

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**KARBAPENEMLERE DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII*
İZOLATLARINDA MOLEKÜLER TİPLENDİRME VE KARBAPENEMAZLARIN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. NİLGÜN ÖZBEY

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. MÜŞERREF TATMAN OTKUN

Çanakkale/2012

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

KARBAPENEMLERE DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII*
İZOLATLARINDA MOLEKÜLER TİPLENDİRME VE KARBAPENEMAZLARIN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. NİLGÜN ÖZBEY

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. MÜŞERREF TATMAN OTKUN

Çanakkale/2012

Bu araştırma COMÜ-BAP tarafından 2011/114 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:...../...../.....

TEZ KONU BAŞLIĞI

Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında moleküler tiplendirme ve karbapenemazların araştırılması

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Müşerref TATMAN-OTKUN

Tez Jürisi Üyeleri:

Adı Soyadı

İmzası

Doç. Dr. Ahmet ÜNVER

.....

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 eğitimi süresince, hoşgörü ortamı içerisinde, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda desteğini gördüğüm, tez çalışmalarımın büyük bir titizlikle yürütülmesini sağlayan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Müşerref TATMAN-OTKUN'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenimim süresince bilgi ve deneyimleri ile her zaman desteğini gördüğüm değerli hocam Doç. Dr. Alper AKÇALI'ya, sayın hocalarım Doç. Dr. Ahmet ÜNVER'e ve Yrd. Doç. Ahmet VURAL'a, asistan arkadaşlarıma, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum laboratuvarımız çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Metin OTKUN'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.

Ege Üniversitesindeki rotasyonum sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda desteğini hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. Süleyha HİLMİOĞLU POLAT'a ve tüm mikoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezim sırasında laboratuvarlarını kullandığım Temel Bilimler Bölüm Başkanı Prof. Dr. Mahmut COŞKUN'a, Dahili Bilimler Bölüm Başkanı Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR'e ve genetik laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca destekleri ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini esirgemeyen; başarı ya da başarısızlığında hep yanımda olan; kendileriyle gurur ve onur duyduğum sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Nilgün ÖZBEY

ÖZET

KARBAPENEMLERE DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARINDA MOLEKÜLER TİPLENDİRME VE KARBAPENEMAZLARIN ARAŞTIRILMASI

Acinetobacter baumannii hastane enfeksiyonlarına yol açan etkenler içinde önemli yer tutmaktadır ve karbapenemlerde dahil antibiyotiklerin çoğuna direnç göstermektedir.

Amaç: Aralık 2008–Kasım 2011 tarihleri arasında izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii*’lerde karbapenemazların varlığı ve bunların kromozomal veya plazmid kaynaklı olduğunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda *A. baumannii*’lerin aynı kaynaktan köken alıp almadıkları ve bu izolatlardan diğer bakterilere genetik olarak aktarılma ile başka karbapenem dirençli bakteriler ile karşılaşma riskimizin olup olmadığı ortaya konulacaktır.

Yöntem-Bulgular: Çalışılan 65 *A. baumannii* en fazla yoğun bakım ünitesindeki hastalardan (%66), en çok kandan (%37) ve endotrakeal aspirat örneklerinden (%25) elde edilmiştir.

Antibiyotik duyarlılıkları karbapenemler için E-test, diğer antibiyotikler için disk difüzyonla çalışılmıştır. En duyarlı antibiyotikler tobramisin, netilmisin, polimiksin B ve kolistin (sırasıyla %98,5, %98,5, %98,5 ve %96,9) duyarlı olarak bulunmuştur. Diğer antibiyotiklere direnç oranı oldukça yüksek olup %92,3-100,0 arasında direnç saptanmıştır.

İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırmak için yapılan AP-PZR sonuçlarına göre; M13 primeri ile iki farklı patern, DAF4 primeri ile üç farklı patern gözlenmiştir.

Karbapenemaz varlığını araştırmak için yapılan multipleks-PZR ile bütün izolatlarda kromozomal kaynaklı OXA-23 ve OXA-51 enzim geni pozitif bulunurken diğer enzim genleri negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan enzimler için yapılan sekanslamada OXA-23 ve OXA-51 enzim varlığı doğrulanarak

izolatlar arası uyum gözlenmiştir.

İzolatların hiçbirinde plazmid izole edilmemiştir.

Sonuç: *A. baumannii* enfeksiyonlarının YBÜ'de, kan örneklerinde daha sık saptanması ve tiplendirme sonucuna göre; izolatların klonal benzerlik göstermesi nedeniyle girişimsel işlemler sırasında bakterilerin hastadan hastaya yayılımını engellemek için temel enfeksiyon kontrol önlemlerine dikkat etmek gerektiği sonucuna varılmıştır.

İzolatların plazmid taşımayan olması şimdilik başka karbapenem dirençli bakteriler ile karşılaşma riskimizin düşük olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, antibiyotik direnci, oksasilinaz, metallo beta laktamaz, PZR.

SUMMARY

MOLECULAR TYPING AND INVESTIGATION OF CARBAPENEMASES IN CARBAPENEM RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLATES

Acinetobacter baumannii plays an important role in causes of hospital infections and are resistant to most antibiotics, including carbapenems.

Aim: It was aimed to investigate the presence and chromosomal or plasmid origin of carbapenemase in carbapenem-resistant *A. baumannii* strains isolated between December 2008-November 2011. At the end of the study we will introduce whether *A. baumannii* had originated from the same source or not and seeing the risk of genetically transmission to other bacterias and risk in future for carbapenem resistant bacteria isolation.

Method and results: Sixty-five *A. baumannii* isolates were obtained mostly from patients in intensive care unit (66%) and blood (37%) and endotracheal aspirate samples (25%).

Antibiotic susceptibility has been studied to carbapenems with E-test, to other antibiotics with disc diffusion method. The most sensitive antibiotics were found to be tobramycin, netilmicin, polymyxin B and colistin (respectively 98,5%, 98,5%, 98,5% and 96,9% susceptible). The rates of resistance to other antibiotics were very high and the, resistance has been found between 92,3 to 100.0%.

AP-PCR was done to investigate the clonal relationship between the isolates; results showed two different patterns with M13 primer, three different patterns with DAF 4 primer.

In all isolates chromosomal originated OXA-23 ve OXA-51 enzyme genes were found positive, other enzyme genes were found negative with Multiplex PCR which was done to investigate carbapenemases. Closeness among the isolates was observed with the confirmation of the presence of the

OXA-23 ve OXA-51 enzymes in the sequencing which is done for positive enzymes.

None of the isolates contained plasmids.

Conclusion: Isolates are clonal similar according to the typing results and more frequent detection of *A. baumannii* infections at blood samples in the ICU; we should pay attention to basic infection control measures during interventional procedures to prevent spreading of bacteria from patient to patient.

Since isolates do not include plasmids, we think that there is small potential to see carbapenemase resistant bacterias for now.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, antibiotic resistance, oxacilinases, metallo-beta-lactamase, PCR.

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	x
Şekiller dizini	xiii
Tablolar dizini	xiv
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	3
2.1. Hastane Enfeksiyonları	3
2.2. Acinetobacter Cinsi	4
2.2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	4
2.2.2. Epidemiyoloji	6
2.2.3. Morfolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri	6
2.2.4. Patogenez ve Virülans	7
2.2.5. Acinetobacter Nedenli Hastane Enfeksiyonları	8
2.2.6 Acinetobacter Enfeksiyonlarında Tedavi	10
2.2.7. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Kullanılan Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları	11
2.2.8. Acinetobacter Türlerinde Karbapenemlere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmalarını Belirleme Yöntemleri	20
2.3. Tiplendirme Yöntemleri	22
2.3.1. Fenotipik Yöntemler	22
2.3.2. Genotipik Yöntemler	24
Gereç ve Yöntem	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Kimyasallar ve Ayıraçların Hazırlanması	29

3.1.1. Besiyerleri	29
3.1.2. Kimyasallar ve Ayıraçlar	30
3.2. Örneklerin Toplanması	31
3.3. Bakterilerin Kültürü ve İdentifikasyonu	31
3.3.1. Katalaz testi	31
3.3.2. Oksidaz testi	31
3.3.3. DNaz ekimi ve değerlendirilmesi	31
3.3.4. TSİ agar besiyerinin ekim yöntemi ve değerlendirilmesi	32
3.3.5. Jelatinaz besiyeri ekimi ve değerlendirilmesi	32
3.3.6. Glukoz O-F besiyeri ekimi ve değerlendirilmesi	32
3.3.7. Çukur lamda hareket bakılması	32
3.3.8. 44°C'de üreme	32
3.4. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	32
3.4.1. Disk Difüzyon Yöntemi	33
3.4.2. MIK Değerlendirme	35
3.5. MBL Varlığının Araştırılması	35
3.5.1. Çift Disk Sinerji Yöntemi	35
3.5.2. Modifiye Hodge Testi	36
3.6. Moleküler Yöntemler	36
3.6.1. DNA ekstraksiyonu	36
3.6.2. PZR bazlı tiplendirme (AP-PZR)	38
3.6.3. Karbapenemaz genlerinin araştırılması (Multipleks PZR)	39
3.6.4. Sekanslama	40
3.6.5. Plazmid ekstraksiyonu	40
3.7. İstatistiksel Analiz	42
Bulgular	43
Tartışma	56
Sonuç ve Öneriler	66
Kaynaklar	68

KISALTMALAR VE SİMGELER

HE	: Hastane enfeksiyonu
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi
ÇAD	: Çoğul antibiyotik dirençli
MBL	: Metallo-beta-laktamaz
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
EMB	: Eozin Metilen Blue
VİP	: Ventilatör ilişkili pnömoni
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
PBP	: Penisilin bağlayan protein
İBL	: İndüklenebilir beta-laktamazlar
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ARI-1	: Acinetobacter rezistan imipenem
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
tRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
LPS	: Lipopolisakkarit
PABA	: Para- aminobenzoik asit
MPA	: Merkaptopropionik asit
ATCC	: The American Type Culture Collection
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
cRNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
PFGE	: Pulsed field gel electrophoresis

RFLP	: Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
AP	: Arbitrarily Primed Amplification
ERIC	: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
REP	: Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Based Metod
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis
RAPD	: Random amplified polymorphic DNA
ÇOMÜ-SUAM: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi	
TSI agar	: Triple sugar iron agar
MHA	: Mueller Hinton agar
DNaz	: Deoksiribonükleaz
MHB	: Mueller Hinton buyyon
BHI buyyon	: Beyin kalp infüzyon buyyon
Glukoz O-F	: %1 glukozlu oksidasyon fermentasyon
LB buyyon	: Lurian-Bertani buyyon
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
SAM	: Ampisilin- sulbaktam
PRL	: Piperasilin
TZP	: Piperasilin-tazobaktam
TIC	: Tikarsilin
TIM	: Tikarsilin-klavulanik asit
CAZ	: Seftazidim
CRO	: Seftriakson
FEB	: Sefepim

GN	: Gentamisin
AK	: Amikasin
TOB	: Tobramisin
NET	: Netilmisin
CİP	: Siprofloksasin
LEV	: Levofloksasin
TET	: Tetrasiklin
DO	: Doksisisiklin
MIN	: Minosiklin
COL	: Kolistin
SXT	: Trimetoprim- sulfametoksazol
PB	: Polimiksin B
MEM	: Meropenem
IMP	: İmipenem
EUCAST	: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
DAF	: DNA amplification fingerprinting
ETA	: Endotrakeal aspirat
PCR	: Plastik Cerrahi ve Rekonstrüksiyon
KVC	: Kardiyo Vasküler Cerrahi
FTR	: Fizik Tedavi Rehabilitasyon
KHD	: Kadın Hastalıkları-Doğum
TÜEAUH	: Trakya Üniversitesi Eğitim Araştırma Uygulama Hastanesi
MYSTIC	: Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. 80-10.000 bp DNA ladder (solda), 1 kb DNA ladder	39
Şekil 4.1. M13 primeri ile görülen farklı paternler	47
Şekil 4.2. DAF4 primeri ile görülen farklı paternler	48
Şekil 4.3. Multipleks PZR sonuçları	49
Şekil 4.4. OXA-23 dendogramı	49
Şekil 4.5. OXA-51 dendogramı	50
Şekil 4.6. Plazmid izolasyonu sonuçları	50

TABLolar

Tablo 2.1 Acinetobacter cinsi üyelerinin genomik numaraları, türleri ve GenBank numaraları	5
Tablo 2.2 Beta-laktamaz sınıflaması (Bush K 1995)	13-14
Tablo 3.1 Disk difüzyon testinin yorumlanmasında kullanılan zon çapları	34
Tablo 3.2 MİK testinin yorumlanmasında sınır değerler	35
Tablo 3.3 Karbapenemaz aranmasında kullanılan primer çiftleri	40
Tablo 4.1 Klinik izolatların hastane ünitelerine göre dağılımı	43
Tablo 4.2 Klinik izolatların materyallere göre dağılımı	44
Tablo 4.3 Test edilen antibiyotiklerdeki duyarlılık yüzdeleri	45
Tablo 4.4 Suşların M13 primeri ile görülen farklı paternlere göre dağılımı	47
Tablo 4.5 Suşların DAF4 primeri ile görülen farklı paternlere göre dağılımı	48
Tablo 4.6 Çalışılan <i>A. baumannii</i> izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre (tüm izolatlarda dirençli saptanan antibiyotikler hariç) antibiyotik duyarlılık profilleri ve AP-PZR paternleri	52-55

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çoğul antibiyotik direnci olan Gram negatif basillerin neden olduğu hastane enfeksiyonları (HE) son yıllarda önemli bir problem haline gelmiştir. HE hasta morbidite ve mortalitesini arttırmakta, hastanede yatış süresini uzatarak tedavi maliyetini yükseltmekte ve ölümlere neden olmaktadır (1,2).

Acinetobacter cinsi bakteriler HE'ye yol açan etkenler içinde önemli bir yer tutmaktadır. Doğada, toprak ve sulara yaygın olarak bulunan ve fırsatçı patojen olan bu bakteriler hastane ortamına yerleşerek hastadan hastaya geçebilir, kolonize olabilir veya yatan hastalarda ciddi enfeksiyona neden olabilir (3). Acinetobacter türleri yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) kalan, solunum desteği gerektiren, immün sistemi yetersiz olan, uzun süre antibiyotik tedavisi alan, cerrahi müdahale geçiren ve onkoloji hastalarında önemli bir HE etkeni olarak dikkati çekmektedir (4).

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanımının bir sonucu olarak günümüzde kullanılan antibiyotiklerin çoğuna dirençli Acinetobacter türleri ortaya çıkmıştır. HE salgınlarında en sık izole edilen ve antibiyotiklere en dirençli tür *Acinetobacter baumannii*'dir (5). Hastanemizde yapılan bir çalışmada 1 Mayıs 2009 - 1 Mayıs 2010 tarihleri arasında YBÜ'de yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen gram negatif üremelerin çoğu karbapenemlerde dahil çoğul antibiyotik dirençli (ÇAD) *A. baumannii* olarak saptanmıştır (6).

Karbapenemler Acinetobacter'e karşı etkinliği son dönemde azalsa da en etkili antibiyotiklerdendir (7). Ancak penisilin bağlayan proteinlerdeki değişme, dış membran permeabilitesinde azalma ve kromozomal veya plazmid kaynaklı beta-laktamaz üretimi ile karbapenemlere direnç gelişmektedir (4). Oksasilinazlar ve metallo-beta-laktamazları (MBL) içeren karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazlar (karbapenemazlar) *A. baumannii*'de karbapenem direncinin ortaya çıkmasına önemli katkıda bulunmaktadır (8).

Karbapenemaz enzimleri kromozomal veya plazmid kaynaklı olabilir. Özellikle plazmid kaynaklı olanlar başka bakteri gruplarına veya duyarlı

Acinetobacter türlerine direnç plazmidinin aktarılması sonucu karbapenem direncinin yayılmasında rol oynayabilir. Bu çalışmada hastanemizde izole edilen *A. baumannii* türlerinde karbapenemazların varlığının araştırılması yanı sıra bunların kromozomal veya plazmid kaynaklı olduğunun araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma sonunda hastanemizde izole edilen ÇAD *A. baumannii*'lerin aynı kaynaktan köken alıp almadıkları ve bu Acinetobacter izolatlarından diğer bakterilere genetik olarak aktarılma ile başka karbapenem dirençli bakteriler ile karşılaşma riskimizin olup olmadığı ortaya konulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastane Enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonları hasta sağlık kuruluşuna başvurduğu sırada var olmayan veya kuluçka döneminde olmayan, hastaneye yatıştan sonra gelişen, bazen de taburcu olduktan sonra ortaya çıkabilen enfeksiyonlardır. HE'leri oluşturduğu yüksek maliyet, morbidite ve mortalite oranlarındaki artış nedeniyle tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur. HE oluşturan mikroorganizmalara karşı yıllar içinde tedavide kullanılan antimikrobiyal ilaçlara direnç gelişmiş ve tedavisi neredeyse imkansız hale gelmiştir. Son yıllarda kullanımdaki antimikrobiyal ilaçların hepsine karşı dirençli; panrezistan mikroorganizmaların neden olduğu, ölümlerle sonuçlanabilen ciddi HE'leri tüm dünyada önemli sorunlara neden olmaktadır (9). Dünya verilerine göre HE oranları ülkeden-ülkeye hatta hastaneden-hastaneye değişmekle birlikte genellikle %3-17 arasında bulunmuştur. Yoğun bakım ve yanık üniteleri gibi birimlerde bu oran %20-40'lara çıkmaktadır. Gelişmemiş ülkelere göre sağlık kuruluşuna başvuran hastalarda HE gelişme riskinin gelişmiş ülkelere göre 2-20 kat artmış olduğu bildirilmiştir (10). Karahocagil ve ark. (11) yaptıkları çalışmada Ocak 2009-Mart 2010 tarihleri arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Araştırma Uygulama Hastanesi'nde HE oranını %3,5 bulmuşlardır. HE'lere neden olan mikroorganizmalar arasında *A. baumannii* %23,2 oranı ile ilk sırada yer almakta, bunu %20,5 ile *Klebsiella spp.*, %19,6 ile *Escherichia coli*, %11,6 ile *Pseudomonas spp.* izlemektedir. Hastanemiz enfeksiyon kontrol komitesinin verileri incelendiğinde; çalışmamızın kapsadığı 2009, 2010 ve 2011 yıllarında HE oranları sırayla %1,73, %2,45 ve %3,6 olarak saptanmıştır. Bölümlere göre yıllık HE oranlarına bakıldığında %14,29, %30,85 ve %25,18 ile YBÜ en çok enfeksiyonun görüldüğü birimdir. Cerrahi bilimler servisindeki HE oranları %0,85, %1,18, %2,60 iken dahili bilimler servisindeki oranlar %0,86, %1,67, %2,25 olarak bulunmuştur. Hastanemizde çalışmamızın yapıldığı üç yılın ortalamasına göre, HE etkeni olarak en sık izole edilen mikroorganizma %19,78

ile *A. baumannii* olarak bulunmuştur. Diğer sık görülen mikroorganizmalar %14,06 ile *P. aeruginosa* ve %8,35 ile *E. coli* olarak tespit edilmiştir.

HE'lerinde en yüksek oranda görülen bakteri olan *Acinetobacter* türleri, deri ve mukoza kolonizasyonu sonrasında yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu bakteri ile gelişen enfeksiyonlarda antibiyotiklere olan direnç önemli sorunlar yaratmaktadır (12). Hastanemizde yapılan çalışmada 1 Mayıs 2009 - 1 Mayıs 2010 tarihleri arasında izole edilen *A. baumannii* suşlarında çoklu direnç gözlenmiş, tüm suşlarda sadece tobramisın ve kolistin duyarlı bulunmuştur (6).

2.2. Acinetobacter Cinsi

2.2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Acinetobacter ilk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiş, 1939 yılında DeBord'un gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesiyle tanımlanmıştır. O zamandan bugüne kadar birçok farklı isimle anılmış, yapısal özellikleri ve biyokimyasal özellikleri ile tanımlanmaları ve sınıflanmaları oldukça karmaşık süreçlerden geçmiştir (13, 14, 15). Deoksi ribonükleik asit (DNA) benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda 33 genomik tür tanımlanmıştır, 24 genomik türe isim verilirken diğer türler isimlendirilememiştir. (Tablo 2.1) (16, 17). Genomik türlerden grup 1, 2, 3 ve 13TU benzerlik gösterip laboratuvarda zor ayırt edildikleri için *A. calcoaceticus-A. baumannii kompleks* olarak tanımlanmışlardır (13, 18). *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* ve *A. lwoffii*, klinik literatürde en sık rapor edilen *Acinetobacter* türleridir (15). Tüm bu türler arasında en sık ve önemli klinik tablolara yol açan tür *A. baumannii*'dir (4).

