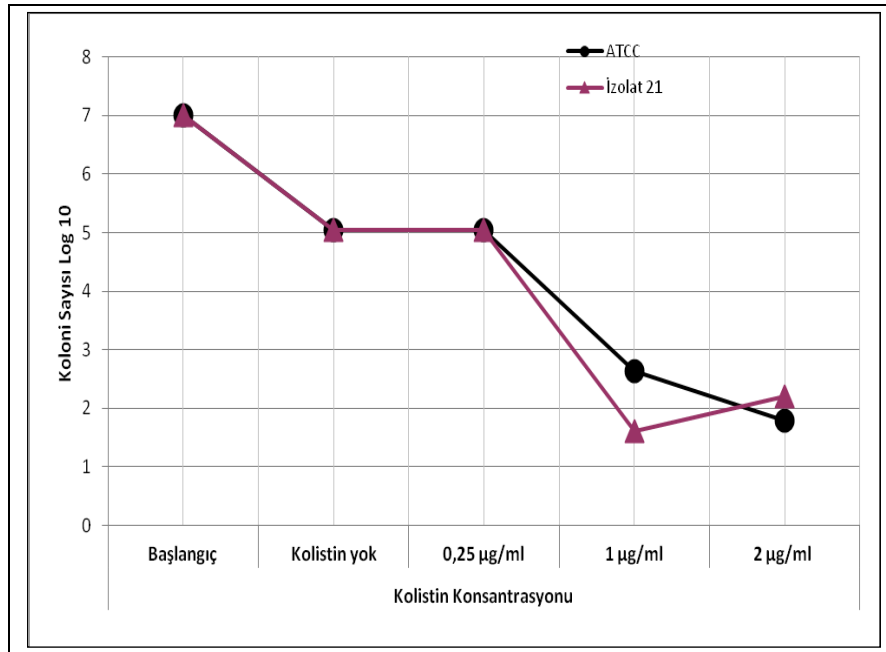
Tablo 4.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen suşların kolistin için MİK değerleri

İzolasyon no	Tarih:	Servis:	Kolistin MİK değerleri (µg/ml)
1	01.02.12	GYB	0.5
2	01.09.12	GYB	0.5
3	01.05.10	İZOLE YB	0.5
4	27.03.10	DYB	0.5
5	08.04.11	GYB	0.5
6	25.07.10	DYB	0.5
7	27.09.10	GYB	0.5
8	15.03.10	GYB	0.5
9	04.01.10	DYB	0.5
10	18.02.12	GYB	0.5
11	24.06.12	GYB	0.5
12	29.03.10	İZOLE YB	0.5
13	09.05.10	GYB	0.5
14	23.05.10	GYB	0.5
15	24.03.10	İZOLE YB	0.5
16	17.05.10	DYB	0.5
17	18.07.10	DYB	0.5
18	05.05.10	DYB	0.5
19	09.07.11	İZOLE YB	0.5
20	11.11.10	GYB	0.5
21	20.12.10	GYB	0.5
22	18.12.10	GYB	0.5
23	29.07.11	GYB	0.5
24	28.02.11	GYB	0.5
25	21.03.11	GYB	0.5
26	29.06.11	GYB	0.5
27	29.06.11	GYB	0.5
28	09.09.10	GYB	0.5
29	26.10.10	GYB	0.5
30	02.02.10	GYB	0.5
31	05.03.10	GYB	0.5
A. baumannii ATCC 19606			0.5
P. aeruginosa ATCC 27853			1
E. coli ATCC 25922			0.5
Kolistin dirençli kontrol izolatu			16

*GYB: Genel Yoğun Bakım, DYB: Dahili Yoğun Bakım

Tablo 4.3. Populasyon analiz profili tablosu

Kolistin miktarı	<i>A.baumannii</i> ATCC 19606	<i>A.baumannii</i> İzolat no:21
Kolistin yok	>100.000 CFU/ml	>100.000 CFU/ml
0.25 µg/ml kolistin	>100.000 CFU/ml	>100.000 CFU/ml
1 µg/ml kolistin	440 CFU/ml	40 CFU/ml
2 µg/ml kolistin	60 CFU/ml	160 CFU/ml

