



T.C.

DICLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII*
SUŞLARINDA BAZI KARBAPENEMAZLARIN
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. NİDA ÖZCAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR 2014



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII*
SUŞLARINDA BAZI KARBAPENEMAZLARIN
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. NİDA ÖZCAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. KADRİ GÜL

DIYARBAKIR-2014

ÖNSÖZ

Bu tez, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 12-TF-77 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım süresince, hoşgörü ortamı içerisinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Kadri GÜL'e, tez çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tuba DAL'a, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın diğer öğretim üyesi hocalarıma, beraber uyum içinde çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve mikrobiyoloji laboratuvar çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Küçük kalplerindeki kocaman anlayışları için kızım Hatice ve oğlum Yusuf'a, beni ve çocuklarımı hiçbir zaman yalnız bırakmayan, sevgi ve güvenlerine layık olmaya çalıştığım anne ve babama, her konuda desteğini hissettiğim eşime ve ablaları olmaktan gurur duyduğum kardeşlerime teşekkür ediyorum.

ÖZET

Son yıllarda karbapenemlerin de dahil olduğu çoklu ilaç direnci, *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı enfeksiyonların tedavisini oldukça zorlaştırmıştır. Çalışmamızın amacı, *A. baumannii*'nin antimikrobiyal duyarlılık paternini belirlemek ve karbapenem direncinin en önemli nedeni olan OXA tipi beta laktamaz genlerinin varlığını araştırmaktır.

Ekim 2012- Şubat 2013 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Hastaneleri yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen 80 *A. baumannii* izolatu konvansiyonel metodlar ve otomatize sistemle -BD Phoenix (Becton Dickinson, A.B.D)- tanımlandı; izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları otomatize sistem ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı. Moleküler yöntem olarak hyplex® CarbOxa ID (Amplex, Almanya) test sistemi kullanıldı. Bu sistem ile bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like} ve bla_{OXA-58-like} gen kümelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu ve elde edilen PZR ürünlerinin enzim bağımlı immünosorbent testi (ELISA) temelli bir sistemde spesifik oligonükleotid problemlerle hibridizasyonunu sağlandı. İzolatların tamamı kolistine duyarlıydı. Tigesiklin, netilmisin, amikasin, trimetoprim-sulfametoksazol, gentamisin ve sefaperazon sulbaktam duyarlılıkları sırasıyla %27.5, %22.5 %16.25, %12.5, %8.75 ve %5 olarak saptandı. İki izolatu levofloksasine orta duyarlı olduğu, izolatların tamamının ise test edilen diğer antibiyotiklere (ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, sefepim, seftriakson, sefotaksim, imipenem, meropenem, siprofloksasin) dirençli oldukları belirlendi.

A. baumannii'ye özgü olduğu kabul edilen bla_{OXA-51-like} genleri 77 (%96) izolatta, bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like} ve bla_{OXA-40 like} gen grupları sırasıyla 48 (%60), 12 (%15) ve 8 (%10) izolatta gösterildi. Kırk yedi (%21.25) izolatu bla_{OXA-51-like} ile bla_{OXA-23-like} genlerini, 10 (%12.5) izolatu ise bla_{OXA-51-like} ile bla_{OXA-58-like} gen gruplarını bir arada taşıdığı saptandı.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, karbapenem direnci, bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like}, bla_{OXA-40-like}

SUMMARY

In the last decades, multiple drug resistance, including carbapenems, made it difficult to treat infections due to *Acinetobacter baumannii*. We aimed to determine the antimicrobial susceptibility of *A. baumannii* and investigate the presence of OXA type beta lactamase genes admitted as the most important reasons of carbapenem resistance in *A. baumannii*.

Eighty *A. baumannii* strains isolated from intensive care units of Dicle University Hospitals between December 2012 and February 2013 were identified with conventional methods and automated microbiology system BD Phoenix (Becton Dickinson, USA). The antibiotics susceptibility tests of the isolates were performed with both automated system and disc diffusion method. The hplex® CarbOxa ID test system was used for amplification of bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like} and bla_{OXA-40-like} gene clusters by multiplex PCR and hybridisation of the polymerase chain reaction (PCR) products to specific oligonucleotide probes in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based system. All isolates (100%) were found to be susceptible to colistin while the susceptibility rates of tygecycline, netilmicin, amikacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin and cefoperazone-sulbactam were 27.5%, 22.5%, 16.25%, 12.5%, 8.75% and 5% respectively. Two strains showed intermediate susceptibility for levofloxacin while all of the isolates were resistant against any remaining tested antibiotics (ampicillin-sulbactam, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, imipenem, meropenem, ciprofloxacin).

Among 80 isolates, 77 (96.25%) of them were positive for bla_{OXA-51-like} genes which were consistently found and unique to *A. baumannii*. bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like} and bla_{OXA-40-like} genes were demonstrated in 48 (60%), 12 (15%) and 8 (10%) isolates respectively. Fortyseven isolates (58.75%) were positive for both bla_{OXA-51-like} and bla_{OXA-23-like} genes, while 10 (12.5%) isolates for both bla_{OXA-51-like} and bla_{OXA-58-like} genes.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, carbapenem resistance, bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like}, bla_{OXA-40-like}

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
Önsöz.....	i
Özet.....	ii
Summary.....	iii
İçindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	viii
Tablolar ve Şekiller.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	3
2.2. Acinetobacter Türlerinin Genel Özellikleri ve Tanımlanması.....	5
2.3. Patogenez ve Virulans.....	6
2.4. Epidemiyoloji.....	6
2.5. Acinetobacter Kaynaklı Enfeksiyonlar.....	7
2.5.1. Hastane enfeksiyonları.....	7
2.5.2. Ventilatör ilişkili pnömoni (VİP).....	8
2.5.3. Kan enfeksiyonları.....	8
2.5.4. Santral sinir sistemi enfeksiyonları.....	9
2.5.5. Üriner sistem enfeksiyonları.....	9
2.5.6. Yumuşak doku enfeksiyonları.....	9

2.6. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Tedavi.....	10
2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	10
2.7.1. Çoklu ilaç direnç mekanizmaları.....	11
2.7.2. İlaça özgü direnç mekanizmaları.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Gereçler.....	21
3.1.1. Besiyerleri.....	21
3.1.2. Kimyasallar ve ayıraçlar.....	22
3.1.3. Sarf Malzemeleri.....	25
3.2. Bakteri İzolatları.....	26
3.2.1 İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri.....	31
3.2.2. İzolatların konvansiyonel yöntemlerle tiplendirilmesi.....	33
3.2.3. Disk difüzyon testi ile antibiyotik duyarlılık tesbiti.....	34
3.3. Multiplex PZR ile Karbapenemaz Genlerinin Saptanması.....	38
3.3.1. Test sisteminin yapısı ve prensibi.....	38
3.3.2. Testin ön hazırlıkları.....	39
3.3.3. Örnek materyalin hazırlanması.....	40
3.3.4. Amplifikasyon reaksiyonu için karışım hazırlanması.....	40
3.3.5. Ters hibridizasyon.....	42

3.3.6. Testin değerlendirilmesi.....	45
4. BULGULAR.....	47
5. TARTIşMA.....	63
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	69
7.KAYNAKLAR.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADT: Antimikrobiyal duyarlılık testi

AK/AN: Amikasin (Oxoid / Becton Dickinson)

ATCC: American Type Culture Collection

BL/Bla: beta laktamaz

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi)

CIP: Siprofloksasin

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CN/GM: Gentamisin (Oxoid /Becton Dickinson))

CONJ: Konjugat

CRO: Seftriakson

CT/CL: Kolistin (Becton Dickinson/Oxoid)

ÇİD: çoklu ilaç dirençli

dATP: Deoksiadenozin trifosfat

dCTP: Deoksisitozin trifosfat

dGTP: Deoksiguanozin trifosfat

dTTP: Deoksitimidin trifosfat

ELISA: Enzyme linked İmmunosorbent Assay (Enzim bağımlı immunosorbent testi)

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EMB: Eozin metilen blue agar

FEP: Sefepim

GN: Gram negatif

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HE: Hastane enfeksiyonu

HYBBUF: Hibridizasyon tamponu

IPM: İmipenem
KKA: koyun kanlı agar
KVC: Kardiyovasküler Cerrahi
LEV/LVX: Levofloksasin (Oxoid / Becton Dickinson)
MHA: Mueller Hinton Agar
MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon
NET: Netilmisin
OMP: Outer membrane protein, Dış membran proteini
OXA: Oksasilinaz
PBP: penisilin bağlayan protein
PCR/PZR: Polimerase Chain Reaction / Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE: Pulse-field jel elektroforezi
RAPD: Rastgele amplifiye polimorfik DNA analizi
SAM: Ampisilin-Sulbaktam
SCF/SCP: Sefoperazon-sulbaktam (Oxoid/ Becton Dickinson)
SDS: Sodyum dodesil sülfat
SSC: Salin citrate buffer
STOP-H₃PO₄-%25: %25lik fosforik asit içeren durdurma solusyonu
STRGWASH: Zorlu yıkama solusyonu
SUBS-TMB: Tetrametilbenzidin substrat solusyonu
SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol
TGC: Tigesiklin
tRNA: Taşıyıcı ribonükleik asit
TSB: Tryptic soy broth
TSI: Triple Sugar Iron (Üç şekerli demirli besiyeri)
TZP: Piperasilin-tazobaktam

VİP: Ventilatör ilişkili pnömoni

WASHBUF: Yıkama tamponu

Y.B.Ü.: Yoğun bakım ünitesi

TABLolar VE ŞEKİLLER.....	Sayfalar
Tablo 2.1. Acinetobacter cinsine ait özel isim verilen türler.....	4
Tablo 2.2. Beta laktamazların sınıflandırılması.....	18-20
Tablo 3.1. Tüm <i>A. baumannii</i> izolatlarının soyutlandığı hastaların yaş, cinsiyet, yattığı klinik ve örnek özellikleri.....	26-30
Tablo 3.2. <i>Acinetobacter</i> izolatları için CLSI'nin önerdiği minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri	32
Tablo 3.3. <i>Acinetobacter</i> izolatları için CLSI'nin önerdiği disk difüzyon inhibisyon zon çapları.....	36
Tablo 3.4. Tigesiklin disk difüzyon inhibisyon zon çaplarının iki ayrı kritere göre değerlendirilmesi.....	37
Tablo 3.5. Hyplex CarbOxa ID test sisteminin hibridizasyon modülleri.....	39
Tablo 3.6. Amplifikasyon reaksiyonu için PZR thermocycler programı.....	42
Tablo 3.7. Ters Hibridizasyon işlem basamakları.....	46
Tablo 4.1. <i>A. baumannii</i> izolatlarının klinik materyallere göre dağılımı.....	47
Tablo 4.2. <i>A. baumannii</i> izolatlarının kliniklere göre dağılımı.....	48
Tablo 4.3. İzolatların elde edildiği tüm hastaların hastaneye yatış ve örnek alınma tarihleri ile yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süreler.....	49-52
Tablo 4.4. <i>A. baumannii</i> izolatlarının otomatize sistem ile saptanan antimikrobiyal duyarlılık paterni [n (%)].....	53
Tablo 4.5. Tigesiklin diski ile <i>A. baumannii</i> izolatlarında saptanan zon çaplarının iki kritere göre değerlendirilmesi [n (%)].....	54

Tablo 4.6. <i>A. baumannii</i> izolatlarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle saptanan antimikrobiyal duyarlılık paterni [n (%)].....	56
Tablo 4.7. <i>A.baumannii</i> izolatlarının her iki yöntemle çalışılan antimikrobiyal duyarlılık paterni [n (%)].....	57
Tablo 4.8. Tüm izolatların multiplex PZR ile saptanan <i>blaOXA</i> gen dağılımı...58-61	
Tablo 4.9. OXA betalaktamaz genlerinin kliniklere göre dağılımı.....	62
Tablo 5.1. Dicle Üniversitesi Hastaneleri’nde yıllara göre karbapenem direnci (%)63	
Tablo 5.2. <i>A. baumannii</i> ’de karbapenem direnç mekanizmaları.....	68
Resim 3.1. Hibridizasyon modülünde kullanılan kuyucuklar.....	42

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hastane enfeksiyonları, morbidite ve mortalitesinin yüksek olması, hastanede kalış süresini uzatması ve yüksek tedavi maliyeti nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur. Son yıllarda özellikle yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere hastane enfeksiyonlarında en sık izole edilen etkenlerin başında *Acinetobacter* cinsi bakteriler gelmektedir.

Moraxellaceae ailesinde yer alan *Acinetobacter* cinsi, hareketsiz, fermentasyon yapmayan gram olumsuz kokobasilleri içerir. Klinik olarak en sık karşılaşılan üç tür; *A. baumannii*, genomik tür 3 ve 13TU, genetik ve fenotipik olarak birbirine çok yakın olduklarından *A.baumannii- calcoaceticus* complex olarak adlandırılmışlardır.

1970’li yıllarda nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonları gentamisin, minosiklin, nalidiksik asit, ampisilin ve karbenisilin ile tek başına veya kombine kullanılarak kolayca tedavi edilmekteyken, yıllar içinde gittikçe artan oranlarda direnç görülmeye başlamıştır. Karbapenemler (imipenem, meropenem veya doripenem) çoklu antibiyotik dirençli *A.baumannii*’ye bağlı ciddi enfeksiyonların tedavisinde önemini korumaktadır. Amikasin, imipenem veya sefoperazonun florokinolonlarla kombinasyonları, kolistin, ampisilin, sefoperazon ve azitromisinin sulbaktamla kombinasyonları, polimiksin B ve kotrimoksazol, azitromisin ve rifampin diğer tedavi seçenekleridir.

A.baumannii’nin kendiliğinden mevcut ve kazanılmış direnç mekanizmaları arasında beta-laktamaz üretimi, aminoglikozidlere karşı modifikasyon enzimi üretimi, kinolonların bağlanma yerindeki değişiklikler, aktif atım pompası (eflux pump) ve hücre duvar kanallarındaki (porinler) değişiklikler yer alır. Bu direnç mekanizmalarının bir veya daha fazlasının bir arada olması kimi zaman tüm ilaçlara karşı olmak üzere yüksek düzeyde ilaç direncine yol açar.

Metallo-beta-laktamazlar ve oksasilinazları içeren karbapenem hidrolize eden beta-laktamazlar (karbapenemazlar) *A.baumannii*’de karbapenem direncinin ortaya çıkmasına önemli katkı sağlamaktadır. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında en sık

bildirilen oksasilinazlar; bla_{OXA-51}, bla_{OXA-58}, bla_{OXA-23} ve bla_{OXA-24/40} olarak belirtilmiştir.

Yoğun bakım ünitelerinde karbapenem kullanımının artması karbapeneme dirençli *A.baumannii*'nin hastane ortamında yayılımını kolaylaştırmaktadır. *A.baumannii*'nin karbapenem direncindeki artış kaygı vericidir. Hastanemizdeki direnç durumunu ve bunun genetik temelini saptamak yeni tedavi protokolleri geliştirmek açısından önemlidir.

Çalışmamızda, Ekim 2012 ile Mayıs 2013 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Hastaneleri'nin çeşitli klinik örneklerden izole edilen 80 *A. baumannii* izolatında fenotipik olarak çeşitli ilaç dirençlerini saptamayı ve multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile bu suşlarda oksasilinaz gen bölgelerini -bla_{OXA-51-like} bla_{OXA-23-like} bla_{OXA-58-like} bla_{OXA-40-like}- araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe ve Sınıflandırma

1800'lü yılların sonunda, morfolojik özelliklerine ilk dikkati çeken iki bilim adamının isimlerine ithafen "Morax-Axenfeld basilleri" olarak adlandırılan Acinetobacterler günümüze kadar birçok farklı isimle adlandırılmış, tanımlanmaları ve sınıflandırmaları oldukça karmaşık süreçlerden geçmiştir(1,2). Brisou ve Pre'vot 1954 yılında Yunanca hareketsiz anlamına gelen "Akinetos" sözcüğünden esinlenerek bu bakterilere 'Acinetobacter' adını vermişlerdir (3). 1968'de Baumann ve arkadaşları tarafından biyokimyasal ve morfolojik özellikleri ayrıntılı olarak ortaya konan Acinetobacterler, 1971'de *Moraxellaceae ailesi* içinde *Acinetobacter cinsi* olarak sınıflandırmadaki yerlerini almışlardır (1,4).

Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin (Centers for Disease Control and Prevention) (CDC) sınıflandırmasında *Acinetobacter* türleri nonfermentatif gram-negatif basiller içerisinde CDC Grup EO -5, CDC Grup NO -1 ve *Bordetella* türleri ile birlikte oksidaz negatif grup içerisinde yer alır (2).

Deoksiribonükleik asit (DNA) benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda 33 genomik tür tanımlanmıştır, 18 türe özel isim verilirken diğer türler isimlendirilememiştir (5). *Acinetobacter* cinsine ait isimlendirilen türler Tablo 2.1'de gösterilmiştir .

A. baumannii, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU, sakkarolitik özellikte olup oksidasyon-fermentasyon besiyerlerinde karbohidratların hepsinden asit oluşturmaktadır (3). *A. baumannii*, insan hastalıklarından sorumlu olan başlıca türdür. *Acinetobacter* genomik tür 3, ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU da insanlar için patojen olabilmektedir. Genellikle su ve topraktan izole edilen *A. calcoaceticus* insanlarda ciddi bir klinik hastalığa yol açmamaktadır (7,8). Fenotipik özellikleri açısından birbirlerine benzerlik gösterdiklerinden bu dört tür "A. *baumannii calcoaceticus kompleks*" adı altında toplanmışlardır (3).

Tablo 2.1. Acinetobacter cinsine ait özel isim verilen türler

<i>A. baumannii</i>
<i>A. calcoaceticus</i>
<i>A. haemolyticus</i>
<i>A. junii</i>
<i>A. johnsonii</i>
<i>A. iwoffii</i>
<i>A. radioresistens</i>
<i>A. ursingii</i>
<i>A. schindleri</i>
<i>A. parvus</i>
<i>A. baylyi</i>
<i>A. bouvetii</i>
<i>A. towneri</i>
<i>A. tandoii</i>
<i>A. tjernbergiae</i>
<i>A. gernerii</i>
<i>A. beijerinckii</i>
<i>A. gyllenbergii</i>

* Tabloda belirtilen türlere ek olarak çoklu suş içeren 26 adet isimlendirilmemiş grup ve en az 21 adet gruplandırılmamış tekli suş içeren türler bulunmaktadır.

2.2. Acinetobacter Türlerinin Genel Özellikleri ve Tanımlanması

Acinetobacter cinsi, fermentasyon yapmayan, gram negatif, hareketsiz, katalaz pozitif, oksidaz negatif basillerden oluşur. Mikroskopik olarak gram negatif kokobasil veya diplokok şeklinde görülen bu mikroorganizmalar, kan kültür şişelerinden ve taze kültürlerinden hazırlanan yaymalarda gram pozitif boyanabilirler. DNAz ve jelatinaz negatif, üç şekerli demirli besiyerinde asit oluşturmayan bakterilerdir. Oksidasyon fermentasyon besiyerinde glukoz oksidasyonu gösterir, triple sugar iron (TSI) besiyerinde fermentasyon yapmazlar(7). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan koyun kanlı agar (KKA), eozin-metilen blue (EMB) agar, triptik soy agar ve MacConkey besiyerlerinde kolay ürer, koyun kanlı agarda 0,5-2 mm çapında, şeffaf veya opak, zeminden kabarık koloniler oluştururlar (3).