Tablo 2.1. Acinetobacter cinsi üyelerinin genomik numaraları, türleri ve GenBank numaraları (16)

Genomik numaraları	Acinetobacter türleri	GenBank numaraları
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DQ207474 = EF611388 = EU477149
2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	DQ207471 = EF611384 = EU477108
3	<i>Acinetobacter pittii</i>	EU477114
4	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	DQ207484 = EU477109 = EF611391
5	<i>Acinetobacter junii</i> (<i>Acinetobacter grimontii</i>)	DQ207486 = EU477110 = EF611394a
6	-	DQ207480 = EU477115
7	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	DQ207485 = EU477113
8	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	EU477111 = EF611395 = DQ060363b
9	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	EU477111 = EF611395 = DQ060363b
10	<i>Acinetobacter berezinae</i>	DQ207475 = EU477116
11	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	DQ207476 = EU477117
12	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	DQ207489 = EU477112 = EF611400
13BJ (14TU)	-	DQ207478 = EU477149
13TU	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	EU477118
14BJ	-	EU477147
15TU	-	EU477119
15BJ	-	EU477133
16	-	DQ207477 = EU477135
17	-	EU477134
-	<i>Acinetobacter venetianus</i>	EU477136
-	<i>Acinetobacter ursingii</i> (<i>Acinetobacter septicus</i>)	DQ231239 = EF611406 = EU477105
-	<i>Acinetobacter schindleri</i>	DQ207490 = EU477128 = EF611402
-	<i>Acinetobacter parvus</i>	DQ207488 = EU477107 = EF611399
-	<i>Acinetobacter baylyif</i>	EU477155 = CR543861
-	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	DQ207473 = EU477150 = EF611387
-	<i>Acinetobacter townneri</i>	DQ207493 = EU477154 = EF611405
-	<i>Acinetobacter tandoii</i>	DQ207491 = EU477152 = EF611403
-	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	DQ207492 = EU477153 = EF611404
-	<i>Acinetobacter gernerii</i>	DQ207482 = EU477151 = EF611389
-	<i>Acinetobacter soli</i>	Belirlenemedi
-	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	EU477124
-	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	EU477148

2.2.2. Epidemiyoloji

Acinetobacter cinsi bakteriler, yaşamlarını sürdürebilmek için gereksinimlerinin az olması ve çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilme avantajı nedeniyle doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler. Acinetobacter'ler kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH ortamlarında canlı kalabilmeleri nedeniyle, cansız yüzeylerde günlerce canlı kalabilmektedirler. Pastörize sütlerden, donmuş yiyeceklerden, hastane havasından, camdan, musluklardan, peritoneal diyaliz maddelerinden, anjiyografi kateterinden, ventilatörlerden, laringoskoplardan, solunum tedavi solüsyonlarından, tansiyon aletinden, kontamine eldivenlerden, pamuktan, kullanılmış enjektörlerden, hasta yastıklarından, kuru filtrelerden izole edilmiştir (4, 14, 19). Sağlıklı bireylerde özellikle koltuk altı, kasık gibi nemli bölgeler başta olmak üzere deride, ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistem florasında da bulunabilir (4, 20).

Hastanede yatmakta olan 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 taşıyıcılığı oranlarının yüksek olması hasta bakımı sırasında sağlık personelinin kontamine olmasına ve etkenin sürekli yayılmasına neden olmaktadır (4, 12).

Seifert ve ark. (21)'nin sağlıklı gönüllüler ve yatan hastalar üzerinde yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada hastalarda *Acinetobacter* türleri ile kolonizasyon oranını %75, kontrol grubunda %42,5 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada en sık kolonizasyon bölgesi eller (%26), kasık bölgesi (%25), ayak parmak arası (%24), alın (%23) ve dış kulak yolu (%21) olarak tespit edilmiştir.

2.2.3. Morfolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri

Acinetobacter cinsindeki bakteriler 1-1,5 µm x 1,5-2,5 µm boyutlarında, gram negatif, üremenin logaritmik fazında basil formunda, üremenin duraklama fazında kok veya kokobasil formunda görülmektedir. Pozitif kan kültür tüpünden hazırlanan yaymalarda Gram pozitif kok görünümünde olabilir (13). Genellikle

düzgün, bazen mukoid, renksiz koloniler oluşturur. Zorunlu aerop, oksidaz, DNaz ve jelatinaz negatif, katalaz pozitif bakterilerdir. Üç şekerli demirli besiyeri (TSİ)'nde asit oluşturmazlar. Oksidasyon, fermentasyon besiyerinde glukoz oksidasyonu gösteren bakterilerdir. Fimbriaları vardır ve hareketsizdirler (4, 18).

Rutin laboratuvar koşullarında *Acinetobacter* tür ayrımı biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre yapılmaktadır. Klinikte sık görülen türlerin ayırımına baktığımızda; glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 44°C'de üreyebilen kökenler *A. baumannii*, glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 37°C'de üreyebilen kökenler *A. calcoaceticus*, glukoz negatif kökenlerden hemoliz yapmayanlar *A. Iwoffii*, hemoliz yapanlar ise *A. haemolyticus* olarak tanımlanmıştır (4, 12, 13, 22).

Acinetobacter cinsi bakterileri klinik örneklerden izole etmek için kanlı agar ve eozin metilen blue (EMB) agar gibi besiyerleri kullanılır. Hem klinik hem de çevreden bu bakterilerin izole edilmesinde kullanılabilen seçici ve ayırt edici besiyerleri geliştirilmiştir. Bu amaçla diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe eden bromkrezol moru, safra tuzları, laktoz, maltoz şekerlerini içeren Herellea agar, vankomisin, sefsulodin, sefradin gibi antibiyotikleri içeren Leeds *Acinetobacter* Medium ve Holton's agar kullanılmaktadır (4, 23). Az sayıda bakterinin bulunabileceği çevre ortamlarından alınan çeşitli mikroorganizmalarla kontamine örnekler amonyum veya nitrat tuzları içeren çoğaltıcı sıvı mineral besiyerine ekilebilmektedir. Sıvı besiyerindeki örnek, 24-48 saat sallanarak yapılan inkübasyon sonrası seçici besiyerine inoküle edilmektedir. Dışkıdan *Acinetobacter* izolasyonunda da bu yöntem kullanılmaktadır (4, 13, 23).

2.2.4. Patogenez ve Virülans

Acinetobacter cinsi bakterilerin virülans potansiyelleri düşük olduğundan konak savunma mekanizması normal olanlarda enfeksiyon oluşturması oldukça güçtür. Genellikle fırsatçı HE'lere neden olurlar (14). Malignite, yanık ve konağın savunma sistemini baskılayan durumlar enfeksiyon gelişimini kolaylaştıran bazı faktörlerdir. Ağır cerrahi girişim, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma, uzun süreli antibiyotik kullanımı, damar içi kateterizasyon, enteral beslenme, idrar sondası, endotrakeal tüp ve trakeostomi

varlığı başlıca risk faktörleridir (2, 4). Yoğun bakım hastalarının birçoğundaki stres ülseri profilaksisinin neden olduğu azalmış mide asit sekresyonu bakterinin midede aşırı üremesine ve hastane kökenli pnömoni veya bakteriyeminin gelişmesine neden olmaktadır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanımı, hem Acinetobacter türleri ile gelişen HE oranını arttırmış hem de bu bakterilerde birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmesine neden olmuştur. Antibiyotik kullanma alışkanlıkları ve çevresel faktörlerin katkısı ile antibiyotik direnci hastaneler, şehirler ve ülkeler arasında farklılık göstermektedir (2, 4, 24).

Virulanstan sorumlu bazı faktörler şunlardır: (4, 25)

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

2) Fimbria ve/veya kapsüller polisakkarit: Epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar.

3) Lipopolisakkarit ve Lipid A: Dokulardaki lipidleri yıkan enzimleri üretir. Hücre duvarında bulunan lipid A potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırır.

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

Antibiyotik direnci sağlayan genler de virülansı artırır ve klinik olarak daha ölümcül enfeksiyonlara neden olur (4, 26)

2.2.5. Acinetobacter Nedenli Hastane Enfeksiyonları

Acinetobacter mekanik ventilasyon gereken yoğun bakım ünitesi hastalarında ventilatör ilişkili pnömoni (VİP)'ye neden olmaktadır. Ventilatör bağımlı hastaların kontrolünde büyük ilerlemelere ve solunum ekipmanlarının dezenfeksiyonunda etkili yöntemlerin kullanımına rağmen insidansta artış görülmektedir (4). Kronik akciğer hastalığı, YBÜ'de yatış süresinin uzun olması, ileri yaş, immünsupresif tedavi, cerrahi, antibiyotik kullanımı, endotrakeal tüp ve gastrik tüp gibi invaziv alet varlığı, solunum ekipmanının tipi Acinetobacter ile alt

solunum yollarının kolonizasyon veya enfeksiyon riskini arttıran faktörler olarak tanımlanmıştır (27, 28).

Acinetobacter bakteriyemisi sıklıkla pnömoni ve damar içi kateter kullanımından sonra gelişen enfeksiyonlara sekonder gelişmektedir. Üriner sistem kateterizasyonu, deri ve abdominal enfeksiyonlar daha az sıklıkla kaynak oluşturur (29). Bakteriyemi için yetişkinlerde en büyük risk grubunu immün sistemi baskılanmış yaşlı hastalar oluşturur. Malignansiler, travma ve yanık en yaygın predispozan faktörler olarak görülmektedir. Hastanın prognozunu genellikle altta yatan hastalıklar belirlemektedir. Malignensi ve yanıklarda prognoz oldukça kötü iken travma hastalarında daha iyi olmaktadır (30). Yenidoğanlar Acinetobacter bakteriyemisi için ikinci önemli hasta grubunu oluşturur. Septisemi için risk faktörleri düşük doğum ağırlığı, mekanik ventilasyon, öncesinde antibiyotik kullanımı ve yeni doğan konvülsiyonlarının varlığı olarak tanımlanmıştır (4).

Primer menenjitli sporadik vakalar bildirilmesine rağmen özellikle beyin cerrahisi uygulamalarından sonra veya kafa travmasını takiben gelişen sekonder menenjit olguları görülmektedir. Acinetobacter türleri ile gelişen menenjit olgularında beyin omurilik sıvısı (BOS) bulguları pürülan menenjit özelliğindedir. Klinik bulgu olarak sıklıkla konvülsiyon ve mental durumda bozulma gözlenirken, ense sertliği nispeten daha az oranda görülen bulgudur. Ventrikülostomi, serebrospinal sıvı kaçağı, BOS fistülleri, beş günden uzun süreli tutulan ventriküler kateterler ve aşırı antibiyotik kullanımı risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (4).

Acinetobacter türleri ile oluşan hastane kökenli üriner sistem enfeksiyonları nadir görülmektedir. Genellikle yaşlı, immün sistemi baskılanmış, sürekli üriner kateteri olan ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda gözlenebilir. Prostat büyümesi nedeniyle sürekli kateter kullanımında yüksek prevalansa sahip oldukları için hastaların çoğunu erkekler oluşturur. Üriner kateter taşıyan hastalardan izole edilen her Acinetobacter gerçek enfeksiyon etkeni olmayabilir, enfeksiyon/kolonizasyon ayrımının yapılması gerekmektedir (4, 13, 31).

Acinetobacter ile oluşan yumuşak doku enfeksiyonlarında travmatik yaralar, yanık, cerrahi insizyon bölgeleri, damar içi kateter uygulamaları, bağışıklık sisteminin baskılanması başlıca risk faktörlerini oluşturur (4). Devamlı peritoneal diyaliz olan hastalarda peritonite neden olabilir. En yaygın tablo olarak karın ağrısı ve bulanık diyalizat görülmektedir. Hastaların çoğu diyalizi sonlandırmaya gerek kalmadan antibiyotik tedavisine yanıt vermektedir. Ayrıca perkutan transhepatik kolanjiografi, perkütan safra drenajı sonrası enfeksiyon gelişen olgular bildirilmiştir (4, 14).

Acinetobacter ile gözde konjonktivit, endoftalmit, lens kontaminasyonu sonucu korneal ülserasyon ve perforasyon oluşabilir. Bu bakteriye bağlı oluşan pankreas ve karaciğer absesi rapor edilmiştir. Otolog kemik iliği transplantasyonundan sonra gelişen osteomyelit, septik artrit bildirilen diğer nadir olgulardır (4, 13).

2.2.6 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 (4).

İzole edilen Acinetobacter izolatlarının birçok antibiyotiğe dirençli olmasından dolayı tedavisi oldukça güçtür. Antibiyotik seçenekleri oldukça sınırlı olabilmekle birlikte karbapenemler, sulbaktam ve kolistin en etkili antibiyotikler olarak görülmektedir (32, 33).

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 duyarlı olarak raporlanmaktadır. Ayrıca duyarlı bildirilen tobramisin tedavide alternatif olarak görülse de bu antibiyotik ülkemizde bulunmamaktadır (34, 35).

Çoğul ilaca dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu VIP'te 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 VIP'te intravenöz yoldan doksisisiklin veya minosiklin tedavisinin etkili olduğu bildirilmiştir (32).

Acinetobacter enfeksiyonlarında en sık kullanılan kombinasyon; düşük direnç oranları ve in vitro sinerjik etki göstermesinden dolayı imipenem ile amikasinidir (32). 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 (36).

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 (37, 38).

2.2.7. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Kullanılan Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam Antibiyotikler: Bu grup antibiyotikler bakterinin peptidoglikan sentezinde görevli olan karboksipeptidaz ve transpeptidazlarını inhibe edip, hücre duvar sentezini durdurarak bakterisidal etki gösterirler. Bu enzimler penisilin bağlayan protein (PBP) olarak adlandırılır. Bir bakteride çok sayıda PBP bulunur. Bu enzimler moleküler ağırlığı en büyükten başlanarak PBP-1, PBP-2, PBP-3 vb. olarak gösterilir. Beta-laktam antibiyotikler hücre duvarı sentezi yapılan, yani çoğalmakta olan bakterilere etki ederler. Beta-laktam antibiyotikler penisilinler, beta-laktamaz inhibitörleri, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler olmak üzere 5 grupta toplanırlar (39).

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 (40).

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 kanallıklar aracılığıyla gerçekleşir (40).

Bakterilerdeki porinlerin sayısı ve özellikleri ve antibiyotiğin yük, çözünürlük, büyüklük gibi özellikleri antibiyotiğin bakteri içine giriş hızını belirler. Antibiyotiklerin bakteri hücrelerinden atılımı, bakterilerin antibiyotiklerin hücre içi yoğunluğunu azaltmak için kullandıkları enerjiye bağımlı bir mekanizmadır. Atım pompaları antibiyotiklere duyarlı ve dirençli tüm mikroorganizmalarda bulunmakta, mutasyonlar sonucunda antibiyotiklere direnç oluşturmaktadır. *Acinetobacter* kökenlerinde dış membran geçirgenliği *E. coli*'nin %1-3'ü kadardır (41).

3) Beta-laktamaz enzimleriyle beta-laktam antibiyotiklerinin inaktive edilmesi: Bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençte en sık kullandıkları mekanizmadır. Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz enzimleri gram-pozitif bakterilere göre daha çok yaygın ve çeşitlidir. Bunun nedeni de birçoğunun plazmid ve transpozon kontrolünde olması ve direnç genlerinin duyarlı bakterilere geçirilebilmesidir. Bu enzimler moleküler yapılarına ya da substrat ve inhibitör profilleri ile belirlenen işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılabilir. En yaygın olarak 1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından önerilen sınıflama günümüzde güncellenmiş şekli ile kullanılmaktadır (42) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Beta-laktamaz sınıflaması (42)

Bush-Jacoby Sınıflaması (fonksiyonel sınıflama)	Temel alt gruplar	Ambler sınıflaması (moleküler sınıflama)	Temel Özellikler
Grup 1 Sefalosporinazlar (klavulanik asit ile inhibe olmaz)		C sefalosporinazlar	Çoğunlukla Gr (-) bakterilerdeki kromozomal enzimler (Amp C) Karbapenem hariç tüm beta -laktamlara dirençli
	1e	C	Seftazidime yüksek afinite
Grup 2 Penisilinazlar (klavulanik asit ile inhibe olur)	2a	A	Gram (+) bakterilerdeki penisilinazlar
	2b	A	Çoğunlukla Gr (-) bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1) Ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin direnci
	2be	A	Genişletilmiş spektrumlu (TEM, SHV türevi enzimler, PER-1, CTX-M, VEB-1, GES-1) Ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin direncine ek olarak seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam direnci
	2br	A	Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam dirençli (TEM-30, SHV-10)
	2ber	A	Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam direncine ek olarak seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam dirençli (TEM-50)
	2c	A	Karbenisilini hidrolize eden enzimler (PSE-1, CARB-3)
	2ce	A	Karbenisiline ek olarak, sefepim, sefpirom hidrolize eden enzimler (RTG-4: CARB-10)
	2d	D	Oksasilin ve kloksasilin hidrolize eden enzimler (OXA-1, OXA-10)
	2de	D	Kloksasilin veya oksasilin hidrolizine ek olarak seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam direnci (OXA-11, OXA-15)
	2df	D	Kloksasilin veya oksasilin hidrolizine ek olarak karbapenem hidrolizi (OXA-23, OXA-48)

Tablo 2.2 (devamı). Beta-laktamaz sınıflaması (42)

Bush-Jacoby Sınıflaması (fonksiyonel sınıflama)	Temel alt gruplar	Ambler sınıflaması (moleküler sınıflama)	Temel Özellikler
	2e	A	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar (CEP A)
	2f	A	Karbapenem, seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam direnci, sefamisin hidrolizi (KPC)
Grup 3 Metallo-beta-laktamazlar	3a	B	Çinko-bağımlı karbapenemazlar Karbapenem hidrolizleri yüksek, monobaktam hidrolizleri zayıf Klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe olmazlar Metal iyonu şelatörleri ile inhibe olurlar (IMP, VIM)
NI		Sınıflanmamış	Dizileri bilinmeyen çeşitli enzimler

Grup 1 sefalosporinazlar Gram negatif bakterilerin çoğu tarafından üretilir. Yapılan çalışmalarda *A. baumannii* kökenlerinin çoğunda grup 1 AmpC kromozomal enzim saptanmıştır (40). Bu enzimler aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle klavulanik asit ve sülfonların beta-laktam halkalarına bağlanamaz. Bu nedenle de beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler (39). Normalde düşük düzeyde üretilen AmpC tipi enzimler, ortamda bir indükleyici bulunması halinde sentezlerinin uyarılması, indükleyici ajan ortadan kalktığına sentezin tekrar bazal seviyeye inmesi nedeniyle, indüklenebilir beta-laktamazlar (İBL) olarak da adlandırılır. Yüksek düzeyde üretilen İBL'ler, karbapenemler hariç tüm beta-laktamları parçalayabilme özelliğindedirler. Karbapenem direnci AmpC beta-laktamaz enziminin aşırı üretimi ile birlikte dış membran porin değişikliği olduğunda görülebilir (43, 44). Ayrıca *Acinetobacter* kökenli sefalosporinazlar olarak adlandırılan sınıf C kromozomal enzimler; ACE-1, ACE-2, ACE-3, ACE-4 bulunmaktadır. ACE-1 sefuroksime karşı zayıf etkili, klavulanik aside dirençli en geniş spektrumlu enzimdir (40, 45).

Grup 2b, Ambler sınıf A'da yer alan TEM-1 ve TEM-2 beta-laktamazlarının varlığı, *Acinetobacter* türlerindeki penisilin direncinden büyük ölçüde sorumlu tutulmaktadır (40).

Grup 2be genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'a bağlı direnç *Acinetobacter* türleri arasında az görülmektedir. Ambler sınıf A'da yer alan GSBL olan PER-1 enzimi ilk kez 1996 yılında Türkiye'de saptanmış ve PER-1 enzimi taşıyan kökenlerle gelişen enfeksiyonlarda prognozun daha kötü olduğu bildirilmiştir. Bunlar seftazidim ve gentamisine yüksek dirençli, amikasine orta dirençli, imipenem ve meropeneme duyarlı veya kısmen duyarlıdır. *A. baumannii*'de PER dışında sık saptanan GSBL enzimleri VEB ve GES enzimleridir (26, 46). Shahcheraghi F. ve ark. (47) 2009-2010 yılları arasında Tahran'da yaptıkları çalışmada GES enzimi pozitif *Acinetobacter* izolatu saptamışlardır.

Grup 2d oksasilinaz ve grup 3 MBL içeren karbapenem hidrolize eden beta-laktamazlar (karbapenemazlar) karbapenem direncinden sorumlu enzimlerdir. Bu enzimler kromozom ve plazmid kontrolünde üretilir.

Günümüzde 120'den fazla D grubu beta-laktamaz tanımlanmış olup bunlardan 45 kadarı karbapenem hidrolize eden oksasilinazdır. Oksasilini klasik penisilinlerden daha hızlı hidrolize etmeleri nedeniyle oksasilinazlar olarak tanımlanmışlardır. Klavulanik asit ve etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ile zayıf bir inhibisyon gösterirler, tazobaktam ve sulbaktamdan etkilenmezler. Genellikle seftazidim, sefotaksim ve aztreonamı ya hiç hidrolize etmezler ya da zayıf bir şekilde hidrolize ederler (48). OXA tipi karbapenemazların çoğu imipenem ve meropeneme karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterirler. Ayrıca diğer direnç mekanizmalarından dış membran proteinlerinin kaybı veya eflüks pompalarının artmış aktivitesi ile birlikte olduklarında daha geniş spektrumlu direncin gelişmesine neden olurlar (49).