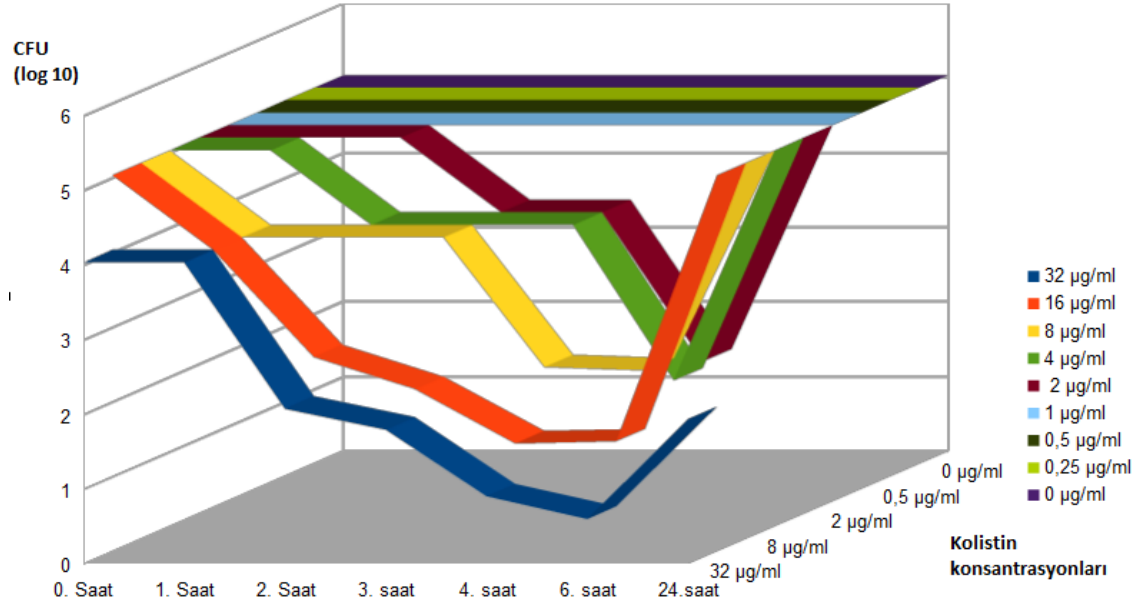


Şekil 4.1. Populasyon analiz profili grafiği

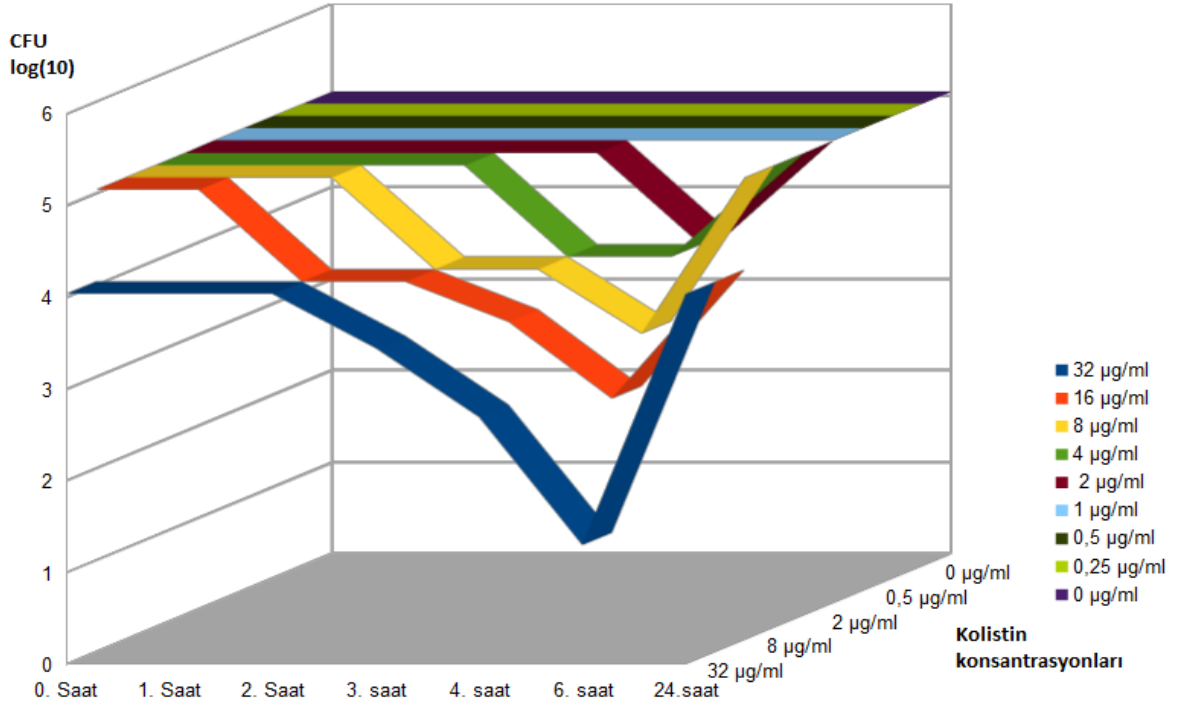
4.3. Time-kill eğrisi sonuçları:

Yapılan time-kill deneyleri sonucu, standart ATCC suşu ve 21 nolu *A.baumannii* suşunda 0, 0.25, 0.5 ve 1 µg/ml kolistin konsantrasyonu içeren süspansiyonlardan agara yapılan pasajlarda herhangi bir inhibisyon gözlenmedi. Her iki suşta da 32 µg/ml kolistin konsantrasyonunda 0. saatte bile 1

log inhibisyon gözlemlendi. Yine her iki suşta da, daha yüksek kolistin konsantrasyonlarında daha belirgin olmak üzere 6. saate kadar inhibisyon gözlemlenmekte ancak 6. saatten sonra, 24. saatte kadar yeniden üreme sonucu bakteri sayısında hızlı bir artış ve heterodirenç seçilimi olmaktadır. Time-kill deneyi sonuçları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de özetlenmiştir.



Şekil 4.2. *A. baumannii* 21 no'lu izolat time-kill eğrisi



Şekil 4.3. *A.baumannii* ATCC 19606 time-kill eğrisi

Grafikler analiz edildiğinde 21. nolu izolatta, inhibisyonun maksimum olduğu 6. saatte, 2 µg/ml ve üstü kolistin konsantrasyonlarında, standart ATCC suşuna göre daha iyi bir inhibisyon gözlemlenmiştir.

Grafik analiz edildiğinde 24. saatin sonunda üreyen koloni sayılarının tekrar arttığı gözlemlenmiştir. Ancak 21 nolu izolatta 32 µg/ml kolistin konsantrasyonunda, 24. saatte bile 3 log düzeyinde inhibisyon gözlemlenmiştir. Bu inhibisyon 32 µg/ml kolistin konsantrasyonunda standart ATCC izolatında 24. saatte daha zayıf gözlemlenmiştir (log=4).

4.4. Değişik antibiyotik kombinasyonları ve konsantrasyonlarında seri pasaj sonuçları

Kolistin-gentamisin, kolistin-rifampisin, kolistin-tigesiklin, kolistin-flukanazol kombinasyonları deneneceğinden, kombine verilecek bu 4 antibiyotik için, çalışılan suşlarda (standart *A.baumannii* ATCC 19606 suşu ve heterodirenç araştırması sonucunda seçilen bir klinik izolat) herbir antibiyotik için saptanan MİK değerleri aşağıda Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Kombine denenecek antibiyotikler için saptanan MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

Antibiyotik	21.nolu klinik izolat	<i>A.baumannii</i> ATCC 19606
Kolistin	0.5	0.5
Rifampisin	4	4
Gentamisin	2	8
Tigesiklin	1	0.25
Flukanazol	> 64	> 64

Kombine antibiyotik ikililerinin MİK değerlerinin 0.5, 2, 8 ve 64 katlarında seri dilüsyonlarının pasajlarından üretilen kolistin dirençli bakterilerin koloni sayıları ve devamında kolistin içermeyen buyyonlardan yapılan pasajlardan üretilen kolistin dirençli bakteri koloni sayıları aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir. (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6)

Tablo 4.5. Standart ATCC *A.baumannii* suşu için değişik ilaç konsantrasyonları ve kombinasyonlarında seri pasaj sonuçları (CFU/ml)

	Sadece Col	Col+Gen	Col+Rif	Col+Tig	Col+Flu
0.5xMİK	100000	0	0	0	100000
2xMİK	100000	0	0	0	100000
8xMİK	100000	0	0	0	100000
64xMİK	100000	0	0	0	100000
1.gün *	100000	0	0	0	100000
2. gün*	100000	0	0	0	100000
3. gün*	100000	0	0	0	100000
4.gün*	100000	0	0	0	100000
5.gün*	100000	0	0	0	100000
6.gün*	100000	0	0	0	100000
7.gün*	100000	0	0	0	100000
8.gün*	100000	0	0	0	100000
9.gün*	100000	0	0	0	100000
10.gün*	100000	0	0	0	100000

*Kolistin içermeyen buyyonlara yapılan pasajlar

Col: kolistin, Gen: gentamisin, Rif: rifampisin, Tig: tigesiklin, Flu: flukanazol

Tablo 4.6. *A.baumannii* 21 nolu izolat için, değişik ilaç konsantrasyonları ve kombinasyonlarında seri pasaj sonuçları (CFU/ml)

	Sadece Col	Col+Gen	Col+Rif	Col+Tig	Col+Flu
0.5xMİK	100000	100000	0	0	100000
2xMİK	100000	100000	0	0	100000
8xMİK	100000	10000	0	0	100000
64xMİK	100000	0	0	0	100000
1.gün *	100000	0	0	0	100000
2. gün*	100000	0	0	0	100000
3. gün*	100000	0	0	0	100000
4.gün*	100000	0	0	0	100000
5.gün*	100000	0	0	0	100000
6.gün*	100000	0	0	0	100000
7.gün*	100000	0	0	0	100000
8.gün*	100000	0	0	0	100000
9.gün*	100000	0	0	0	100000
10.gün*	100000	0	0	0	100000

*Kolistin içermeyen buyyonlara yapılan pasajlar

Col: kolistin, Gen: gentamisin, Rif: rifampisin, Tig: tigesiklin, Flu: flukanazol

Tablolar analiz edildiğinde, kolistin tek başına uygulandığında artan konsantrasyonlarda dahi, bakterilerin inhibe olmadığı ve dirençli hale gelerek üremeye devam ettikleri görülmüştür.