Klinik ve çevre kültürlerinden bu bakterilerin izole edilmesinde kullanılabilen, 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 (7, 9) Dışkı gibi çeşitli mikroorganizmalarla kontamine örnekler ve az sayıda bakterinin bulunabileceği çevre ortamlarından alınan örnekler amonyum veya nitrat tuzları içeren çoğaltıcı sıvı mineral besiyerine ekilebilmekte, 24-48 saat sallanarak yapılan inkübasyon sonrası seçici besiyerine inoküle edilmektedir. (2, 7, 9).

“*A. calcoaceticus-A. baumannii complex*” üyeleri dışındaki türlerin çoğu (*Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter* genomik tür 6, 13BJ, 14BJ, 15BJ, 16 ve 17) koyun kanlı agarda hemoliz oluştururlar (3, 10). Acinetobacterler, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında geleneksel yöntemlerle, ayrıca karbon kaynaklarının asimilasyonu temeline dayanan yarı otomatize ve otomatize sistemlerle tanımlanmaktadır. Geleneksel yöntemlerle *Acinetobacter* tür ayrımı yapılırken glikoza oksidatif etki, hemoliz ve 44°C’de üreyebilme yeteneği değerlendirilir. Glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan izolatlar genellikle *A. baumannii*’dir. *A. baumannii* 44°C’de üreyebilme yeteneğiyle diğerlerinden ayırt edilebilir. Glukoz negatif kökenlerden hemoliz yapmayan *A. iwoffii*, hemoliz yapan

A. haemolyticus'dur. *A. johnsonii* diğer türlerden, 37°C'de üreyememesi nedeni ile ayırt edilebilir (11). *Acinetobacter* türleri ayrıca, bakteriyofajlarından, bakteriyosinlerinden, plazmid ve protein profillerinden yararlanılarak, multilokus enzim elektroforezi, 'pulse-field' jel elektroforezi (PFGE), polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), rastgele amplifiye polimorfik DNA analizi (RAPD) gibi yöntemlerle tiplendirilmektedirler (12).

2.3. Patogenez ve Virulans

Düşük ısı ve asidik pH'da üreyebilmesi, kuru ortamda uzun süre yaşayabilmesi ve kapsül içermesi *Acinetobacter*lerin yaşam süresini uzatan özellikleridir (13,14). L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşan kapsül bakteriyi fagositozdan korumasının yanı sıra hidrofilik özellik kazandırarak kateter, trakeal kanül gibi yüzeylere tutunmasını kolaylaştırır. Aerobaktin ve siderofor gibi demir tutucu dış membran reseptör proteinleri, bakteri üremesi için gerekli demiri sağlarken, hücre duvarı yapısındaki lipopolisakkarit yapı potansiyel toksik etkisiyle patojeniteyi artırır. Ayrıca antibiyotik direnci sağlayan PER-1 geninin virulansı arttırdığı ve daha ölümcül seyreden enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir (7, 13, 15,16).

2.4. Epidemiyoloji

Acinetobacter cinsine ait türlerin birçoğunun doğal ortamı çok iyi bilinmemektedir. Bu türler insanların klinik örneklerinden nadiren izole edilmekte ancak enfeksiyon kontrolü ve klinik öneminden dolayı *A.baumannii* kompleksine ait çoklu ilaç dirençli (ÇİD) izolatlarına dikkat edilmelidir (5).

Toprakta, su ve yiyeceklerde saprofit olarak yaşayabilen *Acinetobacter*ler, koltuk altı, kasık gibi nemli bölgeler başta olmak üzere derinin normal florasında, ağız boşluğunda, solunum yollarında, genitoüriner sistemde ve aşağı gastrointestinal sistemde bulunabilirler (7, 17 18). Sağlıklı insanların normal deri florasında kısa süreli düşük yoğunlukta bulunabilirken hastanede yatan hastalarda deri kolonizasyonunun %40'ın üzerinde olduğu bildirilmiştir(19). Normal populasyonda %7 oranında görülebilen farengal kolonizasyon, hastanede yatan hastalarda, salgın

döneminde %7-18, yoğun bakımda yatan trakeostomili hastalarda ise %45'e varan oranlarda bildirilmektedir (2,7)

Acinetobacter türleri hastane havası, buhar makinesi, musluklar, yatak kenarları, tansiyon aletleri, anjiyografi kateterleri ve mekanik ventilasyon cihazlarından izole edilmiş, günlerce canlı kalabildikleri gösterilmiştir (7, 14, 20) Nozokomiyal salgınlar sıklıkla solunum yolu ekipmanları ve hastane personelinin elleri ile olur. Mikroorganizma hastadan hastaya da geçebilir, kolonize ve enfekte hastalar *A.baumannii* için önemli rezervuardır (7, 21, 22).

Virülans potansiyelleri düşük olduğundan bağışıklık sistemi normal olanlarda enfeksiyon oluşturma olasılığı oldukça düşüktür (13). Uzun süre hastanede yatmak, cerrahiye takiben endotrakeal tüp takılması, intravasküler, ventriküler veya üriner kateter uygulaması, invaziv alet varlığı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, parenteral beslenme ve mekanik ventilasyon gibi işlemler *Acinetobacter* enfeksiyonları için risk faktörü oluşturmaktadır (7, 23).

2.5. *Acinetobacter* Kaynaklı Enfeksiyonlar

2.5.1. Hastane enfeksiyonları

A. baumannii genellikle hastane enfeksiyonlarına neden olur. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), hastane enfeksiyonunu (HE), hastanın hastaneye başvurduğu anda veya hastaneye yattığında henüz enkübasyon döneminde olmayan, hastaneden alınan mikroorganizmalara bağlı olarak daha sonra gelişen enfeksiyonlar olarak tanımlar. Hastane enfeksiyonları, hastanın yatışından en az 48-72 saat sonra gelişir. Dahili hastalarda taburculuğundan sonraki 10 gün, operasyon geçirenlerde 1 ay, protez takılanlarda ise 1 yıla kadar gelişen ilgili enfeksiyonlar HE olarak kabul edilir (24). Mortalite ve morbiditelerinin yüksek, ekonomik yüklerinin fazla olması ve bazı uygulamalarla %20-30 önlenebilir olması hastane enfeksiyonlarını önemli kılar (25).

2.5.2. Ventilatör ilişkili pnömoni (VİP)

Acinetobacter'ler, özellikle *A. baumannii* artık ülkemizde yoğun bakım servislerinde en sık izole edilen gram negatif enfeksiyon etkenleri arasındadır (26, 27).

A.baumannii mekanik ventilasyon gereken yoğun bakım ünitesi (YBÜ) hastalarında ventilatör ilişkili pnömoni (VİP)'ye neden olur. YBÜ'de uzun yatış süresi, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), ileri yaş, immünsupresif tedavi, cerrahi, antibiyotik kullanımı, endotrakeal tüp ve gastrik tüp gibi invaziv alet varlığı, alt solunum yollarının kolonizasyon veya enfeksiyon riskini arttıran faktörlerdir (28, 29) Mekanik ventilatör uygulanan hastaların % 28-85'inde ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) gelişme riskinin olduğu bildirilmiştir. (30) Hastane enfeksiyonları arasında en yüksek mortalite oranının VİP'ye (% 24-71) ait olduğu, özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. gibi dirençli etkenlerin neden olduğu VİP'lerde uygunsuz tedavi ile birlikte bu oranın % 91'e ulaşabileceği de bildirilmektedir (31).

2.5.3. Kan enfeksiyonları

Bakteriyemi sıklıkla hastaneye yatışın ikinci haftasında, pnömoni veya kateter enfeksiyonuna sekonder gelişir. Üriner sistem enfeksiyonları yaralar ve abdominal enfeksiyonlar daha az sıklıkta kaynak oluşturur (14). En sık rastlanan tür *A. baumannii*'dir, polimikrobiyal veya tek başına bakteriyemilere neden olabilir. Mortalite %17-46 arasında bildirilmekte, polimikrobiyal olgularda artarken *A. baumannii* dışındaki türlerle gelişen enfeksiyonlarda düşük seyretmektedir (14,32).

Bakteriyemisi olan yetişkin hastaların büyük çoğunluğunu, immün düşkün yaşlı hastalar oluşturur. Hastanın prognozunu genellikle altta yatan hastalıklar belirler. İmmün sistemi baskılanmış yaşlı hastalarda, malignitelerde ve yanıkta kötü olan prognoz, travma hastalarında daha iyi seyreder (33)

Acinetobacter bakteriyemisi için ikinci önemli hasta grubu yenidoğanlardır. Düşük doğum ağırlığı, mekanik ventilasyon, öncesinde antibiyotik kullanımı ve yeni

doğan konvülsiyonlarının varlığı septisemi için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (7).

2.5.4. Santral sinir sistemi enfeksiyonları

Primer menenjitli olgular bildirilmekle beraber sıklıkla, kafa travmasını takiben veya beyin cerrahisi uygulamalarından sonra *Acinetobacter* türlerine bağlı sekonder menenjit gelişebilir (7). Yoğun antibiyotik kullanımı, beş günden uzun süreli ventriküler kateter uygulamaları, ventrikülostomi, beyin omurilik sıvısı (BOS) kaçağı ve fistülleri, tanımlanan risk faktörleridir(32). Klinik olarak ense sertliğinin daha az görüldüğü menenjitte sıklıkla konvülsiyon ve mental durumda bozulma gözlenir (7). BOS bulguları pürülan menenjit lehinedir. Özellikle ÇİD A. baumannii menenjitlerinde mortalitenin %70lerin üzerine çıktığını bildiren yayınlar mevcuttur (34).

2.5.5 Üriner sistem enfeksiyonları

Yoğun bakımda yatan, sürekli üriner kateteri olan yaşlı hastalarda *Acinetobacter* türleri ile oluşan nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonları görülmektedir. İleri yaş erkek hastalarda prostat büyümesi nedeniyle kateter kullanımı sık olduğundan, bu grupta *Acinetobacter*'e bağlı üriner sistem enfeksiyonu daha sık görülür. Üriner kateteri olan hastalardan izole edilen her *Acinetobacter* türünün enfeksiyon etkeni olmayabileceği düşünölmeli; kolonizasyon göz ardı edilmemelidir (2, 7, 35).

2.5.6. Yumuşak doku enfeksiyonları

Deri bütönlüğünün bozulduğu yanık, travmatize yaralar, post operatif insizyon bölgeleri, damar içi kateterler, yoğun bakımda yatan ve immün sistemi bozuk hastalarda A. baumannii'ye bağlı yumuşak doku enfeksiyonlarına zemin hazırlar (7). Üriner kateterli hastalarda olduğü gibi, yara ve yanıktan izole edilen *Acinetobacter* türleri enfeksiyon etkeni veya kolonizan olabilir. Körfez Savaşı'nda yaralanan askerlerin post travmatik yaralarında *Acinetobacter* türleri enfeksiyon etkeni ve/veya kolonizan olarak izole edilmiştir (36).

Gözde lens kontaminasyonu sonrası konjonktivit, endotalmit, keratit, korneal ülserasyon ve perforasyon, sürekli periton dializi uygulanan hastalarda peritonit, perkütan safra drenajı sonrası kolanjit olguları bildirilmiştir (2, 7, 13). Ayrıca karaciğer ve pankreas apseleri, kemik iliği transplantasyonu sonrası osteomyelit ve septik artrit bildirilen nadir olgulardandır (2, 7).

2.6. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarında Tedavi

Acinetobacter türlerine etkili antibiyotikler; ampisilin- sulbaktam, amoksisilin- klavulanat, tikarsilin- klavulanat, piperasilin- tazobaktam, seftazidim, sefepim, meropenem, imipenem, kinolonlar, kloramfenikol, rifampisin, aminoglikozidler, trimetoprim- sülfametoksazol, doksisisiklin ve kolistin dir (7, 14). Ancak *A. baumannii*'nin, birçok antibiyotiğe direnç kazanmış olması, bu mikroorganizmaya bağlı enfeksiyonların tedavisini güçleştirir. ÇİD *A.baumannii* enfeksiyonlarında en etkili antibiyotikler karbapenemler, sulbaktam, kolistin ve tigesiklidir (7, 37-39).

Giderek artan ilaç direnci çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının kullanımını gündeme getirmiştir. Beta laktam grubu ilaçlarla aminoglikozid veya florokinolon kombinasyonlarının sinerjistik etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (40). İmipenem+aminoglikozid, seftazidim+aminoglikozid veya florokinolon, imipenem+siprofloksasin, sefoperozon+sulbaktam sıklıkla tercih edilen kombinasyonlardır (2, 7, 14, 41, 42). Tigesiklin-piperasilin tazobaktam kombinasyonu antagonist etki gösterirken tigesiklinin kolistin, amikasin, levofloksasin ve imipenemle kombinasyonu sinerjistik etki gösterir (43). Kombinasyon tedavilerinde in vitro sinerji testleri yol gösterici olabilir (44). Polimiksin dirençli suşlar bildirilmekle beraber çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* izolatları sıklıkla polimiksinlere duyarlıdır (45- 48)

2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı beraberinde antibiyotiklere dirençli bakteri izolatlarının artmasıyla sonuçlanır. *Acinetobacter* türlerine bağlı hastane enfeksiyonları 1970'lerin başlarına kadar gentamisin,

minosiklin, nalidiksik asit, ampisilin ve karbenisilinle tedavi edilebiliyordu. İlk olarak 1971 ve 1974 yılları arasında artan direnç oranları fark edildi ve 1975'ten günümüze dek yapılan çalışmalar *Acinetobacter* türlerindeki ilaç direnç artışını bildirmeye devam etmektedir (7, 49, 50).

Acinetobacter baumannii'de ilaç direnç mekanizmaları; çoklu ilaç direncinden sorumlu mekanizmalar ve antibiyotiklere özgü direnç mekanizmaları olmak üzere iki temel gruba ayrılabilir (50) *A.baumannii*'nin kendiliğinden mevcut ve kazanılmış direnç mekanizmaları sıklıkla beta-laktamaz üretimi, aminoglikozidlere karşı modifikasyon enzimi üretimi, kinolonların bağlanma yerindeki değişiklikler, aktif pompa ve hücre duvar kanallarındaki (porinler) değişikliklerdir. Bu direnç mekanizmalarının bir veya daha fazlasının bir arada olması kimi zaman tüm ilaçlara karşı olmak üzere yüksek düzeyde ilaç direncine yol açar.

2.7.1. Çoklu ilaç direnç mekanizmaları

Gram negatif (GN) bakterilerin membranları gram pozitiflere oranla daha kompleks bir yapıya sahiptir. Çoğunluğu hidrofilik özellikte olan beta-laktam grubu antibiyotikler lipid yapıdaki hücre mebranından ancak 'outer membrane protein' (OMP) adı verilen porlar yoluyla geçerek hücre içine girebilirler Beta-laktam antibiyotikler porin C ve porin F adlı 2 kanal aracılığıyla, imipenem, bunlara ek olarak D₂ proteini adı verilen özel bir porin aracılığıyla hücre içine girebilir (51). Porin F ve porin C proteinlerindeki mutasyon imipenem dışındaki beta-laktamlara dirençli kılarken özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* suşlarında dış membrandan D2 proteinin kaybı bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir (51-52).

Acinetobacter baumannii'nin ilaç direncinde, gerek TetA, TetB ve ChI gibi ilaca özgü pompa sistemlerinin gerekse çoklu ilaç direncine yol açan aktif ilaç pompa sistemlerinin önemli yeri vardır (10). *Escherichia coli*'deki AcrAB-TolC ve *P. aeruginosa*'daki MexAB-OprM çoklu direnç pompa sistemlerinin de bağlı olduğu RND protein ailesinin üyesi olan AdeABC (Ade ACINETOBACTER BAUMANNII- CALCOACETICUS COMPLEX pompa sistemi), *A. baumannii*'nin çoklu ilaç direncinde etkilidir (53-55). AdeABC pompası geniş bir substrat profiline

sahip olup farklı sınıftan birçok antibiyotiği, boyaları ve toksik bileşikleri, aktif olarak hücre dışına pompalayabilmektedir. AdeABC pompa sisteminin membran yerleşimli AdeB komponentinin yapısal düzeyde ekspresyonu, bakterinin doğal direncine katkıda bulunurken; yüksek düzeyde ekspresyonu çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasına yol açar (56).

2.7.2. İlaça özgü direnç mekanizmaları

Aminoglikozidler

Streptomisin ribozomun 30S alt ünitesine, diğer aminoglikozidler hem 30S hem de 50S alt ünitelerine bağlanarak, mRNA (mesajcı ribonükleik asit) daki genetik bilginin yanlış okunmasına yol açar, bakterinin protein sentezini durdurur veya yanlış protein sentezletir. Aerop gram-negatif basillere bakterisidal etki gösteren aminoglikozidlerin gram pozitif bakterilere etkisi kısıtlıdır. Antibiyotik konsantrasyonu arttıkça bakterisidal etki artar. Dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında kombine tedavide kullanılmaktadır (57).

Bakteriler, aminoglikozidlere karşı asetiltransferaz, fosfotransferaz ve nükleotidil transferaz gibi inaktive edici enzimlerle direnç geliştirebilirler. *Acinetobacter baumannii*'de genellikle kombinasyonlar halinde bulunan bu enzim grupları plazmidler, transpozonlar ya da sınıf-1 integronlarla bağlantılıdır (58). Bu genlerin ekspresyonu farklı aminoglikozidlere karşı değişken duyarlılıklara yol açar. Amikasin ve netilmisin sadece asetilazlar tarafından inaktive edildikleri, diğer enzimlere dirençli oldukları için aminoglikozidler içinde en geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahiptirler (59).

Tetrasiklinler

Yapılarında dört halka içeren karboksamid türevi bileşiklerdir. Bakteri hücresinde ribozomların 30S alt ünitesinde tRNA (taşıyıcı ribonükleik asit)nın bağlanacağı yere geri dönüşümlü bir şekilde bağlanarak protein sentezini durdururlar. Spiroketler, riketsiya, klamidya ve mikoplazma türleri dahil olmak üzere

gram-pozitif ve gram-negatif, aerop ve anaerop bakterilere etkili olan tetrasiklinler terapötik dozlarda bakteriyostatiktirler.

Tetrasiklin direnç mekanizmalarının en önemlileri eflux pompası ve ribozomun sitozolik proteinlerle korunmasıdır. Enzimatik inaktivasyon ve rRNA' (ribozomal ribonükleik asit) daki mutasyonlar da tetrasiklin direncinde rol oynar (60).

