

TC  
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE  
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YOĞUN BAKIMDA KARBAPENEME DİRENÇLİ

*ACINETOBACTER BAUMANNII*

ENFEKSİYONLARININ KLİNİK SONUÇLARI VE MOLEKÜLER  
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Arzu Nazlı Zeka

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof.Dr. Bilgin Arda

İzmir

2013



TC  
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE  
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YOĞUN BAKIMDA KARBAPENEME DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII*  
ENFEKSİYONLARININ KLİNİK SONUÇLARI VE MOLEKÜLER  
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Arzu Nazlı Zeka

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç.Dr. Bilgin Arda

İzmir

2013

## TEŞEKKÜR

Tezimin planmasından tamamlanmasına kadar geçen her aŐamada verdiği her tŒrlŒ destek için tez danıŐman hocam Prof. Dr. Bilgin Arda' ya, verileri toplamamda emeği geçen Prof. Dr. Feza Bacakoğlu'na, Prof. Dr. Mehmetali Őzinel'e, Prof. Dr. Mehmet Uyar'a, Uzm. Dr. Canan Bor'a, molekŒler çalışmalar için Fransa, Paris'te "Centre Hospitalier Universitaire De Bicetre Service de Microbiologie Le Bicetre" laboratuvarına gitmemde emeği geçen Doç. Dr. OĞuz ReŐat Sipahi'ye, uzmanlık eğitimi sŒresince bilgi ve deneyimlerini paylaŐan, yetiŐmemde emeği geçen Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tŒm degerli hocalarıma ve hayatın her anında uzakta olsalar bile her zaman sevgi ve desteklerini hissettiğim aileme içtenlikle teŐekkŒr ederim.

### III

İÇİNDEKİLER	Sayfa
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	V
İNGİLİZCE ÖZET	VII
TABLOLAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
Sınıflandırma ve Tarihçe	3
Genel Özellikler	5
Virülans Faktörleri	6
Epidemiyoloji, Klinik, Risk Faktörleri	10
Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	13
Tedavi	25
Tiplendirme Yöntemleri	29
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	34
<b>4. BULGULAR</b>	54
<b>5. TARTIŞMA</b>	76
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	89
<b>7. EKLER KAYNAKLAR</b>	91
EK 1. SOFA skorelama sistemi	91
EK 2. APACHE II skorelama sistemi	92
EK 3. CPIS skorelama sistemi	93
EK 4. . AKIN skorelama sistemi	94
<b>8. KAYNAKLAR</b>	95

### IV

## ÖZET

*Acinetobacter baumannii*, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ)ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan en önemli etkenlerden biridir. En etkili tedavi seçeneği olan karbapenemlere karşı artan direnç nedeniyle, *Acinetobakter* enfeksiyonlarının tedavisi giderek zorlaşmaktadır. Çalışmamızda YBÜ'de karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının genel özellikleri, ampirik ve etkene yönelik tedaviler ve mortalite üzerine etki eden faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca hastalardan izole edilen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin direnç genleri, moleküler olarak araştırılmıştır. Çalışmamız Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları YBÜ'de ve Anesteziyoloji ve Reanimasyon YBÜ'de 1 Şubat- 31 Ağustos 2013 tarihleri arasında altı aylık süreçte gerçekleştirilmiştir. Çalışmamıza karbapeneme dirençli *A. baumannii*ye bağlı gelişen 37 ventilatör ilişkili pnömoni (VİP), 15 bakteremi, 8 VİP ve bakteriyemi tanılı toplam 60 hasta alınmıştır. *Acinetobakter* enfeksiyonunun, hastaların yoğun bakımda yatışının ortalama 11. gününde geliştiği gözlenmiştir. Kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç saptanmıştır. Uygun ampirik tedavi, hastaların ancak % 9'una verilebilmiştir. Çalışmamızda kaba mortalite %66,7 ve 30. gündeki mortalite % 71,7 saptanmıştır. Tekli analizde yüksek SOFA skoru, yüksek prokalsitonin değeri, septik şok, böbrek yetmezliği, bağ doku hastalığı, uygun tedavinin üç

günden geç başlanması mortaliteyi etkileyen faktörler olarak saptanmıştır. Lojistik regresyon analizinde ise enfeksiyonun birinci günündeki SOFA skoru mortaliteyi arttıran bağımsız faktör olarak tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalarda ise *A. baumannii* kökenlerindeki karbapeneme karşı direncin, OXA-23 karbapenemazına bağlı olduğu gösterilmiştir. Beş izolatta bu mekanizmaya ek olarak, daha önce ülkemizden bildirilmeyen GES tipi beta- laktamazların bulunduğu saptanmıştır. Bu izolatların multi loküs sekans tiplendirme ile (MLST) dünyada endemik klon, ST 2 'ye ait olduğu belirlenmiştir. Altmış izolatın, pulse field jel elektroforezi (PFGE) ile 6 genotipe ait olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak *A. baumannii*, hastanemiz yoğun bakım ünitesinde yüksek mortaliteyle seyreden enfeksiyonlara neden olmaktadır. OXA-23 salgılayan, poliklonal *A.baumannii* kökenleri yoğun bakımlarımızda endemik olarak bulunmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, ventilatör ilişkili pnömoni mortalite, moleküler epidemiyoloji, OXA-23, GES tipi beta laktamazlar

**İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)**

*Acinetobacter baumannii* is one of the most important agents which cause serious nosocomial infections in intensive care units (ICUs). The treatment of *Acinetobacter* infections is getting more difficult because of increasing resistance to carbapenems which are most effective treatment options. In our study, we aimed to evaluate the general features, empirical and antibiotic specific therapies and factors associated with mortality in *A.baumannii* infections in ICUs. In addition, we investigated the resistance genes in *A.baumannii* by molecular techniques. We carried out our study in Ege University Medical Faculty Chest Disease Respiratory ICU and Anesthesiology and Reanimation ICU for six month period. We included total 60 patients with carbapenem resistant *A.baumannii* infections; 37 ventilator induced pneumonia (VIP), 15 bacteremia, 8 VIP and bacteremia. *Acinetobacter* infections were observed at median 11th day of ICU staying of the patients. The resistance rates against other antibiotics except colistin were very high in isolates. The proper empirical therapy was administered to only 9 % of the patients.



## VII

The crude mortality was 66.7% and the mortality on the day 30 was 71, 7%. In monovariate analysis, high SOFA score, high procalcitonin, septic shock, renal failure, connective tissue disorder and beginning of treatment after three days were associated with mortality. In logistic regression analysis, the SOFA score on the first day of infection was independent factor for mortality. In molecular investigations, the resistance to carbapenems in our *A. baumannii* isolates was related to OXA-23 carbapenemase production. Addition to this resistance mechanism, in five isolates, we detected GES type beta lactamases which are not reported before from our country. These isolates were defined as ST 2 endemic clone in the word, by multi locus sequence typing (MLST). Sixty isolates were grouped into six pulse types by pulse field gel electrophoresis (PFGE). In conclusion, carbapenem resistant *A. baumannii* infections result in high mortality our ICUs. Polyclonal, OXA-23 positive *A.baumannii* isolates are endemic in our ICUs.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, ventilator induced pneumonia, mortality, molecular epidemiology, OXA-23, GES type beta lactamases

## VIII

TABLolar DİZİNİ	Sayfa
Tablo 2.1. <i>Acinetobacter</i> tür adları ve kaynaklar	4
Tablo 2.2. <i>Acinetobacter</i> türlerinin bazı temel özellikleri	6
Tablo 4.1.1 Çalışmamızdaki hastaların genel özellikleri	55
Tablo 4.2.1 Enfeksiyon açısından olası risk faktörlerinin dağılımı	56
Tablo 4.3.1 <i>A.baumannii</i> izolatlarının antibiyotik direnci	57
Tablo 4.4.1 Hastaların almakta olduğu ampirik Tedaviler	58
Tablo 4.4.1 Kültür sonucuna göre başlanan tedaviler	59
Tablo 4.4.2 Kombinasyon tedavileri	59
Tablo 4.6.1 Ölen ve yaşayan hastaların klinik özellikleri	61
Tablo 4.6.2 Tedavide kullanılan antibiyotikler ve mortalite	63
Tablo.4.6.3 Koenfeksiyon ve süperenfeksiyon etkenlerinin dağılımı	64
Tablo 4.7.1 GES pozitif izolatların MLST sonucu	74

ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfa
Şekil 1 OXA-23 geninin PZR jel görüntüsü (1-8 nolu izolatlar)	72
Şekil 2. OXA-23 geninin PZR jel görüntüsü (9-23 izolatlar)	73
Şekil 3. OXA-23 geninin PZR jel görüntüsü (24-45 izolatlar)	73
Şekil 4. OXA-23 geninin PZR jel görüntüsü (28, 34, 48-58 izolatlar)	73
Şekil 5. OXA-23 geninin PZR jel görüntüsü(48,49,57, 70,78,23,32 nolu izolatlar)	74
Şekil 6. GES geni pozitif saptanan izolatların PZR jel görüntüsü (5,11,27,70,78 nolu izolatlar)	74
Şekil 7. GES pozitif izolatlarda plazmitin gösterilmesi	75
Şekil 8. Transkongugat (rifampisin dirençli) ve verici izolatların antibiyogramından örnek	76
Şekil 9. Transkonjugatlarda GES geni PZR görüntüsü	77
Şekil 10. Transkonjugatlarda OXA-23 geni PZR görüntüsü	
Şekil 11. AB_PBRT ile plazmitlerin grup 6'da olduklarının gösterilmesi	77
Şekil 12. blaGES-11 genini taşıyan integronun şematik çizimi	78
Şekil 13. GES-11 pozitif izolatların Diversilab ile genotiplendirilmesi	79
Şekil 14. cpn60 ve fusA genlerinin PZR ile gösterilmesi	79
Şekil 15. glt A ve pyr G genlerinin PZR ile gösterilmesi	79
Şekil 16. rec A ve rpIB genlerinin PZR ile gösterilmesi	77
Şekil 17. pro B geninin PZR ile gösterilmesi	77
Şekil 18. Çalışmamızdan sekans örneği	80
Şekil 19. Çalışmamızdan PFGE görüntüsü	81
Şekil 20. PFGE görüntülerinden elde edilen dendogram	82