Denenen her iki suş için de Col+Rif ve Col+Tig kombinasyonu sub-MİK düzeyde bile etkili bulunmuş ve bakterilerin üremesini inhibe etmiştir.

Col+Gen kombinasyonu naif standart ATCC *A.baumannii* suşu için sub-MİK dahil tüm konsantrasyonlarda etkili iken, hastane enfeksiyonundan izole edilen 21. nolu *A.baumannii* izolatında 0.5, 2 ve 8xMİK konsantrasyonlarında etkisiz bulunmuştur. Bu kombinasyon 64xMİK konsantrasyonda etkili bulunduğu halde, bu kombinasyonun bu kadar yüksek düzeyde in vivo tedavi amaçlı uygulanabilmesi mümkün gözükmemektedir.

Col+Flu kombinasyonu, aynı kolistin tek başına uygulanmasında olduğu gibi hiçbir konsantrasyonda bakterileri inhibe edememiştir.

5. TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonları oluşturduğu yüksek maliyet, morbidite ve mortalite nedeniyle önemli global bir sağlık sorunudur. *Acinetobacter baumannii* türleri hastane kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu olan türdür (27)

Dünya çapında hastane enfeksiyonları oranları coğrafik olarak değişmekle birlikte genellikle %3-17 arasında bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün, dört bölgesini temsil eden 14 ülkede, 55 hastanede yapmış olduğu bir prevalans çalışmasında yatan hastaların ortalama %9'unda hastane enfeksiyonu geliştiği saptanmıştır. En yüksek hastane enfeksiyonu sıklığı Doğu Akdeniz ile Güney Doğu Asya Bölgelerinde sırasıyla %12 ve 10 olarak tespit edilmiştir. Bu değer Avrupa'da %8, Batı Pasifik'de %9 olarak saptanmıştır (28). Yoğun bakım ve yanık üniteleri gibi birimlerde bu oran %20-40'lara çıkmaktadır. Gelişmemiş ülkelerde sağlık kuruluşuna başvuran hastalarda hastane enfeksiyonları gelişme riskinin gelişmiş ülkelere göre 2-20 kat artmış olduğu raporlanmıştır (29).

A.baumannii'nin neden olduğu enfeksiyonlar daha çok yoğun bakım ünitelerindeki immun sistemi zayıf düşmüş hastalarda görülme eğilimindedir. Uzun süreli bakım merkezlerinde, özellikle de ventilatöre bağlı hastaların bakımının yapıldığı merkezlerde bulunan hastalarda risk artmaktadır. Yoğun bakım ünitesinde kalmaya ek olarak, kolonizasyon ve enfeksiyona ilişkin risk faktörleri arasında, yakın zamanda geçirilmiş cerrahi operasyon, santral damar içi kateterizasyon, trakeostomi, mekanik ventilasyon, enteral beslenme ve üçüncü grup sefalosporin, florokinolon veya karbapenem antibiyotikleriyle tedavi de yer almaktadır (30, 31).

Lolans ve ark. (32) 2006 yılında Chicago'da ve Indiana civarında karbapenamaz üreten *Acinetobacter*'e ilişkin bir salgın nedeniyle yaptıkları çalışmada moleküler sınıflandırma sonucu salgının ortak kaynaklı olduğunu

göstermişlerdir. 2005 yılından beri en az beş hastane, üç uzun süreli bakım merkezi ve 200'den fazla hasta bu salgından etkilenmiştir. Fransa'da, çoğul ilaca dirençli monoklonal *A.baumannii* salgınında, Nisan 2003 ile Haziran 2004 tarihleri arasında 53 hastanede 290 izolat toplanmıştır. Epidemik suş, geniş spektrumlu bir beta-laktamaz içermektedir. En fazla etkilenen hastalar, yoğun bakım ünitelerinde, tıbbi servislerde veya uzun süreli bakım merkezlerinde bulunan hastalar olmuştur (33).

Çalışmamızda kan kültürlerinden üretilen CR-ABC suşları en çok genel yoğun bakım ünitesinden (%68) izole edildi. Bunun nedeninin izole ve dahili yoğun bakım ünitelerinin düşük hasta kapasitesi olduğu düşünüldü.

Güvenli verilere ulaşılmasında karşılaşılan zorluklarla beraber ülkemizde günümüzde hastane enfeksiyonları oranının % 5-15 arasında değiştiği kabul edilmektedir (25, 35). Karahocagil ve ark. (36) yaptıkları çalışmada Ocak 2009-Mart 2010 tarihleri arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Araştırma Uygulama Hastanesi'nde HE oranını %3,5 bulmuşlardır. Neden olan mikroorganizmalar arasında ise *A. baumannii* %23,2 oranı ile ilk sırada yer almıştır. Batman Bölge Hastanesinde 2011 yılında yapılan bir araştırmada ise *Acinetobacter* için karbapenem direnç oranı % 75 iken, kolistine direnç saptanmamıştır (37). 2013 yılında yayınlanan, Kayseri'de yapılan bir araştırmada, *A. baumannii* karbapenem direnç oranları %91 bulunmuş iken kolistine dirençli suş saptanmamıştır (38). Çanakkale'de, Araştırma hastanemizde yapılan çalışmada 1 Mayıs 2009 - 1 Mayıs 2010 tarihleri arasında izole edilen *A. baumannii* suşlarında çoklu ilaç direnci gözlenmiş, tüm suşlarda sadece tobramisin ve kolistin duyarlı bulunmuştur (16).

Karbapenem dirençli *A.baumannii* complex (CR-ABC) suşlarında kolistine karşı heterojen direnç seçilimi ve direnç gelişimi önemli bir problemdir. Son yıllarda kolistine heterodirençli ve dirençli izolatlar gittikçe artan düzeyde saptanmaktadır (4).

Kolistine karşı heterojen direnç ilk olarak Li (3) tarafından bildirilmiştir. Geliştirdiği yöntem ile 16 klinik hastane izolatının %94'ünde kolistin heterodirenci tespit etmiştir. Hawley (8) kolistin heterodirencinin, daha önce kolistin tedavisi alan hasta izolatlarında daha yüksek olduğunu raporlamıştır. Ayrıca 21 hastanın tamamında heterodirenç bulmuştur. Tan (9) tedavi uygulama rejimi simülasyonu ile rejimden bağımsız olarak kolistine maruziyet sonrası direnç gelişimini deneysel olarak raporlamıştır. Rodriguez (11) bir çalışmasında kolistin tedavisi alan menenjitli bir hastanın BOS örneğinden kolistin dirençli hale gelmiş ABC izole etmiştir. Böylece kolistinin kendine karşı direnç gelişini indüklediği gözlemlenmiştir.