A. baumannii türleri zayıf karbapenemaz aktivitesi gösteren kromozomal OXA-51 benzeri enzim kümesine ait doğal sınıf D oksasilinaz üretir. *ISAbal1* ile komşu olan OXA-51 enzimi olan suşlarda karbapenem direnci saptanmıştır. *ISAbal1*, OXA-51 için düzenleyici gibi görünmektedir. Diğer OXA enzimlerinin de yakın bölgesinde bulunabilen *ISAbal1*, enzim genlerinin yanına atlar ve promotor görevi görüp yüksek dirence neden olur. OXA-51 enzim kümesi üyeleri *A. baumannii*'nin hemen hemen tüm izolatlarında doğal yapı olmasına rağmen diğer *Acinetobacter* türlerinde bulunmaz (50, 51).

Kromozomal OXA-51 enziminden başka, karbapenemlere karşı aktivite gösteren üç kazanılmış sınıf D oksasilinaz kümesi tanımlanmıştır (52). *Acinetobacter*'de kazanılmış karbapenem hidrolize eden oksasilinaz ilk olarak 1985'te Edinburg Üniversitesinde izole edilen suşta gösterilmiştir. Enzimin genetik ve biyokimyasal incelenmesini takiben ARI-1 (*Acinetobacter* rezistan imipenem) olarak adlandırılmıştır. Bu enzime daha sonra OXA-23 adı verilmiştir (49). Bu kümedeki diğer oksasilinaz OXA-27'dir (53).

Kazanılmış ikinci küme oksasilinazlar OXA-24, OXA-25, OXA-26 ve OXA-40'ı içerir. Bu kümedeki enzimlerin pek çoğu birbirinin yakın varyantı gibi görünmektedir (45).

Kazanılmış üçüncü oksasilinaz kümesi ilk olarak Fransa'da saptanan OXA-58'dir. OXA-58'in *A. baumannii*'de eksprese olduğunda karbapenemlere

duyarlılığı azaltıp, aşırı ekspresyon durumunda da yüksek karbapenem direncine yol açtığı bildirilmiştir (54).

Gür ve ark. (55) 2000- 2006 yılları arasında yaptıkları çalışmada, kan ve solunum yolu örneklerinden izole edilen 44 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatinin 18 (%40,9)'inde OXA-58, 26 (%59,1)'sında OXA-23 saptamışlardır. Başka bir çalışmada Vahapoğlu ve ark. (56) 72 izolattan 56 OXA-51 pozitifliği, 10 OXA-58 pozitifliği saptamış, bu enzimlerin beraber pozitifliğinde tüm antibiyotiklere direncin görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Diğer karbapenemaz olan MBL'lar aktif bölgelerinde taşıdıkları metal iyonları nedeniyle bu ismi almışlardır. Tanımlanmış altı grup MBL vardır (IMP, VIM, SIM, SPM, GIM ve GSO). *A. baumannii*'de altı IMP varyantı (IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8 ve IMP-11) saptanmıştır (57). Diğer enzimler nadir olarak saptanmaktadır. Bu enzimler monobaktamlar hariç tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı güçlü hidrolitik etkinliğe sahip olup yüksek düzeyde dirence neden olurlar. IMP-1'de imipenem direnci daha fazla olup, IMP-2 ve IMP-3 deki direnç tüm beta-laktam antimikrobialer için aynıdır. Beta-laktamlar arasında sadece sefepim ve daha az miktarda piperasilin-tazobaktam MBL üreten suşlara karşı aktiviteye sahiptir (58).

Ulusoy-Al M ve ark. (59) Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yaptıkları çalışmada 79 *Acinetobacter* suşunda MBL üretimini fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırıp, Etest ile 41'inin (%51,9), kombine disk sinerji testi ile 46'sının (%58,2), çift disk sinerji testi ile 44'ünün (%55,7), modifiye Hodge Testi ile 55'inin (%69,6) MBL ürettiği saptamışlardır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle IMP-1 geni araştırılmış, ancak pozitiflik bulunamamıştır.

Shahcheraghi ve ark. (47) 2009-2010 yılları arasında Tahran'da 203 *Acinetobacter* izolatu ile yaptıkları çalışmada 100 izolatta imipenem direnci saptayıp, altı izolatta MBL, 94 izolatta OXA enzimi tespit etmişlerdir. MBL'lerden IMP, VIM, SPM enzimlerini arayıp, VIM ve SPM enzimlerinde pozitiflik saptamışlardır. Oksasilinaz enzimlerinden de OXA-23, OXA-51 arayıp iki enzimle de pozitiflik saptamışlardır.

Aminoglikozidler: Pseudomonaslar başta olmak üzere gram-negatif aerob bakteriler üzerine etkilidirler. Etkileri antibiyotik konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Dirençli Acinetobacter enfeksiyonlarında kombine tedavide etkilidirler. Gram-pozitif bakterilere etkinlikleri kısıtlıdır. Etki mekanizması olarak, mRNA (mesajcı ribonükleik asit)'daki genetik bilginin yanlış okunmasına yol açarak bakteri ribozomundaki protein sentezini inhibe ederler ve duyarlı bakteri hücrelerine hızlı bakterisidal etkinlik gösterirler. Aminoglikozidlerin konsantrasyona bağlı bakterisidal ve postantibiyotik etkilerinden yararlanılarak tek ve yüksek doz uygulanmalarıyla başarılı tedavi sonuçları elde edilmiş ve beklenenin aksine önemli toksik etkiler de saptanmamıştır (60).

Aminoglikozidlere karşı ribozomal, enzimatik (asetiltransferaz, fosfotransferaz ve nükleotidil transferaz enzimine bağlı) ve membran geçirgenliğinde azalma mekanizmaları ile direnç söz konusudur (61).

Netilmisin ve amikasin bakterilerin salgıladığı inaktive edici enzimlerin çoğuna karşı dayanıklıdır; sadece asetilazlar tarafından inaktive edilirler. Bu direnç sayesinde grup içinde en geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahiptirler (62).

Tetrasiklinler: Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere, aerob ve anaerob mikroorganizmalara, spiroketlere, özellikle riketsiya, klamidy ve mikoplazma türlerine etkili geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Gram-negatif bakterilere dış duvardaki porin kanallarından pasif difüzyonla girer. Protein sentezi yapmakta olan 70S ribozomun 30S alt ünitesinde yeni tRNA (taşıyıcı ribonükleik asit) molekülünün yerleşeceği bölge ile birleşir. Bunun sonucu tRNA ribozomdaki yerini alamaz, tRNA'nın getirdiği aminoasit sentezlenen polipeptide bağlanmaz ve protein sentezi duraklar. Tetrasiklinler terapötik konsantrasyonlarda bakteriyostatiktirler (63).

Aerob gram-pozitif, gram-negatif ve anaerob patojenlere karşı etkinlik gösteren tigesiklin, karbapenemaz üreten Acinetobacter suşlarına karşı etkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda tetrasiklin direnç genlerini taşıyan birçok bakterinin tigesikline duyarlı olduğu gösterilmiştir. Yapılan klinik çalışmalarda komplike deri, yumuşak doku enfeksiyonları ve komplike intraabdominal

enfeksiyonlarda tigesiklin monoterapisi etkili bulunmuştur. İdrarla (%32) atılımı düşük olduğu için üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılması önerilmemektedir (64, 65)

Bakterilerde tetrasiklinlere dirençte, sitoplazmik membrandaki proteinler ile ilacın enerjiye bağlı olarak hücre dışına pompalanması, enzimatik olarak tetrasiklinin inaktive edilmesi, rRNA (ribozomal ribonükleik asit)'daki mutasyonlar ve ribozomun sitozolik proteinlerle korunması rol oynar (66).

Kinolonlar: DNA sentezini direkt olarak inhibe eden tek antimikrobiyal gruptur. Kinolonlar bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan DNA-giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV enzimleri ile etkileşime girer, DNA'nın replikasyonu ve RNA-polimeraz enziminin DNA'ya bağlanarak mRNA oluşturması engellenir, sonuçta da 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 bir ajandır. Fakat günümüzde dirençli kökenler ön plandadır (67).

Florokinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerindeki mutasyonlara, geçirgenlikte azalmaya veya antibiyotiğin aktif atımına bağlı olabilmektedir (67).

Kolistin: Polimiksinler kimyasal olarak beş farklı bileşiği içeren (polimiksin A-E) polipeptid antibiyotiklerdir. Klinik pratikte sadece polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmıştır (68). Kolistinin hedefi bakteri hücre membranıdır. Katyonik bir peptid olan kolistin ile gram-negatif bakterilerin dış membranındaki anyonik lipopolisakkarit (LPS) molekülleri elektrostatik ilişkiye girerler ve hücre membranında düzensizliğe yol açarlar. 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 (69).

Son yıllarda çoğul ilaca dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*

bakterilerinin neden olduğu enfeksiyonlarda ve özellikle de kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin kullanılmaktadır (68).

Sülfonamidler ve trimetoprim: Bakteriler folik asidi memeliler gibi dışardan alamadıklarından, kendileri para-aminobenzoik asit (PABA)'ten sentezlerler. Sülfonamidler, PABA analoglarıdır (antimetaboliti) ve dihidropteroat sentetaz enzimi için onunla yarışarak folik asid sentezine girerler ve folik asid sentezini inhibe ederler. Sonuçta bakterilerde RNA ve DNA sentezi bozular. Bakteriyostatik etkilidirler. Trimetoprim, bu sentez yolağı üzerinde dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder. Sülfonamid+trimetoprim kombinasyonu, folik asid sentez yolağında ardışık inhibisyonla bakterisid etki yapar (70).

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 (71).

Bakteriler tarafından aşırı dihidrofolat redüktaz enzimi sentezlenmesi, trimetoprime geçirgenliğinin kaybı ve plazmid veya transpozonlarda bulunan genler tarafından trimetoprime dirençli yeni bir dihidrofolat redüktaz enzimi sentezlenmesi trimetoprim direncine neden olabilmektedir (71).

A. baumannii izolatları trimetoprim-sülfametoksazole karşı yüksek düzeyde direnç göstermektedirler, ancak bu direncin genetik temeli çok az bilinmektedir. Trimetoprim direncinden, plazmid DNA'sı tarafından taşınan *dhfr* geninin kodladığı dihidrofolat redüktaz enziminin sorumlu olduğu bildirilmiştir (72).

2.2.8. Acinetobacter Türlerinde Karbapenemlere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmalarını Belirleme Yöntemleri

Karbapenemazların identifikasyonu için çeşitli fenotipik yöntemler geliştirilmiştir ve bu testler bu enzimlerin spesifik inhibitörleri kullanılarak belirlenebilmektedir. Fenotipik testlerin klinik laboratuvarlarda rutin olarak hızlı ve doğru olarak uygulanması klinik ve epidemiyolojik açıdan önemlidir.

Oksasilinaz enzimlerini tespit eden güvenilirliği onaylanmış ve

standardize edilmiş fenotipik bir test günümüze kadar geliştirilememiştir. Bu enzimler ancak genotipik yöntemler kullanılarak tespit edilebilmektedir (73).

MBL enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Ama bugüne kadar bakterilerin MBL direnç geni taşıdığını tesbit eden standart fenotipik yöntemler ortaya konulamamıştır (74). MBL enzimleri aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn^{+2} iyonu bulunan enzimlerdir ve metal şelatörü olan EDTA ya da merkaptopropionik asit (MPA) ile inhibe olurlar. Uygulanan fenotipik yöntemlerin temelini bu inhibisyon oluşturur (75).

Modifiye Hodge test; imipenem duyarlı bir bakterinin MBL üreten bir bakteri ile bir arada bulunduğu imipenem varlığında da üreyebilmesi esasına dayanmaktadır. Bu test penisilinaz üreten *Neisseria gonorrhoeae* tespitinde kullanılan Hodge testinin MBL üretimini göstermek için *Staphylococcus aureus* ATCC (The American Type Culture Collection) 25923 yerine *E. coli* ATCC 25922, penisilin diski yerine de imipenem diski kullanılması ile modifiye edilmiştir (40, 76).

Kombine disk testi; plak içerisine yerleştirilen 2 imipenem diskinden bir tanesine EDTA eklendikten sonraki inhibisyon zon çapı farkına göre değerlendirilmenin yapıldığı testtir. EDTA solüsyonunun eklendiği imipenem-EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm ise bakteri MBL pozitif kabul edilmektedir. Kombine disk difüzyon testinde imipenem-EDTA kombinasyonu dışında 2-MPA ile kombinasyonu da kullanılabilir (77, 78).

Çift disk sinerji testinde; imipenem ve seftazidim diski ve bu disklerin merkezinden 10mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirilir. Boş disk üzerine EDTA veya MPA eklendikten sonra imipenem ve seftazidim diski inhibisyon zonunun EDTA veya MPA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilir (79,80).

MBL E Test yöntemi; test stribinin bir tarafında imipenem (IMP) diğer tarafında imipenem ve EDTA bulunmaktadır. IMP\IMP-EDTA MİK (Minimal inhibitör konsantrasyon) oranlarının 8 kat azalması ya da fantom zonunun görülmesi MBL pozitifliği olarak değerlendirilir (77). MİK değerlendirmek için E

test striplerinden başka M.I.C. Evaluator striplerde (Oxoid, İngiltere) kullanılabilir.

Mikrodilüsyon testi; imipenem MİK değeri mikrodilüsyon yöntemi ile ölçülür, sonra metal şelatörleri eklenerek tekrar MİK değerine bakılır, 8 kat azalma MBL pozitif olarak değerlendirilir (79).

MBL tesbitinde kullanılan genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksektir (49).

Karbapenemazların tespit edilmesinde kullanılan PZR yöntemi ile; bakterinin karbapenemaz geni taşıyıp taşımadığını ve enzim tipini saptamak olasıdır. DNA probları kullanılarak da bu direnç genleri tesbit edilebilir (49). Moleküler yöntemlerin altın standardı ise dizi analizi, protein analizi ve klonlama yöntemleridir. Karbapenemazları saptamak için kullanılan diğer testler izoelektrik odaklama yöntemi ve spektrofotometrik yöntemlerdir (81).

2.3. Tiplendirme Yöntemleri

Tiplendirme yöntemleri başlıca; hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların belirlenmesi, dirençli suşların tanımlanması ve yaygınlığının belirlenmesi, enfeksiyon etkenlerinin yayılımının belirlenmesi, salgın araştırmalarında epidemik suşların kaynağı ile yayılım yolunun belirlenmesi ve hastalardaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konulması gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemi bulunmaktadır (4).

2.3.1. Fenotipik Yöntemler

Bakterilerin identifikasyonunda anahtar olabilecek fenotipik özellikler belirlenmiştir. Fenotipik yöntemler genetik özellikleri yansıtır ve genellikle bakterilere spesifiktir. Buna göre identifikasyon işlemleri yapılır. Bir fenotip bir patojen kökende ender olarak bulunuyorsa, bu fenotip tek başına kökenin yayılma yolu hakkında fikir verebilir. Ancak her zaman görülebilen fenotipik özelliklere sahip kökenler saptandığında ek olarak alt tiplendirme yapılmalıdır. Fenotiplendirme için sıklıkla kullanılan yöntemler arasında; antimikrobiyal

maddelere duyarlılık, serotiplendirme, faj ve bakteriyosin tiplendirme, protein elektroforezleri, biyokimyasal özelliklerine göre yapılan biyotiplendirme sayılabilir (4, 82).

Antibiyotipleme; izolatların benzerliklerine göre gruplandırmak ve direnç gelişimini tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Genellikle MİK ve disk difüzyon zon değerleri kullanılmaktadır. Tiplendirme için antibiyogram sonuçlarının diğer yöntemlerle ve epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bazen benzer olmayan suşlar aynı antibiyogram profilini gösterirken, bazen de enfeksiyon atakları sırasında duyarlılık profilleri değişmektedir (4, 83).

Serotipleme; bazı çalışmalarda suşların serotiplemesi ile salgınlar tanımlanmıştır. Fakat serotiplemenin DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri ile desteklenmesi gerekmektedir (4,84). Bu sistem hastane kaynaklı salgın çalışmaları için umut vericidir fakat yoğun emek gerektirmektedir (85).

Faj tiplleme; Fransa ve diğer Avrupa ülkelerinde *Acinetobacter* izolatlarının farklı epidemiyolojik çalışmalarında görülen faj tipleri (17 ve 124 numaralı faj) salgın suşu olarak izole edilmiştir. Zaman alıcı olmasına rağmen diğer yöntemlerle birlikte çalışıldığında kullanışlı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (4).

Bakteriosin tiplemesi; DNA-DNA hibridizasyon tekniği ile birlikte çalışıldığında klinik olarak önemli *Acinetobacter* suşlarının tiplendirilmesinde yararlı bir tiplendirme yöntemi olmaktadır (4).

Protein profilleri; *Acinetobacter* türleri ile ilgili epidemiyolojik ve taksonomik çalışmalarda hem hücre duvarı proteini hem de tüm hücre proteinleri kullanılmıştır (4). Bu yöntem hastane salgınlarında ve endemik ataklarda başarı ile uygulanabilmektedir. Tüm hücre proteinlerinin elektroforetik analizi örnek hazırlama aşamasında hücre duvarı proteinlerine kıyasla daha basit olması nedeniyle avantajlı bulunmuştur (86).

Biyotipleme; bakteri tür ayrımı sağlar. *Acinetobacter*lerin tür ayrımında glukozdan asit oluşumu, jelatin hidrolizi, karbon kaynağı levulinate, sitrakonate,

L-fenilalanin, fenil asetat, 4-hidroksi benzoat, L-tartaratın kullanımı, değişik ısılarda üreme özelliği (37°C, 41°C, 44°C) gibi biyokimyasal özellikler kullanılmaktadır (13, 22). Acinetobacterlerde karbon asimilasyon testlerine dayanan API 20 NE (bioMerieux, Fransa) ticari sistemi ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır. API 20 NE beş tür (*A. baumannii-calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. Iwoffii*, *A. junii*, *A. johnsonii*) tanımlayabilirken Biolog GN2 Sistem (Biolog, Hayward ABD) 15 tür tanımlayabilmektedir. Bu testlerin duyarlılık ve tekrarlanabilirliğinde problemler yaşanmakta, ayırt etme yeteneği yetersiz bulunmaktadır (4). Otomatize sistemlerde grup 1, 2, 3 ve 13TU genomik türleri benzerliklerinden dolayı *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks olarak tanımlanmakta, alt tiplendirme için 44°C'de üreme varlığı araştırılıp, üreme olduğunda bakteri *A. baumannii* olarak tanımlanabilmektedir (22). 2009 yılında yapılan bir çalışmada, VITEK2 otomatize sistem (bioMerieux, Fransa) ile Acinetobacter izolatlarının %75'inin tür düzeyinde yanlış tanımlandığı tespit edilmiştir. Doğru tanımlama için genotipik yöntemler önerilmektedir (16, 87).

2.3.2. Genotipik Yöntemler

Bakteri plazmidlerinin veya kromozomal DNA'nın genotiplendirmesi, fenotiplendirme yöntemlerindeki olumsuzlukları ortadan kaldırıp, epidemiyolojik araştırmalarda daha güvenilir veriler sağlamıştır. Farklı tiplerin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler, DNA dizisindeki farklılıkların saptanmasına dayanır. Yöntem seçiminde ayırıcı güç, üstün bir tekrarlanabilirlik özelliği, uygulama ve sonuçları değerlendirmedeki karmaşıklıkların dikkate alınmasının yanında, maliyet ve laboratuvarın yöntemi uygulayabilme kapasitesi de büyük önem taşır. Genotiplendirme yöntemleri fenotiplendirmeye göre; tiplendirebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırıcı güç yönünden daha üstündür (82, 88).

Plazmid profili; epidemiyolojik yönden incelenecek kökenlerin plazmidlerinin ayrılarak, agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmesine dayanan bu yöntem kolay, hızlı ve tekrarlanabilir olma özelliğine sahiptir. Plazmidler, bakteri türleri ve hatta cinsleri arasında başta konjugasyon olmak üzere birçok mekanizma ile nakledilebildiğinden, hastanelerdeki epidemiler bazen tek

kökenin yayılması ile değil, bir plazmidin yayılması ile ortaya çıkar. Epidemik kökenin plazmid taşınamaması, birçok plazmidin kolayca kaybedilmesi veya kazanılabilmesi ve birer ekstrakromozomal element olduklarından doğal olarak bakterinin genotipini yansıtmaması bu yöntemin olumsuz yönlerini oluşturur. Diğer türlerde plazmid saptanmaz iken *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks türünde 1-4 adet plazmid bulunmuştur (4).