Tetrasiklin ailesinin yeni üyesi, bir glisilsiklin türevidir olan tigesiklin gram pozitif ve negatif bakterilere, ayrıca karbapenemaz üreten *Acinetobacter* suşlarına karşı etkili bulunmuştur. Komplike deri, yumuşak doku enfeksiyonları, intraabdominal enfeksiyonlarda etkili olan tigesiklinin idrarla atılımı düşük olduğu için üriner sistem enfeksiyonlarında kullanımı önerilmemektedir (61,62).

Kinolonlar

Bakterilerde DNA (deoksi-ribonükleik asit) replikasyonu için gerekli topoizomera II (DNA giraz) ve topoizomera IV ile etkileşime girerek DNA sentezini durdururlar. Konsantrasyona bağlı bakterisidal etkili kinolon grubu antibiyotiklerin gram pozitif ve gram negatif bakterilerdeki birincil hedefi farklıdır. Gram pozitiflerde birincil hedef topoizomera IV, gram-negatif bakterilerde ise DNA girazdır (63).

Dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarının kombine tedavisinde siprofloksasin ve levofloksasin kullanılmaktadır. Bakteriler, geçirgenlikte azalma, efluks pompa sistemleri, DNA-giraz ve topoizomera IV enzim mutasyonlarıyla kinolonlara karşı direnç geliştirebilir (64).

Beta-laktamlar

A. baumannii'ye karşı en etkili beta-laktam antibiyotikler seftazidim, piperasilin ve karbapenemlerdir (64). Beta-laktam antibiyotiklere karşı dört farklı mekanizma ile direnç gelişmektedir; antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi, penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklikler, efluks pompasının aktive olması ve beta-laktamaz enzimleriyle antibiyotiğin parçalanması. Beta-laktam

antibiyotiklerin β -laktam halkasındaki amid bağlarını parçalayarak antibakteriyel etkisini ortadan kaldıran enzimler beta-laktamaz olarak adlandırılır (65). Günümüze kadar tanımlanan 350 ye yakın beta-laktamaz enzimi biyokimyasal özellikleri substrat profilleri moleküler yapılarına göre farklı şekillerde sınıflandırılmıştır.

Bunlar arasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırılmaları kullanılmaktadır. Ambler beta-laktamazları moleküler yapılarına göre ayırırken, Bush, Jacoby ve Medeiros biyokimyasal özellikler ve substrat profillerine göre sınıflandırır. Ambler sınıflandırması göre:

Sınıf A: penisilinleri hidrolize eder, aktif bölgelerinde serin aminoasiti taşırlar.

Sınıf B: metallobetalaktamazlardır, aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektirir.

Sınıf C: sefalosporinazlardan oluşur, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanmaları nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılırlar.

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardan oluşur.

Bush, Jacoby ve Medeiros 1995 yılında biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre beta-laktamazları 4 gruba ayırmışlardır (66).

Grup 1: İndüklenebilir enzimlerdir. Birçoğu kromozomal enzimlerdir ancak plazmidlerce de kodlanan ve Enterobacteriaceae arasında transmisyon yoluyla aktarılabilmektedir Kromozomal AmpC enzimleri, plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 beta-laktamazları bu grupta yer alır. Salmonella dışında hemen tüm gram-negatif bakterilerde grup 1 beta-laktamazlar'lar bulunur. Moleküler olarak sınıf C' de yer alırlar. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz ederler. Sulbaktam ve klavulanik asitten etkilenmezken aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Karbapeneme duyarlıdırlar. Bu enzimler bakteri tarafından düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir penisilin ya da sefalosporin eklenmesiyle enzim sentezi indüklenir, birkaç yüz kat artış gösterebilir (67). İndükleyici beta-laktamın ortamdaki uzaklaşmasıyla sentez tekrar bazal düzeylere iner. Ancak doğada bu enzimleri sürekli yüksek düzeyde sentezleyen mutant suşlar

bulunur. Bu suşların enfeksiyonları sırasında indükleyici bir antibiyotik kullanılması duyarlı bakterilerin ortadan kalkması ve dirençli mutant suşların çoğalmasıyla sonuçlanır. Bu suşların hastane mikroflorasına yerleşmesi hastane enfeksiyonu epidemilerine yol açabilir (67,68).

Grup 2: Moleküler sınıf olarak A ve D'de yer alan bu grup; penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılır(69).

2a. Penisilini hidrolize eden, klavunat ile inhibe olan enzimler. *S. aureus*, *B. cereus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler bu gruptadır (66).

2b: Penisilin ve sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta-laktamazlardır (67). Enterobacteriaceae ailesinde yaygın olarak bulunan plazmid kontrolündeki “geniş spektrumlu” TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. Özellikle *E.coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan TEM-1 beta-laktamaz, Enterobacteriaceae üyelerinin yanı sıra *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunur. SHV-1 beta-laktamaz, *K.pneumoniae* suşlarında bulunur(70,71)

TEM-1, TEM-2, CARB-5, ve SHV-like enzimleri penisilinaz aktivitesi göstermektedirler. ACE-1, ACE-2, ACE-3 ve ACE-4 enzimleri ise sefalosporinaz ve bir miktar penisilinaz aktivitesine sahiptirler. Fakat aztreonam, seftazidim ve sefotaksimi hidrolize edici aktiviteleri yoktur. En güçlü aktiviteleri sefaloridin ve ACE-4 hariç sefradine karşı görülmektedir. ACE-1 en geniş etkili sefalosporinazdır.

2be: Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar olarak adlandırılan bu enzimler, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlere 1-4 aminoasit değişikliği ile geliştirilen yeni TEM- ve SHV- enzimleridir (70). *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında yaygın görülür. Seftazidim, seftriakson, sefotaksim ve aztreonam gibi geniş spektrumlu beta laktamlara etkili olup klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri olan PER-1 enzimi ilk kez Türkiye'den bildirilen bakteriyel suşlarda saptanmıştır (72,73).

2br: TEM-30 dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ile TRC-1 enzimini kapsar. Klavulanik asitten etkilenmeyen geniş spektrumlu beta-laktamazlardır.

2c: Karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimleri içerir. *Moraxella catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *Aeromonas hydrophilia*'nın ER-1enzimi, *V.cholerae*'nın SAR-1 enzimi ile PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları bu gruptadır.

2d: Oksasilini klasik penisilinlerden daha hızlı hidrolize etmelerinden dolayı oksasilinazlar olarak adlandırılan bu grup amoksisilin, metisilin, cefaloridin ve cefalotini hidrolize ederler. OXA23, OXA24, OXA58, OXA51 olarak 4 temel gruba ayrılırlar.

İlk olarak 1985'de Edinburgh'da bir kan kültüründen izole edilen imipenem dirençli bir *A.baumannii* izolatında gösterilen ARI-1 enziminin imipenem ve azlosilini hidrolize edebilirken sefuroksim, seftazidim ve sefotaksime etkisiz olduğu tespit edildi (74). Plazmid kaynaklı olduğu düşünülen ARI-1 enzimi daha sonra OXA-23 olarak isimlendirildi. OXA 23 ana grubunda OXA-27 ve OXA 49 subgrupları da bulunmaktadır. *Acinetobacter baumannii*'nin karbapenem direncinden sorumlu en sık mekanizma OXA-23 varlığıdır (75).

OXA24 grubu; OXA25, OXA 26, OXA 40 subgruplarını içermektedir. OXA24 ve OXA25 varyantları İspanya'da karbapenem dirençli *A. baumannii*'de bildirilmiştir. İlk olarak Fransa'daki bir salgın sırasında identifiye edilen OXA 58, İspanya, Romanya, İngiltere, İtalya, Arjantin, Avusturya, Türkiye ve Kuveyt gibi ülkelerden de bildirilmiştir. OXA-24 kromozomal kaynaklıyken, OXA23 ve OXA58 genlerinin bir kısmının plazmidten izole edildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (76). OXA-58'in *A. baumannii*'de eksprese olduğunda karbapenemlere duyarlılığı azaltıp, aşırı ekspresyon durumunda da yüksek karbapenem direncine yol açtığı bildirilmiştir (77).

A. baumannii türleri zayıf karbapenemaz aktivitesi gösteren kromozomal OXA-51 benzeri enzim kümesine ait doğal sınıf D oksasilinaz üretir. Bu enzim

kümesi üyeleri *A. baumannii*'nin hemen hemen tüm izolatlarında doğal yapı olmasına rağmen diğer Acinetobacter türlerinde bulunmaz (78,79)

2e: Klavulanik asitle inhibe olan sefalosporinazlardır (66).

2f: Karbapenemleri hidrolize eder, klavulanik asitle inhibe olurlar (66).

Grup 3c: Güçlü sefalosporinaz etkiye sahip olup karbapenemlere zayıf etkilidirler. Geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler dahil sefalosporinleri yüksek oranda hidrolize ederler. *Legionella gormanni*'nin metallo-beta-laktamaz enzimi bu gruptadır (80-81)

Grup 4: Klavulanik asitle inhibe olmayan penisilinazlardır. Yapıları ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir. *E.coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazı dışında hepsi kromozomaldır. *Alcaligenes faecalis*, *B.fragilis*, *C.jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi ve *Pseudomonas cepacia*'daki beta-laktamazlar bu gruptadır.

Hastane enfeksiyonlarında sorun olarak en sık karşılaşılanlar; Grup 1 kromozomal beta-laktamazlar, Grup 2 geniş spektrumlu beta laktamazlar ve Grup 3 beta-laktamazlarıdır. Bir bakteride birden çok direnç mekanizması, birden çok beta laktamaz enzimi olabilir. Kromozomal ve plazmid kökenli beta laktamazlar bazen bir arada bulunabilir.

Tablo 2.2. Beta laktamazların sınıflandırılması (82 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır)

Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması	Alt grup	Ambler sınıflaması	Temel özellikler
Grup 1 Sefalosporinazlar		C	Klavulanik asitle inhibe olmaz. Gram (-) bakterilerdeki kromozomal enzimler (AmpC) Karbapenem hariç tüm beta laktamlara dirençli
	1e	C	Seftazidime yüksek afinite
Grup 2 Penisilinazlar	2a	A	Gram (+) bakterilerdeki penisilinazlar
	2b	A	Gr (-) bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1) Ampisilin, tikarsilin, karbenisilin, sefalotine direnç
	2be	A	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM,SHV türevleri, PER-1, CTX-M..)2b'ye ek olarak seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam direnci

Tablo 2.2. (devamı): Beta laktamazların sınıflandırılması

Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması	Alt grup	Ambler sınıflaması	Özellikler
	2ber	A	TEM-50 2br'ye ek olarak seftazidim, sefotaksim, seftriakson, aztreonam direnci
	2c	A	PSE-1, CARB-3 Karbonisilini hidrolize eder
	2ce	A	RTG-4, CARB-10 2c'ye ek olarak sefepim, sefpiromu hidrolize eder
	2d	D	OXA-1,OXA-10 Oksasilin ve kloksasilini hidrolize eder
	2de	D	OXA-11, OXA-15 2d'ye ek olarak seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam direnci
	2df	D	OXA-23, OXA-48 2d'ye ek olarak karbapenem hidrolizi
	2e	A	CEP-A Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar

Tablo 2.2. (devamı): Beta laktamazların sınıflandırılması

Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması	Alt-grup	Ambler sınıflaması	Özellikler
	2f	A	KPC Karbapenem, seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam, sefamisin direnci
Grup 3 Metallo betalaktamazlar	3a	B	IMP, VIM Çinko bağımlı karbapenemazlar Metal iyonu şelatörleri ile inhibe olurlar Karbapenem hidrolizi yüksek Monobaktam hidrolizi zayıf Klavulanik asit ve tazobaktamla inhibe olmaz
Grup 4		-	Diğer gruplara girmeyen enzimler

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 01.02.2012/378 no'lu kararı uyarınca etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmamız, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 12-TF-77 numaralı proje ile destek sağlanarak Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, Ekim 2012 – Şubat 2013 tarihleri arasında izole edilen çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* izolatları ile gerçekleştirildi.

3.1. Gereçler

3.1.1. Besiyerleri

- %5 Koyun kanlı agar (RTA, Türkiye),
- Eozin Metilen Blue agar (EMB) (Oxoid, İngiltere),

Toz EMB'den 37 gr alınarak distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 1 atmosfer (atm) basınçta 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı. 50°C'ye soğutulup steril petrilere dökülerek kullanıma hazır hale getirildi.

- Triptik soy broth (Oxoid, İngiltere),

İzolatların saklanması için %16 gliserol içeren triptik soy broth besiyeri kullanıldı. 30 g triptik soy broth, 160 ml gliserol ve 840 ml distile suda eritildi. 1 atm basınç ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra 1.5 ml'lik ependorflara 1'er ml'lik hacimlerde bırakıldı.

- Mueller Hinton Agar (Oxoid, İngiltere),

Toz halindeki Mueller-Hinton Agar (MHA)'dan 38 gr alınarak distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilizasyon sağlandı, 50°C'ye soğutulduktan sonra kalınlığı 4 mm olacak şekilde steril petrilere döküldü.

- Triple Sugar Iron Agar (Üç Şekerli Demirli Besiyeri) (Oxoid, İngiltere)

Toz halindeki Triple Sugar Iron Agar (Oxoid, İngiltere) 65 gr tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7,4'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra steril cam tüplere dağıtıldı, yatık olarak katılaştırıldı.

- Kan kültürü vasatları (BD Bactec Plus Aerobic/F ve BD Bactec Peds Plus/F) (Becton Dickinson company, ABD),
- Bakteri identifikasyon (ID) ve Antimikrobial duyarlılık test (ADT) buyyon (Becton Dickinson company, ABD).

3.1.2. Kimyasallar ve ayıraçlar

Katalaz ayıracı: 1 ml %30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) (Sigma ABD) solusyonu 9 ml distile su ile karıştırılarak %3'lük H₂O₂ reaktifi hazırlandı. Reaktif 2-8°C'de bekletildi.

Kovacs ayıracı: N, N, N, N-Tetrametil-p-fenilenediamin hidroklorürün (Sigma ABD) distile sudaki %1'lik eriyiği hazırlandı. Eriyik 2-8°C'de bekletildi

Bakteri identifikasyon (ID) ve antimikrobiyal duyarlılık test (ADT) indikatörleri (Becton Dickinson Company, ABD)

Kullanılan antibiyotik diskleri

Ampisilin-sulbaktam (SAM, 10/10µg) (Oxoid,İngiltere)

Piperasilin-tazobaktam (TZP, 100/10µg) (Oxoid,İngiltere)

Tikarsilin-klavulanik asit (TIM, 75/10µg) (Oxoid,İngiltere)

Sefaperazon-sulbaktam (SCP, 105 µg) (Oxoid,İngiltere)

Seftazidim (CAZ, 30µg) (Oxoid,İngiltere)

Seftriakson (CRO, 30µg) (Oxoid,İngiltere)

Sefepim (FEP, 30µg) (Oxoid,İngiltere)

Gentamisin (CN, 10µg) (Oxoid,İngiltere)

Amikasin (AK, 30µg) (Oxoid,İngiltere)

Netilmisin (NET, 30µg) (Oxoid,İngiltere)

Siprofloksasin (CIP, 5µg) (Oxoid,İngiltere)

Levofloksasin (LEV, 5µg) (Oxoid,İngiltere)

Tigesiklin (TGC, 15µg) (Oxoid,İngiltere)

Trimetoprim-sülfametoksazol (SXT, 1.25/23.75µg) (Oxoid,İngiltere)

İmipenem (IPM, 10 µg) (Oxoid,İngiltere)

Meropenem (MEM, 10 µg) (Oxoid,İngiltere)

Kalite kontrol kökenleri

P. aeruginosa ATCC (American Type Culture Collection) 27853

E. coli ATCC 25922

E. Coli ATCC 35218

Polimerase Zincir Reaksiyonu (PZR) modülü için gerekli reagen seti (Amplex, Almanya)

Lizis buffer 60 ml (katalog no: 3950)

İşaretili oligonükleotid primer 240 µl

Nükleotid mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP içeren)120 µl

Pozitif kontrol 125 µl

Negatif kontrol 100 µl

Steril, iki kez distile edilmiş su (enjeksiyonluk distile su kullanıldı)

Hibridizasyon modülü (Amplex, Almanya)

Her bir kuyucuğunda, farklı OXA gen kümelerini ve *A. baumannii*' ye spesifik genleri saptamak için immobilize oligonükleotid problemleri içerir. Her gen grubu için farklı renklerde (kırmızı, mor, mavi, yeşil) 96'şar kuyucuktan oluşur.

MTS-BR-AB: *A. baumannii* (bla_{OXA-51-like})-kırmızı-96 kuyucuk

MTS-BR-O23: bla_{OXA-23-like} - mor-96 kuyucuk

MTS-BR-O40: bla_{OXA-40-like} - koyu yeşil-96 kuyucuk

MTS-BR-O58: bla_{OXA-58-like} - mavi-96 kuyucuk

MTS-BR-BLANK: reagen kontrol, renksiz-16 kuyucuk

HYBBUF (Hibridizasyon tamponu): Salin citrate buffer (SSC), sodyum dodesil sülfat (SDS) ve N-lauroylsarcosine içerir. 10ml

STRGWASH (Zorlu yıkama solusyonu): SSC ve SDS içerir. 100ml

WASHBUF (Yıkama tamponu): Fosfat tamponu, NaCl ve deterjan , koruyucu olarak da metilizotiazolon ve oxipiron içerir. 20 kat konsantre edilmiştir.