Yau ve arkadaşları (4) 30 acinetobacter izolatı içinde %23 heterodirenç ve %3.3 kolistine karşı direnç bulmuşlardır. Ko ve arkadaşları (5) iki Kore hastanesinden 265 klinik izolat çalışmış ve kolistine karşı direnç oranını %27.9 bulmuşlardır. Souli ve arkadaşları (6) Atina civarındaki 17 hastaneden izole edilen Acinetobacter'lerde kolistine karşı direnç oranını %3 olarak bulmuşlardır. Yine 2011 yılında Tayvan ve Kuveyt'de devlet hastanelerinde klinik örneklerden izole edilen ABC suşlarında yapılan çalışmalarda kolistine karşı direnç oranı %10 ve %12 civarında bulunmuştur (58, 59).

Türkiye'den Aycengel ve Dizbay (47) 2010 yılında kolistin dirençli ABC raporlamışlardır. Eser ve arkadaşları (88). Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran hastalardan izole edilen Acinetobacter suşlarında %11.3 kolistin direnci saptamışlardır. Araştırma hastanemiz yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan bir hastanın Beyin omurilik sıvısı örneğinden 2011 yılında, laboratuvarımızda da kolistin dirençli ABC suşu izole edilmiştir.

Tez çalışmamız sırasında öncelikle Li ve arkadaşlarının (3) önerdiği metod kullanılarak heterodirençli ABC suşları olup olmadığı ve bu heterodirencin oranı araştırıldı. Araştırma yapılan 25 hastaya ait 31 klinik izolat içerisinden, birden çok üremesi olan 6x2=12 tanesi aynı hastaların kan kültürlerinden izole edilen kronolojik olarak ilk ve son kültür örneklerden seçildi.

Burada amacımız kolistin tedavisi alan hastaların, son örneklerinde, ilk örneklerine kıyasla kolistin heterodirenç oranının artıp artmayacağını görmektir. Uygulanan yöntem sonunda 31 klinik izolatin hiçbirinde kolistine karşı heterodirenç gözlemlenmedi. Bu yüzden, hastanemizde ABC ile enfekte hastalara verilen kolistin tedavisinin, daha sonraki kan kültürlerinden izole edilen ABC suşlarında oluşturması muhtemel kolistin heterodirenç artışı değerlendirilemedi. Heterodirençli suş saptanamaması nedeni olarak, ülkemizde kolistinın geç kullanıma girmesi ve/veya izole edilen bakteri populasyon grubu içindeki kolistin dirençli bireylerin saptanamayacak kadar az oranda olması düşünüldü.

Heterodirençli suş saptanamaması üzerine, suşlar sub-inhibitör düzeyde kolistin ile muamale edilerek kolistin dirençleri açığa çıkarılmaya çalışıldı. Sonuçta, tüm suşlar kolistin dirençli hale geldi. Bu durum aşağıdaki iki muhtemel önermeyi düşündürdü.

1. Li (3) metodu uygulandığında heterodirenç saptanamayan suşlarda, belki de sub-inhibitör muamele yöntemi sonrası saptanamayacak kadar düşük düzeyde veya oranda olan genetik olarak kolistin dirençli mutantlar, daha kolay seçilip çoğalabildi ve populasyonu tamamen domine etti. Heterojen direnç saptanmasının yukardaki önermeyle ilişkili olarak tamamlayıcı bir nedeni de ülkemizde kolistinın henüz son yıllarda rutin kullanıma girmesi ve ülkemizde suşların kolistin ile diğer ülkelerden daha az oranda karşılaşmış olması olabilir.

2. Kolistin, daha önce bahsedilen bazı mekanizmalarla (61, 62, 65) ilişkili olarak bir şekilde bakterileri sadece morfolojik (17, 48) olarak değil, aynı zamanda genetik olarak da değiştirip yeni mutant ve kolistin dirençli suşlar yaratmaktadır. Ayrıca devam eden pasajlarda bu direnç devam etmektedir.

Heterodirenç analizi aşamasından sonra populasyon analizi aşamasına geçildi. Bu aşamada da, yukarda bahsedilen durumla uyumlu olarak, kolistin-sülfatın 0, 0.25, 1, 2 µg/ml konsantrasyonlarında üreme saptanır iken,

beklendiği gibi direnç sınır değeri olan 4 µg/ml kolistin içeren Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine yapılan pasajlarda üreme saptanmadı. Yau (4) ile Li ve arkadaşlarının (3) yaptıkları çalışmalarda ise populasyon analiz profillerinde, Yau'nun çalışmasında 30 izolattan 23'ünde, Li'nin çalışmasında ise 15 suştan birinde 2 µg/ml üzerinde kolistin konstrasyonlarında üreme saptandı. Hawley (8) Amerika'da 2008'de yaptığı çalışmada 21 hastanın tamamında heterodirenç tespit etti. Daha sonra Rodriguez ve arkadaşları (11, 54) 2009 ve 2010 yıllarında Arjantin'de yaptıkları çalışmalarda heterodirenç oranını %46 ve %43 olarak bulmuşlardır. Hastanemizde yapılan bir tezde (89) yoğun bakımında izole edilen suşların aynı kökenden gelmiş oldukları gösterilmişti. Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak hiçbir izolatin heterodirenç göstermemesinin hepsinin aynı kökenden gelmiş olmasına bağlı olduğunu düşündük. Tez izolatlarımızın hiçbirisinde kolistin heterodirenci saptanmamış olmasına karşın, 21 no'lu izolatin üretildiği hastanın BOS kültüründe daha sonra kolistin dirençli ABC üremesi ve tüm izolatlarımızın sub-inhibitör kolistin maruziyeti sonrasında kolistin dirençli hale gelmeleri heterodirenç tespit yönteminin daha sonrasında gelişebilecek kolistin direnci tahmini için uygun olmayabileceğini düşündürdü. Homojen duyarlı gözükten suşların da, kolistin maruziyeti ile heterodirençliler gibi kolayca dirençli hale gelebilecekleri ve bu yüzden konuyla ilgili yeni çalışmalar gerektiği öngörüldü. Bu konuda yapılacak çalışmalarda tezimiz heterodirenç analizi sonuçları göz önüne alındığında, yukarıda bahsedilen 2. önermeye özellikle dikkat etmek uygun olacaktır.

Time-kill deneyleri sonucu, standart ATCC suşu ve 21 nolu *A.baumannii* suşunda 0, 0.25, 0.5 ve 1 µg/ml kolistin konsantrasyonu içeren süspansiyonlardan agara yapılan pasajlarda herhangi bir inhibisyon gözlenmedi. İn-vitro çalışmamızda kolistin bakterinin MİK değerinde ve hatta bu değer bir dilüsyon üstünde, bakteriye tamamen etkisiz kaldı. Bu da kolistin ilacının uygun dozda kullanımının ne kadar önemli olduğunu bir kez daha hatırlattı. Her iki suşta da 32 µg/ml kolistin konsantrasyonunda 0. saatte bile 1

log inhibisyon gözlemlendi. Yine her iki suşta da, daha yüksek kolistin konsantrasyonlarında daha belirgin olmak üzere 6. saate kadar inhibisyon gözlemlenmekte ancak 6. saatten sonra, 24. saatte kadar yeniden üreme sonucu bakteri sayısında hızlı bir artış ve direnç gelişimi olmaktadır.