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

*Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) aerobik, morfolojisi değişken hareketsiz Gram negatif bir basildir. Fırsatçı bir patojen olan *A. baumannii* uzun süreli (> 90 gün) hastane yatışı olan bağışıklığı baskılanmış hastalarda yüksek oranda saptanmaktadır (1). Genellikle deri, solunum yolu ve orofarenks gibi nemli bölgelerde kolonizasyon ve enfeksiyon etkeni olarak gösterilmiştir (2,3). Günümüzde *A. baumannii*, tüm antibiyotiklere karşı, hızla geliştirdiği direnç nedeniyle tıp otoriteleri tarafından 'kırmızı alarm' olarak değerlendirilmektedir (4). Çoklu ilaç direnci (ÇİD) olan patojenler hem hastaneden hem de toplumdaki edinilmiş enfeksiyonlar nedeniyle ciddi endişe uyandırmaktadır (5). Dünya Sağlık Örgütü antibiyotik direncini toplum sağlığının en önemli üç probleminden biri olarak tanımlamıştır (6). *A. baumannii*, 1970'lerde birçok antibiyotiğe duyarlı iken günümüzde direnç nedeniyle tedavi seçeneğinin bir iki antimikrobiyal ile sınırlandırıldığı bir patojen haline gelmiştir (7). Birçok çalışmada *A. baumannii* enfeksiyonlarının mortaliteyi ve yatış süresini arttırdığını gösterilmiştir (8,9). Uygun olmayan ampirik tedavinin mortaliteyi arttıran en önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir

(10,11). Çoklu antibiyotik direnci olan bu etkenin direnç paterninin bilinmesi ve tedavide kullanılan antimikrobiyallerin klinik ve mikrobiyolojik iyileşmedeki etkilerinin bilinmesi, tedavi protokolleri oluşturulmasında önemlidir.

Ege Üniversitesi Enfeksiyon Kontrol Komitesi kayıtlarına göre Anesteziyoloji ve Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitelerinde son yıllarda ÇİD olan *A. baumannii*'ye bağlı enfeksiyonlarda artış olduğu gözlemlenmiştir (8).

Bu çalışmada, karbapeneme dirençli *A.baumannii*'nin etken olduğu ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) ve bakteremi olgularının genel özellikleri, ampirik ve etkene yönelik tedaviler, kullanılan antibiyotiklerin klinik, mikrobiyolojik iyileşmeye olan etkileri ve mortalite üzerine katkılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu hastalardan izole edilen *A. baumannii* kökenlerinde beta ( $\beta$ ) laktam antibiyotiklere karşı dirence neden olan genlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile taranması, kökenlerin birbirleriyle olan genotipik ilişkisi için pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) , tüm dünyadaki kökenler ile genotipik ilişkisinin belirlenmesi için ise multiloküs sekans tiplendirme (MLST) yönteminin kullanılması planlanmıştır. Çalışmamızdan elde edilecek veriler hastanemizde *A.baumannii* enfeksiyonlarının yönetiminde tedavi, enfeksiyon kontrolü, korunma protokollerinin belirlenmesinde ve ayrıca *A. baumannii* izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin değerlendirilmesinde yardımcı olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Sınıflandırma ve Tarihçe

*Acinetobacter* türleri ilk kez Beijerinck tarafından 1911'de topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırılmıştır (12). Günümüzdeki *Acinetobacter* adı Yunanca'da hareketsiz anlamına gelen *akinetos* kelimesinden gelmektedir. 1954'de Brisou ve Pre' vot tarafından *Achromobacter* ailesi içinde hareketsiz olmaları nedeniyle verilmiştir (13). 1968'de Baumann ve arkadaşları bu 15 değişik türün tek bir familyaya ait olduklarını bildirmiş ve *Acinetobacter calcoaceticus* (genomik tür 1) olarak isimlendirmişlerdir (14). Hibridizasyon çalışmalarının sonucunda *Acinetobacter* cinsi bakteriler *Moraxellaceae* ailesinde sınıflandırılmıştır (15). 1986'da Bouvet ve Grimont, DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarını ile 12 genetik tür tanımlamışlardır. Bunlar arasında *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* ve *A. lwoffii* sayılabilir (16). Tjenberg, Ursing ve Nishimura isimli araştırmacılar da 32'ye ulaşan genomik tür keşfine katkıda bulunmuşlardır (17,18).