CONJ (Konjugat): 100 kat konsantre edilmiştir. Koruyucu olarak metilizotiazolon, dimetiaminoantipirin ve klorasetamid içerir.120µl

SUBS-TMB (Subtrat): Kullanılmaya hazır tetrametilbenzidin (TMB) substrat solusyonunu içerir.12 ml

STOP-H3PO4-%25 (Durdurma solusyonu): Kullanılmaya hazır, %25lik fosforik asit içerir. 12 ml

- Çalışmada kullanılan, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait cihazlar ise şunlardır:

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Hassas Terazı (Vibra, Japonya)

Multi-Blok Isıtıcı (Lab-Line, Japonya)

Veriti Termal Cyler (Applied Biosystems, İngiltere)

Biogüvenlik Kabini (JSR ,Japonya)

Etüv (Heraeus, Almanya)

Mikrotitre plate fotometre (450-620 nm arası) (Sunrise-Tecan, İsviçre)

Buzdolabı (-80°C) (Sanyo, Japonya)

Buzdolabı (-20°C) (Beko, Türkiye)

Buzdolabı (+2-+8°C) (Beko, Türkiye)

10, 100, 1000µl'lik pipetler (Eppendorf Research, ABD)

Metal özeler

3.1.3. Sarf Malzemeleri

10,100 1000µl'lik tek kullanımlık pipet uçları

PZR reaksiyon kapları (0.2ml'lik)

Tek kullanımlık plastik özeler

Tek kullanımlık 15 cm çaplı boş petri kutuları

Tek kullanımlık 9 cm çaplı petri kutuları

3.2. Bakteri İzolatları

Dicle Üniversitesi Hastaneleri'nin yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların (0-94 yaş aralığında) Ekim 2012- Şubat 2013 tarihleri arasında gönderilen klinik örneklerinden izole edilen, BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, MD, USA)

otomatize sistem ile *A. baumannii* olarak tanımlanan ve konvansiyonel yöntemlerle *A. baumannii* olduğu doğrulanan çoklu ilaç dirençli 80 izolat çalışmaya dahil edildi. Aynı hastaya ait mükerrer izolatlar çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya alınan izolatların özellikleri Tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1. Tüm *A. baumannii* izolatlarının soyutlandığı hastaların yaş, cinsiyet, yattığı klinik ve örnek özellikleri

No	Yaş	Cins	Hastanın yattığı klinik	Örnek
1	84	E	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü	Katater
2	78	K	Dahiliye Y.B.Ü.	Kan
3	62	K	Nöroloji.Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
4	39	E	Anestezi ve Reanimasyon Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
5	20	K	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
6	67	E	Dahiliye Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
7	0	K	Çocuk Hastalıkları Y.B.Ü.	Yara
8	57	E	Kardiyoloji Y.B.Ü.	Kan
9	86	E	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
10	76	K	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
11	50	E	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü	Trakeal aspirat
12	0	E	Çocuk Hastalıkları Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
13	26	E	Ortopedi ve Travmatoloji Y.B.Ü.	Yara

Tablo 3.1.(devamı) Tüm *A. baumannii* izolatlarının soyutlandığı hastaların yaş, cinsiyet, yattığı klinik ve örnek özellikleri

No	Yaş	Cins	Hastanın yattığı klinik	Örnek
14	40	E	Enfeksiyon Hastalıkları Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
15	1	K	Çocuk Cerrahisi Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
16	22	E	Anestezi ve Reanimasyon Y.B.Ü.	Katater
17	20	E	Plastik Cerrahi Y.B.Ü.	Yara
18	48	K	Dahiliye Y.B.Ü.	Kan
19	43	E	Dahiliye Y.B.Ü.	Kan
20	36	K	Kadın Hastalıkları ve Doğum Y.B.Ü.	Yara
21	47	E	Plastik Cerrahi Y.B.Ü.	Yara
22	64	E	Kardiyovasküler Cerrahi Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
23	38	K	Dahiliye Y.B.Ü.	Kan
24	88	E	Nöroloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
25	0	E	Çocuk Hastalıkları Y.B.Ü.	Kan
26	31	E	Nöroşirürji Y.B.Ü.	Katater
27	75	K	Kardiyoloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
28	12	E	Çocuk Cerrahisi Y.B.Ü.	İdrar
29	19	K	Genel Cerrahi Y.B.Ü.	Kan
30	62	K	Nefroloji Y.B.Ü.	İdrar

Tablo 3.1.(devamı) Tüm *A. baumannii* izolatlarının soyutlandığı hastaların yaş, cinsiyet, yattığı klinik ve örnek özellikleri

No	Yaş	Cins	Hastanın yattığı klinik	Örnek
31	75	E	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü	Trakeal aspirat
32	46	K	Kardiyoloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
33	65	E	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü	Trakeal aspirat
34	3	E	Çocuk Hastalıkları Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
35	25	E	Yanık Ünitesi Y.B.Ü.	Yara
36	94	K	Dahiliye Y.B.Ü..	Trakeal aspirat
37	26	K	Nefroloji Y.B.Ü.	Katater
38	52	K	Göğüs Hastalıkları ve Y.B.Ü	Kan
39	38	E	Genel Cerrahi Y.B.Ü.	Kan
40	54	E	Göğüs Hastalıkları ve Y.B.Ü	Kan
41	17	E	Anestezi ve Reanimasyon Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
42	15	K	Nöroşirürji Y.B.Ü.	Yara
43	58	K	Üroloji Y.B.Ü.	İdrar
44	80	E	Nöroloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
45	58	K	Nöroloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
46	29	E	Yanık Ünitesi Y.B.Ü.	Yara
47	20	K	Nefroloji Y.B.Ü.	Katater

Tablo 3.1. (devamı) Tüm *A. baumannii* izolatlarının soyutlandığı hastaların yaş, cinsiyet, yattığı klinik ve örnek özellikleri

No	Yaş	Cins	Hastanın yattığı klinik	Örnek
48	44	K	Dahiliye Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
49	83	K	Dahiliye Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
50	61	E	Nöroloji Y.B.Ü.	İdrar
51	24	K	Ortopedi ve Travmatoloji Y.B.Ü.	Yara
52	84	E	Nöroloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
53	87	K	Dahiliye Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
54	10	K	Yanık Ünitesi.Y.B.Ü.	Kan
55	78	E	Dahiliye Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
56	51	E	Genel Cerrahi Y.B.Ü.	Kan
57	2	E	Yanık Ünitesi.Y.B.Ü.	Yara
58	58	E	Nöroşirürji Y.B.Ü.	Katater
59	34	E	Anestezi ve Reanimasyon Y.B.Ü.	İdrar
60	84	K	Nöroloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
61	69	E	Kardiyoloji Y.B.Ü.	Kan
62	64	E	Dahiliye Y.B.Ü.	Kan
63	80	E	Nöroloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
64	53	K	Nöroloji Y.B.Ü.	Kan

Tablo 3.1. (devamı). Tüm *A. baumannii* izolatlarının soyutlandığı hastaların yaş, cinsiyet, yattığı klinik ve örnek özellikleri

No	Yaş	Cins	Hastanın yattığı klinik	Örnek
65	42	E	Nöroloji Y.B.Ü.	Kan
66	76	E	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü	Kan
67	4	E	Anestezi ve Reanimasyon Y.B.Ü.	Yara
68	0	K	Yenidoğan Y.B.Ü.	Katater
69	83	E	Genel Cerrahi Y.B.Ü.	Kan
70	0	K	Yenidoğan Y.B.Ü.	Katater
71	88	E	Dahiliye Y.B.Ü.	Kan
72	0	K	Yenidoğan Y.B.Ü.	Kan
73	0	E	Çocuk Hastalıkları Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
74	13	K	Çocuk Hastalıkları Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
75	39	E	Dahiliye Y.B.Ü.	Katater
76	82	K	Nöroloji Y.B.Ü.	Trakeal aspirat
77	91	K	Genel Cerrahi Y.B.Ü.	Kan
78	56	K	Genel Cerrahi Y.B.Ü.	Dren sıvısı
79	59	E	Nöroloji Y.B.Ü.	Katater
80	70	E	Göğüs Hastalıkları Y.B.Ü	Trakeal aspirat

Y.B.Ü: Yoğun bakım ünitesi

3.2.1. İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri

Laboratuvarımıza gelen idrar örnekleri %5 KKA ve EMB agara inoküle edilirken diğer örnekler ise %5 KKA, EMB agar ve çukolata agara inoküle edildi ve uygun koşullarda inkübe edildi. Kan kültür vasatına inoküle edilmiş olarak gönderilen kan örnekleri ise otomatize kültür sisteminde (BACTEC™ 9120 Blood Culture System) inkübe edildi. Üreme sinyali izlenildiğinde kan kültür vasatından alınan bir miktar örnek %5 KKA, EMB agar ve Sabouraud Dextroz agara (SDA) inoküle edildi ve $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16-24 saat inkübe edildi (83-85). Besiyerinde saf koloni şeklinde üreyen aerob, Gram negatif diplokok veya kokobasil morfolojisindeki bakterilere ait kolonilerin identifikasyonu yapıldı ve otomatize sistemle antibiyotik duyarlılık testleri çalışıldı.

Antibiyotik duyarlılık testleri için, CrystalSpec™ nefelometre kullanılarak ID buyyonu içerisinde yoğunluğu 0.5 McFarland standartına ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlandı. Böylece konsantrasyonu yaklaşık 1×10^8 CFU/ml olan bakteri süspansiyonundan, antimikrobiyal duyarlılık test buyyon tüpüne 25 µL ilave edildi. ADT buyyon içerisine bir damla Phoenix™ AST indikatörü damlatıldı. Bu paneller 35°C inkübasyon sıcaklığı sağlayan ve 20 dakikada bir analiz yapan Phoenix™ cihazına yerleştirildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları NMIC/ID-55 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix™ sistemi ile test edildi (86,87). Duyarlılık testlerinin sonuçları Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi. *Acinetobacter* izolatları için CLSI'nin önerdiği minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri tablo 3.2.'de gösterilmiştir (88).

A. baumannii olarak tiplendirilen çoklu ilaç dirençli izolatlar, çalışma yapıncaya kadar %16 gliserol içeren triptik soy buyyon besiyerinde -80°C 'de saklandı (89-90). En az üç antibiyotik sınıfının tipik antibiyotiklerine dirençli olan *A. baumannii* izolatları çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* olarak tanımlandı. Bu amaçla kullanılan antibiyotik sınıfları; aminoglikozidler (gentamisin, amikasin, netilmisin), antipseudomonal penisilinler (piperasilin, tikarsilin), karbapenemler (imipenem, meropenem), sefalosporinler (sefepim, seftazidim, seftriakson,

sefotaksim), kinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin) ve bunlara ek olarak kolistin, ampicilin/sulbaktam, sefaperazon-sulbaktam ve tetrasiklinler (tigesiklin) idi.

Tablo 3.2. *Acinetobacter* izolatları için CLSI'nin önerdiği minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri (89)

Antimikrobiyal	Duyarlı (µg/ml)	Orta duyarlı (µg/ml)	Dirençli (µg/ml)
Ampisilin-Sulbaktam	≤8/4	16/8	≥32/16
Piperasilin-Tazobaktam	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Seftazidim	≤8	15-19	≥32
Sefotaksim	≤8	15-19	≥32
Sefepim	≤8	15-19	≥32
Seftriakson	≤8	14-20	≥64
İmipenem	≤4	8	≥16
Meropenem	≤4	8	≥16
Gentamisin	≤4	8	≥16
Amikasin	≤16	32	≥64
Siprofloksasin	≤1	2	≥4
Levofloksasin	≤2	4	≥8
Trimetoprim-sulfametoksazol	≤2/38	-	≥4/76

3.2.2. İzolatların konvansiyonel yöntemlerle tiplendirilmesi

Stoklanmış bakteriler çalışılmadan önce iki kez pasajlandı. EMB agardaki ilk pasaj $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 20-24 saat inkübe edildi. Ardından, hemoliz ve 44°C 'de üreyebilme özelliklerini değerlendirmek amacıyla %5 KKA'a pasajlanarak $44\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 20-24 saat inkübe edildi. 44°C 'de üreyemeyen ve kanlı agarda hemoliz yapan izolatlar çalışmaya alınmadı. İzolatlarda katalaz ve oksidaz varlığı araştırıldı. TSİ agar ve hareket besiyerlerine ekim yapıldı.

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 H_2O_2 - damlatıldı. Steril öze ile alınan koloni lamin üzerinde ezilerek katalaz reaktifi ile karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif, görülmemesi ise negatif olarak değerlendirildi (91). Çalışmaya alınan izolatların tamamının katalaz pozitif olduğu gözlemlendi.

Oksidaz testi

Hazırlanan dimetil-p-fenilendiamin hidrokloridin saf sudaki %0.5-1'lik eriyiği ile ıslatılmış süzgeç kağıdının üzerine, besiyerindeki kolonilerden steril platin öze yardımıyla bir miktar sürüldü. 5-10 saniye içinde kolonilerin mor renge dönüşmesi pozitif, renk oluşmaması negatif sonuç olarak değerlendirildi (91). Çalışılan izolatlar renk değişimi göstermedikleri için oksidaz negatif olarak saptandı.

Üç şekerli demirli besiyerinin (TSİ) ekim yöntemi ve değerlendirilmesi

EMB besiyerinde tek düşen koloniye dokundurulan iğne öze ile alınan bakteriler TSİ besiyerinin önce dik kısmına batırılarak sonra yatık kısmının yüzeyinde zik zak çizilerek ekim yapıldı. Ekimler $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildi, fermantatif veya nonfermantatif olması incelendi (92). İzolatların hiçbirinde besiyerinde asit ortam oluşumu gözlenmedi, izolatlar non-fermenter olarak değerlendirildi.

Hareket testi

Sığır eti özütü (3 gr), pepton (10 gr), NaCL (5 gr) ve agar (4 gr), hacim 1000ml'ye tamamlanacak şekilde distile su içinde karıştırılarak eritildi. Hazırlanan besiyerinin pH'sı 7.0'ye ayarlandı, cam tüplere dağıtımı yapıp 1 atm. basınçta 121°C'de 15 dakika steril edildi. Bakteri kolonisinden steril iğne öze ile alınarak tüpteki besiyerine batırma ekimi yapıldı. 35±2°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası besiyerinde inokülasyon çizgisinden yanlara doğru bulanıklık görülmesi bakterinin hareketli olduğunu, yanlara doğru bulanıklık görülmemesi hareketsiz olduğunu düşündürdü. Çalışılan izolatların tamamı hareketsizdi.

Otomatize sistemle *A. baumannii* olarak tanımlanan, ardından konvansiyonel yöntemlerle; Gram negatif kok/kokobasil görünümde, 44°C'de üreyebilen, %5 koyun kanlı agarda hemoliz yapmayan, katalaz (+), oksidaz (-), hareketsiz ve TSİ besiyerinde fermentasyon yapmadığı saptanan izolatlar *A. baumannii* olarak değerlendirilerek çalışmamızın sonraki aşaması olan disk difüzyon testine geçildi.

3.2.3. Disk difüzyon testi ile antibiyotik duyarlılık tesbiti

Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılığı Kirby–Bauer disk difüzyon tekniği ile CLSI önerileri dikkate alınarak MHA'da yapıldı (88). Otomatize sistem panelinde olmayan tigesiklin, netilmisin ve sefoperazon-sulbaktam diskleri ile de çalışılarak izolatların bu antibiyotiklere direnç durumu belirlendi.

Kalite kontrol kökeni olarak *P. aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 27853, *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı (94). Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları için ayrıca *E. Coli* ATCC 35218 standart suşu kullanıldı (88).

Steril, tek kullanımlık, 15 ve 9 cm çaplı petri plaklarına 4 mm yükseklikte olacak şekilde Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) döküldü ve kullanılıncaya kadar +4°C'de bekletildi. Pasajlanan plaklarda saf koloni halinde üremiş olan bakteri kolonilerinden steril öze ile bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland bulanıklık sağlanacak şekilde süspanse edildi. Steril eküvyon ile bu

süspansiyondan MHA besiyeri üzerine yaygın ekim yapıldı. Plakların kuruması beklenecek şekilde üretici firmalardan sağlanan antibiyotik diskleri plaklara aplik edildi.

Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri; ampisilin-sulbaktam (SAM, 10µg/10µg), piperasilin-tazobaktam (TZP, 100/10µg), sefaperazon-sulbaktam (SCP, 105µg), seftazidim (CAZ, 30µg), seftriakson (CRO, 30µg), sefepim (FEP, 30µg), gentamisin (GN, 10µg), amikasin (AN, 30µg), netilmisin (NET, 30µg), siprofloksasin (CIP, 5µg), levofloksasin (LEV, 5µg), tigesiklin (TGC, 15µg), imipenem (IPM, 10µg), meropenem (MEM, 10µg) ve trimetoprim/sulfametaksazol (SXT, 1.25/23.75µg) (Oxoid, İngiltere) idi.

Her *Acinetobacter* kökeni için çapı 15 ve 9cm olan iki petri kutusu kullanıldı. 15cm'lik petri kutularının her birine 10 antibiyotik diski kenardan 15 mm, birbirinden 25–30 mm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirildi. 9cm'lik petri kutularının her birine 5 antibiyotik diski, kenardan 15 mm, birbirinden 25-30 mm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirildi. Petri kutuları 35–37°C' de, 18–24 saat inkübe edildikten sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar CLSI kriterlerine göre Tablo 3.3'de belirtildiği şekilde duyarlı (S), orta duyarlı (I) veya dirençli (R) olarak yorumlandı.

Netilmisin için CLSI kriterlerinde *Acinetobacter baumannii* izolatlarına yönelik disk difüzyon zon çapları belirlenmediğinden, EUCAST'da *Acinetobacter* türleri için belirlenen zon çapları esas alındı (93). Sefoperazon- sulbaktam disk difüzyon zon çapını değerlendirirken, CLSI'nin *P. aeruginosa* izolatlarında 75 µg Sefoperazon için belirlenen disk difüzyon zon çapları baz alındı (94). *Acinetobacter baumannii* izolatları için CLSI'nin önerdiği disk difüzyon zon çapları Tablo 3.2'de gösterildi (95). *Acinetobacter* türlerinde kolistin antimikrobiyal duyarlılığını saptamak için CLSI ve FDA, MİK değerlerinin esas alınmasını önermektedir. Biz de çalışmamızda, kolistin duyarlılığını otomatize sistemle saptanan MİK değerlerine göre belirledik.

Tablo 3.3. *Acinetobacter* izolatları için CLSI'nin önerdiği disk difüzyon inhibisyon zon çapları (95)

Antimikrobiyal	Duyarlı (mm)	Orta duyarlı (mm)	Dirençli (mm)
Ampisilin-Sulbaktam 10/10 µg	≥15	12-14	≤11
Piperasilin-Tazobaktam 100/10 µg	≥21	18-20	≤17
Seftazidim 30 µg	≥18	15-19	≤14
Sefepim 30 µg	≥18	15-19	≤14
Seftriakson 30 µg	≥21	14-20	≤13
İmipenem 10 µg	≥16	14-15	≤13
Meropenem 10 µg	≥16	14-15	≤13
Gentamisin 10 µg	≥15	13-14	≤12
Amikasin 30 µg	≥17	15-16	≤14
Siprofloksasin 5 µg	≥21	16-20	≤15
Levofloksasin 5 µg	≥17	14-16	≤13
Trimetoprim-sulfametoksazol 1.25/23.75µg	≥16	11-15	≤10
Netilmisin ⁽⁹³⁾ 30 µg	≥16		<16
Sefoperazon ⁽⁹⁴⁾ 75µg	≥21	16-20	≤15

⁽⁹³⁾ : EUCAST'ın *Acinetobacter* türleri için önerdiği inhibisyon zon çapları

⁽⁹⁴⁾ : CLSI'nin *P. aeruginosa* için belirlediği inhibisyon zon çapları

Tigesiklin için iki ayrı değerlendirme yapıldı. İlkinde FDA'nın *Acinetobacter* türleri için önerdiği tigesiklin duyarlılık zon çapları olmadığından, *Enterobacteriaceae* türleri için önerilen zon çapları (19 mm ve üstü duyarlı, 15-18 mm orta duyarlı, 14 mm ve altı dirençli) esas alınarak değerlendirildi (96). İkinci olarak; Jones'un *Acinetobacter* türlerinde disk difüzyon çaplarının yorumlanması için önerdiği kriterlere göre (16 mm ve üstü duyarlı, 13-15mm orta duyarlı, 12 mm'nin altı dirençli) yorumlandı (97). FDA ve Jones kriterlerine göre tigesiklin disk difüzyon zon çapları Tablo 3.4'de gösterildi.