Grafikler (Şekil 4.2 ve 4.3) analiz edildiğinde, 21. nolu izolatta, inhibisyonun maksimum olduğu 6. saatte, 1 µg/ml üstü kolistin konsantrasyonlarında, standart ATCC suşuna göre daha iyi bir inhibisyon gözlemlenmiştir. Yine grafikler analiz edildiğinde 24. saatin sonunda üreyen koloni sayılarının tekrar arttığı gözlemlenmiştir. Ancak 21 nolu izolatta, 32 µg/ml kolistin konsantrasyonunda, 24. saatte daha iyi bir inhibisyon gözlemlenmiştir (logaritması hala 2'nin altında). Bu inhibisyon 32 µg/ml kolistin konsantrasyonunda standart ATCC izolatında 24. saatte daha zayıf gözlemlenmiştir (log=4). Bu yüzden yüksek antibiyotik dozlarında kolistine 21. nolu izolatın daha iyi cevap verdiği söylenebilir.

Time-kill deneyi sonuçları analiz edildiğinde, 24. saatte yeniden üreme olması kolistin antibiyotiğinin mutlaka kombine kullanılması gerekliliğini tekrar hatırlatmaktadır. Ayrıca deneyimizde, yüksek MİK değerlerinde bile tam bir inhibisyon olmaması, kolistin ilacı doz rejiminin tekrar gözden geçirilerek kolistin doz önerilerinin daha yüksek tutulması gerektiğini bize düşündürmüştür. Nitekim tez yürütülmesi sırasında kolistin antibiyotiği için optimal doz önerileri 3 kat düzeyine kadar arttırılmıştır (90).

Hem Li (3) hem de Yau ve arkadaşları (4) yapmış oldukları Time-kill deneylerinde Li'nin çalışmasında daha belirgin olmak üzere, 6. saatten sonra hızlı bir yeniden üreme gözlemlenmişlerdir. Çalışmamız 21 no'lu izolatta da 6. saatten sonra hızlı bir yeniden üreme gözlemlendi.

Çalışmamızda son olarak bakteri süspansiyonu, kolistin-gentamisin, kolistin-rifampisin, kolistin-tigesiklin, kolistin-flukonazol kombinasyonlarının artan dozlarında denendi. Kombine verilecek bu 4 antibiyotik için, çalışılacak suşlarda

(standart *A.baumannii* ATCC 19606 suşu ve 21 no'lu klinik izolat) MİK değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Her antibiyotik için saptanan MİK değerlerinin uygun katları seri dilüsyon aşamasında kullanıldı. Sonuçlar analiz edildiğinde, kolistin tek başına uygulandığında artan konsantrasyonlarda dahi, bakterilerin inhibe olmadığı ve dirençli hale gelerek üremeye devam ettikleri görülmektedir (Tablo 4.5 ve 4.6). Bu olay time-kill deneyi ile uyumlu olarak yine kolistin monoterapisinden sakınılması gerektiğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda test edilen kolistin-rifampisin kombinasyonunun, seri bakteri dilüsyonlarına etkisi değerlendirildiğinde sub-inhibitör düzeyde dahi bu kombinasyonun her iki suşa etkili olduğu saptanmıştır. (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6). Nitekim birçok çalışma ve vaka raporu kolistin-rifampisin kombinasyonun etkili olduğunu raporlamıştır. Pachon-Ibanez ve arkadaşları (91) 2010 yılında bu kombinasyonun hem in-vitro hem de in-vivo deneysel pnömoni ve menenjit modellerinde etkili olduğunu raporlamışlardır. Timurkaynak ve arkadaşları (92) 2006 yılında çoklu ilaç direncine sahip 5 izolatın dördünde bu kombinasyonun sinerjik olduğunu raporlamıştır. Liang ve arkadaşları (93) 2011 yılında yaptıkları araştırmada bu kombinasyonu sinerjik olarak bildirmişlerdir. Rodriguez ve arkadaşları (54) 2010 yılındaki bir vaka çalışmasında bu kombinasyonun heterodirençli ABC izolatlarına etkili olduğunu ve kolistin dirençli mutantların gelişmesini engellediğini raporlamışlardır. Rifampisin çalışmamıza göre bir kombinasyon alternatifi olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda test edilen kolistin-tigesiklin kombinasyonunun, seri bakteri dilüsyonlarına etkisi değerlendirildiğinde sub-inhibitör düzeyde dahi bu kombinasyonun her iki suşa etkili olduğu saptanmıştır. (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6). Bunu doğrulayacak şekilde Özbek ve arkadaşları (94) 2010 yılında yaptıkları bir in-vitro çalışmada meropenem dirençli ABC için kolistin-tigesiklin sinerjisi saptamışlardır. Peck ve arkadaşları (95) 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada benzer şekilde 0.5xMİK düzeyinde dahi bu kombinasyonun sinerjik ve bakterisidal etki gösterdiğini raporlamışlardır.

Kolistin-gentamisin kombinasyonu naif standart ATCC *A.baumannii* suşu için sub-MİK dahil tüm konsantrasyonlarda etkili iken, hastane enfeksiyonundan izole edilen 21 no'lu *A.baumannii* izolatında 0.5, 2 ve 8xMİK konsantrasyonlarında etkisiz bulunmuştur. Bu kombinasyon 64xMİK konsantrasyonda etkili bulunduğu halde, bu kombinasyonun bu kadar yüksek düzeyde in vivo tedavi amaçlı uygulanabilmesi mümkün gözükmemektedir. Literatürde bu kombinasyonların ABC üzerine etkisini araştıran çalışma bulunamamıştır. Bu çalışma kolistin-gentamisin kombinasyonunun ABC üzerine etkisini araştıran ilk çalışma olabilir. Sonuçta her ne kadar klinik izolatta yeterli etki göstermese de bu kombinasyonun monoterapiden üstün olduğu ve monoterapiye yeğlenebileceği değerlendirilmiştir.

Kolistin+Flukanazol kombinasyonu, aynı kolistinin tek başına uygulanmasında olduğu gibi hiçbir konsantrasyonda bakterileri inhibe edememiştir. Literatürde bu iki kombinasyonu değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız genel olarak değerlendirildiği zaman aşağıdaki sonuçlar ve katkıların ortaya çıktığı değerlendirilmiştir.

Ülkemizde ilk defa bir çalışmada, hastanede kültürlerden üretilen ABC klinik izolatları üzerinde kolistin için heterojen direnç araştırması yapıldı. Sonuçta 31 klinik izolatın hiçbirisi heterojen dirençli bulunmadı. Ülkemizde ilk defa bu konuda bir veri elde edildi.

Çalışmamızda sub-inhibitör düzeyde kolistin ile muamele sonucunda tüm suşlar kolistin dirençli hale getirilebilmiştir. Bu da, heterojen dirençli gözükmeyen suşların bile kolistin maruziyeti sonrasında kolayca dirençli hale gelebileceklerini göstermiştir.

Time-kill deneyi sonucunda elde edilen verilerde, düşük antibiyotik konsantrasyonlarında neredeyse hiç inhibisyon olmaması, yine time-kill deneyinde 6. saatten sonra çok hızlı bir yeniden üreme gözlemlenmesi önemli bulundu. Bu veriler ışığında, kolistin antibiyotiğinin klinikte kullanılırken, mutlaka yeniden güncellenen yüksek dozlarda ve uygun aralıklarla kullanılması yanısıra mutlaka başka bir antibiyotik ile kombine edilmesi gerekmektedir.