Ribotiplendirme; rRNA genleri evrim boyunca en fazla korunan genlerdir ve teorik olarak tüm bakterilerde bulunmaktadır. Bakteri DNA'sı *E. coli* rRNA'sından üretilmiş prob ile reaksiyona girmektedir. Bakteriyel kromozom birkaç kopya rRNA içermektedir ve sadece rRNA gen sekansını içeren kromozom varlığında prob ile hibridizasyon mümkün olmaktadır. Hibridizasyon sırasında oluşan bantların analizine dayalı olarak bakteriler gruplandırılmaktadır. Bu yöntem *Acinetobacter* için ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. Safılaştırılmış DNA restriksiyon enzimleri ile kesilip, elektroforez ile DNA parçaları ayrıştırıldıktan sonra *E. coli* rRNA'sından rekombinasyonla elde edilen işaretli cDNA (tamamlayıcı deoksi ribonükleik asit) ile hibridizasyon uygulanmaktadır. Yöntemin tekrarlanılabilirliği oldukça iyi bulunmuştur. Ribozomal gen modellerinin bir tür içinde nispeten stabil halde bulunması, epidemiyolojik kökenleri birbirinden ayırmada yöntemin gücünü bir dereceye kadar azaltır. Ribotiplendirme diğer tip metodlarla kombine edilerek kullanıldığında değerli epidemiyolojik bilgiler sağlanabilir (4, 83).

Pulsed field gel elektroforezi (PFGE); yüksek oranda tekrarlanabilirlik özelliğinden dolayı, birçok araştırmacı tarafından moleküler yöntemler içinde altın standart olarak kabul edilmiştir. Bu yöntemle DNA molekülleri belirli zaman aralıklarında birbirlerine farklı açıda elektriksel alanların etkisinde bırakılmaktadır. DNA molekülünün yönünü değiştirmek için uygulanacak elektriksel akımın zamanı molekülün büyüklüğüne bağlı olmaktadır. DNA molekülleri bir elektriksel akıma uygun hareket ederken kısa bir süre sonra diğer akıma uygunluk göstermek zorunda kalmaktadırlar. Böylece yaklaşık beş megabaz büyüklüğüne kadar DNA parçalarının ayırımına izin vermektedir Bu yöntemle çeşitli büyüklükteki DNA fragmanlarını ayrı ayrı görebilmek mümkün

olmaktadır. Bakteriyel DNA'nın genomik düzeyde gösterilmesindeki işlemler sırasında büyük DNA moleküllerinin parçalanması nedeniyle uygun kromozomal DNA fragmanlarının hazırlanması zor olmakta ve sonuçta gözlenemeyecek kadar küçük ve çok sayıda DNA fragmanı elde edilmektedir. Bu nedenlerle; PFGE yönteminde bakteri agaroz içine gömülerek in situ lizis sonucunda tek, uzun kromozomal DNA hazırlanıp, restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmektedir. Oluşan büyük DNA parçaları PFGE ile agaroz jelde yürütülmektedir. Böylece total genomik DNA farklı elektroforetik hareketlerle değişik sayıda restriksiyon fragmanlarına ayrılmaktadır (88, 89)

Acinetobacter kökenlerinin DNA'sı izole edildikten sonra Apal, SmaI ve NheI restriksiyon enzimleri ile parçalanması sonucu oluşan DNA parçalarının uzunluk polimorfizmi gösterilmektedir. Bu yöntem, *A. baumannii* için salgınlarda veya bir hastanın izole edilen farklı kökenlerin tiplendirilmesinde yararlı bir metottur. Dezavantajı, pahalı ve uzun süreye ihtiyaç duyulmasıdır. PFGE oldukça ayırt edici ve epidemiyolojik çalışmalar için çok yararlı bir metottur (4, 88, 89, 90).

Southern blotting ve restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP); gen belirleme için tam kromozomal DNA bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve parçalar agaroz jel içinde elektroforez ile ayrılır. Parçalar, agaroz jelden nitroselüloza veya naylon membrana geçirilir. Membrana bağlı nükleik asit daha sonra bir veya daha çok işaretli ve incelenen gen ile homolog olan prob ile hibridize edilir. Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizm analizinde sadece problarla hibridize olan DNA parçaları görülür hale geldiği için sonuçların analizi de büyük ölçüde kolaylaşmıştır (82, 91).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli yöntemler; 50–2000 baz çiftli DNA veya RNA'nın tek zincirinin bir yarı otomatik sistem içinde birkaç saatte primerler kullanılarak bir milyondan fazla kat çoğalmasını sağlayan üç basit reaksiyonun bir döngü halinde tekrarlanmasıdır. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek ve hızlı bir yöntem olması, mikroorganizmaların ve ürünlerin direkt olarak tiplendirilmesi yararlı özellikleridir. Buna karşın, kontaminan DNA'nın amplifikasyonuna ya da epidemi ile ilgisi bulunmayan mikroorganizmaların çok

benzer nükleik asit sıralarının tanımlanmasına bağlı olarak yanlış pozitif sonuç vermesi, primerlerin sadece hedeflenen nükleik asit sırasını tanımlaması da, epidemiyolojik araştırmalarda PZR'nin güvenilirliğini azaltan başlıca olumsuz özelliklerdir (82, 88, 91).

A. *baumanni*'nin tiplendirilmesinde kullanılan Arbitrarily Primed Amplification (AP)-PZR yönteminde hedefe bağlı kalınmadan, rastgele seğilmiş, kısa primerler kullanılarak, agaroz jel elektroforezinde farklı bant profilleri oluşturabilecek, değişik uzunluklarda DNA amplifikasyon ürünleri elde edilmektedir. Uygulama kolaylığı, kısa sürede sonuç verebilme özellikleri ve nispeten ucuz olmalarından dolayı yaygın kullanım alanı bulan bu yöntemlerin en önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır. Ayrım gücü primerlerin baz dizilimi ve amplifikasyon koşullarına göre değişmektedir. Patern farklılığının yorumlanmasında kabul görmüş bir kural yoktur. Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik oranı yüksek değildir. Bu sorunları gidermek için kullanılan hedef DNA ekstraksiyon protokolü, DNA konsantrasyonu, primerlerin baz dizilimi ve konsantrasyonu, MgCl₂ konsantrasyonu, tampon ve Taq DNA polimeraz enziminin çalışma süresince sabit tutulması gerekmektedir. Laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamak için, M13 olarak bilinen üniversal primerin kullanılması; sonuçların güvenilirliğini arttırmak için standardize edilmiş amplifikasyon karışımı, aynı ısı döngü cihazında (thermalcycler) standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanmalıdır (88, 91).

A. *baumanni*'nin tiplendirilmesinde ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)-PZR, REP (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Based Metod)-PZR, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis), RAPD (random amplified polymorphic DNA) yöntemleride alternatif yaklaşımlar olarak kullanılmaktadır (18, 92).

DNA dizi analizi ya da sekanslama; gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlar. DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu

hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. DNA hibridizasyonu sonrası çift zincirli DNA tek zincirli hale getirilmek üzere denatüre edilir ve sonra işaretlenmiş komplementer tek zincirli DNA probuna bağlanma oranını belirlemek için ölçüm yapılır (88).

Birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem;

1- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (93)

2- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi. (94)

Otomatik analizde de Sanger' in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılır. Bu yöntem DNA polimerazların dNTP'ler yanında deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de kullanmaları esasına dayanır. Sentezlenen DNA iplikçğine dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde zincir uzaması durmaktadır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. DNA dizi analizi cihazlarında altı bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir DNA dizi analizi maliyeti pahalı ve sonuçların yorumlanması yönünden en zor yöntemdir (88).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2011-114 numaralı proje ile destek sağlanarak Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜ-SUAM) Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, Aralık 2008 – Kasım 2011 tarihleri arasında izole edilen *A. baumannii* suşları ile gerçekleştirildi.

3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Kimyasallar ve Ayıraçların Hazırlanması

3.1.1. Besiyerleri:

Eosin Methylene Blue(EMB), 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 (Becton Dickinson and Company ABD)'den 22 gr alınarak, hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda (Wisd WiseStir MSH-20D Almanya) eritildikten sonra deney tüplerine 2'şer ml dağıtıldı. Otoklavda (Hırayama, 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 150 ml'ye tamamlanıp 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.

Lurian-Bertani (LB) buyyon: Toz LB (Becton Dickinson and Company ABD)'den 25 gr alınarak hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı.

3.1.2. Kimyasallar ve Ayıraçlar

Katalaz ayıracı: 2 ml hidrojen peroksit (H₂O₂) (Sigma ABD), 8 ml distile su ile karıştırılarak %3'lük H₂O₂ hazırlandı.

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

DNaz miyarı: 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.

EDTA solüsyonu: 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için; 186,1 g disodium EDTA.2H₂O (Sigma ABD) 1000 ml distile suda çözüldü ve NaOH (Merck Almanya) kullanılarak pH 8,0'e ayarlandı.

0,5 McFarland bulanıklık tüpü: 2012 Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standarts Institute-CLSI) önerilerine göre hazırlandı (95).

5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu: 54 gr trisbase (Sigma ABD), 27,5 gr borik asit (Sigma ABD), 900 ml distile karıştırılıp manyetik karıştırıcıda eritildi. 20 ml 0,5 M EDTA solüsyonundan karıştırılıp son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

3.2. Örneklerin Toplanması

Çalışmada ÇOMÜ SUAM'da yatan hastaların kültürlerinden HE etkeni olarak 2009–2011 tarihleri arasında izole edilen, karbapenemlerde dahil olmak üzere çoğul ilaca dirençli *A. baumannii* kökenleri kullanıldı. Aynı hastaya ait birden fazla klinik örnekte *A. baumannii* üremesi olan hastaların izolatlarının antibiyotik duyarlılık paternleri incelenerek, iki hasta dışında her hastadan bir tane izolat çalışmaya dahil edildi.

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 ATCC *A. baumannii* 19606 suşu çalışma anında iki kez EMB agara pasajlandı ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde (Memmert 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 reaktifi %3 H₂O₂ damlatılıp, üzerine steril öze ile alınan koloni karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif, görülmemesi ise negatif olarak değerlendirildi (96).

3.3.2. Oksidaz testi: Hazırlanan Kovacs ayırıcı kurutma kağıdına damlatıldı. Koloniden alınıp ayıraçlı kağıda sürüldüğünde 10 saniye içinde mor rengin oluşması pozitif olarak, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi (96).

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 miyarı döküldü. Koloni çevresinde HCl ve DNA birleşmesi sonucu presipitasyon gözleendiğinde (besiyeri matlaştığında) DNaz negatif olarak yorumlandı (97).

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 (97).

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 gözleendi (97).

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 (97).

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 (97).

3.3.8. 44°C'de üreme:

BHI buyyonunda bir gece 37°C'de üretilmiş bakteri süspansiyonundan 5 ml, aynı besiyerini içeren tüpe bir damla damlatıldıktan sonra tüp 44°C'lik su banyosuna konuldu, 24 ve 48 saat sonra üremeleri değerlendirildi (97).

3.4. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin ve ATCC *A. baumannii* 19606 suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi; karbapenemler hariç Mueller Hinton agar ve standart antibiyotik diskleri (Oxoid İngiltere) kullanılarak CLSI'ya göre disk

difüzyon test yöntemiyle, karbapenemler ise MHA ve M.I.C.Evaluator stripleri (Oxoid İngiltere) kullanılarak üreticisinin önerilerine göre yapıлып, yorumlandı. Kalite kontrol kökeni olarak *P. aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı (95).

3.4.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotik diskleri şunlardır: Ampisilin-sulbaktam (SAM, 10/10µg), piperasilin (PRL, 100µg), piperasilin-tazobaktam (TZP, 100/10µg), tikarsilin (TİC, 75µg), tikarsilin-klavulanik asit (TIM, 85µg), seftazidim (CAZ, 30µg), seftriakson (CRO, 30µg), sefepim (FEP, 30µg), gentamisin (GN, 10µg), amikasin (AK, 30µg), tobramisin (TOB, 10µg), netilmisin (NET, 30µg), siprofloksasin (CIP, 5µg), levofloksasin (LEV, 5µg), tetrasiklin (TET, 30µg), doksisiklin (DO, 30µg), minosiklin (MİN, 30µg), kolistin (COL, 10µg), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT, 1.25/23.75µg), polimiksin B (PB, 300µg).

Bakteri suşlarının yoğunluğu 0,5 Mc Farland bulanıklığında olacak şekilde MHB'ta süspansiyon edildi ve bir eküvyon yardımı ile MHA yüzeyine ekim yapıldı. Plaklar 3-5 dakika kuruduktan sonra üzerine duyarlılıkları incelenecek olan antibiyotik diskleri merkezden merkeze en az 24 mm arayla yerleştirildi. 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Zon çapları kumpas yardımıyla ölçülerek, netilmisin, kolistin ve polimiksin B dışındaki antibiyotikler CLSI kriterlerine göre, netilmisin ise EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi (95, 98). Kolistin ve polimiksin B için CLSI ve EUCAST kriterlerinde *Acinetobacter spp.* için değerlendirmede kullanılan zon çapı bulunmadığı için bu antibiyotikleri değerlendirmede CLSI kriterlerine göre *P. aeruginosa*'da kullanılan zon çapları kullanılmıştır (95). Çalışmamızda değerlendirmede kullanılan sınır değerler Tablo 3.1'de gösterilmektedir

Tablo 3.1. Disk difüzyon testinin yorumlanmasında kullanılan zon çapları (mm)
(95, 98)

Antibiyotik	Dirençli	Orta Duyarlı	Duyarlı
Ampisilin-sulbaktam	≤ 11	12-14	≥ 15
Piperasilin	≤ 17	18-20	≥ 21
Piperasilin-tazobaktam	≤ 17	18-20	≥ 21
Tikarsilin	≤ 14	15-19	≥ 20
Tikarsilin-klavulanik asit	≤ 14	15-19	≥ 20
Seftazidim	≤ 14	15-17	≥ 18
Seftriakson	≤ 13	14-20	≥ 21
Sefepim	≤ 14	15-17	≥ 18
Amikasin	≤ 14	15-16	≥ 17
Gentamisin	≤ 12	13-14	≥ 15
Tobramisin	≤ 12	13-14	≥ 15
Netilmisin *	< 15	-	≥ 15
Siprofloksasin	≤ 15	16-20	≥ 21
Levofloksasin	≤ 13	14-16	≥ 17
Tetrasiklin	≤ 11	12-14	≥ 15
Doksisiklin	≤ 9	10-12	≥ 13
Minosiklin	≤ 12	13-15	≥ 16
Kolistin **	≤ 10	-	≥ 11
Trimetoprim-Sulfametoksazol	≤ 10	11-15	≥ 16
Polimiksin B **	≤ 11	-	≥ 12

*EUCAST'a (98) göre yorumlandı.

**CLSI'daki (95) *P. aeruginosa* zon çaplarına göre yorumlandı.

3.4.2. MİK değerlendirme

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 (95). Testin değerlendirilmesinde kullanılan sınır değerler Tablo 3.2'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. MİK testinin yorumlanmasında sınır değerler (µg/ml) (95)

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

3.5. MBL Varlığının Araştırılması

3.5.1. Çift Disk Sinerji Yöntemi:

Bu yöntemde imipenem, seftazidim ve boş antibiyotik diskleri ile EDTA solüsyonu kullanıldı.

1- Bakteriler 0.5 Mc Farland bulanıklığına göre ayarlanıp MHA'a yayıldı.

2- 10 µg imipenem diski, 30 µg seftazidim diski ve bu disklere uzaklığı 10mm mesafe olacak şekilde boş disk MHA'a yerleştirildi.

3- Daha önce hazırlanan 0.5 M EDTA solüsyonundan boş disk üzerine 10µl eklendi. Petriler 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve sonuçlar değerlendirildi.

İnkübasyon sonrası imipenem-EDTA ve seftazidim-EDTA arasındaki küçük bir sinerjistik inhibisyon zonunun bile bulunması MBL varlığı açısından pozitif olarak değerlendirildi (99, 100).

3.5.2. Modifiye Hodge Testi:

1- Önce MHA'a yoğunluğu 0.5 Mc Farland bulanıklığına eşdeğer olarak ayarlanmış olan imipeneme duyarlı *E. coli* ATCC 25922 kökeni indikatör mikroorganizma olarak steril eküvyon ile yayıldı.

2- Petri kurutulduktan sonra 10 µg imipenem diski petrinin ortasına yerleştirildi.

3- Her petride dört kökene bakılabilecek şekilde denenecek olan *Acinetobacter* suşları disk kenarından periferine doğru düz çizgi şeklinde ekildi.

4- Petriler bir gece etüvde inkübe edildi ve değerlendirildi.

İnkübasyon sonrasında *E. coli*'ye ait inhibisyon zonunda yonca yaprağı şeklinde görülen bozulma MBL üretimi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (99, 100).

3.6. Moleküler Yöntemler

A. baumannii izolatlarında ve ATCC *A. baumannii* 19606 suşunda DNA, GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas İngiltere) kullanılarak firmanın talimatları doğrultusunda izole edildi. Suşlar arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koymak için M13 ve DAF4 primerleri kullanılarak AP-PZR yapıldı, suşlarda karbapenemaz enzimlerinden oksasilinaz ve MBL'lerin varlığı multipleks PZR ile araştırıldı. Pozitif bulunan enzimler için sekanslama yapıldı. Ayrıca plazmid kaynaklı karbapenemaz enzim varlığını araştırmak için GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (Fermentas İngiltere) ile plazmid araştırıldı.

3.6.1. DNA ekstraksiyonu: Çalışmada GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Lot No: 00092519, Cat No: K0721) kullanıldı. TSİ agarda üreyen *A. baumannii* kolonileri, 1,5 ml LB broth bulunan 2 ml 'lik mikrosantrifüj

tüpünde 2×10^9 (7 Mc Farland bulanıklığı) bakteri olacak şekilde süspanse edildi, 10 dk 5000 g'de santrifüj (Eppendorf Almanya) yapıldı ve süpernatant atıldı.

Yıkama solüsyonları için çalışma öncesi hazırlık: Yıkama solüsyonlarından 10'ar ml alınarak 30 ml %100 alkol ile karıştırıldı.

1- Oluşan pellet 180 µl digestion solüsyonu ile resüspanse edildi.

2- 20 µl proteinaz K solusyonu eklenip, vorteksle iyice karıştırıldı.

3- 56°C'de karıştırıcı su banyosunda hücreler tamamen eriyene kadar yaklaşık 30 dk bekletildi.

4- 20 µl RNaz solusyonu eklenip, vorteksle ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.

5- 200 µl lizis solüsyonu eklendi. Vorteksle homojen bir karışım elde edinceye kadar, yaklaşık 15 sn karıştırıldı.

6- 400 µl %50 lik etanol eklendi ve vorteksle karıştırıldı.

7- Hazırlanan karışım koleksiyon tüp içine alınmış olan GeneJet Genomic DNA Purification kolona aktarıldı.

8- Kolon 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

9- İçinde sıvı bulunan koleksiyon tüpü atılıp, purifikasyon kolonu yeni 2 ml'lik koleksiyon tüp içine alındı.

10- 500 µl yıkama solüsyonu 1 (%100'lük etanol eklenmiş olan) eklendi.

11- 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı atılıp, purifikasyon kolonu aynı koleksiyon tüpüne konuldu.

12- Purifikasyon kolonuna 500 µl yıkama solüsyonu 2 (%100'lük etanol eklenmiş olan) eklendi.

13- 13000 g'de 3 dk santrifüj edildi.

14- Purifikasyon kolonunda kalan sıvıyı atmak için koleksiyon tüpü boşaltılıp, 13000 g'de 1 dk tekrar santrifüj edildi.

15- Koleksiyon tüpü atıldı, purifikasyon kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.

16- Purifikasyon kolonun merkezine 200 µl yıkama solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilip, 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

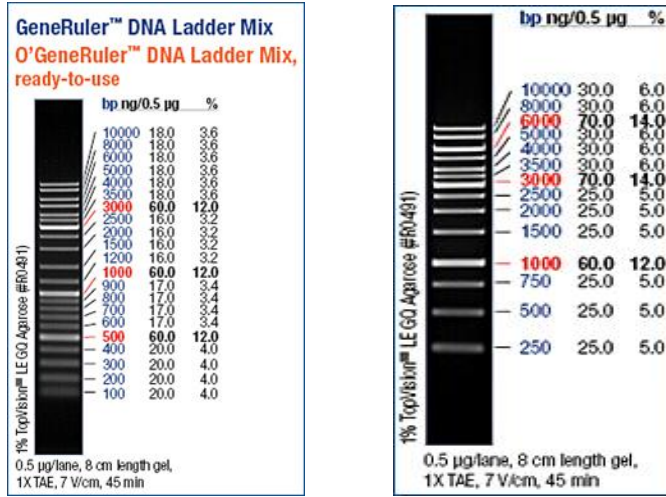
17- DNA veriminin yüksek olması için yıkama aşaması 200 µl yıkama solüsyonu ile tekrarlandı.