Tablo 3.4. Tigesiklin disk difüzyon inhibisyon zon çaplarının iki ayrı kritere göre değerlendirilmesi

Kriter	S (mm)	I (mm)	R (mm)
FDA ⁽⁹⁶⁾	≥19	15-18	≤14
Jones ⁽⁹⁷⁾	≥16	13-15	≤12

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

⁽⁹⁶⁾: FDA'in *Enterobacteriaceae* türleri için önerdiği zon çapları

⁽⁹⁷⁾: Jones'un 2005 yılında *Acinetobacter* türlerinin disk difüzyon sonuçlarının yorumlanmasında önerdiği değerler

3.3. Multiplex PZR ile Karbapenemaz Genlerinin Saptanması

3.3.1. Test sisteminin yapısı ve prensibi

Hyplex CarbOxa ID test sistemi, OXA tipi karbapenemaz üreten bakterileri kalitatif yöntemle saptamaya yarayan in vitro tanı aracıdır. Bu sistem; bla_{OXA-51}, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-40} ve bla_{OXA-58} ailelerinin tüm tanımlanmış üyelerini saptar.

Hyplex CarbOxa ID PCR Modülü ile sağlanan amplifikasyon ürünleri, Hyplex CarbOxa ID Hibridizasyon Modülü ile spesifik oligonükleotid problemleriyle ters hibridizasyon yoluyla görünür hale gelirler.

PCR Modülü, örnek materyalden her PCR reaksiyonunda maximum on hibridizasyona yetecek kadar amplifikasyon ürünü sağlar.

Hibridizasyon Modülü, *A. baumannii*'ye spesifik genleri ve 3 farklı OXA ailesini kodlayan genleri saptamaya yönelik, her bir kuyucuğunda immobilize oligonükleotid problemlerinin olduğu 96'şar kuyucuğu ve reagenleri içerir. Örnek materyal, hyplex CarbOxa ID PCR modülü ile elde edilen amplifikasyon ürünleridir. Hibridizasyon modülündeki spesifik problemlerin listesi tablo 3.5.'de gösterilmiştir.

Hyplex CarbOxa PCR Modülü, tek bir PCR reaksiyonu ile farklı DNA bölgelerinin eş zamanlı spesifik amplifikasyonunu sağlayan işaretli oligonükleotid primerlerini içerir. Uygun DNA varlığında, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-40} ve bla_{OXA-58} benzeri ve *A. baumannii* spesifik genlerin (bla_{OXA-51}) amplifikasyon ürünleri sentezlenir, ardından Hyplex CarbOxa hibridizasyon modülü ile görünür hale gelir.

Bunun için, Hyplex CarbOxa PCR Modülü ile elde edilen amplifikasyon ürünleri, ısıyla denatüre edilip tek zincirli hale getirilir ve polistiren yüzeylerine spesifik problemler yapılandırılmış mikrotitrasyon plaklarına eklenir. Hibridizasyon tamponu kullanılarak tamamlayıcı dizilerin hibridizasyonu sağlanır ve ELISA prensibiyle saptanabilir. Birkaç zorlu yıkama basamağından sonra bir peroksidaz konjugatı eklenir. Konjugat, yüksek spesifikiteyle, oligonükleotid proba bağlanmış olan tek zincirli işaretli PCR ürününe bağlanır. İleri yıkama basamaklarından sonra, peroksidazla karşılaşınca mavi renk oluşturan TMB substrat solusyonu eklenir. Bu

reaksiyon, stop solusyonuyla durdurulur ve rengin sarıya dönüştüğü gözlenir. Kuyucukların renk değişimi, fotometrede, 450 nm'lik dalga boyunda ölçülür.

Pozitif sinyaller, belirli DNA dizilerinin spesifik amplifikasyonlarına, dolayısıyla incelenen örnekte ilgili genlerin olduğuna işaret eder.

Tablo 3.5. Hyplex CarbOxa ID test sisteminin hibridizasyon modülleri

Semboller	Spesifite	Kuyucuk rengi	Katalog numarası
MTS BR AB	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Kırmızı	3881
MTS BR O23	OXA-23 ailesi	Mor	3882
MTS BR O40	OXA-40 ailesi	Koyu yeşil	3883
MTS BR O58	OXA-58 ailesi	Mavi	3884

3.3.2. Testin ön hazırlıkları

Pozitif kontrol problemleri (+2- +8°C) dışında hyplex CarbOxa PCR modülü bileşenleri -20°C'de tutuldu. Reagenlerin çokca dondurulup çözümleri önlendi. İlk kullanımdan sonra çözüp dondurmadan sakınmak için 2-8°C'de bekletildiler ve üreticinin önerileri doğrultusunda 3 ay içinde kullanıldılar.

Hyplex CarbOxa ID Hibridizasyon modülleri 2-8°C'de, buzdolabında saklandı. Teste başlamadan önce yıkama tamponu, TMB substrat solusyonu, stop solusyonu ve içinde mikrotitre kuyucuklarının olduğu kapalı durumdaki hava sızdırmaz paket en az 30 dakika oda sıcaklığında (18-25°C) bırakıldı. Zorlu yıkama solusyonu 50°C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek ısıtıldı. Hibridizasyon tamponu ve konjugat, çalışma sırasında da soğuk tutulması gerektiğinden buzdolabında bekletildi.

Non-spesifik ürün oluşumunu minimuma indirmek için amplifikasyon reaksiyonlarının pipetajı temiz bir kabinde buz kalıbının üzerinde yapıldı ve reagenler içinde en son DNA polimeraz eklendi. Kontaminasyonu önlemek için uygun tek kullanımlık pudrasız eldivenler giyildi ve filtreli pipet uçları kullanıldı.

3.3.3. Örnek materyalin hazırlanması

Örnek materyal; izole edilmiş DNA, saf bakteri hücreleri veya olası enfekte klinik örnekler olabilir.

Bizim çalışmamızda, örnek materyal olarak bakteri hücreleri kullanıldı. Bunun için -80°C 'de stoklanmış bakteriler 2 kez pasajladıktan sonra her örnek için tek bir bakteri kolonisi $300\mu\text{l}$ hyplex Lysis Buffer (katalog no:3950) içinde suspense edildi. Bu suspansiyon 99°C 'ye ayarlı ısı bloğunda 10 dakika bekletildikten sonra 10.000 devirde 2 dakika santrifüjlendi ve $5\mu\text{l}$ süpernatant, amplifikasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere $200\mu\text{l}$ 'lik ependorflara aktarıldı.

3.3.4. Amplifikasyon reaksiyonu için karışım hazırlanması

Non-spesifik ürün oluşumu ihtimalini minimuma indirmek için temiz ve kapalı bir kabinde, tek kullanımlık pudrasız eldivenlerle çalışıldı, amplifikasyon reaksiyonu için hazırlanan karışıma en son DNA polimeraz eklendi ve işlem buz aküsü üzerinde gerçekleştirildi.

Amplifikasyon reaksiyonu için hazırlanan karışım için kullanılan kimyasallar:

x μl	Örnek materyal (Örn: 5 μl örnek lizatı veya 5 μl negatif /pozitif kontrol)
1 μl	Nükleotid mix (sarı kapaklı)
2 μl	Primer mix (yeşil kapaklı)
5 μl	10 \times PCR buffer
1 μl	DNA polimeraz (1 U)

50 µl'ye tamamlayacak kadar iki kez distile edilmiş su (Bunun için 36 µl steril enjeksiyonluk su kullanıldı.)

Karışımında kullanılacak kimyasal miktarı [örnek sayısı+1] ile çarparak belirlendi.

Şöyle ki:

11 örnek çalışıldığında 12×36 µl enjeksiyonluk su (432 µl)

12×5 µl PCR buffer (60 µl)

12×2 µl primer mix (24 µl)

12×1 µl nükleotid mix (12 µl)

12×1 µl DNA polimeraz (12µl) (12 U)

540 µl toplam karışım

Ependorflara aktarılmış olan her 5 µl'lik örnek materyal üzerine, hazırlanan amplifikasyon karışımından 45 µl eklendi. Toplam 50 µl'lik karışım içeren ependorflar PCR thermocycler cihazına yerleştirildi. Üreticinin önerileri doğrultusunda PCR thermocycler cihazı tablo 3.6'da gösterilen şekilde programlandı.

Amplifikasyon işlemi bittikten sonra ters hibridizasyon aşamasına geçilinceye kadar amplifikasyon ürünleri -20°C'de bekletildi.

Tablo 3.6. Amplifikasyon reaksiyonu için PZR thermocycler programı

Döngü sayısı	Isı [°C]	Zaman	Reaksiyon
1 kez	94	5 dakika	DNA'nın ilk denaturasyonu
35 kez	94	25 saniye	DNA denaturasyonu
	52	25 saniye	Primerlerin bağlanması
	72	20 saniye +1 sn/döngü veya 45 saniye	3'-OH ucundan primerlerin uzantısı
1 kez	72	3 dakika	Son uzantı

3.3.5. Ters hibridizasyon

Ön hazırlık ve test plaklarının yerleştirilmesi

Teste başlanmadan önce yıkama tamponu (washing buffer), TMB substrat solusyonu, stop solusyonu ve mikrotitrasyon kuyucukları buzdolabından çıkarıldı, 30 dakika bekletilerek oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı. Zorlu yıkama solusyonu, sıcaklığı 50°C olan etüvde bekletilerek 50°C'ye ısıtıldı.

4cc yıkama tamponu, 76cc steril distile su ile karıştırılarak 1/20 oranında seyreltildi.

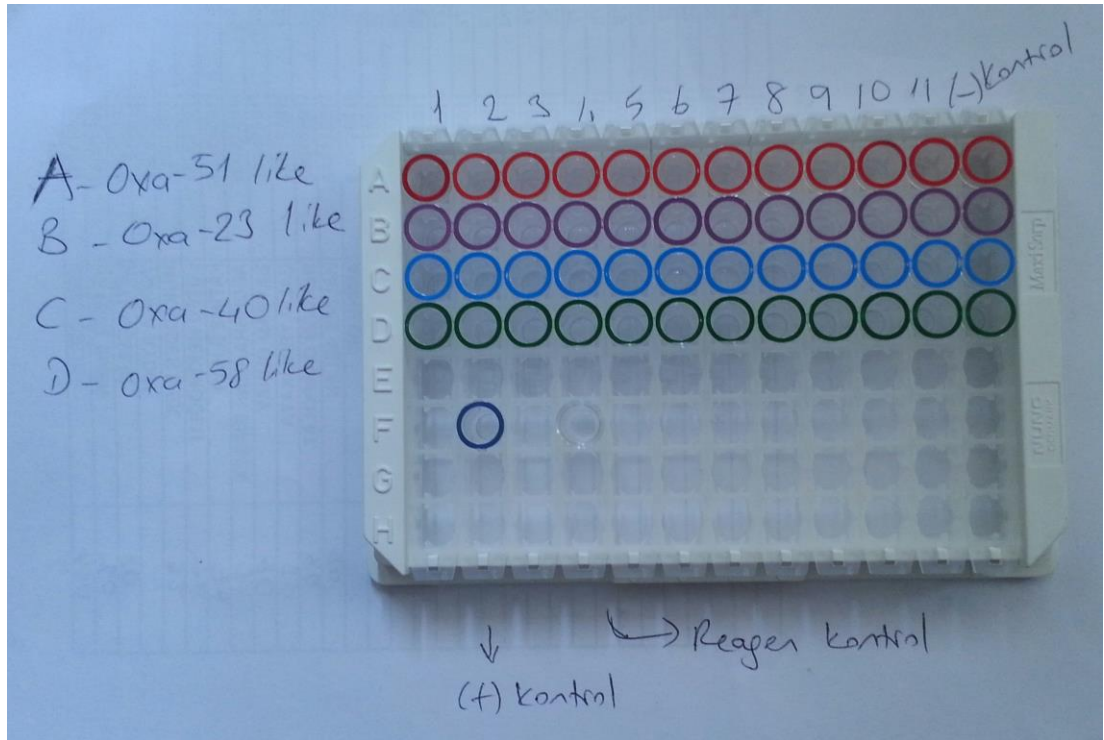
Çalışılacak örnek sayısı ve yapılacak testlere uygun olarak kuyucuklar birbirinden ayrıldı ve çerçeveye sıkıca yerleştirildi. 11 örnek materyalinin çalışıldığı testte; kuyucuklardan biri negatif kontrol kuyucuğu olmak üzere, her bir gen bölgesi için farklı renkte (kırmızı, mor, koyu yeşil ve mavi) 12'şer kuyucuk yerleştirildi.

Pozitif kontrol için koyu mavi renkte bir kuyucuk, reagen kontrol için renksiz bir kuyucuk yerleştirildi (resim1).

Kullanılmayan kuyucuklar, içinde kurutucu madde olan hava sızdırmaz paketlere konularak tekrar 2-8°C’de bekletildi.

Arka plan sinyal ölçümü için, her test grubuyla birlikte bir reagen kontrol kuyucuğu kullanıldı. 50 µl hibridizasyon tamponunun eklenmesinden sonraki tüm basamaklar reagen kuyucuğu için de uygulandı.

Bir sporun üzerine, her örnek için bir adet, pozitif ve negatif kontroller için de birer adet 1000µl’lik steril ependorf yerleştirildi ve numaralandırıldı. Bu ependorflar, hibridizasyon solusyonuyla PZR ürünlerinin karıştırılması için kullanıldı.



Resim 3.1. Hibridizasyon modülünde kullanılan kuyucuklar.

11 örnek + negatif kontrol için her gen grubundan birer kuyucuk (kırmızı: *bla*_{OXA-51-like}, mor: *bla*_{OXA-23-like}, mavi: *bla*_{OXA-40-like}, yeşil: *bla*_{OXA-58-like}), pozitif kontrol için bir kuyucuk (koyu mavi), reagen kontrol için renksiz kuyucuk yerleştirildi.

PZR örneğinin hazırlanması ve hibridizasyon işlemi

Amplifikasyon işlemiyle elde edilen 50 µl'lik reaksiyon karışımları, ısıtılmış kapaklı bir thermal cycler'da 95°C'de 10 dakika bekletilerek denatüre edildi.

Spor üzerine yerleştirilmiş ependorflara, her örneğin PZR yığınının kuyucuk başına 5 µl, soğuk (2-8°C) hibridizasyon solusyonundan da 50'şer µl eklendi, iyice karıştırıldı ve hızlıca ilgili kuyucuklara 50 µl dağıtıldı.

Şöyle ki:

1 numaralı örnek için: $5 \times 4 = 20$ µl PZR yığını, $50 \times 4 = 200$ µl hibridizasyon solusyonu ile karıştırıldı. Bu karışımdan, 1 numaralı örneğe ait 4 kuyucuğın, (kırmızı, mor, koyu yeşil ve mavi) her birine 50'şer µl eklendi.

Pozitif kontrol PZR yığınının 5µl, 50 µl hibridizasyon solusyonuyla karıştırıldı. Pozitif kontrol kuyucuğuna (koyu mavi) bu karışımdan 50 µl eklendi.

Negatif kontroller için, $5 \times 4 = 20$ µl negatif kontrol PZR yığını, hibridizasyon solusyonundan $50 \times 4 = 200$ µl ile ependorf içinde karıştırıldı. Bu karışımdan 4 kuyucuğa (kırmızı, mor, koyu yeşil ve mavi) 50'şer µl eklendi.

Hibridizasyon karışımları eklenen mikrotitrasyon plakları, solusyonun buharlaşmaması için üzeri kapatılarak 50°C'de, 30 dakika inkübe edildi.

Zorlu yıkama için kuyucuklar tamamen boşaltıldı ve 200 µl zorlu yıkama solusyonuyla 3 kez yıkandı.

Her yıkama basamağından sonra zorlu yıkama solusyonun tamamen giderilmesi sağlandı.

Son yıkama basamağından sonra plak bir kağıt havlu üzerine ters bırakılarak kuyucuklarda sıvı artığı kalmaması sağlandı.

Konsantre yıkama tamponu 1/20 oranında deiyonize su ile dilüe edildi. Dilüe edilen yıkama tamponu oda sıcaklığında 1 haftaya kadar bekletilebilir. Biz de seyreltirken 4 cc konsantre yıkama tamponunu 76 cc deiyonize su ile karıştırdık.

Kuyucuklar 1 kez oda sıcaklığındaki 200 µl yıkama tamponuyla yıkandı.

Peroksidaz konjugatı ile inkübasyon için konjugat solusyonu üretici firmanın önerisi doğrultusunda her çalışmada taze olarak hazırlandı. Temiz bir kapta, kuyucuk başına 1 µl konsantre konjugat solusyonu ile 100 µl dilüe edilmiş yıkama tamponu karıştırılarak 1+100 lük bir dilüsyon sağlandı. Her kuyucuğa bu dilüsyondan 100 µl eklendi ve 30 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi.

Kuyucuklar boşaltıldı. Her kuyucuk, oda sıcaklığında 3 kez 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama sonrası yıkama tamponunun tamamen giderilmesine dikkat edildi.

TMB substrat solusyonu kullanıma hazır şekilde üretilmiştir. Her kuyucuğa bu solusyondan 100 µl eklendi ve ışık almayacak bir şekilde oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi ilk kuyucuğun pipetajı ile başlatıldı.

Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl stop solusyonu eklendi. Pipetaj işleminde TMB substratın pipetleme sırasına uyuldu.

Kuyucuklardaki sönme olayı, mikrotitrasyon plak fotometre ile 450 nm'de, 620-650 nm referans aralıklarıyla ölçüldü. Sıfır karşılaştırma havaya karşı yapıldı. Ölçüm, reaksiyon durdurulduktan sonraki ilk 60 dakika içinde gerçekleştirildi.

Ters hibridizasyon işlem basamakları tablo 3.7.'de özetlendi.

3.3.6. Testin değerlendirilmesi

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, testin değerlendirilebilmesi için;

Reagen kontrol sönme değeri ≤ 0.200

Negatif kontrol sönme değeri ≤ 0.200

Pozitif kontrol sönme değeri ≥ 1.500 olarak ölçüldü.

Çalışmamızda, örnek materyal olarak saf kültürden elde edilen bakteri hücreleri kullanıldı. Bu durumda, üreticinin önerileri doğrultusunda analitik kriter olarak:

≥ 0.400 değerleri pozitif,

≤ 0.200 değerleri negatif kabul edilirken,

0.200- 0.400 arasındaki değerler sınır değer sayılarak tekrar çalışıldı.