Seri dilüsyon çalışmalarında, kolistin-gentamisin, kolistin-rifampisin, kolistin-tigesiklin, kolistin-flukanazol kombinasyonlarının, CR-ABC izolatlarında, heterojen direnç seçilimine ve direnç gelişimine karşı inhibitör etkileri bir standart suş ve bir adet hastane kültür izolatı kullanılarak karşılaştırıldı. Kolistin-rifampisin, kolistin-tigesiklin kombinasyonları çok düşük dozlarda bile bakterileri inhibe etti ve direnç gelişimini önledi.

Kolistin-gentamisin kombinasyonu naif standart suş için sub-inhibitör dahil tüm konsantrasyonlarda etkili bulunmuş iken, 21 no'lu izolatta sadece MİK değerlerinin 64 katında etkili bulundu. Literatür tarandığında gentamisin

kombinasyonunu değerlendiren başka bir çalışmaya rastlanamadı. Bu yüzden bu çalışma kolistin-gentamisin kombinasyonun etkisini değerlendiren ilk çalışma olabilir. İleride daha fazla izolat ile kolistin-gentamisin kombinasyonunun etkinliğinin araştırılması uygun olacaktır.

Kolistinin tek başına ve kolistin-flukanozol ikilisinin direnç seçilimi üzerine etkisi değerlendirildiğinde, seri dilüsyonlarda bunların direnç seçilimi üzerine hiçbir inhibitör etkilerinin olmadığı saptandı.

Bu alışmalar ışığında kolistin-rifampisin, kolistin-tigesiklin kombinasyonlarının diğer tüm kombinasyonlara üstün olduğu saptandı. Kolistin-gentamisin kombinasyonu ise kısmi olarak etkili bulundu ve bu kombinasyonun klinikte kullanımının, kolistin tek başına kullanımından daha iyi sonuçlar ortaya çıkarabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak kolistin antibiyotiği, yıllardan beri yoğun bakım ünitelerinin kronik sorunu haline gelmiş dirençli ABC enfeksiyonları için, elde kalan son ilaçlardan biridir. Bu yüzden bu son sığınak antibiyotiği elde tutmak için çok dikkatli bir ilaç uygulama rejimi seçilmelidir. Yeni yapılacak çalışmalar ve literatürdeki çalışmalar ışığında dirençli ABC enfeksiyonlarında kolistin mutlaka güncellenen yüksek dozlarda ve de kombine olarak kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. TATMAN - OTKUN, M., DÜNDAR, V. (1999). Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter* türlerinde beta-laktam direnci ve beta-laktamaz aktivitesi. *İnfeksiyon Dergisi*. 13: 505-514.
2. GÜR, D., KORTEN, V., ÜNAL, S., DESPHANDE, L.M., CASTANHEIRA, M. (2008). Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: Report from the Turkish SENTRY Program sites. *Journal of Medical Microbiology*. 57: 1529-1532.
3. LI, J., RAINER, R.C., NATION, L.R., OVEN, R.J., SPELMAN, D., TAN, K.E., LIOLIOS, L. (2006). Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 2946-2950.
4. YAU, W., OWEN, R.J., PAUDYAL, A., BELL, J.M., TURNIDJE, J.D., YU, H.H., NATION, R.L., LI, J. (2009). Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Infection*: 58: 138-144.
5. KO, K.S., SUH, J.S., KWON, K.T., JUNG, S., PARK, K., KANG, C.I., CHUNG, D.R., PECK, K.R., SONG, J. (2007). High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 1163-1167.
6. SOULI, M., KONTOPIDOU, F.V., KORATZANIS, E., ANTONIADOU, A., GIANNITSIOTI, E., EVANGELOPOULOU, P., KANNAVAKI, S., GIAMARELLOU, H. (2006). In vitro activity of tygecycline against multiple-drug resistant, including pan-resistant, Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 3166-3169.
7. RINDER, H. (2001). Editorial: Hetero-resistance: An under-recognised confounder in diagnosis and therapy. *J.Med. Microbiol.* 50: 1018-1020.
8. HAWLEY, J.S., MURRAY, C.K., JORGENSEN, J.H. (2008). Colistin

heteroresistance in Acinetobacter and its association with previous colistin therapy. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 52: 351-352.

9. TAN, C.H., LI, J., NATION, R.L. (2007). Activity of colistin against heteroresistant Acinetobacter baumannii and emergence of resistance in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51: 3413-3415.
10. ROLAIN, J.M., ROCHE, A., CASTANIÉRE, M., PAPAŽIAN, L., RAOULT, D. (2011). Acinetobacter baumannii resistant to colistin with impaired virulence: a case report from France. *J Infect Dis*. 204 (7): 1146-1147.
11. RODRIGUEZ, C.H., BOMBOCINO, K., GRANADOS, G., NASTRO, M., VAY, C., FAMIGLIETTI, A. (2009). Selection of colistin-resistant Acinetobacter baumannii isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 65: 188-191.
12. MUNOZ-PRICE, L. S., WEINSTEIN, R. A. (2008). Acinetobacter infection. *The New England Journal of Medicine*. 358 (12): 1271-1281.
13. SCHRECKENBERGE, P. C., DANESHVAR, M. I., HOLLIS, D. G. (2008). Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella ve diğer nonfermentatif Gram-negatif basiller. *Manual of Clinical Microbiology*. MURRAY, P. R., BARON E. J., PFALLER, M. A., JORGENSEN, J. H., LANDRY, M. L. (2008). 9. Baskı. Ankara: Atlas Yayıncılık. s.: 770-802.
14. BAHAR, İ. H., ESEN, N. Acinetobacter türleri ve diğer Gram negatif nonfermentatif basiller. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 2195-2201.
15. BERGOGNE-BEREZIN, E., TOWNER, K. J. (1996). Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*. 9(2): 148-165.
16. ÖZBEY, N., AKÇALI, A., BARUT, T., ZANAPALIOĞLU, Ö., ŞENER, A.,

- TATMAN-OTKUN, M., OTKUN, M. (2010). Yoğun bakım ünitesinde Gram negatif bakteriyemiler, bir yılın mikrobiyolojik ve klinik değerlendirilmesi. *XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*. Girne, KKTC. .323.
17. SOON, R.L., NATION, R.L., HARTLEY, P.G., LARSON, I., LI, J. (2009). Atomic force microscopy investigation of the morphology and topography of colistin-heteroresistant *Acinetobacter baumannii* strains as a function of growth phase and in response to colistin treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(12):4979-4986.
18. HANLON, G.W. (2005). The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. *Letters in Applied Microbiology*. 41: 375-378.
19. ALLEN, D.M., HARTMAN, B.J. *Acinetobacter* species. (2005). In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. 2: 2632-2636.
20. VAHAPOĞLU, H., COSKUNKAN, F., TANSEL, O., OZTURK, R., SAHİN, N., KOKSAL I., KOCAZEYBEK, B., TATMAN-OTKUN, M., LEBLEBİCİOĞLU, H., OZINAL, M. A., AKALIN, H., KOCAGÖZ, S., KORTEN, V. (2001) Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal Medicine Microbiology*. 50: 642-645.
21. D'AGATA, E. M. C., THAYER, V., SCHAFFNER, W. (2000). An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 21: 588-591.
22. JAWAD, A., SEIFERT, H., SNELLING, A. M., HERITAGE, J., HAWKWY, P. M. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 1938-1941.
23. BONOMO, R. A, SZABO, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infection Diseases*. 43: 49-56.