18- Purifikasyon kolonu atıldı.

19- Tüpteki sıvıda ekstrakte edilmiş DNA kaldı.

Elde edilen DNA çalışmada kullanılana kadar -20°C'ye kaldırıldı.

3.6.2. PZR bazlı tiplleme (AP-PZR): PZR karışımı son çalışma hacmi 25 µl olacak şekilde ayarlandı. Son içerikleri; 1X tampon solüsyonu, 25 pM M 13 primeri (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), 1.5 mM MgCl₂, dATP, dGTP, dCTP, dTTP nin her birinden 400 µM, 1 U Taq DNA polimeraz olacak şekilde steril bidistile suya eklenip karışım oluşturuldu. Son olarak 2 µl DNA ekstraktı eklendi. DAF4 (DNA amplification fingerprinting) primerinden (5'-CGGCAGCGCC-3') 25pM kullanılarak aynı karışım hazırlandı. Isı döngü cihazında (Eppendorf Almanya); M13 primeri için amplifikasyon programı: 94°C'de 2 dk, 35 siklus 94°C'de 20 sn, 50°C'de 1dk ve 72°C'de 20 sn, son olarakta 72°C'de 5 dk olacak şekilde uygulandı. DAF4 primeri için amplifikasyon programı: 94°C'de 2 dk, 45 siklus 94°C'de 40 sn, 45°C'de 40sn ve 72°C'de 40sn, son olarakta 5 dk 72°C'de olacak şekilde uygulandı. Elde edilen PZR ürünü %1'lik agoroz jelde 100 V akım uygulanarak 45 dk elektroforezde (Wealtec ABD) yürütüldü, UV lamba ile incelenerek görüntü fotoğraflandı. Oluşan bantlara göre izolatlar arası farklı paternler değerlendirildi (101, 102). Görüntüleme 80-10.000 bp DNA ladder (Fermentas, İngiltere, Lot no: 00091136) ve 1 kb DNA ladder (Fermentas, İngiltere, Lot no: 00092189) kullanıldı (Şekil 3.1). Pozitif kontrol olarak ATCC *A. baumannii* 19606, negatif kontrol olarak steril deiyonize su kullanıldı.



Şekil 3.1. 80-10.000 bp DNA ladder (sol), 1 kb DNA ladder (sağ)

3.6.3. Karbapenemaz genlerinin araştırılması (Multipleks PZR):

Karbapenemaz enzimlerinin araştırılması amacıyla Tablo 3.3'teki primer çiftleri ile OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 ilk grup, IMP, VIM, SIM ve SPM ikinci grup olacak şekilde multipleks PZR yapıldı. Son çalışma hacmi 25 µl olacak şekilde ayarlandı. Son içerikleri; 1X tampon solüsyonu, her primerden 12.5 pM, MgCl₂ 1.5 mM, dATP, dGTP, dCTP, dTTP nin her birinden 200 µM, 1.5 U Taq DNA polimeraz olacak şekilde steril bidistile suya eklenip karışım oluşturuldu. Son olarak 3 µl DNA ekstraktı eklendi. Isı döngü cihazında; amplifikasyon programı: 94°C'de 3 dk., 35 siklus 94°C'de 45 sn, 57°C'de 45 sn ve 72°C'de 1 dk, son olarakta 72°C'de 5 dk olacak şekilde uygulandı. Elde edilen PZR ürünü %1 lik agoroz jelde 100 V akım uygulanarak 45 dk yürütüldü, UV lamba ile incelenerek, görüntü fotoğraflandı. Oluşan bantlara göre gen varlığı araştırıldı (103, 104). Görüntüleme 80-10.000 bp DNA ladder (Fermentas, İngiltere, Lot no: 00091136) ve 1 kb DNA ladder (Fermentas, İngiltere, Lot no: 00092189) kullanıldı (Şekil 3.1). Pozitif kontrol olarak ATCC *A. baumannii* 19606, negatif kontrol olarak steril deiyonize su kullanıldı.

Tablo 3.3. Karbapenemaz aranmasında kullanılan primer çiftleri (52, 105).

OXA-23-likeF	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3'
OXA-23-likeR	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'
OXA-24-likeF	: 5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'
OXA-24-likeR:	5'- AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'
OXA-51-likeF:	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'
OXA-51-likeR:	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'
OXA-58-likeF	: 5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'
OXA-58-likeR	5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'
IMP1-F	5'-CTA CCG CAG CAG AGT CTT TGC-3'
IMP1-R	5'-GAA CaA CCA GTT TTG CCT TAC C-3'
SPM-F	5'-CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC-3'
SPM-R	5'-TCG CCG TGC CAG GTA TAA C-3'
VIM-F	5'-TCT ACA TGA CCG CGT CTG TC-3'
VIM-R	5'-TGT GCT TTGA CAA CGT TCG C-3'
SIM-R	5'-GTA CAA GGG ATT CGG CAT CG-3'
SIM-F	5'-TGG CCT GTT CCC ATG TGA G-3'

3.6.4. Sekanslama: Sekanslama için beş suşta ayrıca PZR yapıldı ve dizi analizi için İontek (İstanbul) laboratuvarına gönderildi. Sanger' in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanıldı.

3.6.5. Plazmid ekstraksiyonu: GeneJET Plazmid Miniprep Kiti (Lot No: 00091675, Cat No: K0502) ile çalışıldı. TSİ agarda üreyen *A. baumannii* kolonileri, 10 ml LB broth bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpüne ekildi. Bir gece etüvde inkübe edildikten sonra, 10 dk 5000 g'de santrifüje (Universal Almanya) edildi ve süpernatant atıldı.

Çalışma öncesi hazırlık: 20 ml yıkama solüsyonu ile 35 ml %100 alkol karıştırıldı. Süspansiyon solüsyonu içine RNaz solüsyonu eklendi.

1- Pelletteki hücreler 250 µl resüspaniyon solüsyonu (RNaz solüsyonu eklenmiş olan) ile resüspanse edilip, mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve vortekslendi.

2- 250 µl lizis solusyonu eklendi. Solusyon visköz olana kadar ve sıvı temiz görünene kadar tüp 4-6 kere nazikçe çalkalandı.

3- 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklenip, 4-6 kere nazikçe çalkalandı.

4- 12000 x g'de 5 dk santrifüj edildi.

5- Süpernatant kısmı GeneJet spin kolona pipetle aktarıldı.

6- 1 dk 12000 x g'de santrifüj edildi.

7- Alta geçen sıvı atıldı ve spin kolon aynı tüpe geri konuldu.

8- 500 µl yıkama solusyonu (%96-100lük etanol eklenmiş olan) spin kolona eklendi. 12000 x g'de 30-60 sn santrifüj edildi ve sıvı atıldı. Aynı koleksiyon tüpüne spin kolon geri konuldu.

9- Tekrar 500 µl yıkama solusyonu (%100'lük etanol eklenmiş olan) spin kolona eklenip. 12000 x g'de 30-60 sn santrifüj edildi ve sıvı atıldı. Aynı koleksiyon tüpüne spin kolon geri konuldu.

10- Kalan wash solusyonunu atmak için 1 dk daha santrifüj edildi.

11- Spin kolon yeni, temiz 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.

12- Plazmid DNA'sını saflaştırmak için spin kolonun tam merkezine 50 µl yıkama solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilip, 2 dk 12000 x g'de santrifüj edildi.

13- DNA veriminin yüksek olması için 12.basamak tekrarlandı.

14- Kolon atıldı ve elde edilen plasmid DNA'sı -20 °C'de saklandı.

Plazmid varlığını görmek için elde edilen plazmid DNA'sı %1 lik agoroz jelde 100 V akım uygulanarak 45 dk yürütüldü, UV lamba ile incelenerek, görüntü fotoğraflandı. Görüntüleme 80-10.000 bp DNA ladder kullanıldı (şekil

3.1). Pozitif kontrol olarak laboratuvarımızda hastalardan izole edilen *E. coli* izolatları, negatif kontrol olarak steril deiyonize su kullanıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz:

Elde edilen verilerin analizinde istatistik paket programlarından IBM-SPSS versiyon 19 kullanıldı. Hastaların servisleri ve materyal türü değişkenlerine ait veriler tanımlayıcı istatistiksel analizler kullanılarak sıklık ve yüzde olarak sunuldu.

4. BULGULAR

Aralık 2008-Kasım 2011 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜ-SUAM) Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden üreyen, antibiyotik duyarlılık paternleri farklı, karbapenemlerde dahil olmak üzere çoğul ilaca dirençli 65 *A. baumannii* klinik izolatın 33'ü erkek, 29'u kadın hastaya aitti. Bir hastada kan ve solunum sekresyonundan, diğer hastada ise iki BOS ile bir kan örneğinde antibiyotik paternleri farklı olan izolatlar çalışmaya dahil edildiğinden 62 hastaya ait izolat çalışmaya alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması en küçük 4 yaş, en büyük 91 yaş olmak üzere $60,26 \pm 18,198$ SS olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmaya alınan klinik izolatların ünitelere ve izole edildikleri klinik örnekler göre dağılımı Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de sunulmuştur. *A. baumannii*'nin en fazla izole edildiği birim %66,2 (43/65) ile yoğun bakım ünitesi olarak saptanmıştır. İzolatların en çok %36,9 (24/65) ile kan; ve ardından %24,6 (16/65) ile endotrakeal aspirat (ETA) örneklerinden elde edildiği saptanmıştır.

Tablo 4.1. Klinik izolatların hastane ünitelerine göre dağılımı

<i>A. baumannii</i> (n=65)	YBÜ	Üroloji	Nöroloji	PCR	Enfeksiyon Hast.	Ortopedi	KVC	FTR	KHD	Göğüs Hast.
Sayı	43	5	4	4	3	2	1	1	1	1
%	66,2	7,7	6,2	6,2	4,6	3,1	1,5	1,5	1,5	1,5

YBÜ: Yoğun Bakım Üniteleri, **PCR:** Plastik Cerrahi ve Rekonstrüksiyon, **KVC:** Kardiyovasküler Cerrahi, **FTR:** Fizik Tedavi Rehabilitasyon, **KHD:** Kadın Hastalıkları-Doğum

Tablo 4.2. Klinik izolatların materyallere göre dağılımı

<i>A. baumannii</i> (n=65)	Kan	Endotrakeal aspirat	Yara yeri	İdrar	Balgam	BOS	Doku
Sayı	24	16	8	8	5	2	2
%	36,9	24,6	12,3	12,3	7,7	3,1	3,1

BOS: Beyin-omurilik sıvısı.

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.

Karbapenemler için M.I.C.Evaluator strip ile, diğer antibiyotikler için disk difüzyonu ile test edilen tüm suşlarda en yüksek duyarlılığa sahip olan antimikrobiyal ajan %98,5 duyarlılık oranı ile tobramisin, netilmisin ve polimiksin B olarak bulunmuştur. Sonraki en etkili antimikrobiyal ajan %96,9 duyarlılık oranı ile kolistindir. Amikasin için %7,7, minosiklin için %3,1, ampisilin-sulbaktam, tikarsilin-klavulanik asit, gentamisin, levofloksasin, tetrasiklin, doksisisiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol için %1,5 şeklinde duyarlılık oranları tespit edilirken suşların tamamı tikarsilin, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, seftriakson, sefepim, siprofloksasin, imipenem ve meropeneme dirençli bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Test edilen antibiyotiklerdeki duyarlılık yüzdeleri (n=65)

Antibiyotik	Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Ampisilin-sulbaktam	1	1,5	13	20	51	78,5
Tikarsilin	-	-	-	-	65	100
Piperasilin	-	-	-	-	65	100
Piperasilin-tazobaktam	-	-	-	-	65	100
Tikarsilin-klavulanik asit	1	1,5	-	-	64	98,5
Seftazidim	-	-	-	-	65	100
Seftriakson	-	-	-	-	65	100
Sefepim	-	-	-	-	65	100
İmipenem	-	-	-	-	65	100
Meropenem	-	-	-	-	65	100
Amikasin	5	7,7	-	-	60	92,3
Gentamisin	1	1,5	-	-	64	98,5
Tobramisin	64	98,5	-	-	1	1,5
Netilmisin	64	98,5	-	-	1	1,5
Siprofloksasin	-	-	-	-	65	100
Levofloksasin	1	1,5	-	-	64	98,5
Tetrasiklin	1	1,5	-	-	64	98,5
Doksisiklin	1	1,5	-	-	64	98,5
Minosiklin	2	3,1	2	3,1	61	93,8
Kolistin	63	96,9	-	-	2	3,1
Trimetoprim-Sulfametoksazol	1	1,5	-	-	64	98,5
Polimiksin B	64	98,5	-	-	1	1,5

MBL varlığını araştırmak için yapılan çift disk sinerji testi ve modifiye Hodge testinde hiçbir izolatta pozitiflik saptanmamıştır.

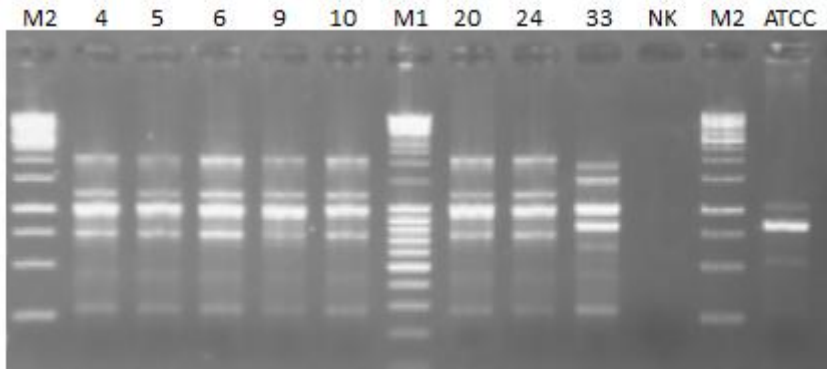
Suşlar arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koymak için yapılan AP-PZR sonuçlarına göre; M13 primeri ile iki farklı patern, DAF4 primeri ile üç farklı patern gözlenmiştir (Tablo 4.4, Şekil 4.1, Tablo 4.5, Şekil 4.2). M13 primeri ile diğer suşlara göre 33. izolatta farklı patern saptanırken, DAF4 primeri ile diğer suşlara göre 33. izolat ve 35. izolatta farklı patern saptanmıştır.

Otuzüçüncü izolatın ait olduğu hasta; 12. 10. 2010 tarihinde farklı Şehirdeki bir dış merkezde lumbal disk hernisi nedeniyle opere olan, 29. 11. 2010 tarihinde hastanemiz FTR servisinde yatışı sırasında yara yerinden gönderilen örnekte *A. baumannii* üremesi olan hastadır. Çalışmamızdaki diğer izolatlarla antibiyogram açasından karşılaştırıldığında farklı olarak tetrasiklin, doksisisiklin ve minosikline duyarlı, levofloksasine orta duyarlı, tobramisine dirençli olduğu saptanmıştır.

Otuzbeşinci izolatın ait olduğu hasta; 03. 12. 2010 tarihinde subaraknoid kanama sonrası yoğun bakım servisine yatırılan ve nöroşirurji kliniği tarafından izlenen, 20. 12. 2010 tarihinde kan kültüründe *A. baumannii* üremesi olan hastadır. Çalışmamızda antibiyotik duyarlılıkları farklı olduğu için, bu hastaya ait üç bakteri çalışılmıştır. Otuzbeşinci izolat hastaya ait diğer iki izolattan önce saptanmış, antibiyogram açasından karşılaştırıldığında kolistin duyarlı bulunmuş, 25.01.2011 ve 17.02.2011 tarihlerinde hastanın BOS'undan izole edilen çalışmamızdaki 37. ve 65. izolatlarda kolistin direnci saptanmıştır.

Tablo 4.4. Suşların M13 primeri ile görülen farklı paternlere göre dağılımı

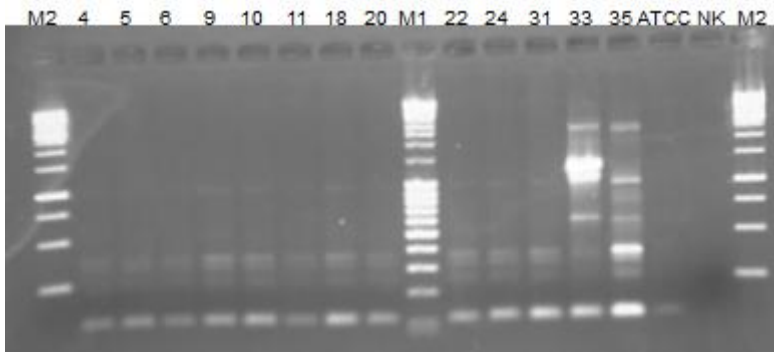
M13 patern	Suş no
A	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65
B	33



Şekil 4.1. M13 primeri ile görülen farklı paternler. M1: 80-10.000 bp DNA ladder, M2: 1 kb DNA ladder, NK: Negatif kontrol, ATCC: The American Type Culture Collection *A. baumannii* 19606

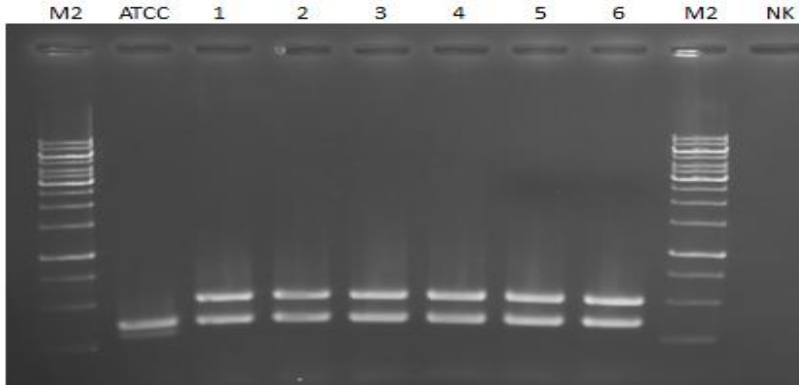
Tablo 4.5. Suşların DAF4 primeri ile görülen farklı paternlere göre dağılımı

DAF4 patern	Suş no
1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65
2	33
3	35



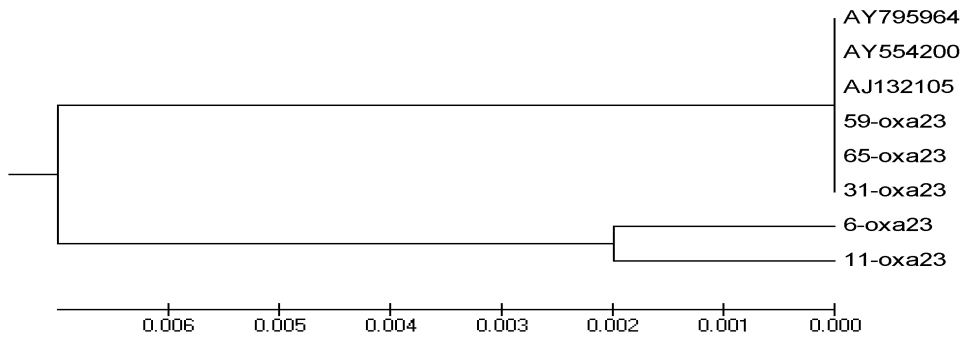
Şekil 4.2. DAF4 primeri ile görülen farklı paternler. M1: 80-10.000 bp DNA ladder, M2: 1 kb DNA ladder, NK: Negatif kontrol, ATCC: The American Type Culture Collection *A. baumannii* 19606

Suşlardaki oksasilinaz ve MBL varlığı araştırmak için yapılan multipleks PZR sonuçlarına göre; bütün izolatlarda 501 bp büyüklüğünde OXA-23 ve 353 bp büyüklüğünde OXA-51 enzim geni pozitif bulunurken (Şekil 4.3) alışılan OXA-24, OXA-58, IMP-1, SPM, VIM, SIM enzim genleri negatif bulunmuştur.



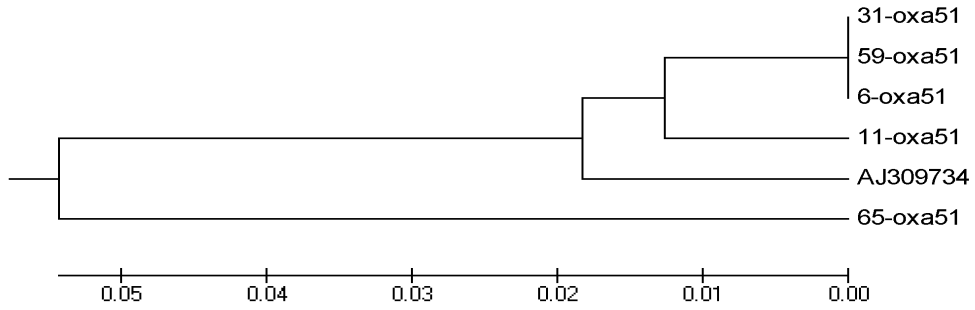
Şekil 4.3. Multipleks PZR sonuçları. M2: 1 kb DNA ladder, NK: Negatif kontrol, ATCC: The American Type Culture Collection *A. baumannii* 19606

Sekanslama sonuçlarına göre; OXA-23 enzimi için 6, 11, 31, 59, 65 nolu izolatların, AJ132105, AY795964 ve AY554200 GenBank kaydı (48) referans alınarak Mega 5 programı; clustalW seçeneği ile alignmentı yapılıp, filogenetik ağacı çizilmiştir. OXA-23 enzimi varlığı doğrulanıp; izolatlar arası uyum gözlenmiştir (Şekil 4.4).