Tablo 3.7. Ters Hibridizasyon işlem basamakları

Dilüsyonlar		
Yıkama tamponu solusyonu	<i>1+19 deiyonize su ile</i>	Kuyucuk başına 0.05 ml+0.95 ml
Konjugat dilüsyonu	1+100 dilüe yıkama solusyonu ile	Kuyucuk başına 1µl + 100 µl
Test basamakları		
Denaturasyon	PCR reaksiyon ürünü	95°C'de 10 dakika
Örneklerin dilüsyonu	50 µl hibridizasyon solusyonuna PCR reaksiyon ürünü eklenir	5 µl
Hibridizasyon	Kuyucuk başına 50 µl	50°C ±1°C'de 30 dakika
Zorlu yıkama	Kuyucuk başına 200 µl	3 kez
Yıkama	Kuyucuk başına 200 µl	1 kez
Konjugat inkübasyonu	Kuyucuk başına 100 µl	Oda sıcaklığında 30 dakika
Yıkama	Kuyucuk başına 200 µl	3 kez
Substrat inkübasyonu	Kuyucuk başına 100 µl	Oda sıcaklığında 15 dakika
Durdurma	Kuyucuk başına 100 µl stop solusyonu ile	
Fotometrik ölçüm	450/620nm	

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 80 izolattın, 46 (%57.5)'sı erkek, 34 (%42.5)'ü kadın hastalara aitti. Hastaların ortalama yaşı 46.44 ± 28.79 , yaş aralığı 0-94 olarak hesaplandı. İzolatların 32 (%40)'si trakeal aspirat, 21 (%26.25)'i kan, 11 (%13.75)'i yara sürüntüsü, 10 (%12.5)'u kateter sürüntüsü, 5 (%6.25)'i idrar ve 1 (%1.25)'i dren sıvısından izole edildi. İzolatların klinik materyallere göre dağılımı Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. A. baumannii izolatlarının klinik materyallere göre dağılımı

Klinik materyal	Trakeal aspirat	Kan	Yara	Katater	İdrar	Dren	Toplam
Sayı (n)	32	21	11	10	5	1	80
Oran (%)	40	26.25	13.75	12.5	6.25	1.25	100

İzolatların elde edildiği hastaların tamamı yoğun bakımda yatan hastalardı. Dahiliye, nöroloji, göğüs hastalıkları, genel cerrahi ve kardiyoloji yoğun bakım ünitelerinden sırasıyla 13, 12, 11, 6 ve 4; çocuk hastalıkları, yenidoğan ve çocuk cerrahisi yoğun bakım ünitelerinden ise sırasıyla 6, 3 ve 2 hastadan elde edilen *A. baumannii* izolatu çalışmamızda kullanıldı. Yanık ünitesi, nöroşirürji, plastik cerrahi, ortopedi yoğun bakımlarından sırasıyla 4, 3, 2, 2; üroloji, enfeksiyon hastalıkları, kardiyovasküler cerrahi, ve kadın doğum kliniklerinin yoğun bakımlarından ise 1'er hastanın izolatu çalışıldı. İzolatların elde edildiği hastaların kliniklere göre dağılımı Tablo 4.2'de özetlenmiştir

Tablo 4.2. A. baumannii izolatlarının kliniklere göre dağılımı

Klinik	Sayı (n)	Oran (%)
Dahiliye YBÜ	13	16.25
Nöroloji YBÜ	12	15.00
Göğüs Hastalıkları YBÜ	11	13.75
Genel Cerrahi YBÜ	6	7.50
Çocuk Hastalıkları YBÜ	6	7.50
Anestezi YBÜ	5	6.25
Kardiyoloji YBÜ	4	5.00
Yanık Ünitesi YBÜ	4	5.00
Nöroşirürji YBÜ	3	3.75
Yenidoğan YBÜ	3	3.75
Nefroloji YBÜ	3	3.75
Ortopedi YBÜ	2	2.50
Plastik Cerrahi YBÜ	2	2.50
Çocuk Cerrahisi YBÜ	2	2.50
Enfeksiyon Hastalıkları YBÜ	1	1.25
Kardiyovasküler Cerrahi YBÜ	1	1.25
Kadın Hastalıkları YBÜ	1	1.25
Üroloji YBÜ	1	1.25
Toplam	80	100

Y.B.Ü: Yoğun bakım ünitesi

Hastane enfeksiyonunu (HE), hastanın hastaneye başvurduğu anda veya hastaneye yattığında henüz enkübasyon döneminde olmayan, hastaneden alınan mikroorganizmalara bağlı olarak daha sonra gelişen enfeksiyonlar olarak tanımlanır

ve hastanın yatışından en az 48-72 saat sonra gelişir. Sağlıklı insanda deri kolonizasyonu kısa süreli ve geçiciyken hastanede yatan hastalarda kolonizasyon %40'ı geçebilir. Sağlıklı insanda farengal kolonizasyon %7 olarak saptanmışken trakeostomili hastalarda %45'lere çıkabilir. Çalışmaya dahil edilen hastaların hastaneye yatışları ile örnek alınma zamanları, hastaneye yattıktan ne kadar sonra Acinetobacter baumannii'ye bağlı enfeksiyon geliştiği tabloda 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. İzolatların elde edildiği tüm hastaların hastaneye yatış ve örnek alınma tarihleri ile yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süreler

No	Hastaneye yatış tarihi	Örnek alınma tarihi	Yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süre (gün)
1	02.10.2012	16.10.2012	12
2	30.09.2012	11.10.2012	11
3	29.08.2012	16.10.2012	49
4	02.10.2012	10.10.2012	8
5	20.10.2012	28.10.2012	8
6	21.10.2012	01.11.2012	11
7	13.09.2012	11.02.2012	161
8	29.09.2012	22.10.2012	23
9	16.10.2012	20.10.2012	4
10	02.11.2012	06.11.2012	4
11	02.11.2012	09.11.2012	7
12	31.10.2012	05.11.2012	5
13	30.10.2012	12.11.2012	13
14	31.10.2012	05.11.2012	5
15	15.11.2012	19.11.2012	4
16	22.10.2012	19.11.2012	28
17	17.11.2012	23.11.2012	6

Tablo 4.3. (devamı) İzolatların elde edildiği tüm hastaların hastaneye yatış ve örnek alınma tarihleri ile yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süreler

No	Hastaneye yatış tarihi	Örnek alınma tarihi	Yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süre (gün)
18	08.11.2012	21.11.2012	13
19	17.11.2012	22.11.2012	5
20	18.11.2012	25.11.2012	7
21	19.10.2012	26.11.2012	38
22	21.11.2012	26.11.2012	5
23	15.11.2012	24.11.2012	9
24	19.11.2012	27.11.2012	8
25	01.10.2012	03.12.2012	63
26	15.11.2012	06.12.2012	21
27	13.11.2012	06.12.2012	23
28	22.11.2012	27.11.2012	5
29	18.11.2012	05.12.2012	27
30	24.11.2012	11.12.2012	17
31	04.12.2012	03.01.2013	33
32	07.12.2012	24.12.2012	17
33	07.02.2012	01.03.2013	20
34	22.10.2012	20.12.2012	59
35	21.12.2012	25.12.2012	4
36	23.12.2012	13.01.2013	21
37	27.12.2012	13.01.2013	25
38	05.01.2013	18.02.2013	44
39	10.12.2012	09.01.2013	30
40	04.01.2013	09.01.2013	36
41	05.01.2013	17.01.2013	12
42	31.12.2012	15.01.2013	15
43	04.01.2013	18.01.2013	14
44	14.01.2013	18.01.2013	4

Tablo 4.3. (devamı) İzolatların elde edildiği tüm hastaların hastaneye yatış ve örnek alınma tarihleri ile yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süreler

No	Hastaneye yatış tarihi	Örnek alınma tarihi	Yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süre (gün)
45	16.01.2013	14.02.2013	29
46	21.01.2013	26.01.2013	5
47	15.01.2013	25.01.2013	10
48	03.01.2013	24.01.2013	21
49	11.01.2013	24.01.2013	13
50	21.01.2013	27.01.2013	6
51	21.01.2013	26.01.2013	5
52	17.01.2013	27.01.2013	10
53	04.01.2013	30.01.2013	26
54	29.01.2013	14.02.2013	16
55	29.01.2013	04.02.2013	6
56	01.02.2013	10.02.2013	8
57	30.01.2013	07.02.2013	8
58	21.02.2013	25.02.2013	4
59	01.03.2013	06.03.2013	5
60	02.03.2013	06.03.2013	4
61	15.02.2013	14.03.2013	27
62	01.03.2013	13.03.2013	10
63	10.02.2013	20.03.2013	38
64	08.03.2013	20.03.2013	40
65	07.03.2013	19.03.2013	12
66	16.03.2013	25.03.2013	9
67	12.03.2013	25.03.2013	13
68	14.03.2013	26.03.2013	12
69	11.03.2013	28.03.2013	48
70	16.03.2013	20.03.2013	4

Tablo 4.3. (devamı) İzolatların elde edildiği tüm hastaların hastaneye yatış ve örnek alınma tarihleri ile yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süreler

No	Hastaneye yatış tarihi	Örnek alınma tarihi	Yatış tarihinden örnek alınmasına kadar geçen süre (gün)
71	24.03.2013	30.03.2013	7
72	13.03.2013	19.03.2013	6
73	10.04.2013	18.04.2013	8
74	10.04.2013	15.04.2013	5
75	11.04.2013	17.05.2013	37
76	03.05.2013	15.05.2013	12
77	10.05.2013	16.05.2013	6
78	05.06.2013	25.06.2013	26
79	15.05.2013	21.05.2013	37
80	16.05.2013	27.05.2013	42

Hastaların tümü enfeksiyon etkeni için örnek alındığı sırada hastanede 3 gün (72 saat) ve daha fazla süreyle yatmaktaydı. Hastaneye yatış ile enfeksiyon etkeni için örnek alınma zaman aralığı 4- 161 gün arasında olup, ortalama süre 18.76 ± 21.36 gün olarak hesaplandı. 45 hastada, hastaneye yatış ile etken için örnek alınmasına kadar geçen süre 10 günden uzun olarak saptandı.

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları NMIC/ID-55 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix™ sistemi ve Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile test edildi (86,87). *A. baumannii* izolatlarının otomatize sistemle yapılan antimikrobiyal duyarlılık testinde izolatların tamamının kolistine duyarlı olduğu görüldü. Kolistinden sonra en duyarlı antibiyotik olarak saptanan amikasine duyarlı izolat sayısı 13 (%16.25), dirençli izolat sayısı ise 67 (% 83.75) olarak belirlendi. İzolatların 10 (%12.50)'u trimetoprim-sulfametoksazole duyarlı, 70 (%87.5)'i dirençliydi. Gentamisine 7 (%8.75) izolat duyarlı, 5 (%6.25) izolat orta duyarlı, 68 (%85) izolat ise dirençli olarak saptandı. İzolatların sadece 2 (%2.5)'si levofloksasine orta duyarlıyken geri kalan 78 (%97.5) izolat dirençliydi. İzolatların

tamamı test edilen diğer antibiyotiklere (ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, sefepim, sefotaksim, seftriakson imipenem, meropenem, siprofloksasin) dirençliydi. İzolatların otomatize sistemle saptanan duyarlılık paterni Tablo 4.4.'de gösterildi.

Tablo 4.4. A. baumannii izolatlarının otomatize sistem ile saptanan antimikrobiyal duyarlılık paterni [n (%)]

Antibiyotik	Duyarlı [n (%)]	Orta duyarlı [n (%)]	Dirençli [n (%)]
Kolistin	80 (100)	-	-
Amikasin	13 (16.25)	-	67 (83.75)
Trimetoprim-sulfametoksazol	10 (12.50)	-	70 (87.50)
Gentamisin	7 (8.75)	5 (6.25)	68 (85)
Levofloksasin	-	2 (2.50)	78 (97.50)
Ampisilin-sulbaktam	-	-	80 (100)
Piperasilin-tazobaktam	-	-	80 (100)
Seftazidim	-	-	80 (100)
Sefepim	-	-	80 (100)
Sefotaksim	-	-	80 (100)
Seftriakson	-	-	80 (100)
İmipenem	-	-	80 (100)
Meropenem	-	-	80 (100)
Siprofloksazin	-	-	80 (100)

Otomatize sistemde çalışılan antibiyotiklere ek olarak netilmisin, sefaperazon-sulbaktam ve tigesiklin antibiyotik diskleriyle Kirby-Bauer Disk Difüzyon testiyle antimikrobiyal duyarlılık çalışıldı. Kolistin için disk difüzyon çalışılmadı. Duyarlılık testlerinin sonuçları Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (95). Tigesiklinin disk difüzyon duyarlılık zon çapları CLSI’da bulunmadığından, FDA’in Enterobacteriaceae türleri için önerdiği değerler ile, Jones ve arkadaşlarının 2005 yılında *Acinetobacter* türlerinin disk difüzyon sonuçlarının yorumlanmasında önerdiği değerler esas alınarak iki ayrı değerlendirme yapıldı (96, 97). Jones kriterleri esas alındığında 22 izolat (%27.5) duyarlı, 49 izolat (%61.25) orta duyarlı, 9 izolat (%11.25) da dirençli olarak saptandı. FDA kriterlerine göre yorumlandığında izolatların hiçbiri duyarlı olarak değerlendirilmedi, 42’si (%52.5) orta duyarlı, 38’i (%47.5) dirençli olarak belirtildi. Tigesiklin diski ile *A. baumannii* izolatlarında saptanan zon çaplarının iki ayrı kritere göre değerlendirilmesi Tablo 4.5.’de özetlendi.

Tablo 4.5. Tigesiklin diski ile *A. baumannii* izolatlarında saptanan zon çaplarının iki kritere göre değerlendirilmesi [n (%)]

Kriter	Duyarlı [n (%)]	Orta duyarlı [n (%)]	Dirençli [n (%)]
FDA ⁽⁹⁶⁾	-	42 (52.50)	38 (47.50)
Jones ⁽⁹⁷⁾	22 (27.50)	49 (61.25)	9 (11.25)

Netilmisin için EUCAST’ın *Acinetobacter* türleri için belirlediği zon çapları esas alınarak değerlendirme yapıldı (93). *Acinetobacter* türlerinde sefoperazon-sulbaktam disk difüzyon zon çapları belirtilmediğinden CLSI’da sefoperazonun *P. aeruginosa* için belirtilen zon çapları baz alındı (94).

İzolatlardan 18 (%22.5)'i netilmisine duyarlı, 62 (%77.5) 'si dirençliydi. Trimetoprim-sulfametoksazole disk difüzyonla 9 (%11.5) izolat duyarlı, 2 (%2.5) izolat orta duyarlı olarak saptandı. Amikasin, disk difüzyon yöntemiyle 14 (%17.5) izolat duyarlı, 1 izolat orta duyarlı olarak saptandı. Gentamisin duyarlı ve orta duyarlı izolat sayısı sırasıyla 8 (%10) ve 4 (%5) olarak bulundu. Disk difüzyon ile 4 izolat levofloksasin için orta duyarlılık gösteriyordu. Sefaperazon-sulbaktam duyarlı izolat sayısı 4 (%5) iken, dirençli izolat sayısı 76 (%95) idi. Otomatize sistemde ampisilin-sulbaktam kombinasyonuna tüm izolatlar dirençliken disk difüzyon yöntemi ile 79 izolat dirençli, 1 izolat duyarlı saptandı. Disk difüzyon uygulanan izolatların tamamı, test edilen diğer antibiyotiklere (piperasilin-tazobaktam, seftazidim, sefepim, sefotaksim, seftriakson imipenem, meropenem, siprofloksasin) dirençliydi. İzolatların disk difüzyon yöntemiyle saptanan antimikrobiyal duyarlılıkları Tablo 4.6.'da gösterildi.

Çalışmamıza dahil edilen *A. baumannii* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık tespitinde tüm izolatların kolistine duyarlı, kolistin dışındaki antimikrobiyallere ise yüksek oranda dirençli oldukları saptandı. Tigesiklin ve netilmisin %27.5 ve %22.5'lik duyarlılık oranlarıyla *A. baumannii* izolatlarının kolistinden sonra en duyarlı olduğu antimikrobiyaller olarak belirlendi. Trimetoprim-sulfametoksazole duyarlı izolat sayısı otomatize sistemde 10 (12.5) olarak tespit edilirken disk difüzyon yöntemiyle 9 (%11.5) izolat duyarlı, 2 (%2.5) izolat orta duyarlı olarak saptandı. Otomatize sistemle 13 (%16.5) izolat amikasin duyarlıyken, disk difüzyon yöntemiyle 14 (%17.5) izolat duyarlı, 1 (%1.25) izolat orta duyarlı olarak belirlendi. Gentamisin duyarlı ve orta duyarlı izolat sayısı otomatize sistemde 7 (%8.75) ve 5 (%6.25), disk difüzyon yönteminde ise sırasıyla 8 (%10) ve 4 (%5) olarak saptandı. Otomatize sistemde 2 (%2.5), disk difüzyon ile 4 (%5) izolat levofloksasine orta duyarlılık gösterdi. Ampisilin sulbaktam otomatize sistemde tüm izolatlar dirençliken disk difüzyon ile 1 (%1.25) izolat orta duyarlı olarak saptandı. 'Orta duyarlı' izolatlar 'dirençli' kabul edildiğinde; trimetoprim-sulfametoksazol, amikasin, gentamisin, levofloksazin ve ampisilin-sulbaktam duyarlılığı açısından otomatize sistem ve disk difüzyon yöntemi arasında istatistikî olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Her iki sistemle çalışılan antimikrobiyal duyarlılık paterni Tablo 4.7.'de gösterildi.

Tablo 4.6. *A. baumannii* izolatlarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle saptanan antimikrobiyal duyarlılık paterni [n (%)]

Antibiyotik	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Netilmisin	18 (22.50)	-	62 (77.5)
Amikasin	14 (17.5)	1 (1.25)	65 (81.25)
Trimetoprim-sulfametoksazol	7 (8.75)	2 (2.50)	71 (88.75)
Gentamisin	8 (10)	4 (5)	68 (85)
Sefaperazon-sulbaktam	4 (5)	-	76 (95)
Levofloksasin	-	4 (5)	76 (95)
Ampisilin-sulbaktam	-	1 (1.25)	79 (98.75)
Piperasilin-tazobaktam	-	-	80 (100)
Seftazidim	-	-	80 (100)
Sefepim	-	-	80 (100)
Sefotaksim	-	-	80 (100)
Seftriakson	-	-	80 (100)
İmipenem	-	-	80 (100)
Meropenem	-	-	80 (100)
Siprofloksazin	-	-	80 (100)

Tablo 4.7. *A.baumannii* izolatlarının iki ayrı yöntemle çalışılan antimikrobiyal duyarlılık paterni [n (%)]

AB	Otomatize sistem ile			Disk difüzyon ile		
	S	I	R	S	I	R
CL	80 (100)	-	-	Çalışılmadı		
AN	13 (16.25)	-	67 (83.75)	14 (17.5)	1 (1.25)	65 (81.25)
SXT	10 (12.50)	-	70 (87.50)	7 (8.75)	2 (2.50)	71 (88.75)
GN	7 (8.75)	5 (6.25)	68 (85)	8 (10)	4 (5)	68 (85)
LVX	-	2 (2.50)	78 (97.50)	-	4 (5)	76 (95)
SAM	-	-	80 (100)	-	1 (1.25)	79 (98.75)
TZP	-	-	80 (100)	-	-	80 (100)
CAZ	-	-	80 (100)	-	-	80 (100)
FEP	-	-	80 (100)	-	-	80 (100)
CTX	-	-	80 (100)	-	-	80 (100)
CRO	-	-	80 (100)	-	-	80 (100)
IMP	-	-	80 (100)	-	-	80 (100)
MEM	-	-	80 (100)	-	-	80 (100)
CIP	-	-	80 (100)	-	-	80 (100)

AB:Antibiyotik, S:Duyarlı, I:Orta duyarlı, R: Dirençli, CL:Colistin, AN:Amikasin, GN:Gentamisin SXT:Trimetoprim-sulfametoksazol, LVX:Levofloksazin, SAM:Ampisilin-sulbaktam, TZP:Piperasilin-tazobaktam, CAZ:Seftazidim, FEP:Sefepim, CTX:Sefotaksim, CRO:Seftriakson, IMP:İmipenem, MEM:Meropenem, CIP:Siprofloksazin

Otomatize sistem ve disk difüzyon yöntemiyle karbapenem direnci saptanan *A. baumannii* izolatlarında multiplex PZR ile *A. baumannii*'ye spesifik yapısal bir gen grubu olan bla_{OXA-51-like} ile literatürde karbapenem direncinden sorumlu olduğu belirtilen bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like} ve bla_{OXA-40-like} gen gruplarının varlığı araştırıldı. Örnek materyal olarak bakteri kolonileri çalışıldı.