24. SEIFERT, H., DIJKSHOORN, L., GERNER-SMIDT, P., PELZER, N., TJERNBERG, I., VANEECHOUTTE, M. (1997). Distribution of Acinetobacter species on human skin: Comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2819-2825.
25. PEŞKEN, Y. Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisi. (2002). GÜNAYDIN, M., ESEN, Ş., SANIÇ, A., LEBLEBİCİOĞLU, H. (Editörler). *Sterilizasyon, dezenfeksiyon ve hastane infeksiyonları*'nda. Samsun: Deomed Medikal Yayıncılık. s.203–213.
26. ÖNCÜL, O. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 575-604
27. VILLEGAS, M., HARTSTEIN A. (2003). Acinetobacter outbreaks 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol.*; 24:284-295.
28. ERTEK, M. Hastane Enfeksiyonları: Türkiye Verileri. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. *Hastane Enfeksiyonları: Korunma ve Kontrol*. Sempozyum Dizisi No:60. (2008). s.:9-14
29. ÖZTÜRK, R., ÇETİNKAYA-ŞARDAN, Y., KURTOĞLU, D. (2011). T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Sağlıkta Dönüşüm Programı, Hastane Enfeksiyonlarının Önlenmesi: Türkiye Deneyimi Eylül 2004 – Aralık 2010. Ankara.
30. GARNACHO-MONTERO, J., ORTIZ-LEYBA, C., FERNANDEZ-HINOJOSA, E., et al. Acinetobacter baumannii ventilatör-associated pneumonia: epidemical and clinical findings. *Intensive Care Med*. 2005;31(5):649-655.
31. MANIKAL, V.M., LANDMAN, D., SAURINA, G., OYDNA, E., LAL, H., QUALE, J. (2003). Endemic carbapenem-resistant Acinetobacter species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis*. 31:101-106.
32. LOLANS, K., RICE, T.W., MUNOZ-PRICE, L.S., QUINN, J.P. (2006). Multicity outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:2941-2945.

33. NAAS, T., COIGNARD, B., CARBONNE, A. (2006) et al. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* .12:1214-1222.
34. DAVIS, K.A., MORAN, K.A., McALLISTER, C.K., GRAY, P.J. (2005). Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg Infect Dis*. 11:1218-24.
35. T.C. Sayıştay Başkanlığı, Performans Denetim Raporu. Hastane Enfeksiyonları İle Mücadele. Aralık 2007; 33. <http://www.sayistay.gov.tr/rapor/perdenrap/2007/2007-2HastaneEnfeksiyon/2007-2HastaneEnfeksiyon.pdf>
36. KARAHOCAGİL, M. K., YAMAN, G., GÖKTAŞ, U., SÜNNETÇİOĞLU, M., ÇIKMAN, A., BİLİCİ, A., YAPICI, K., BARAN, A. İ., BİNİCİ, İ., AKDENİZ, H. (2011). Hastane enfeksiyon etkenlerinin ve direnç profillerinin belirlenmesi. *Van Tıp Dergisi*. 18 (1): 27-32.
37. DAĞI, H.T., ARSLAN, U., TUNCER, İ. (2011). Kan kültürlerinden izole edilen *A. baumannii* suşlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Dergisi*. 25(1): 22-26.
38. GÖZÜTOK, F., SARIGÜZEL, F.M., ÇELİK, İ., BERK, E., AYDIN, B., GÜZEL, D. (2013) Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması. *ANKEM Dergisi*. 27(1): 7-12.
39. AKALIN, H. (2007). Çoklu ilaç direncinde tedavi yaklaşımı ve ilaç politikaları. *ANKEM Dergisi*. 21 (Ek2):186-191.
40. LEVIN, A. S., BARONE, A. A., PENCO, J., SANTOS, M. V., MARINHO, I. S., ARRUDA, E. A. G., MANRIQUE, E. I., COSTA, S. F. (1999). Intravenous colistin therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infection Diseases*. 28: 1008-1011.
41. IRAZ, M., CEYLAN, A., AKKOYUNLU, Y. (2012). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının incelenmesi. *ANKEM Dergisi*. 26 (2): 80-85.
42. AKALIN, H. (2004). Nozokomiyal pnömoni-II: Tedavisi ve önleme. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*. 8: 215-224.

43. WILLIAMS, J. D. (1997). Beta-lactamase inhibition and invitro activity of sulbactam and sulbactam/cefaperazon. *Clinical Infection Diseases*. 24: 494–497.
44. SABALLS, M., PUJOL, M., TUBAU, F., Pena, c., Montero, A., Dominguez, M. A., Gudiol, F. G., Ariza.J. (2006). Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58: 697-700.
45. PELEG, A. Y., POTOSKI, B. A., REA, R., ADAMS, J., SETHI, J., CAPITANO, B., HUSAIN, S., KWAK, E. J., BHAT, S. V., PATERSON, D. L. (2007). *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59: 128-131.
46. DİZBAY, M., ALTUNÇEKİÇ, A., SEZER, B.E., ÖZDEMİR, K., ARMAN, D. (2008). Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 32: 29-32.
47. AYGENCEL, G., DİZBAY, M., ÇİFTÇİ, A., TÜRKOĞLU, M. (2010). Ventilatör-ilişkili pnömoniden izole edilen kolistin dirençli *Acinetobacter baumannii*: Türkiye'den Bir Olgu Sunumu. *Yoğun Bakım Dergisi*. 9(3): 164-167
48. GORDON, N. C., PNG, K., WAREHAM. D. W. (2010). Potent Synergy and Sustained Bactericidal Activity of a Vancomycin-Colistin Combination versus Multidrug-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54: 5316–5322.
49. NEONAKIS, I.K., SPANDIDOS, D.A., PETINAKI, E. (2011). Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: A review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37: 102–109.
50. PETERSON, D.L.(2006). The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species, *Clin Infect Dis*. 43(Suppl 2):43-8.
51. PIMENTEL, J.D., LOW, J., STYLES, K. (2005). et al: Control of an outbreak of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an

- intensive care unit and a surgical ward. *J Hosp Infect* . 59(3):249-253.
52. RAHAL, J.J. (2006). Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis*. 43(Suppl 2):S95-99.
53. PEREZ, F., HUJER, A.M., HUJER, K.M., DECKER, B.K., RATHER, P.N., BONOMO, R.A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 51(10):3471-3484.
54. RODRIGUEZ, C.H., DE AMBROSIO, A., BAJUK, M., SPINOZZI, M., NASTRO, M., BOMBOCINO, K., RADICE, M., GUTKIND, G., VAY, C., FAMIGLIETTI, A. (2010). In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. *J.Infect Dev Ctries*.4: 164-167.
55. LI, J., NATION, R. L., OWEN, R. J., WONG, S., SPELMAN, D., FRANKLIN, C. (2007). Antibiograms of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clinical Infectious Diseases*. 45: 594–598.
56. ARDA, B. (2010). Çoğul İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* olgusu. *ANKEM Dergisi*. 24(Ek 2):78-81.
57. FALAGAS, M.E., KASIAKOU, S.K. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 40(9):1333-1341.
58. AL-SWEIH, N.A., AL-HUBAIL, M.A., ROTIMI, V.O. (2011). Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *J. Chemother*. 23:13-16.
59. LEE, S.C., HUANG, S.S., SEE, L.C., TSAI, M.H., SHIEH, W.B. (2011). In vitro activities of nine current antibiotics against culprit bacteria in nosocomial infections in an institution in Northern Taiwan. *Chang Gung Med J*. 34: 580-589.
60. CAI, Y., CHAI, D., WANG, R., LIANG, B., BAI, N. (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

67(7):1607-1615.