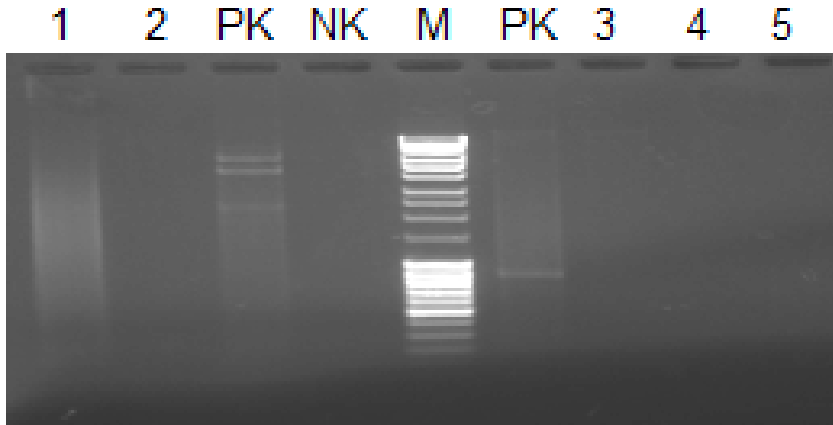
Şekil 4.4. OXA-23 dendrogramı

OXA-51 enzimi için yapılan sekanslamada 6, 11, 31, 59, 65 nolu izolatların, AJ309734 GenBank kaydı (48) referans alınarak Mega 5 programı; clustalW seçeneği ile alignmentı yapıp, filogenetik ağacı çizilmiştir. OXA-51 enzimi varlığı doğrulanıp izolatlar arası uyum gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. OXA-51 dendrogramı

Plazmid kaynaklı karbapenemaz enzim varlığını araştırmak için yapılan çalışmada suşlarda plazmid izole edilmemiştir (Şekil4.6).



Şekil 4.6. Plazmid izolasyonu sonuçları. M: 80-10.000 bp DNA ladder, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

Tablo 4.6'da *A. baumannii* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre (tüm izolatlarda dirençli saptanan antibiyotikler hariç) antibiyotik duyarlılık profilleri ve

AP-PZR paternleri verilmiştir. Tüm izolatlarda E-test ile çalışılan imipenem ve meropenem dirençli olarak bulunmuş olup tüm izolatlarda MİK değerleri >32 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 4.6. *A. baumannii* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre (tüm izolatlarda dirençli saptanan antibiyotikler hariç) antibiyotik duyarlılık profilleri ve AP-PZR paternleri

İzolat no	İzolasyon tarihi	Yaş	Servis	Materyal	Antibiyotikler													M13	DAF
					SAM	TİM	AK	GN	TOB	NET	LEV	TET	DO	MİN	COL	SXT	PB		
1	22.12.09	32	YBÜ	ETA	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
2	11.01.10	70	YBÜ	İdrar	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
3	02.02.10	57	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
4	19.02.10	76	Nöroloji	ETA	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
5	24.02.10	41	PCR	Yara	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	S	A	1
6	05.03.10	66	YBÜ	Kan	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
7	15.03.10	64	YBÜ	Balgam	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
8	24.03.10	53	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
9	29.03.10	77	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
10	05.05.10	76	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
11	09.05.10	66	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
12	09.05.10	77	Ortopedi	Yara	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
13	17.05.10	69	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
14	17.05.10	69	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
15	23.05.10	91	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
16	24.05.10	4	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
17	18.07.10	84	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
18	19.08.10	72	Ortopedi	Kan	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
19	24.08.10	58	YBÜ	Balgam	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1

Tablo 4.6 (devamı). *A. baumannii* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre (tüm izolatlarda dirençli saptanan antibiyotikler hariç) antibiyotik duyarlılık profilleri ve AP-PZR paternleri

İzolat no	İzolat tarihi	Yaş	Servis	Materyal	Antibiyotikler													M13	DAF	
					SAM	TIM	AK	GN	TOB	NET	LEV	TET	DO	MİN	COL	SXT	PB			
20	06.09.10	82	YBÜ	Kan	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
21	09.09.10	82	YBÜ	Kan	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
22	27.09.10	18	Üroloji	İdrar	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
23	28.09.10	66	Nöroloji	Balgam	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
24	01.10.10	74	Enfeksiyon	Kan	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
25	12.10.10	50	Enfeksiyon	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
26	21.10.10	56	YBÜ	Yara	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
27	26.10.10	72	YBÜ	Kan	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
28	03.11.10	46	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
29	06.11.10	21	Enfeksiyon	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
30	11.11.10	79	YBÜ	Kan	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
31	23.11.10	42	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
32	23.11.10	76	KVC	Yara	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
33	29.11.10	28	FTR	Yara	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	R	S	B	2	
34	18.12.10	59	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
35	20.12.10	29	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	3	
36	13.01.11	79	Üroloji	İdrar	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	A	1	
37	25.01.11	29	YBÜ	BOS	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	A	1	
38	26.02.11	63	PCR	İdrar	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	S	R	S	A	1

Tablo 4.6 (devamı). *A. baumannii* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre (tüm izolatlarda dirençli saptanan antibiyotikler hariç) antibiyotik duyarlılık profilleri ve AP-PZR paternleri

İzolat no	İzolat tarihi	Yaş	Servis	Materyal	Antibiyotikler												M13	DAF	
					SAM	TİM	AK	GN	TOB	NET	LEV	TET	DO	MIN	COL	SXT			PB
39	28.02.11	77	YBÜ	Kan	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
40	21.03.11	73	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
41	22.05.11	67	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
42	27.05.11	55	Göğüs	Balgam	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
43	04.06.11	81	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
44	13.06.11	74	YBÜ	İdrar	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
45	24.06.11	61	PCR	Doku	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
46	29.06.11	69	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
47	29.06.11	70	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
48	03.07.11	58	YBÜ	Yara	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
49	04.07.11	58	KHD	Yara	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
50	09.07.11	29	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
51	18.07.11	61	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
52	19.07.11	66	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
53	20.07.11	62	Üroloji	İdrar	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
54	29.07.11	64	YBÜ	Kan	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
55	10.08.11	71	YBÜ	ETA	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
56	17.08.11	59	Üroloji	İdrar	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
57	05.09.11	38	Üroloji	Doku	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1

Tablo 4.6 (devamı). *A. baumannii* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre (tüm izolatlarda dirençli saptanan antibiyotikler hariç) antibiyotik duyarlılık profilleri ve AP-PZR paternleri

İzolot no	İzolot tarihi	Yaş	Servis	Materyal	Antibiyotikler													M13	DAF
					SAM	TİM	AK	GN	TOB	NET	LEV	TET	DO	MİN	COL	SXT	PB		
58	07.09.11	47	PCR	Yara	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	A	1
59	06.10.11	66	Nöroloji	İdrar	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
60	11.10.11	68	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
61	16.03.11	76	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
62	08.11.11	75	Nöroloji	Balgam	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
63	14.11.11	61	YBÜ.	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
64	17.11.11	77	YBÜ	ETA	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	A	1
65	17.02.11	29	YBÜ	BOS	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	S	R	A	1

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi, **PCR:** Plastik Cerrahi ve Rekonstrüksiyon, **KVC:** Kardiyovasküler Cerrahi, **FTR:** Fizik Tedavi Rehabilitasyon, **KHD:** Kadın Hastalıkları-Doğum, **ETA:** Endotrakeal aspirat, **BOS:** Beyin omurilik sıvısı, **S:** Duyarlı, **R:** Dirençli, **I:** Orta duyarlı, **SAM:** Ampisilin-sulbaktam, **AK:** Amikasin, **GN:** Gentamisin, **TOB:** Tobramisin, **LEV:** Levofloksasin, **TET:** Tetrasiklin, **COL:** Kolistin, **SXT:** Trimetoprim- sulfametoksazol, **NET:** Netilmisin, **TİM:** Tikarsilin-klavulanik asit, **PB:** Polimiksin B, **DO:** Doksisisiklin, **MİN:** Minosiklin.

5. TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonları (HE) hastanede kalış süresini uzatarak, morbidite ve mortalite oranlarını arttıran ve tedavi maliyetlerini yükselterek ekonomik kayıplara yol açan önemli bir sağlık problemidir. Hastanelerde enfeksiyon oranı yaklaşık %3-17 arasında değişmektedir (10). Trakya Üniversitesi Eğitim Araştırma Uygulama Hastanesi (TÜEAUH)'nde 2006 yılında yapılan çalışmada HE oranları 2003, 2004 ve 2005 yıllarında sırasıyla %5,7, %4,9 ve %3,7 oranında bulunmuştur (105). Elazığ Fırat Üniversitesinde 2006 yılında yapılan çalışmada bu oran %5,97 olarak saptanmıştır (106). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Araştırma Uygulama Hastanesi'nde 2010 yılında yapılan çalışmada ise HE oranı %3,5 olarak bulunmuştur (11). Hastanemiz enfeksiyon kontrol komitesi verilerine göre, çalışmamızın yapıldığı 2009-2011 yılları arasında bildirilen HE oranları yıllara göre sırasıyla %1,73, %2,45 ve %3,6 olarak bulunmuştur. Hastanemizin hizmet vermeye başladığı 2009 yılı HE oranı düşük oranda görülürken, yatan hasta sayısının artması ile birlikte 2010 yılında HE oranı artmış, 2011 yılında diğer hastanelerin HE oranı ile benzer olmuştur.

Özellikle YBÜ'leri başta olmak üzere HE'lerde izolasyon sıklığı artan mikroorganizmalar arasında *Acinetobacter*'ler gelmektedir. *A. baumannii* en sık izole edilen *Acinetobacter* türü olarak bildirilmektedir (4).

Acinetobacter izolatlarının biyokimyasal özelliklerine göre yapılan tür düzeyindeki tanımlanmasında sorunlar yaşanmaktadır. Yarı otomatize veya tam otomatize sistemlerde tüm türler tanımlı değildir (4, 13). Bizim çalışmamızda da VİTEK 2 otomatize sistemi ile *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks olarak tanımlanan bakterilerde yapılan ısı testinde 44°C'de üremeye bakılarak *A. baumannii* varlığı doğrulanmıştır.

Ülkemizde yedi üniversite ve bir eğitim hastanesinin YBÜ'lerinde ardışık yıllarda yapılmış çok merkezli iki çalışmada hastalardan izole edilen Gram negatif bakteriler arasında *Acinetobacter* türlerinin 1999'da dördüncü ve 2000 yılında ise ikinci sırada yer aldığı görülmektedir (107, 108). Akın ve ark.'nın (109) 2004-2008 yılları arasında bir üniversite hastanesi anestezi yoğun bakım

ünitesinde yaptıkları çalışmada ve Karahocagil ve ark.'nın (11) 2010 yılında bir eğitim hastanesinde yaptıkları çalışmada *A. baumannii*'nin HE etkenleri arasında ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Hastanemizde çalışmamızın yapıldığı üç yılın ortalamasına göre, HE etkeni olarak saptanan mikroorganizmalar arasında *A. baumannii* %19,78 oranıyla ilk sırada yer almaktadır. Hastanemizdeki sonuçların son yıllarda yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmektedir.

A. baumannii hastaneye yatan, özellikle de YBÜ'de kalan hastalarda pnömoni, dolaşım sistemi enfeksiyonu, menenjit, üriner sistem enfeksiyonu gibi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmaktadır (13, 110). Alp ve ark.'nın (111) yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *A. baumannii* son yıllarda yüksek ölüm oranına sahip nozokomiyal dolaşım sistemi enfeksiyonlarına neden olan önemli bir patojen olarak ortaya çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda da *A. baumannii* izolatları %36,9 oranında kan kültüründen izole edilmiştir.

Yoğun bakım ünitesinde izlenen hastalar HE'ye daha duyarlıdır. Yoğun bakım ünitesi hastalarının enfeksiyonlara olan bu yatkınlıkları; alta yatan hastalıklar, birden çok hastalığın olması, komplikasyonların varlığı, savunma mekanizmalarındaki bozukluk, immunsupresyon ve malnütrisyon varlığı gibi intrensek; intravasküler kateter, endotrakeal tüp, üriner kateter ve cerrahi drenlerin uygulanması gibi ektrrensek faktörlerden kaynaklanmaktadır (112). Hastanede gelişen tüm HE'lerin %20-25'inin ortaya çıktığı birim YBÜ'lerdir (113). Hastanemizde de HE'lerin 2009, 2010 ve 2011 yıllarında sıra ile %14,29, %30,85 ve %25,18'ini YBÜ'de yatan hastalardaki HE'ler oluşturmaktadır.

Ülkemizde yoğun bakım hastalarından izole edilen kökenlerde yapılan çok merkezli çalışmalarda *Acinetobacter* suşlarında yıllara göre giderek artan antibiyotik dirençlerinin olduğu gösterilmiştir (114, 115). Çoklu ilaç direncindeki artış nedeniyle *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde güçlük yaşanmaktadır. En sık beta-laktam antibiyotiklere, aminoglikozidlere ve florokinolonlara direnç görülürken, son yıllarda karbapenem dirençli *A. baumannii* suşları nedeniyle oluşan HE'leri artmaktadır (101). Bizim laboratuvarımızda da 2009 yılı aralık ayında ilk karbapenem dirençli *A. baumannii* izole edilmiş, sonraki aylarda dirençli izolatların sayısı artmıştır.

Tatman-Otkun ve ark. (116) TÜEAUH'de 1994–2000 yıllarında HE etkeni olarak izole edilen *A. baumannii*lerle yaptıkları çalışmada kökenlerin tamamının imipeneme duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Aminoglikozidlerin (tobramisin %77 duyarlı, amikasin %55 duyarlı) ve siprofloksasilinin (%64 duyarlı) alternatif tedavide kullanılabileceği görülmektedir. Aynı hastanede Karagöl (117) 2006'da yaptığı çalışmada %54,3 oranında imipenem direnci saptamış, amikasin (%76) ve siprofloksasinde (%84,7) direnç oranlarının arttığını gözlemişlerdir. Hacettepe Üniversitesi'nde 2000-2004 yılları arasında yapılan MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) antimikrobiyal süveyans programı çalışma sonuçlarına göre meropenem; %53, imipenem; %48 ve tobramisin; %44 duyarlılık oranları ile en duyarlı antibiyotikler olarak görülmektedir (118). Iraz M. ve ark.'nın (34) Ekim 2011-Mart 2012 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada izole edilen *Acinetobacter*lerin %99'u kolistin, %85'i netilmisine duyarlı olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre tobramisin, netilmisin ve polimiksin B, %98,5, kolistin; %96,9 duyarlılık oranları ile en yüksek duyarlılığa sahip antibiyotikler olarak saptanmıştır.

Çoklu ilaç direncindeki artış hastanelerde ciddi sağlık sorunudur. Bu sorunun hızlı büyümesinin başlıca nedeni yoğun ve uygunsuz antibiyotik kullanımınıdır. Aztreonam ve 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımının karbapenem dirençli *Acinetobacter* türlerinde artışa neden olduğu bulunmuş ve dirençli türlerin yayılımını azaltmak için antibiyotik kullanımının azaltılması önerilmiştir (119). Zarilli ve ark. (120) çalışmalarında dirençli *A. baumannii* kökenlerinin epidemik duruma gelmesi ile bu grup antibiyotiklerin yoğun kullanımının paralel olduğunu göstermişlerdir.

Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında tercih edilen karbapenemlere karşı oluşan direnç sıklıkla Sınıf B veya sınıf D beta-laktamazları sentezleyen genlerin kazanılmasıyla ilişkilidir. *A. baumannii*'de karbapenem direncine neden olan en yaygın beta-laktamaz tipi; bu türe spesifik olan kazanılmış oksasilinazlardan OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 enzimleri ve IMP, VIM, SIM tip MBL enzimleridir. Ayrıca OXA-51 tip doğal oksasilinazın aşırı üretimi de kazanılmış karbapenem direncine neden olmaktadır (57).

Yunanistan'da 2002 Mart-Kasım ayları arasında YBÜ'de izole edilen 17 *A. baumannii* izolatında OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 enzimlerinden 15 izolatta OXA-51 pozitifliği saptanırken 14 izolatta OXA-58 pozitif bulunmuştur. OXA-23 ve OXA-24 pozitifliği saptanmamıştır. Aynı zamanda MBL enzimleri için E test ve moleküler yöntemlerle IMP, VIM, SIM, SPM enzimleri araştırılmıştır. İki yöntemle de MBL pozitifliği saptanamamıştır (121). Madagaskar'da 2006- 2009 yılları arasında yapılan çalışmada *A. baumannii* izolatlarında OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 enzimleri araştırılıp, OXA-23, OXA-51'i pozitif bulunurken, OXA-24 ve OXA-58 enzimi pozitif izolat saptanamamıştır (122). Brezilya'da yapılan çalışmada 172 *A. baumannii* izolatının tümünde OXA-23 pozitifliği saptanırken, araştırılan MBL enzimlerinde; IMP, VIM, SIM, SPM'de negatiflik saptanmıştır (104).

Bizim çalışmamızda multipleks PZR ile oksasilinaz enzimlerinden OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 ve MBL enzimlerinden IMP, VIM, SIM, SPM enzimi araştırılmış olup, tüm suşlarda OXA-23 ve OXA-51 pozitifliği saptanıp, OXA-24, OXA-58, IMP, VIM, SIM, SPM enzimleri negatif olarak bulunduğu için karbapenemaz direncinin; OXA-51 tip doğal oksasilinazın aşırı üretimi sonucu ve OXA-23 enzim geninden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

MBL enzimlerini saptayan fenotipik testler de bulunmaktadır. Bu testlerin karşılaştırmasının yapıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Jesudason ve ark. (123) MBL üretimini tespit etmede EDTA çift disk sinerji testini, Modifiye Hodge testine göre daha duyarlı bulmuşlardır. Arakawa ve ark. (124) Japonya' da yaptıkları bir çalışmada, IMP-1 tipi MBL üreten gram negatif bakterilere biri CAZ diğeri ise MBL inhibitörü içeren iki disk kullanılarak çift disk sinerji testi uygulamışlardır. Uyguladıkları yöntemin özgüllük ve duyarlılık açısından PZR analizleriyle kıyaslanabilir nitelikte olduğunu belirtmişlerdir. Yan ve ark. (125) Tayvan'da üç fenotipik yöntemi karşılaştırdıklarında MPA çift disk sinerji metodunun kombine disk ve E-teste göre en duyarlı yöntem olduğunu tespit etmişlerdir. En iyi sonuçlar IMP ile elde edilmiştir. Kombine disk metodunu %86,7 duyarlı bulmuşlardır Sarı ve ark. (78) Modifiye Hodge testi ile %16, kombine disk sinerji yöntemi ile %56 olarak MBL pozitif bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda MBL fenotipik testlerinden modifiye Hodge testi ve çift disk sinerji

testi yapılmıştır. Fakat iki test ile de hiçbir suşta pozitiflik saptanamamıştır. Multipleks PZR ile aradığımız MBL enzimlerinden IMP, VIM, SIM, SPM enzimleri de negatif bulunduğu için çalıştığımız bakterilerde MBL enzimlerinin var olmadığı düşünülmüştür.

Acinetobacterlere karşı oluşan antibiyotik direnci hekimleri, yeni tedavi seçenekleri arayışına sevk etmektedir. Bu suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin kullanılabilir (33). Son yıllarda sadece kolistine duyarlı bulunan etkenler ile enfeksiyonlar ortaya çıkmakta ve kolistin kullanımı ile başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Bizim çalışmamızda da kolistin %96,9 oranındaki duyarlılığı ile %98,5 oranında duyarlı bulunan tobramisin, netilmisin ve polimiksin B'den sonra dördüncü en yüksek duyarlılığa sahip antibiyotik olarak bulunmuştur. Hastanemizde çoklu dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde; VİTEK2 otomatize sistem AST-N90 kartı ile netilmisin ve polimiksin B çalışılmadığı için ve duyarlı bildirilen tobramisinin temin edilmesi güç olduğundan kolistin kullanılmaktadır. Ancak bu ilacında ciddi yan etkilerinin bulunması kullanımında sorunlar yaratmaktadır. Ayrıca son zamanlarda kolistine karşı dirençli bildirilen suşların yanı sıra kolistin için heterorezistan suşlar bildirilmiş olması ve bu suşların tespitinde zorlukların yaşanması bu ilacın kullanımını sınırlandırmaktadır (68, 126). Bizim çalışmamızda da kolistine dirençli iki izolat tespit edilmiştir. Bu izolatlar (37 ve 65 nolu izolatlar) aynı hastaya ait olup hastada bu izolatlardan yaklaşık bir ay öncesinde izole edilmiş olan (35 nolu izolat) kolistine duyarlı *A. baumannii* üremesinden sonra hastaya kolistin tedavisi verilmiş olup hastada muhtemelen var olan hetero kolistin direnci kolistin direncine dönüşmüştür. Ancak çalışmamızda kolistin heterodirenci araştırılmadığı için bu konuda kesin bir bilgi vermemiz mümkün değildir. *A. baumannii* tedavisinde kolistine karşı direncin saptanmaya başlamış olması kolistin dışında diğer antibiyotik seçeneklerine de ihtiyaç göstermektedir.