A. baumannii'ye özgü yapısal bir gen grubu olan bla_{OXA-51-like} gen grubu izolatların 77(% 96.25)'sinde saptandı. İzolatların 48 (%60)'inde saptanan bla_{OXA-23-like} gen grubu, bla_{OXA-51-like} gen grubundan sonra en sık rastlanan gen grubuydu. İzolatların 12 (%15)'sinde bla_{OXA-58-like} , 8 (%10)'inde bla_{OXA-40-like} gen grubu pozitifliği saptandı. İki izolatta (%2.5) hiçbir gen grubu saptanamazken, 11 (%13.75) izolatta sadece bla_{OXA-51-like} pozitifliği mevcuttu. Bir (%1.25) izolatın dört gen grubunu bir arada taşıdığı saptandı. İzolatların 65 (%81.25)'inde bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like} veya bla_{OXA-40-like} genlerinden en az birisi pozitif bulundu.

Kırk yedi (%58.75) izolatın bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-23-like} genlerini, 10 (%12.5) izolatın bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-58-like} genlerini, 7 (%8.75) izolatın da bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-40-like} genlerini bir arada taşıdığı saptandı. İzolatların multiplex PZR ile saptanan bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-58-like} ve bla_{OXA-40-like} genlerinin dağılımı tablo 4.8'de gösterildi.

Tablo 4.8. Tüm izolatların multiplex PZR ile saptanan bla_{OXA} gen dağılımı

No	bla _{OXA-51-like}	bla _{OXA-23-like}	bla _{OXA-58-like}	bla _{OXA-40-like}
1	+	+	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	-	-	+
5	+	+	-	-
6	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	+	+	-	-
9	+	+	-	-

Tablo 4.8.(devamı) Tüm izolatların multiplex PZR ile saptanan *bla*OXA gen dağılımı

No	<i>bla</i>OXA-51-like	<i>bla</i>OXA-23-like	<i>bla</i>OXA-58-like	<i>bla</i>OXA-40-like
10	+	-	-	-
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-
13	+	+	-	-
14	+	+	-	-
15	+	+	-	-
16	+	-	-	+
17	+	-	+	-
18	+	-	-	-
19	+	-	-	+
20	+	+	-	-
21	+	-	+	-
22	+	-	+	-
23	+	-	-	-
24	+	+	-	-
25	+	+	-	-
26	+	+	-	-
27	+	+	-	-
28	+	-	-	-
29	+	+	-	-
30	+	-	-	-
31	+	+	-	-
32	+	-	-	-
33	+	-	-	-
34	+	+	-	-
35	-	-	-	-
36	+	+	-	-
37	+	+	-	-

Tablo 4.8. (devamı) Tüm izolatların multiplex PZR ile saptanan *bla*OXA gen dağılımı

No	<i>bla</i>OXA-51-like	<i>bla</i>OXA-23-like	<i>bla</i>OXA-58-like	<i>bla</i>OXA-40-like
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	+	-	+	-

Tablo 4.8.(devamı) Tüm izolatların multiplex PZR ile saptanan *bla*OXA gen dağılımı

No	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	<i>bla</i> _{OXA-23-like}	<i>bla</i> _{OXA-58-like}	<i>bla</i> _{OXA-40-like}
66	+	-	-	-
67	+	+	-	-
68	+	-	+	-
69	+	+	-	-
70	+	-	-	+
71	+	+	+	+
72	+	+	-	-
73	+	-	-	+
74	+	-	-	+
75	+	+	-	-
76	+	-	+	-
77	+	+	-	-
78	+	-	+	-
79	+	+	-	-
80	+	-	-	+

Dört gen grubunu bir arada taşıdığı saptanan izolat Dahiliye YBÜ’de yatmakta olan 88 yaşında septisemi tanılı bir hastanın kan kültüründen izole edildi. Dahiliye YBÜ’nden izole edilen diğer izolatların 9’unda *bla*_{OXA51-like} ve *bla*_{OXA23-like}, 1’inde *bla*_{OXA51-like} ve *bla*_{OXA40-like}, 2 izolatta ise sadece *bla*_{OXA51-like} saptandı.

Nöroloji YBÜ’nde yatan hastalardan izole edilen 12 örnekten 1’inde hiçbir gen grubuna rastlanmazken, 8 izolatta *bla*_{OXA51-like} ve *bla*_{OXA23-like}, 3 izolatta da *bla*_{OXA51-like} ve *bla*_{OXA58-like} saptandı. Göğüs Hastalıkları YBÜ’nden gelen 11 izolatın 4’ünde tek başına *bla*_{OXA51-like}, 7’sinde ise *bla*_{OXA51-like} ve *bla*_{OXA23-like} genleri

mevcuttu. Anestezi YBÜ'ndeki hastalardan izole edilen 5 izolatin 1'inde sadece $bla_{OXA51-like}$, 3'ünde $bla_{OXA51-like}$ ve $bla_{OXA40-like}$, 1'inde ise $bla_{OXA51-like}$ ve $bla_{OXA23-like}$ genleri saptandı. OXA beta-laktamaz genlerinin kliniklere göre dağılımı Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. OXA beta-laktamaz genlerinin kliniklere göre dağılımı

Klinik	<i>bla_{OXA51-like}</i>	<i>bla_{OXA23-like}</i>	<i>bla_{OXA58-like}</i>	<i>bla_{OXA40-like}</i>
Dahiliye YBÜ	13	10	1	2
Nöroloji YBÜ	11	8	3	-
Göğüs Hastalıkları YBÜ	11	7	-	-
Genel Cerrahi YBÜ	5	3	1	-
Çocuk Hastalıkları YBÜ	6	4	-	2
Anestezi YBÜ	5	1	-	3
Kardiyoloji YBÜ	4	3	-	-
Yanık Ünitesi YBÜ	3	1	2	-
Nöroşirürji YBÜ	3	2	1	-
Yenidoğan YBÜ	3	1	1	1
Nefroloji YBÜ	3	2	-	-
Ortopedi YBÜ	2	2	-	-
Plastik Cerrahi YBÜ	2	-	2	-
Çocuk Cerrahisi YBÜ	2	1	-	-
Enfeksiyon Hst.YBÜ	1	1	-	-
KVC. YBÜ	1	-	1	-
Kadın Hastalıkları YBÜ	1	1	-	-
Üroloji YBÜ	1	1	-	-
Toplam	77	48	12	8

5. TARTIŞMA

A.baumannii türüne etkili antibiyotikler; ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanat, tikarsilin-klavulanat, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, sefepim, meropenem, imipenem, kinolonlar, kloramfenikol, rifampisin, aminoglikozidler, trimetoprim-sülfametoksazol, doksisisiklin ve kolistindir (2,7). Ancak özellikle hastane enfeksiyonlarından izole edilen ve çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi giderek zorlaşmıştır. Çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenemler, sulbaktam-sefaperazon, kolistin ve tigesiklinler kullanılmakla birlikte günümüzde birçok *A. baumannii* izolatu bu antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir (7, 39).

Dicle Üniversitesi'nde 2006 yılında sırasıyla %24 ve %25 direnç oranlarıyla imipenem ve meropenem *A. baumannii* suşlarına en etkili antibiyotikler olarak saptanmıştır (98). 2007 yılında direnç oranları artmış, imipenem için %56, meropenem için ise %39'a çıkmıştır (99). Karbapenem direncindeki artış 2008 ve 2009 yıllarında %70'lerin, 2010 yılında ise %80'lerin üzerine çıkmıştır (100). Dicle Üniversitesi Hastanesi'nde *A. baumannii* izolatlarının karbapenem direncinin yıllara göre dağılımı tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Tablo 5.1. Dicle Üniversitesi Hastaneleri'nde yıllara göre karbapenem direnci (%)

	2004 ⁽⁹⁸⁾	2006 ⁽⁹⁸⁾	2007 ⁽⁹⁹⁾	2008 ⁽¹⁰⁰⁾	2009 ⁽¹⁰⁰⁾	2010 ⁽¹⁰⁰⁾
İmipenem	çalışılmamış	24	56	77	78	80
Meropenem	7	25	39	71	75	88

Çok merkezli bir çalışmada 2008-2011 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen *A. baumannii* izolatlarında saptanan ilaç direnç oranları amoksisilin-klavulanat için %96.8, siprofloksasin için %86.8, gentamisin için %74.7, amikasin için %71.7, sefaperazon-sulbaktam için %73.5, imipenem için %72.1 ve meropenem için %73 olarak belirtilmiştir (101).

Iraz ve arkadaşlarının Ekim 2011- Mart 2012 tarihleri arasında bir üniversite hastanesinde izole ettikleri 143 *Acinetobacter* izolatında imipenem ve meropenem direnci %92 olarak belirtilmiş (102).

Bizim çalışmamızdaki izolatların tamamı karbapenemlere dirençliken, tigesiklin, netilmisin ve sefaperazon-sulbaktam duyarlılıkları sırasıyla %27.5, %22.5 ve %5 olarak saptandı. Çalışmamız verileri dikkate alındığında hastanemizdeki çoklu antibiyotik direnci gösteren *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinin önemli bir sorun olduğu ortaya çıkmaktadır. Literatürde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak (101- 104), kolistin karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatları için halen etkili bir antibiyotik olduğu gözlenmektedir.

A. baumannii izolatlarının antibiyotik direncinde Ambler B ve D sınıfı karbapenemazların rolünü araştıran çalışmalar 1990ların sonu ile 2000li yılların başında yapılmaya başlanmıştır (77, 78, 79). Bu çalışmalarda, B sınıfı metallo enzimler göreceli olarak daha nadir, karbapenemleri hidrolize eden D sınıfı enzimler birden çok kıtada yaygın olarak saptanmıştır (105, 111, 112). Ambler D sınıfı oksasilinazlar, amoxicilin, methicilin, cephloridine ve cephalotini hidrolize eden beta-laktamazlar olup, bu enzimler bla_{OXA23}, bla_{OXA24}, bla_{OXA58} ve bla_{OXA51} olarak 4 temel gruba ayrılır (75). *A. baumannii* izolatlarındaki oksasilinaz tiplerinin dağılımı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir.

İngiltere’de 2006 yılında yapılan bir çalışmada, Turton ve arkadaşları *A. baumannii* olarak tanımlanan 141 izolatın tümünde bla_{OXA-51-like} genini saptarken, diğer *Acinetobacter* türleri olarak tanımlanan 22 izolatın hiçbirinde bla_{OXA-51-like} genini saptayamadıklarını belirtmişlerdir (78).

Hırvatistan’da 2009-2010 yılları arasında izole edilen 185 çoklu ilaç direnci gösteren *Acinetobacter baumannii* izolatının dahil edildiği bir çalışmada, karbapenem dirençli izolatların hepsinde ISAbal’in düzenleyici olduğu intrinsic bla_{OXA-51-like} geninin over ekspresyonu gözlenmiş ve bu izolatların %69’unun kazanılmış OXA-tip beta laktamaz ürettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada karbapenem dirençli izolatlarda sırasıyla bla_{OXA-58-like}, bla_{OXA-24/40-like}, ve bla_{OXA-23-like} genlerinin oranı %33, %27 ve %9 olarak bildirilmiş (105).

Hasan B. ve arkadaşlarının Pakistan’da yaptığı bir çalışmada ise 90 *A.baumannii* izolatından 59’u karbapeneme dirençli olarak tespit edilmiş. İzolatların

tamamında bla_{OXA-51-like} mevcutmuş ve 14 izolatta bla_{OXA-23-like} ile birlikte bulunmaktaymış. Bu çalışmada bla_{OXA-24-like} and bla_{OXA-58-like} genlerine ise rastlanmamış (106).

Çin’de yapılan bir çalışmada da 57 karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatının tümünde ISAbal-bla_{OXA-51-like} geni saptanmış (107).

Çin’de yapılan bir başka çalışmada 2009 yılında toplanan 174 *A.baumannii* izolatından, tümünün bla_{OXA-51-like} genini taşıdığı, 74 izolatın karbapenemaz ürettiği ve bunlardan 71 izolatın bla_{OXA-23-like} geni bulundurduğu bildirilmiş (108). Ayrıca 2012 yılında Taiwan’da yapılan bir çalışma ile 142 imipenem dirençli *A.baumannii* izolatının tümünde bla_{OXA-51-like} ve 30’unda bla_{OXA-23-like} genleri saptanmış (109).

Nowak ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Polonya’da bir hastanenin yoğun bakım ve yanık ünitelerinden izole edilen 104 karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatından 46’sının bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-23-like} genlerini; 48’inin bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-40-like} genlerini taşıdığı bildirilmiş. Aynı çalışmada bütün izolatlarda bla_{OXA-51-like} ve beraberinde ISAbal bulunduğu saptanmış. Üç izolatta bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-23-like} ve bla_{OXA-40-like} birlikte bulunurken 7 izolatta bla_{OXA-51-like} haricindeki oksasilinazlara rastlanmamış (110).

Hindistan’da da bla_{OXA-51} ‘in *A.baumannii* izolatlarının karbapenem direncinden sorumlu olduğu saptanmış (111).

İran’da yapılan bir çalışmada çoklu ilaç direnci gösteren ve hastanede yatan hastalardan izole edilen 100 *A.baumannii* kökeninden hepsinin bla_{OXA-51-like} geninin bulundurduğu, 62 imipenem dirençli izolatın %88.7’sinin bla_{OXA-23-like}, %1.6’nın bla_{OXA-40-like}, ve %3.2’sinin bla_{OXA-58-like} genlerini taşıdığı belirtilmiş. İzolatların %90’ı ISAbal elementi içerdiği ve bunun % 74.2’ü imipenem dirençli izolatlar olduğu bildirilmiş (112).

İran’da 2009 Mart-2010 Kasım ayı arasında yürütülen bir çalışmada, Karmostaj ve arkadaşları, yoğun bakım ünitelerinden izole edilen 91 *Acinetobacter baumannii* izolatının 84’ünde (%92.30) bla_{OXA-51-like} geni saptanmış (113).

Ülkemizde 2006 yılında, 6 farklı merkezden gönderilen seftazidim dirençli klinik izolatların dahil edildiği çalışmada Vahapoğlu ve arkadaşları 72 izolatın 56'sında (%77.8) bla_{OXA-51-like} geni saptayarak bunların kromozomal yerleşimli olduğunu belirtmişler. Bla_{OXA-58-like} geninin ise plazmid kaynaklı olduğu ve 10 (%13.8) izolatta saptandığı, bu izolatların bla_{OXA-51-like} genini de taşıdığı bildirilmiş. Bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-58-like} gen birlikteliğinin tüm ilaçlara dirençli suşlarla ilişkili olabileceği belirtilmiş (114).

Türk SENTRY antimikrobiyal sörveyans programı kapsamında 2006 yılında İstanbul ve Ankara'daki merkezlerden toplanan 76 *A. baumannii* izolatının imipenem, meropenem ve seftazidime dirençli olan 44 (58.6)'ünde karbapenemaz varlığı araştırılmış. Karbapeneme dirençli izolatların tümünde oksasilinazları kodlayan gen gruplarına (bla_{OXA-23,-24} veya -58) rastlanmıştır. 44 izolatın 26 (%60)'sı bla_{OXA-23-like} genini taşıyormuş ve bu izolatların 25'i İstanbul'dan gönderilen örneklermiş. Bla_{OXA-58-like} genini taşıyan 18 (%40.9) izolatın ise 17'si Ankara'dan gönderilmiş (115).

İzmir'de 2013 yılında yapılan bir çalışmada; bir hastanede 20 hastada bla_{OXA-24/40} üreten *A.baumannii*'ye bağlı bir salgın bildirilmiş. Bu çalışmada bildirilen spesifik enzim bla_{OXA-72} olarak belirlenmiş (116).

Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nde yapılan başka bir çalışmada 101 *A.baumannii* kökeninden hepsinde bla_{OXA-51}, 79'unda bla_{OXA-23} ve 1'inde bla_{OXA-40} bulunmuş. Bu çalışmada 79 köken bla_{OXA-51} ve bla_{OXA-23}'ü birlikte ihtiva ediyormuş (117).

Ankara'da yapılan bir çalışmada 2004-2010 yıllarında kan kültürlerinden izole edilen *A.baumannii* izolatlarının %31'inde bla_{OXA-23-like} ve %23'ünde bla_{OXA-58-like} genler tespit edilmiş. Bla_{OXA-58-like} genlerini taşıyan izolatların 2004 ve 2009 yılları arasında arttığı, 2010'da düştüğü bildirilmiş. Buna karşın bla_{OXA-23-like} taşıyan izolat sayılarının 2008-2010 yılları arasında artış gösterdiği saptanmış (104).

Çiftçi ve arkadaşlarının yürüttüğü çok merkezli çalışmada izolatların tamamının bla_{OXA-51-like} genini; karbapenem dirençli izolatların %74.4'ünün bla_{OXA-}

23-like, %17.3'ünün de *bla*_{OXA-58-like} genini taşıdığı saptanmış. Çalışma süresince *bla*_{OXA-58-like} geninin azaldığı, *bla*_{OXA-23-like} geni ile birlikte karbapenem direncinin arttığı gözlenmiş. 2008 yılı izolatlarıyla karşılaştırıldığında 2011 yılı izolatlarında *bla*_{OXA-23-like} geni 3 kat yüksek oranda gözlenmiş (101).

N. Sarıca, 2010 yılında, "Hastane kaynaklı *Acinetobacter* suşlarında karbapenem direncinin moleküler analizi ve suşlar arası klonal ilişkinin gösterilmesi" konulu tez çalışmasında, *Acinetobacter baumannii*'ye özgü olan *bla*_{OXA-51-like} genini suşların % 99'unda saptamış, karbapenem dirençli suşlarda *bla*_{OXA-23-like} oranını % 75, *bla*_{OXA-58} oranını ise % 23 olarak tespit etmiştir. Çalışmada ayrıca, suşların %90'ında *bla*_{OXA-23-like} ya da *bla*_{OXA-58} genlerinin en az bir tanesinin bulunduğu, 1 suş hariç *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like} genleri taşıyan suşların hepsinde karbapenemlerin en az birine karşı azalmış duyarlılık veya direnç olduğu belirtilmiştir (118).

"Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında moleküler tiplendirme ve karbapenemazların araştırılması" konulu tez çalışmasında N. Özbey; multipleks PZR ile oksasilinaz enzim genlerinden *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, ve *bla*_{OXA-58} gen bölgeleri ile metalloβ-laktamaz enzimlerinden IMP, VIM, SIM ve SPM enzim genlerini araştırmış. Tüm izolatlarda *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} pozitifliği saptanan çalışmada *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, IMP, VIM, SIM ve SPM enzimleri negatif olarak bulunduğu için karbapenemaz direncinin; *bla*_{OXA-51} tip doğal oksasilinazın aşırı üretimi sonucu ve *bla*_{OXA-23} enzim geninden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (119).

Bizim çalışmamızda izolatların %96.25'inde *bla*_{OXA-51-like} geni bulunmaktaydı. İzolatlarımızın %60'ında *bla*_{OXA-23-like}, %15'inde *bla*_{OXA-58-like}, %10'unda ise *bla*_{OXA-40-like} gen pozitifliği saptandı. On bir izolatta (%13.75) sadece *bla*_{OXA-51-like} bulunurken, 65 (%81.25) izolatta *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like} veya *bla*_{OXA-40-like} genlerinden en az birisinin pozitifliği saptandı.

Yurt dışında ve ülkemizde yapılan *A. baumannii*'de karbapenem direnciyle ilgili çalışmalara paralel olarak biz de çalışmamızda *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58} enzimlerinin varlığının ya da bu enzimlerin beraber bulunmasının karbapenem

direncine veya ilaç duyarlılığının azalmasına neden olduğu sonucuna vardık. Bunlara ek olarak karbapenemlere karşı azalan duyarlılığın penisilin bağlayıcı protein ve porinlerin modifikasyonu veya AdeABC eflüks sisteminin artması gibi sekonder direnç mekanizmalarıyla bağlantılı olabileceği ve değişik mekanizmaların karşılıklı etkileşimlerinin *A.baumannii*'de yüksek seviyede karbapenem direncine sebep olabileceği dikkate alınmalıdır. *A. baumannii*'de karbapenem direnci mekanizmaları Tablo 5.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 5.2. *A. baumannii*'de karbapenem direnç mekanizmaları

Direnç mekanizması	Özellik	Referanslar
bla_{OXA-51-like}	<i>A. baumannii</i> 'de yapısal olarak bulunur. Kromozomal kaynaklıdır. IS _{Aba-1} elementi varlığında karbapenem direnci sağlar	8, 17, 76, 78, 105-114
bla_{OXA-23-like}	IS elementleri ile çevrili kromozomal veya plazmid kaynaklı genler	8, 17, 78-80, 104-112
bla_{OXA-24/40-like}	Kromozomal veya plazmid kaynaklı genler	8,116
bla_{OXA-58-like}	IS elementleri ile çevrili plazmid veya kromozomal kaynaklı genler	17, 101-105,114, 115, 118-120
IMP-1,-2,-4,-5,-6,-11, VIM-2, SIM-1	B sınıfı metallo beta-laktamazlar	8, 17,122, 123
Diğer	PBP veya porin modifikasyonu, AdeABC eflux pompa regulasyonu	8, 17, 122, 123

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamız, hastanemizde karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatlarında bla_{OXA-51-like} gen grubundan sonra bla_{OXA-23-like} gen grubunun en yaygın bulunan oksasilinaz geni olduğunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda ayrıca bla_{OXA-58-like} ve bla_{OXA-40-like} grubu oksasilinaz genleri de saptanmıştır.

Acinetobacter türleri içinde klinik açıdan en önemli tür *A. baumannii*'dir. Dolayısıyla bu türü diğer *Acinetobacter* türlerinden ayırarak tanımlayabilmek önem arzeder. Gerek literatürdeki çalışmalarda, gerekse bizim çalışmamızda yüksek oranda saptadığımız bla_{OXA-51-like} geninin *A. baumannii*'de yapısal olarak bulunduğu kabul edilmektedir. *A. baumannii*'nin hastane enfeksiyon etkeni olarak önemi düşünüldüğünde, diğer *Acinetobacter* türleriyle ayırımında, biyokimyasal parametrelere dayanan tanımlama yöntemleri yerine daha hızlı ve güvenilir olan bla_{OXA-51-like} geninin saptanmasının pratik kullanımda yer alması göz ardı edilmemelidir

clinically important. *Acinetobacter spp.* and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *Journal Clinical Microbiology*.1994; 32 (10): 2353-8.

10. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrugresistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007.5: 939-51.

11 Yıldırım İH. Sefaperazon-Sulbaktam, İmipenem ve Sefepimin Antibiyoterapi Etkinliklerinin Çoğul Dirençli ve Duyarlı *Acinetobacter baumannii* ile Oluşturulan Deneysel İkili Apse Modelinde Karşılaştırılması.Uzmanlık Tezi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi. Edirne 2006. s.5.

12. Seifert HR, Baginski A, Schulze, Pulverer. The distribution of *Acinetobacter species* in clinical culture materials. *Zentralbl Bakteriologie* 1993; 279: 544-552.

13. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008; 2195-2201

14. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter species*. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6 th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005;2:2632-2636.

15. Goel VK, Kapil A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane Proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiol* 2001;1:16-23.

16. Vahapoglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol* 2001;50:642-645.

17. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006 12: 826-836

18. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkwy PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*.1998; 36: 1938-1941.
19. Hartzel DJ, Kim SA, Kortepeter MG, Moran KA. Acinetobacter Pneumonia: A Review. *Med Gen Med*. 2007;9(3):4-11.
20. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect*.2003;54(1):39–45.
21. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infection Diseases*.2006; 43: 49–56.
22. Kaul R, Burt J, Cork L, Dedier H, Garcia M, Kennedy C., Brunton J., Krajden M., Conly J. Investigation of a multiyear multiple critical care unit outbreak due to relatively drug-sensitive *Acinetobacter baumannii*: risk factors and attributable mortality. *J Infect Dis* 1996; 174: 1279-1287.
23. Yalçın AN. (2000). Nozokomiyal Gram-negatif çomak infeksiyonları. *Klinik Dergisi*.2000; 13: 23-25.
24. Peşken Y. Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisi.İçinde: Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H (Editörler). Sterilizasyon, dezenfeksiyon ve hastane infeksiyonları Kitabı Samsun: Deomed Medikal Yayıncılık; 2002. s.203–13
25. Yalçın AN. İnfeksiyon kontrolünde maliyet analizi.İçinde: Doğanay M, Ünal S (Editörler). Hastane infeksiyonları 1. baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003.s.125–34.
26. Leblebicioğlu H, Rosenthal VD, Arikan OA, Ozgultekin A, Yalcın AN,Koksal I, et al: Device-associated hospital-acquired infection rates in Turkish intensive care units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC), *J Hosp Infect* 2007;65(3):251-7.

27. Yücesoy M, Yuluğ N, Kocagöz S, Ünal S, Çetin S, Çalangu S. Antimicrobial resistance of gram-negative isolates from intensive care units in Turkey: Comparison to previous three years. *J Chemother.* 2000;12(4): 294-8.
28. Garnacho-Montero, J., Ortiz-Leyba C., Jimenez-Jimenez, F. J., Barrero-Almodovar, A. E., Garcia-Garmendia, J. L., Bernabeu-Wittelı, M., Gallego-Lara, S. L., Madrazo-Osuna, J. Treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator- associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: A comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clinical Infectious Diseases.* 2003; 36: 1111–1118.
29. 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 A. multidrug –resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerging Infectious Diseases.* 2007;13: 97-103.
30. Toraks Derneği: Erişkinlerde Hastane Kökenli Pnömoni Tanı ve Tedavi Rehberi, Ankara (2002).
31. Karaca S, Çırak K, Halilçolar H: Ventilatörle ilişkili pnömoni tanısında derin trakeal aspirat ve bronkoalveoler lavaj örneklerinin kantitatif kültürlerinin sonuçları ve karşılaştırılması, *Solunum* 2005; 7 (1): 13-17.
32. Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dünder İH. Nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonları. *Flora* 1999; 4: 170-176.
33. Seifert H, Bagiski R, Schulze A, Pulverer G. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *antimicrobial. Agents and Chemotherapy.* 1993; 37: 750- 753.
34. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007 60:197–199
35. Başustaoğlu A, Özyurt M. Nozokomiyal patojen olarak *Acinetobacter*'lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi.* 1998; 2: 88-93

36. Tong MJ. Septic complications of war wounds. JAMA 1972; 219: 1044-1047.
37. Levin AS. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 144- 153.
- 38 . Koomanachai P, Tiengrim S, Kiratisin P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of colistin (colistimethate sodium) for therapy of infections caused by multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. Int J Infect Dis. 2007 Eylül;11(5):402-6.
39. Sader HS, Jones RN, Dowzicky MJ, Fritsche TR. Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 52:203- 208.
40. Ferrara AM. Potentially multidrug-resistant nonfermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(3): 183-195.
- 41 Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PM, Waites KB. Comparative *in vitro* antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 881- 5.
42. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. *In vitro* activities of non- traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug- resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. Int J Antimicrob Agents 2006; 27:224- 8.
43. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2009; 8:18.

44. Haddad FA, Van Horn K, Carbonaro C, Agüero- Rosenfeld M, Wormser GP. Evaluation antibiotic combinations against multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii* using E-test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 577- 9.
45. Falagas ME, Mourtzoukou EG, Polemis M, et al. Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from hospitalized patients in Greece and treatment implications. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13, 816–819.
46. Choi, J.Y., Kim, C.O., Park, Y.S., et al. Comparison of efficacy of cefoperazone/sulbactam and imipenem/cilastatin for treatment of *Acinetobacter* bacteremia. *Yonsei Med. J.* 2006; 47,63–69.
47. Urban C, Mariano N, Rahal JJ, et al. Polymyxin B resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate susceptible to recombinant BPI21 and Cecropin P1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45, 994–995.
48. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J. Antimicrob. Chemother* 2007; 60, 1163–1167.
49. Garcia I, Fainstein V, Leblanc B, Bodey GP. In vitro activities of new beta-lactam antibiotics against *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother* 1983; 24:297–299.
50. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK. Global challenge of multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51 (10): 3741-3484.
51. Bradford PA. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microb Rev* 2001;14:933-51.
52. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1991; 78:7–16.
53. Nikaido H, Zgurskaya HI. AcrAB and related multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3(2): 215-218.

54. Poole K, Heinrichs DE, Neshat S. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol* 1993; 10: 529–544.
55. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 (39): 1948–1953.
56. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, Seifert H, Kern WV: Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii* comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 970-974.
57. Kayaalp SO. (2009). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Aminoglikozidler. 12. Baskı. Ankara: Türkiye: Pelikan Yayıncılık. s.: 209-213.
58. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter spp.* *J Med Microbiol* 1998;47:455–62.
59. Gür D. (1996). Gram negatif bakterilerde aminoglikozid antibiyotiklere direnç ve aminoglikozidleri değiştirici enzimler. *Ankem Dergisi*. 10: 247-251.
60. Çokça F. Tetrasiklinler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.: 308-313.
61. Çalık N, Akova M. Tigesiklin. *Ankem Dergisi*. 21 (Ek 2) 2007; 29-33. 76
62. Livermore, D. M. Tigecycline: What is it, and where Should it be used? *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56 (4): 611-614.
63. Hooper GC. Quinolones. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone 2000; 404–19.

- 64 Ruiz, J. Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2003;51: 1109-1117.
65. Güler Ö, Aktaş O, Uslu H. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerde betalaktamaz varlığının ve çeşitli antibiyotik gruplarına karşı duyarlılıkların araştırılması *ANKEM Derg* 2008; 22(2):72-80.
66. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
67. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbial Rev* 1995; 8: 557-84.
68. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfek Derg* 1997;1: 38-45.
- 69 Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 19-45.
70. Yuluğ N. Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. *ANKEM Derg* 1997; 11: 205-7
71. Livermore DM. Beta-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *JAntimicrob Chemother* 1998; 41: 24-41.
- 72 Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalın HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 281-94. 39.
73. Vahapoğlu H, Hall LM, Mülazımoğlu L, et al. Resistance to extended spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *J Med Microbiol* 1995; 43: 294-299.

74. Paton, R. H., R. S. Miles, J. Hood, and S. G. B. Amyes. ARI-1:Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1993; 2:81–88.
75. Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, et al. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3837-3843.
76. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology 2006;10.1111/j.1469-0691. 01456.
77. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2005; 49 (8): 3198-3202.
78. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal Clinical Microbiology*.2006; 44 (8): 2974-296.
79. Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, Xu Y, Zhu, Y. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* from Chinese hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2007;51 (11): 4022-4028.
80. Bimbaum J, Kahan F M, Kroop H. Carpapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. *Am J Med*, 1985; 78(6): 3–21.
81. Harold C, Neu M D. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am J Med*, 1985; (2A): 2–13.
82. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54: 969–976.

83. Richard B, Thomson JR, Speert DP: Bakteriyolojik Örneklerin Toplanması, Taşınması ve İşleme Alınması (çev Şenses Z). A. Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, Tanyüksel M (Ed): Klinik Mikrobiyoloji'de (Manual of clinical microbiology-çeviri). Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 2009; 1: 291-333
84. Carroll KC, Weinstein MP: Mikroorganizmaların Saptanma ve Tanımlanmasında Manuel ve Otomatik Sistemler (Çev G Haşçelik), A. Başustaoğlu, A Kubar, ŞT Yıldırım, M Tanyüksel (Ed): Klinik Mikrobiyoloji'de (Manual of clinical microbiology-çeviri). Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara 2009; 1:192-217.
85. Nolte FS, Williams JM, Jerris RC, Morello JA, Leitch CD, Matushek S, Schwabe LD, Dorigan F, Kocka FE: Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 552-557, 1993.
86. <http://www.bd.com/europe/regulatory/documents.asp?i=314>
87. O'Hara CM: Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST System and NID Panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 928-933, 2006.
88. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th Informational Supplement, 2010, M100-S20. CLSI.
89. Petti CA, Carrol CK, Reimer LG: Mikroorganizmaların Saklanma Yöntemleri (Çev Kaşifoğlu N): Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M (Ed): Klinik Mikrobiyoloji'de (Manual of clinical microbiology-çeviri). Dokuzuncu Baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara 2009; 1:55-61.

90. Robson RL, Essengue S, Reed NA, Horvat RT: Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* induced by frozen storage in glycerol. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 58: 185-90
91. Chapin KC, Lauderdale TL. Ayraçlar, Boyalar ve Besiyerleri: Bakterioloji. *Manual of Clinical Microbiology*. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Landry ML. 9. Baskı. Ankara: Atlas Yayıncılık.2008: 334-364.
92. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* 6. Baskı. Lippincott Williams-Wilkins 2006: 303-391.
93. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0, valid from 2012-01-01
94. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2007). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Seventeenth Informational Supplement*. USA. M100-S17
95. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Twenty-Second Informational Supplement*. USA. M100-S22
96. Tygacil package insert [Haziran 2005], Wyeth Pharmaceuticals Inc., Philadelphia, PA
97. Jones RN, Ferraro MJ, Reller LB, Schreckenberger PC, Swenson JM, Sader HS. Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):227-30
98. Gülhan B, Özekinci T, Atmaca S, Bilek H. 2004-2006 yıllarında izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2007; 21: 32-36

99. Gülhan B, Nergiz Ş, Meşe S, Özekinci T, Atmaca S. *Acinetobacter baumannii* suşlarında tigesiklin için disk difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çaplarının iki farklı kritere göre değerlendirilmesi, ANKEM Derg 2009;23(2):78-81.
100. Deveci Ö, Dal T, Tekin R, Bozkurt F, Dayan S. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: where is it heading? *Le Infezioni in Medicina*. 2013; 3: 211-215
101. Çiftçi İH, Aşık G, Karakeçe E, Öksüz L, et al. *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında *bla* OXA Genlerinin Dağılımı: Çok Merkezli Bir Çalışma, Mikrobiyoloji Bülteni 2013; 47(4): 592-602
102. Iraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının incelenmesi. ANKEM 2012; 26(2): 80-85
103. Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, Fung CP. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla* OXA-51-like gene that is intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;13:1124–1127
104. Ergin A, Hascelik G, Eser OK. Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scand J Infect Dis*. Ocak 2013;45(1):26–31
105. Vranić-Ladavac M, Bedenić B, Minandri F, Ištók M, Bošnjak Z, Frančula-Zaninović S, ve diğerleri. Carbapenem resistance and acquired class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009-2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 06 Kasım 2013; 1991-9
106. Hasan B, Perveen K, Olsen B, Zahra R. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Pakistan. *J Med Microbiol*. 2014 Ocak;63(Pt 1):50-5

107. Dai W, Huang S, Sun S, Cao J, Zhang L. Nosocomial spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (types ST75 and ST137) carrying blaOXA-23-like gene with an upstream ISAbal in a Chinese hospital. *Infect Genet Evol.* 2013 Mart;14:98-101
108. Chen Z, Liu W, Zhang Y, Li Y, Jian Z, Deng H, Zou M, Liu Y. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* from XiangYa Hospital, in Hunan Province, China. *J Basic Microbiol.* 2013 Şubat;53(2):121-7
109. Lee M-H, Chen T-L, Lee Y-T, Huang L, Kuo S-C, Yu K-W, ve diğerleri. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying Bla(OxA-23) from hospitals in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 22 Eylül 2012;
110. Nowak P, Paluchowska P, Budak A. Distribution of blaOXA genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol.* 2012 Temmuz;35(3):317-25
111. Tiwari V, Kapil A, Moganty RR. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase in high resistant strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from India. *Microb Pathog.* Ağustos 2012;53(2):81–6.
112. Sohrabi N, Farajnia S, Akhi MT, Nahaei MR, Naghili B, Peymani A, ve diğerleri. Prevalence of OXA-type β -lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran. *Microb Drug Resist.* Ağustos 2012;18(4):385–9.
113. Karmostaj A, Peerayeh SN, Salmanian AH. Emergence of Tygecyclin Resistant *Acinetobacter baumannii* From an Intensive Care Unit (ICU) in Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2013 Mayıs; 6(3): 215-19
114. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, et al. High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter spp.*: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(3):537-42
115. Gur D, Korten V, Unal S et al. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing

Acinetobacter baumannii: report from the Turkish. J Med Microbiol. 2008 vol. 57 no. 12:1529-1532

116. Sarı AN, Biçmen M, Gülay Z. The first report on the outbreak of OXA-24/40-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. Jpn J Infect Dis. 2013;66(5):439–42.

117. Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, ve diğerleri. OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. Clin Microbiol Infect. 19 Temmuz 2013;

118. Sarıca N. Hastane kaynaklı *Acinetobacter* suşlarında karbapenem direncinin moleküler analizi ve suşlar arası klonal ilişkinin gösterilmesi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi. Ankara 2010

119. Özbey N. Karbapenemlere dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında moleküler tiplendirme ve karbapenemazların araştırılması. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi. Çanakkale 2012

120. Poirel L, Nordmann P Genetic structure at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*OXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother . 2006.50: 1442-1448

121. Zarrilli R, Vitale D, Di Popolo A, Bagattini M, Daoud Z, Khan AU, Afif C, Triassi M. A plasmid-borne *bla*OXA-58 gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2008.52: 4115-4120

122. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. Antimicrob Agents Chemother 2005;49: 1432-1440.

123. Fernandez-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein

and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob Chemother 2003;51: 565–574.