61. MOFFATT, J.H., HARPER, M., HARRISON, P., HALE, J.D., VINOGRADOV, E., SEEMANN, T., HENRY, R., CRANE, B., MICHAEL, F., COX, A.D., ADLER, B., NATION, R.L., LI, J., BOYCE, J.D. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:4971-4977.
62. MOFFATT, J.H., HARPER, M., ADLER, B. et al. (2011). Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:3022–3024.
63. HENRY, R., VITHANAGE, N., HARRISON, P. et al. (2012). Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly-b-1,6-N-acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(1): 59-69.
64. SOON, R.L., NATION, R.L., COCKRAM, S. et al. (2011). Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J Antimicrob Chemother.* 66: 126–133.
65. ADAMS, M.D., NICKEL, G.C., BAJAKSOUZIAN, S. et al. (2009). Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB twocomponent system. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 3628–3634.
66. AKOVA, M., KAYAALP, S. O. Beta-Laktam Antibiyotikler 1: Penisilinler. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.* KAYAALP, S. O. (2009). 12. Baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık. s.: 167-187.
67. LIVERMORE, D. M. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 8: 557-584.
68. BUSH, K., JACOBY, G. A. (2010). Updated Functional Classification of Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 969–976.
69. KAYAALP, S.O. (2009). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*

Tetrasiklinler. 12. Baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık. s.: 167-187.

70. ÇALIK, N., AKOVA, M. (2007). Tigesiklin. *Ankem Dergisi*. 21 (Ek 2): 29-33.
71. LIVERMORE, D. M. (2005). Tigecycline: What is it, and where Should it be used? *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 56 (4): 611-614.
72. ÇOKÇA, F. Tetrasiklinler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 308-313.
73. KAYAALP, S. O. (2009). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* Aminoglikozidler. 12. Baskı. Ankara: Türkiye: Pelikan Yayıncılık. s.: 209-213.
74. WİLKE-TOPCU, A. Aminoglikozidler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 294-303.
75. GÜR, D. (1996). Gram negatif bakterilerde aminoglikozid antibiyotiklere direnç ve aminoglikozidleri değiştirici enzimler. *Ankem Dergisi*. 10: 247-251.
76. RUIZ, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 1109-1117.
77. KAYAALP, S. O. (2009). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* Sulfonamidler, Ko-trimaksazol ve Trimetoprim. 12. Baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık. s.: 239-241.
78. AKSU, H. Z. S., CANDEVİR, A. Sulfonamidler, Trimetoprim ve Trimetoprim\Sulfametoksazol. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 368-372.
79. CONLON, M., AHMED, E., PAL, T., SONNEVEND, A. (2010). Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its [E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides*. 31: 1806–1810.

80. CIRIONI, O., SILVESTRI, C., GHISELLI, R., ORLANDO, F., RIVA, A., GABRIELLI, E. ET AL. (2009). Therapeutic efficacy of buforin II and rifampin in a rat model of *Acinetobacter baumannii* sepsis. *Crit Care Med.* 37: 1403–1407.
81. ROUTSIAS, J.G., KARAGOUNIS, P., PARVULESKU, G., LEGAKIS, N.J., TSAKRIS, A. (2010). In vitro bactericidal activity of human β -defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides.* 31: 1654–1660.
82. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Twenty-second informational supplement. USA. M100-S22.
83. Antimikrobiyal duyarlılık testleri. <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf> Erişim tarihi: 26.10.2013.
84. KAHLMETER G, BROWN DF, GOLDSTEIN FW, MACGOWAN AP, MOUTON JW, ODENHOLT I, RODLOFF A, SOUSSY CJ, STEINBAKK M, SORIANO F, STETSIOUK O. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 501-503.
85. COURVALIN P., LECLERCQ R., RICE L.B. (2010). *Antibiogram. Phenotypic Techniques* Chapter 6, p55-66, Eska Publishing, ASM press.
86. CHAPIN, K. C., LAUDERDALE, T. L. Ayraçlar, boyalar ve besiyerleri: Bakteriyoloji. *Manual of Clinical Microbiology*. MURRAY, P. R., BARON E. J., PFALLER, M. A., JORGENSEN, J. H., LANDRY, M. L. (2008). 9. Baskı. Ankara: Atlas Yayıncılık. s.: 334-364.
87. WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (2006). 6. Baskı. Lippincott Williams-Wilkins s.: 303-391.
88. ESER, Ö., ERGİN, A., HASÇELİK, G. (2009). *Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç ve metallo-beta-laktamaz varlığı. *Mikrobiyoloji Bülteni.* 43: 383-390.

89. ÖZBEY, N. (2012). Karbapenemlere dirençli acinetobacter baumannii izolatlarında moleküler tiplendirme ve karbapenemazların araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. ÇOMÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
90. GILBERT, D.N., MOELLERİNG, R.C., ELİOPOULOS, G.M., CHAMBERS, H.F., SAAG, M.S. (2012). *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy*. S.: 77
91. PACHON-IBANEZ, M., DOCOBO-PEREZ, F., LOPEZ-ROJAS, R., DOMÍNGUEZ-HERRERA, J. , JÍMENEZ-MEJÍAS, M., GARCÍA-CURİEL, A., PÍCHARDO, C., JÍMENEZ, L., PACHON, J. (2010). Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 54: 1165–1172.
92. TİMURKAYNAK, F., CAN, F., AZAP, OK., DEMİRBİLEK, M., ARSLAN, H., KARAMAN, SO. (2006). In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolated from intensive care units. *Int J Antimicrobial Agents*. 27: 224-228.
93. LIANG, W., LIU, X.F., HUANG, J., ZHU, D.M., LI, J., ZHANG, J. (2011). Activities of colistin and minocycline-based combinations against extensive drug resistant Acinetobacter baumannii isolates from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis*. 11:109.
94. ÖZBEK, B., ŞENTÜRK, A. (2010). Postantibiotic effects of tigecycline, colistin sulfate, and levofloxacin alone or tigecycline-colistin sulfate and tigecycline-levofloxacin combinations against Acinetobacter baumannii. *Chemotherapy*. 56: 466–471.
95. PECK, KR., KIM, MJ., CHOI, JY., KIM, HS., KANG, CI., CHO, YK., PARK, DW., LEE, HJ., LEE, MS., KO, KS. (2012). In vitro time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii, including colistin or tigecycline resistant isolates. *J. Med Microbiology*. 61: 353-360.