Sesli-Çetin E. ve ark. (127) yaptıkları çalışmada 78 *A. baumannii* izolatının %97'sinin polimiksin B'ye duyarlı olduğunu saptamışlar, Holloway ve ark. (128) ÇAD *A. baumannii* üremesi olan hastalarda polimiksin B kullanıldığında klinik kür oranını %76, mortalite oranını %27 olarak

belirlemişlerdir. Özgür-Akın ve ark (129) yaptıkları çalışmada *A. baumannii* suşlarının polimiksin B'ye karşı direncin saptanmasında disk difüzyon, buyyon mikrodilüsyon, E-test yöntemlerini karşılaştırdıklarında, yöntemler arasında farkın anlamlı olmadığını belirleyip, disk difüzyon ile %3,2 oranında direnç saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da; VİTEK 2 sistem AST-N90 kartı ile değerlendirilmemiş olan ve bizim disk difüzyon ile araştırdığımız, CLSI ve EUCAST'a göre *Acinetobacter spp.* için değerlendirme zon çapı bulunmayan, değerlendirmede CLSI'da *P. aeruginosa*'daki (95) zon çapları kullanılan, tobramisin ve netilmisin ile birlikte en yüksek duyarlılık oranına (%98,5) sahip olan polimiksin B'nin *A. baumannii* tedavisinde kullanıma uygun bir ilaç olduğu gözlenmiştir. Fakat bu antibiyotiğin yurt dışında bulunan parenteral formu ülkemizde bulunmamakta, sadece deri pomadı, göz damlası ve göz pomadı bulunmaktadır. *A. baumannii*'ye bağlı göz enfeksiyonu, deri enfeksiyonu dışında kullanılamamaktadır.

Tatman-Otkun ve ark. (116) tarafından yapılan çalışmada TÜEAUH'de 1994-2000 döneminde izole edilen 150 *A. baumannii*'de netilmisin için bir bakteride direnç saptanmıştır. Sesli-Çetin E. ve ark. (130)'nın çalışmasında netilmisin direnci %3,2 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da; VİTEK2 otomatize sistem AST-N90 kartı ile bakılmadığı halde disk difüzyon metodu ile EUCAST kriterlerine göre değerlendirildiğinde polimiksin B gibi %98,5 duyarlılık yüzdesine sahip olan netilmisin *A. baumannii* tedavisinde kullanılabilir ilaç olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda VİTEK2 otomatize sistemdeki duyarlılık kartlarında bulunmayan netilmisin ve polimiksin B duyarlılık oranının yüksek olması en azından kolistine dirençli bulunan suşlarda VİTEK2 dışında bir yöntemle duyarlılık bakılmasının iyi olacağını düşündürmüştür.

Yüksek duyarlılık oranları ile netilmisin ve polimiksin B önemli bir seçenek olsa da çoklu dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında halen etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmamış olduğu için bu antibiyotiklerin klinik kullanımdaki yerini ve yan etkilerini netleştirmeye yönelik klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Acinetobacter tiplendirme çalışmalarında hedef, tanımlanmış olan kökenlerin epidemiyolojik olarak birbirleri ile ilişkili olup olmadıklarını ortaya

koyup, ilişkili ise bu ilişkiyi derecelendirmektir. *Acinetobacter* türlerinin tiplendirmesi için kullanılan fenotipik yöntemler yeterli bulunmamakta, genotipik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Genotipik yöntemlerin tümü farklı paternlerin veya DNA parmak izinin çıkartılmasına dayanmaktadır (82, 88). Laboratuvarımızda *A. baumannii* izolasyon sıklığında artışın yanı sıra suşların antibiyotik duyarlılıklarının aynı veya benzer oluşu; izole edilen bakterilerin hastadan hastaya geçiş ile yayıldığını düşündürüp, çalışmamızın çıkış noktasını oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalarda *A. baumannii* için standart tiplendirme yönteminde fikirbirliğine varılamamıştır. *A. baumannii*'nin epidemiyolojik tiplendirmesi amacıyla PZR temelli yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. PZR ile tiplendirmenin ayırt etme yeteneği diğer sık kullanılan yöntemlerle karşılaştırıldığında ribotiplendirme ile benzer, fakat PFGE'den bir miktar az bulunmuştur. PFGE salgın suşları arasında PZR yaklaşımlarından daha çok minor mutasyon saptamakta, epidemiyolojik tiplendirme için altın standart olarak görülmektedir. PZR basit, hızlı ve daha ucuz olması nedeniyle klinik laboratuvarlarda kullanım için daha avantajlı ve uygun bir teknik olarak görülmektedir (131).

Grundmann ve ark. (102) 1997 yılında yaptıkları, farklı ülkelerdeki laboratuvarların katıldığı çok merkezli çalışmada izole edilen *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* kompleks'lerle M13, DAF4, ERIC2 ve REP primer setleri kullanılarak PZR yapılmış ve çalışmaya katılan bütün laboratuvarlarda sonuçlar yüksek oranda benzer bulunmuştur. Standart DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyon koşulları sağlandığında benzer sonuçlar elde edildiği, M13 primerinde, diğer primerlerle karşılaştırıldığında daha belirgin bant paternleri gözlemlendiği ve bu primer ile daha iyi ayırım yapıldığı bildirilmektedir (102). Bizim çalışmamızda da M13 ve DAF4 primerleri kullanılmış olup, bant paternleri incelendiğinde; M13 primeri ile daha belirgin paternler gözlenmiştir.

AP-PZR sonuçlarının yorumlanması bazen zordur, çünkü AP-PZR varyasyonu spesifik genetik olaylar ile sıkı ilişkili değildir. Bu yüzden PFGE için belirlenen kurallar AP-PZR paternlerine uygulanamaz. AP-PZR'de suşlarda

görülen bantlar aynı ise ya da 3 veya daha fazla farklı bant gözleniyorsa yorumlama sırasıyla aynı suşlar ya da birbirinden farklı suşlar diye yapılır. Fakat tek bir bant büyüklüğündeki bir değişikliği ya da birkaç bant yoğunluğunu yorumlamada bir kriter yoktur (132).

Bizim yaptığımız çalışmada imipenem dirençli *A. baumannii* suşlarında M13 primeri ve DAF4 primeri kullanılarak yapılan AP-PZR ile tiplendirmede oluşan bantlardaki farklılıklar gözle değerlendirildiğinde M13 primeri ile 2 farklı patern, DAF4 primeri ile 3 farklı patern gözlenmiştir.

M13 ve DAF4 primerleri ile farklı patern olarak saptanan 33. izolatın ait olduğu hasta; farklı şehirdeki bir dış merkezde opere olup, yaklaşık bir ay kadar sonra bizim hastanemiz FTR servisinde izlendiği sırada operasyon yerinden alınan örnekte *A. baumannii* üremesi saptandığı ve çalışmamızdaki diğer izolatlarla antibiyogram açısından karşılaştırıldığında tetrasiklin, doksisisiklin ve minosiklinin duyarlı, levofloksasin orta duyarlı, tobramisin dirençli saptandığı için hastanemizle ilişkisiz olduğu, kaynağının opere olduğu dış merkez olduğu düşünülmüştür.

DAF4 ile farklı görülen 35. izolatın ait olduğu hasta kolistin direnci nedeniyle yukarıda tartışılan hasta olup bakterinin muhtemelen var olan kolistin hetero direnci farklı bant paternine neden olmuş olabilir.

İki izolat dışında diğer bakterilerin aynı paterni göstermelerinden dolayı hastanemizde üreyen *A. baumannii*'lerin klonal benzerlik gösterip tek bir kaynaktan köken aldığı ve bakterilerin hastadan hastaya geçişini azaltmak için temel enfeksiyon kontrol önlemlerine daha fazla dikkat edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Çoğul ilaca dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonunun kontrolüne ilişkin başlıca amaçlar; bu bakterinin, öncelikle YBÜ'de olmak üzere yayılmasını kontrol etmek ve endemik suşların oluşmasını önlemektir. Kontrol en çok ortak bir kaynak tanımlanıp ortadan kaldırıldığında başarılı olacaktır. Ortak kaynağın tanımlanmaması durumunda kontrol, kolonize ve enfekte hastalar için etkin gözetim ve temas izolasyonu, kuru yüzeylerin ve hastalar arasında ortak kullanılan tıbbi ekipmanın uygun dezenfeksiyonu, ortak kullanılan malzemelerin mümkün olduğunca azaltılması ve sağlık çalışanlarının el hijyeni, eldiven

kullanımı konusunda sık aralıklarla eğitimine dayanmaktadır. Ayrıca uygun sürede, antibiyogram sonucuna göre antibiyotik kullanımının da yararı olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle tüm hekimlerin, enfeksiyon hastalıkları uzmanlarıyla işbirliği içerisinde, kendi klinik ortamlarında dirençli organizmaların çeşitliliği, prevalansı, mikrobiyal özellikleri ve uygun tedavisi konusunda bilinçli olmaları önem taşımaktadır. Böylece gereksiz ilaç kullanımının ve direnç gelişiminin önüne geçilebilir. Rutin olarak çevre örneklerinin alınması önerilmemektedir. Ancak salgınlar sırasında çok önemli bilgiler sağlanması ve salgın yapan mikroorganizmanın rezervuarının saptanması amacıyla mutlaka çevresel örnekleme yapılmalıdır (133, 134). Bizim hastanemizde dirençli *A. baumannii* suşları 2009 yılından bu yana ara ara izole edildiği için, bu klonal suşun salgın suşu olarak değil, endemik suş olarak değerlendirilmesi daha doğrudur.

Acinetobacterlerde tiplendirme için plazmid profil analizinin de yararlı olduğu saptanmıştır. Bu yöntem basit bir tekniktir ve tekrarlanabilir olma özelliğine sahiptir. Çoğu tanı laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilmekte; minimum ekipman ve harcama gerektirmektedir. Yer ve zaman şartları kısıtlı olduğunda, PFGE sonuçları ile klinik veriler arasında uyumsuzluk olduğu veya PFGE'nin yetersiz kaldığı durumlarda *A. baumannii* salgınlarının analizi için kullanılması uygun görülmüştür. (85). Bizim izolatlarımızda plazmid saptanmadığı için plazmid profil analizi yapılamamıştır.

Bakteri türleri arasında başta konjugasyon olmak üzere birçok mekanizma ile nakledilebilen hareketli DNA fragmentleri olan plazmidlerin yayılması ile hastanelerde epidemiler ortaya çıkabilir. Birçok plazmid kolayca kaybedilebilir veya kazanılabilir (4). Bizim çalışmamızda plazmid ekstraksiyonu yaptığımızda plazmidlerin olmadığı saptanmıştır. Çalışmamızdaki suşların plazmid taşımayan olması Acinetobacterlerden kaynaklanan başka karbapenem dirençli bakteriler ile karşılaşma riskimizin düşük olduğunu düşündürmektedir.

Nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan sekanslama yöntemi; gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlar. Fakat pahalı, uygulanabilmesi için gelişmiş laboratuvar olanakları

gerektiren yöntemdir. Ayrıca sonuçların yorumlanması yönünde zorluklar bulunmaktadır (88). Bizim çalışmamızda da sekanslama dış merkezde çalışılmış ve ortaya çıkan verilere göre; multipleks PZR ile çalışılıp pozitiflik saptanmış olan OXA-23 ve OXA-51 enzimlerinin varlığı doğrulanmış ve izolatlar arası uyum gözlenmiştir.

Sonuç olarak çoğul ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının yayılımı ve tedavisi açısından ciddi problemlerle karşı karşıya bulunmaktayız. ÇAD olan izolatlarla yaptığımız çalışmada; tiplendirme için yapılan AP-PZR ile iki izolat hariç izolatlarda aynı paternler gözlenirken, bütün suşlarda kromozomal veya plazmid aracılığı ile taşınabilen OXA-23 geni ve kromozomal gen olup, çok salgılandığı durumda ilaç direncine yol açabilen OXA-51 genlerinde pozitiflik saptanmıştır. Buna göre hastanemizde izole edilen *A. baumannii*'lerin klonal benzerlik gösterdiği ve plazmid negatif saptandığı için karbapenem direncini oluşturan OXA-23 ve OXA-51 genlerinin kromozomal olduğu saptanmıştır.

Son yıllarda HE etkeni olarak ilk sırada saptanan *A. baumannii* tedavisinde klinik kullanıma giren veya girme potansiyeli olan antibiyotiklerin azalması, yakın gelecekte uygun ve etkili bir tedavisi olmayabilecek olan ÇAD izolatlar nedeniyle, *A. baumannii* ile kolonize veya enfekte hastalardan çapraz geçişi engellemek için; temas izolasyonuna daha fazla önem verilmeli, personel eğitimi belirli aralıklarla tekrarlanmalı, özellikle el yıkamanın önemi vurgulanmalı ve çevre dezenfeksiyonu daha sık aralıklarla yapılmalıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Çalışmamıza alınan *A. baumannii* suşlarının en sık görüldüğü birim %66,2 ile yoğun bakım ünitesi olarak saptanmıştır.

2- İzolatların en çok %36,9 (24/65) ile kan ve ardından %24,6 (16/65) ile endotrakeal aspirat örneklerinden elde edildiği saptanmıştır.

3- Yapılan fenotipik testlerde tüm suşlar katalaz pozitif, oksidaz negatif, DNaz negatif olarak saptanmıştır. TSİ agarda nonfermenter reaksiyon, glukoz OF besiyerinde glukozun oksidasyonu gözlenmiş, jelatinaz negatif olarak tespit edilmiştir. Tüm bakterilerin hareketi negatif, 44°C de üremesi pozitif olarak saptanmıştır.

4- Çalışılan kökenlerin tümünde antibiyotikler içinde en yüksek duyarlılığa sahip antibiyotikler %98,5 duyarlılık oranı ile tobramisin, netilmisin ve polimiksin B olup bunu kolistin %96,9 duyarlılık oranı ile takip etmekteydi. Çalışmaya alınan 65 kökenin tamamı tikarsilin, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, seftriakson, sefepim, siprofloksasin, imipenem ve meropenem dirençliydi. Amikasin %92,3, minosiklin %96,9, ampisilin-sulbaktam, tikarsilin-klavulanik asit, gentamisin, levofloksasin, tetrasiklin, doksisisiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol %98,5 oranında dirençli bulunmuştur.

5- Suşlar arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koymak için yapılan AP-PZR sonuçlarına göre; M13 primeri ile bir bakterinin çalışmadaki diğer bakterilerden farklı olması nedeniyle iki farklı patern gözlenirken, DAF4 primeri ile iki ayrı bakterinin çalışmadaki diğer bakterilerden farklı olması nedeniyle üç farklı patern gözlenmiştir. Ancak DAF4 primeri ile farklı gözlenen ikinci bakterinin antibiyotik duyarlılık verileri incelendiğinde klonal benzerlik gösteren diğer bakterilerle benzer olduğu düşünülmüştür.

6- Suşlardaki oksasilinaz enzimlerini araştırmak için yapılan multipleks PZR sonuçlarına göre; bütün izolatlarda kromozomal kaynaklı OXA-23 ve OXA-51 enzim geni pozitif bulunmuştur.

7- Suşlardaki MBL varlığını araştırmak için yapılan fenotipik yöntemlerden; çift disk sinerji testi ve modifiye Hodge testinde ve moleküler yöntemlerde hiçbir izolatta pozitiflik saptanmamıştır.

8- Pozitif bulunan enzimler için yapılan sekanslamada OXA-23 ve OXA-51 enzim varlığı doğrulanarak, izolatlar arası uyum gözlenmiştir.

9- Plazmid kaynaklı karbapenemaz enzim varlığını araştırmak için yapılan çalışmada, suşların plazmid taşıyor olması nedeniyle Acinetobacterlerden kaynaklanan başka karbapenem dirençli bakteriler ile karşılaşma riskimizin düşük olduğu düşünülmüştür.

10- Acinetobacter izolatlarının biyokimyasal özelliklerine göre yarı otomatize veya tam otomatize sistemlerle yapılan tür düzeyindeki tanımlanmasında sorunlar yaşandığı için çıkan sonucun fenotipik ek testlerle doğrulanması gerekmektedir.

11- Tiplendirme için AP-PZR basit, hızlı ve daha ucuz olması nedeniyle uygun bir yöntem olmakla birlikte, sonuçların yorumlanmasında zorluklar bulunmaktadır.

12- Dirençli *A. baumannii* tedavisinde kullanılan kolistin dışında, çalışmamızda duyarlı bulunan netilmisin ve polimiksin B'nin de kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bu amaçla özellikle kolistin direnci saptanan hastalarda ve uzun süre kolistin kullanılması düşünülen hastalarda kolistin heterodirencinin dirence dönüşmesini engellemek için disk difüzyonu ile zon çaplarına bakılması veya MİK değerlerinin bulunması ile netilmisin ve polimiksin B'ye karşı duyarlılığın araştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

13- *A. baumannii* enfeksiyonlarının yoğun bakım ünitesinde, kan örneklerinde daha sık saptanması, izolatların klonal benzerlik göstermesi nedeniyle bu birimler başta olmak üzere bütün hastanede; girişimsel işlemler sırasında kolonize veya enfekte hastalardan çapraz geçişi engelleme ve enfeksiyonu önleme açısından evrensel korunma önlemlerine dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. VAHABOĞLU, H. (2000). Çoğul dirençli nonfermentatif Gram-negatif basiller. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*. 4: 222-225.
2. YALÇIN, A. N. (2000). Nozokomiyal Gram-negatif çomak enfeksiyonları. *Klinik Dergisi*. 13: 23-25.
3. SESLİ-ÇETİN, E., KAYA, S., TETİK, T., CİCİOĞLU-ARIDOĞAN, B. (2006). Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi*. 20 (4): 202-205.
4. BERGOGNE-BEREZİN, E., TOWNER, K. J. (1996). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Microbiological and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*. 9 (2): 148-165.
5. 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.
6. ÖZBEY, N., AKÇALI, A., BARUT, T., ZANAPALIOĞLI, Ö., ŞENER, A., TATMAN-OTKUN, M., OTKUN, M. (2009). Yoğun bakım ünitesinde Gram negatif bakteriyemiler. XXXIV. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi*. Girne, KKTC.
7. TURNER, P. J., GREENHALGH, J. M. (2003). The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. *Clinical Microbiology and Infection*. 9 (6): 563-567.
8. LOLANS, K., RİCE, T.W., MUNOZ-PRICE, S. L., QUINN, J. P. (2006). Multicity outbreak of carbapenem- resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50 (9): 2941-2945.
9. ÇETİNKAYA-ŞARDAN, Y. Hastane Enfeksiyonları: Tanımlar, Sürveyans, Epidemilere Yaklaşım. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 545-557.

10. 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.

11. 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.

12. BONOMO, R. A, SZABO, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infection Diseases*. 43: 49–56.

13. SCHRECKENBERGE, P. C., DANESHVAR, M. I., HOLLİS, D. G. *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 Bonfermentatif basiller. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. p.: 2195-2201.

15. MUNOZ-PRICE, L. S., WEINSTEIN, R. A. (2008) *Acinetobacter* infection. *The New England Journal Medicine*. 358 (12): 1271-1281.

16. KARAH, N. (2011). Identification, molecular epidemiology, and antibiotic resistance characterization of *Acinetobacter spp.* clinical isolates. Doktora tezi, Kuzey Norveç Üniversitesi Hastanesi. Sağlık Bilimleri Fakültesi.

17. NEMEC ,A, DE BAERE,T., TJERNBERG, I., VANEECHOUTTE, M., VAN DER REİJDEN, T. J. K., DİJKSHOORN, L.(2001). *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1891–1899.

18. BARTUAL, S. G., SEİFERT, H., HİPPLER, C., DOMİNGUEZ-LUZON, M. A., WİSPLİNGHOFF, H., RODRİGUEZ-VALERA, F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (9): 4382–4390.
19. 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.
20. JAWAD, A., SEİFERT, H., SNELLİNG, A. M., HERİTAGE, 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.
21. SEİFERT, H., DİJKSHOORN, L., GERNER-SMİDT, 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.
22. TATMAN-OTKUN, M. (1998). Hastane infeksiyonlarından izole edilen *Acinetobacter* türlerinde β laktamazların izoelektrik odaklama yöntemiyle tiplendirilmesi. Doktora Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
23. JAWAD, A., HAWKEY, P. M., HERİTAGE, J., SNELLİNG, A. M. (1994). Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important. *Acinetobacter spp.* and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *Journal Clinical Microbiology*. 32 (10): 2353-8.
24. TAŞOVA, Y., YAMAN, A., SALTOĞLU, N., YILMAZ, G., KARA, O., DÜNDAR, İ. H. (1999). Nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonları. *Flora Dergisi*. 4 (3): 170-176.

25. GOEL, K. V., KAPIL, A. (2001). Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiology*. 1: 16–23.
26. VAHABOGLU, 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.
27. GARNACHO-MONTERO, J., ORTÍZ-LEYBA, C., JÍMENEZ-JÍMENEZ, F. J., BARRERO-ALMODOVAR, A. E., GARCIA-GARMENDÍA, J. L., BERNABEU-WITTELI, M., GALLEGO-LARA, S. L., MADRAZO-OSUNA, J. (2003). Treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: A comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases*. 36: 1111–1118.
28. SUNENSHINE, R. H., WRIGHT, M. O., MARAGAKIS L. L., HARRIS, A. D., SONG, X., HEBDEN, J., COSGROVE, S. E., ANDERSON, A., CARNELL, J., JERNIGAN, D. B., KLEINBAUM, D. G., PERL, T. M., STANDIFORD, H. C., SRINIVASAN, (2007). A multidrug –resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerging Infectious Diseases*. 13: 97-103.
29. MCDONALD, L. C., BANERJEE, S. N., JARVIS, W. R. (1999). Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987–1996. *Clinical Infectious Diseases*. 29: 1133–1137.
30. SEIFERT, H., BAGINSKI, R., SCHULZE, A., PULVERER, G. (1993). Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. antimicrobial. *Agents and Chemotherapy*. 37: 750- 753.
31. BAŞUSTAOĞLU, A., ÖZYURT, M. (1998). Nozokomiyal patojen olarak *Acinetobacter*'lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*. 2: 88-93.

32. AKALIN, H. (2004). Nozokomiyal pnömoni-II: Tedavisi ve önleme. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*. 8: 215-224.

33. LEVİN, A. S., BARONE, A. A., PENCO, J., SANTOS, M. V., MARİNHO, I. S., ARRUDA, E. A. G., MANRİQUE, 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.

34. IRAZ, M., CEYLAN, A., AKKOYUNLU, Y. (2012). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının incelenmesi. *ANKEM Dergisi*. 26 (2): 80-85.

35. Shareek, P. S., Ramgopalakrishnan, D. S., Ramasubramanian, V., Ghafur, K. A., Thirunarayanan, M. A. (2012). Antibiotic sensitivity pattern of blood isolates of *Acinetobacter* species in a tertiary care hospital: A retrospective analysis. *American Journal of Infectious Diseases* 8 (1): 65-69.

36. WILLAMS, J. D. (1997). Beta-lactamase inhibition and invitro activity of sulbactam and sulbactam/cefaperazon. *Clinical Infection Diseases*. 24: 494–497.

37. 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.

38. PELEG, A. Y., POTOSKİ, B. A., REA, R., ADAMS, J., SETHİ, J., CAPİTANO, B., HUSAİN, 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.

39. 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.

40. LİVERMORE, D. M. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 8: 557-584.
41. HANCOCK, R. E. W. (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clinical Infection Diseases*. 1: 38-45.
42. BUSH, K., JACOBY, G. A. (2010). Updated Functional Classification of Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54: 969–976.
43. AYZ, C. Beta Laktamların Genel Özellikleri ve Penisilinler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 266-278.
44. BRADFORD, A. P., URBAN, C., MARIANO, N., PROJAN, S. J., RAHAL, J. J., BUSH, K. (1997). İmpipemen resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT–1, a plasmid mediated Amp C β laktamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 563–569.
45. PORİEL, L., NORDMANN, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infections*. 12: 826–836.
46. VAHABOĞLU, H., ÖZTÜRK, R., AYGÜN, G., COŞKUNKAN, F., YAMAN, A., KAYGUSUZ, A., LEBLEBİCİOĞLU, H., BALIK, İ., AYDIN, K., OTKUN, M. (1997). Widespread detection of PER–1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: A nationwide multicenter study. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 41: 2265–2269.
47. SHAHCHERAGHİ, F., ABBASALİPOUR, M., FEİZABADİ, M. M., EBRAHİMİPOUR, G. H., AKBARİ, N. (2011). Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran. Journal Microbiology*. 3 (2): 68-74.

48. WALTHER-RASMUSSEN, J., HOÏBY, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 57 (3): 373-383.
49. POÏREL, L., NAAS, T., NORDMANN, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 54 (1): 24-38.
50. TURTON, J. F., WOODFORD, N., GLOVER, J., YARDE, S., KAUFMANN, M. E., PÏTT, T. L. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal Clinical Microbiology*. 44 (8): 2974-296.
51. WANG, H., GUO, P., SUN, H., WANG, H., YANG, Q., CHEN, M., XU, Y., ZHU, Y. (2007). Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* from Chinese hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 51 (11): 4022-4028.
52. WOODFORD, N., ELLINGTON, M. J., COELHO, J. M., TURTON, J. F., WARD, M. E., BROWNC, S., AMYESC, S. G. B., LÏVERMORE, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *International Journal Antimicrobial Agents*. 27 (4): 351-353.
53. AFZAL-SHAH, M., WOODFORD, N., LÏVERMORE, D. M. (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27 molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45 (2): 583-588.
54. HÉRÏTIER, C., POÏREL, L., NORDMANN, P. (2005). Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49 (8): 3198-3202.
55. GÏR, D., KORTEN, V., ÜNAL, S., DESHPANDE, L. M., CASTANHEÏRA, 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.

56. VAHABOĞLU, H., BUDAK, F., KASAP, M., GACAR, G., TOROL, S., KARADENİZLİ, A., KOLAYLI, F., EROGLU, C. (2006). High prevalence of OXA-51-type class D b-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter spp.*: Co-existence with OXA-58 in multiple centres. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58: 537–542.

57. POİREL, L., NORDMANN, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology Infections* 12 (9): 826-836.

58. TSAKRİS, A., IKONOMİDİS, A., POURNARAS, S., TZOUVELEKİS, L. S., SOFİANOÜ, D., LEGAKİS, N. J., MANİATİS, A. N. (2006). VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*. 12 (6): 981-983.

59. ULUSOY-AL, M., MUMCUOĞLU, İ., AKSU, N., DOLAPÇI, İ., KARAHAN, Z. C., BARAN, İ., KURŞUN, Ş. (2011). İmipenem dirençli *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 41 (1): 29-36.

60. KAYAALP, S. O. (2009). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Aminoglikozidler. 12. Baskı. Ankara: Türkiye: Pelikan Yayıncılık. s.: 209-213.

61. WİLLKE-TOPCU, A. Aminoglikozidler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 294-303.

62. GÜR, D. (1996). Gram negatif bakterilerde aminoglikozid antibiyotiklere direnç ve aminoglikozidleri değiştirici enzimler. *Ankem Dergisi*. 10: 247-251.

63. KAYAALP, S.O. (2009). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Tetrasiklinler. 12. Baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık. s.: 167-187.

64. ÇALIK, N., AKOVA, M. (2007). Tigesiklin. *Ankem Dergisi*. 21 (Ek 2): 29-33.

65. LİVERMORE, D. M. (2005). Tigecycline: What is it, and where Should it be used? *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 56 (4): 611-614.

66. ÇOKÇA, F. Tetrasiklinler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 308-313.

67. RUIZ, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 1109-1117.

68. AKALIN, H. (2007). Kolistin. *Ankem Dergisi*. 21 (Ek 2): 26-28.

69. FALAGAS, M. E., KASIAKOU, S. K (2005). Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clinical Infection Diseases*. 40 (9): 1333-1341.

70. KAYAALP, S. O. (2009). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Sulfonamidler, Ko-trimaksazol ve Trimetoprim. 12. Baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık. s.: 239-241.

71. 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.

72. LOOVEREN, M. V., GOOSSENS, H. (2004). Antimicrobial resistance of *Acinetobacter spp.* in Europe. *Clinical Microbiology Infections*. 10: 684–704.

73. FIGUEIREDO, S., BONNIN, R. A., POIREL, L., DURANTEAU, J., NORDMANN, P. (2012). Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clinical Microbiology Infections*. 18 (9): 907-913.

74. LEE, K., LIM, Y. S., YONG, D., YUM, J. H., CHONG, Y. (2003) Evaluation of the hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metalloβ-lactamase producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *Journal Clinicial Microbiology*. 41: 4623-4629.

75. PAYNE, D. J., HUESO-RODRÍGUEZ, J. A., BOYD, H., CONCHA, N. O., JANSON, C. A., GILPIN, M., BATESON, J. H., CHEEVER, C., NÍCONOVICH, N. L., PEARSON, S., RITTENHOUSE, S., TEW, D., DÍEZ, E., PEREZ, P., FUENTE, J. D. L., REES, M., RÍVERA-SAGREDO, A. (2002). Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo- β -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 1880–1886.
76. PAYNE, D. J., CRAMP, R., BATESON, J. H., NEALE, J., KNOWLES, D. (1994). Rapid identification of metallo- and serine β -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 38: 991–996.
77. WALSH, T. R., BOLMSTRÖM, A., QWARNSTRÖM, A., GALES, A. (2002). Evaluation of new E test for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *Journal Clinical Microbiology*. 40 (8): 2755-2759.
78. SARI, H. (2005). Karbapenemlere dirençli Gram negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/ meropenem EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge test ile metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
79. MİGLIACCA, R., DOCQUIER, J. D., MUGNAIOLÌ, C. (2002). Simple microdilution test for detection of metallo- β -lactamase producing in *P. aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 4388-4390.
80. MOLAND, E. S., HANSON, N. D., HERRERA, V. I., BLACK, A. J. (2003). Plasmid –mediated carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 711-714.
81. ROBLEDO, I. E., AQUINO, E. E., SANTÉ, M. I., SANTANA, J. L., OTERO, D. M., LEÓN, C. F., VÁZQUEZ, G. J. (2010). Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* in Puerto Rico. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 54 (3): 1354-1357.
82. DURMAZ, R., (2009). Direnç gelişimini önlemede moleküler mikrobiyolojinin katkısı. *ANKEM Dergisi*. 23 (2): 111-115.

83. BIENDO, M., LAURANS, G., LEFEBVRE, J.F., DAOUDI, F. EB, F. (1999). Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using a combination of antibiotyping and ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2170-2175.
84. PANTOPHLET, R., NEMEC, A., BRADE, L., BRADE, H., DÍJKSHOORN, L. (2001). O-antigen diversity among *Acinetobacter baumannii* strains from the Czech republic and Northwestern Europe, as determined by Lipopolysaccharide-Specific Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2576-2580.
85. SEIFERT, H., SCHULZE, A., BAGINSKI, R., PULVERER, G. (1994). Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 82-86.
86. DÍJKSHOORN, L., MICHEL, M. F., DEGENER, J. E. (1987). Cell envelope protein profiles of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated in hospitals. *Journal of Medical Microbiology*. 23: 313-319.
87. BOO, T. W., WALSH, F., CROWLEY, B: (2009). Molecular characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter* species in an Irish University Hospital: Predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. *Journal of Medical Microbiology*. 58 (2): 209-216.
88. OLIVE, D. M., PRINCIPLES, P. B. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal Clinical Microbiology*. 37 (6): 1661.
89. GOUBY, A., NURIT, M. J. C., BOUZIGES, N., BOURG, G., MESNARD, R., BOUVET, P. (1992). Use of pulsed field gel electrophoresis for investigation hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *Journal Clinical Microbiology*. 30: 1588–91.
90. SEIFERT, H., GERNER-SMIDT, P. (1995). Comparison of ribotyping and pulsed field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *Journal Clinical Microbiology*. 33: 1402–1407.

91. NOLTE, F. S., CALIENDO, A. M. Mikroorganizmaların Moleküler Yöntemlerle Tespit Edilmesi ve Tanımlanması. *Manuel 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.: 218-244.

92. SEİFERT, H., DOLZANI, L., BRESSAN, R., REİJDEN, T., STRİJEN, B., STEFANİK, D., HEERSMA, H., DİJKSHOORN, L. (2005). Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 4328-4335.

93. MAXAM, A., GİBERT, W. (1977). A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 560-564.

94. SANGER, F., NİCKLEN, S., COULSON, A. R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 5463-5467.

95. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Twenty-Second Informational Supplement. USA. M100-S22.

96. CHAPIN, K. C., LAUDERDALE, T. L. Ayıraçlar, 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.

97. WİNN, 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.

98. www.eucast.org/

Erişim tarihi: 14/09/2012.

99. LEE, K., CHONG, Y., SHİN, H. B., KİM, Y. A., YONG, D., YUM, J. H. (2001). Modified hodge and EDTA-disk synergy tests to screen

metalloβactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *European Journal of Clinical Microbiology*. 7: 88-102.

100. FİDAN, İ., ÇETİN-GÜRELİK, F., YÜKSEL, S., SULTAN, N. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metalloβactamaz sıklığı. *ANKEM Dergisi*. 19 (2): 69-70.

101. BOU, G., CERVERO, G., DOMİNGUEZ, M. A., QUEREDA, C., MARTİNEZ-BELTRAN, J. (2000). PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology Infection*. 6: 635-643.

102. GRUNDMANN, H. J., TOWNER, K. J., DIJKSHOORN, L., GERNER-SMIDT, P., MAHER, M., SEİFERT, H., VANEECHOUTTE, M. (1997). Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 3071–3077.

103. TURTON, J. F., GABRİEL, S. N., VALDERREY, C., KAUFMANN, M. E., PİTT, T. L. (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*. 13: 807-815.

104. BİER, K. E. S., LUİZ, S. O., SCHEFFER, M. C., GALES, A. C., PAGANİNİ, M. C., NASCİMA, J., CARİGNANO, E. , COSTA, L. M. D. (2010). Temporal evolution of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *American Journal of Infection Control*. 38: 308-314.

105. AKATA, F., OTKUN, M., KULOĞLU, F., ERKAN, T., KESKİN, S., TUĞRUL, M. (2006). Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde nozokomiyal infeksiyon oranlarının değerlendirilmesi. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*. 10 (ek 1): 38.

106. ÇELİK, İ., ŞENOL, A., ESER-KARLIDAĞ, G., AKMİRZA-İNCİ, N. (2009). Fırat Üniversitesi Hastanesi 2006 yılı hastane enfeksiyonları surveyans sonuçları. *Fırat Tıp Dergisi*. 14 (4): 242-246.

107. AKSARAY, S., DOKUZOGUZ, B., GÜVENER, E., YÜCESOY, M., YULUĞ, N., KOCAGÖZ, S., ÜNAL, S., ÇETİN, S., ÇALANGU, S., GÜNAYDIN, M., LEBLEBİCİOĞLU, H., ESEN, Ş., BAYAR, B., WİLLKE, A., FINDIK, D., TUNCER, İ., BAYSAL, B., GÜNSEREN, F., MAMIKOĞLU, L. (2000). Surveillance study of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45: 695-699.

108. GÜNSEREN, F., MAMIKOĞLU, L., ÖZTÜRK, S., YÜCESOY, M., BİBEROĞLU, K., YULUĞ, N., DOĞANAY, M., SÜMERKAN, B., KOCAGÖZ, S., ÜNAL, S., ÇETİN, S., ÇALANGU, S., KÖKSAL, İ., LEBLEBİCİOĞLU, H., GÜNAYDIN, M. (1999). Surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43: 373-378.

109. AKIN, A., ESMAOĞLU-ÇORUH, A., ALP, E., GÜNAY-CANPOLAT, D. (2011). Anestezi yoğun bakım ünitesinde beş yıl içerisinde gelişen nozokomiyal enfeksiyonlar ve antibiyotik direncinin değerlendirilmesi. *Erciyes Tıp Dergisi*. 33 (1): 007-016.

110. CORBELLÀ, X., MONTERO, A., PUJOL M., DOMINGUEZ, M. A., AYATS, J., ARGERICH, M. J., GARRIGOSA, F., ARIZA, J., GUDIOL, F. (2000). Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 4086-4095.

111. ALP, E., ESEL, D., YILDIZ, O., VOSS, A., MELCHERS, W., DOĞANAY, M. (2006). Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream isolates in a Turkish University Hospital. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 38: 335–340.

112. CİSNEROS, J. M., BARIÓ, R. J. (2002). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, clinical features and treatment. *Clinical Microbiology Infection*. 8: 687–693.

113. TEKELİ, E., PALABIYIKOĞLU, İ. (2003). Yoğun bakım ünitesi enfeksiyonlarının dünü, bugünü, geleceği. *Flora dergisi*. 8: 171–199.

114. DEMİRTÜRK, N., DEMİRDAL, T. (2004). Antibiyotiklerde direnç sorunları. *Kocatepe tıp dergisi*. 5: 17–21.
115. ÇAYLAN, R. (2003). Çok ilaca dirençli hastane kökenli Gram negatif nonfermantatif bakteriler: Ülkemizdeki durum, tedavi ve kontrol politikaları. *Klimik dergisi*.16 (özel sayı): 18–20.
116. TATMAN-OTKUN, M., GÜRCAN, Ş., ÖZER, B., TÜRE, M. (2003). Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde 1994'den 2000'e yıllık antibiyotik direnç değişimi. *Ankem dergisi*. 17: 1–6.
117. KARAGÖL, Ç. (2008). Hastane kökenli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları ve imipenem dirençli izolatların genotiplemesi. Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
118. ZARAKOLU, P., HASÇELİK, G., ÜNAL, S. (2006). Antimicrobial susceptibility pattern of nosocomial Gram negative pathogens: Results from MYSTIC study in Hacettepe University adult Hospital (2000-2004). *Mikrobiyoloji Bülteni*. 40: 147-154.
119. MANİKAL, V. M., LANDMAN, D., SAURİNA, G., OYDNA, E., LAL, H., QUALE, J. (2000). Endemic carbapenem resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence,, interinstitutional spread and relation to antibiotic usage. *Clinical Infection Diseases*. 31: 101–106.
120. ZARRİLLİ, R., CRİSPİNA, M., BAGATTİNİ, M., BARRETTA, E., POPOLO, A. D., TRİASSİ, M., VİLLARİ, P. (2004). Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. *Journal Clinical Microbiology*. 946–953.
121. Pournaras, S., Markogiannakis, A., Ikonmidis, A., Kondyli, L., Bethimouti, K., Maniatis, A. N., Legakis, N. J., Tsakris, A. (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 557–561.

122. ANDRIAMANANTENA, T. S., RATSİMA, E., RAKOTONİRİNA, H. C., RANDRIANİRİNA, F., RAMPARANY, L., CAROD, J. F., RİCHARD, V., TALARMİN, A. (2010). Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 9: 17.
123. JESUDASON, M. V., KANDATHİL, A. J., BALAJİ, V. (2005). Comparison of two methods to detect carbapenemase and metallo-beta-lactamase production in clinical isolates. *Indian Journal Medical Research*. 121: 780-783.
124. ARAKAKWA, Y., SHİBATA, N., SHİBAYAMA, K., KUROKAWA, H., YAGI, T., FUJIWARA, H., GOTO, M. (2000). Convenient test for screening metallo-beta-lactamase producing Gram negative bacteria by using thiol compounds. *Journal Clinical Microbiology*. 38: 40-43.
125. YAN, J. J., WU, J. J., TSAİ, S. H., CHUANG, C. L. (2004). Comparison of the double disk combined disk and E-test methods for detecting metallo-beta-lactamases in Gram negative bacilli. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 49: 5-11.
126. HAWLEY, J. S., MURRAY, C. K., JORGENSEN, J. H. (2008). Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 52 (1): 351-352.
127. SESLİ-ÇETİN, E., TETİK, T., KAYA, S., CİCİOĞLU-ARIDOĞAN, B. (2011). Polimiksin B'nin imipeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı in-vitro aktivitesi. *ANKEM Dergisi*. 25 (2): 94-98.
128. HOLLOWAY, K. P., ROUPHAEL, N. G., WELLS, J. B., KİNG, M. D., BLUMBERG, H. M. (2006). Polymyxin B and doxycycline use in patients with multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infections in the intensive care unit. *Annals of Pharmacotherapy*. 40 (11): 1939-1945.
129. ÖZGÜR-AKIN, F. E., BAYRAM, A., BALCI, İ. (2010). Çoğul Dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında kolistin, polimiksin B ve tigesiklin

direncinin saptanmasında disk difüzyon, E-test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 44: 203-210..

130. SESLİ-ÇETİN, E., KAYA, S., TETİK, T., CİCİOĞLU-ARIDOĞAN, B. (2006). Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi*. 20 (4): 202-205.

131. LİU, P. Y. F., WU, W. L. (1997). Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 28: 19-28.

132. ÇALIŞKAN, A. (2008). *Acinetobacter*'lerde direnç ve klonal ilişkinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi.

133. AYGÜN, G. (2003). Yoğun bakım birimi infeksiyonlarında çevre şartlarının önemi. *Klimik Dergisi*. 16 (3): 106-107.

134. RELLO, J. (1999). *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. *Chest*. 115: 1226–1229.