*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (*Acinetobacter* genomik tür-3) ve *A. nosocomialis* (*Acinetobacter* genomik tür-13TU), birbirleriyle yakın ilişkilidirler ve fenotipik özellikleri açısından ayırt edilmeleri zordur. Bu yüzden bu dördü tek bir isim altında toplanarak, bu bakteriler için, *A.calcoaceticus-A.baumannii* complex terimi kullanılmaktadır (5).

Günümüzde genomik tür sayısı 46'ya ulaşan bakterilerin tür adları ve kaynakları tabloda belirtilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. *Acinetobacter* tür adları ve kaynaklar

Tür adı	Kaynak
<i>A. antiviralis</i>	Lee et al. 2009
<i>A. baumannii</i> (GT 2)	Bouvet et Grimont 1986
<i>A. baylyi</i>	Carr et al. 2003
<i>A. beijerinckii</i>	Nemec et al. 2009
<i>A. bereziniae</i> (GT 10)	Nemec et al. 2010
<i>A. boissieri</i>	Alvarez-Perez et al. 2012
<i>A. bouvetii</i>	Carr et al. 2003
<i>A. brisouii</i>	Anandham et al. 2010
<i>A. calcoaceticus</i> (GT 1)	Baumann et al. 1968
<i>A. gernerii</i>	Carr et al. 2003
<i>A. grimontii</i>	Carr et al. 2003
<i>A. guillouiae</i> (GT 11)	Nemec et al. 2010
<i>A. gyllenbergii</i>	Nemec et al. 2009
<i>A. haemolyticus</i> (GT 4)	Bouvet et Grimont 1986
<i>A. indicus</i>	Malhotra et coll. 2012
<i>A. junii</i>	Bouvet et Grimont 1986
<i>A. kyonggiensis</i>	Lee et Lee 2010
<i>A. lwoffii</i> (GT 8/9)	Baumann et al. 1968
<i>A. marinus</i>	Yoon et al. 2007
<i>A. nectaris</i>	Alvarez-Perez et al. 2012
<i>A. nosocomialis</i> (GT 13TU)	Nemec et al. 2011
<i>A. oleivorans</i>	Kang et al. 2011
<i>A. oryzae</i>	Chaudhary et al. 2012
<i>A. parvus</i>	Nemec et al. 2003
<i>A. pittii</i> (GT 3)	Nemec et al. 2011
<i>A. radioresistens</i> (GT 12)	Nishimura et al. 1988
<i>A. rhizosphaerae</i>	Gulati et al. 2009
<i>A. rudis</i>	Vaz-Moreira et al. 2011
<i>A. schindleri</i>	Nemec et al. 2001
<i>A. seohaensis</i>	Yoon et al. 2007
<i>A. septicus</i>	Kilic et al. 2008
<i>A. soli</i>	Kim et al. 2008
<i>A. tandoii</i>	Carr et al. 2003
<i>A. tjernbergiae</i>	Carr et al. 2003
<i>A. towneri</i>	Carr et al. 2003
<i>A. venetianus</i>	Di Cello et al. 1997
<i>Acinetobacter</i> GT 6	Bouvet et Grimont 1986
<i>Acinetobacter</i> GT 14TU (13BJ)	Tjernberg et Ursing 1989, Bouvet et Jeanjean 1989
<i>Acinetobacter</i> GT 14BJ	1989
<i>Acinetobacter</i> GT 15BJ	Bouvet et Jeanjean 1989
<i>Acinetobacter</i> GT 15TU	Bouvet et Jeanjean 1989
<i>Acinetobacter</i> GT 16BJ	Tjernberg et Ursing 1989
<i>Acinetobacter</i> GT 17BJ	Bouvet et Jeanjean 1989
<i>Acinetobacter</i> GT 1 ve GT 3 arasındaki	Bouvet et Jeanjean 1989
<i>Acinetobacter</i> GT 13 TU benzeri	Gerner-Smidt ve Tjernberg 1993 Gerner-Smidt ve Tjernberg 1993

## 2.2. *Acinetobacter baumannii* 'nin Mikrobiyolojik Özellikleri

*Acinetobacter* cinsi bakteriler; sporsuz, karbonhidratları fermente etmeyen Gram negatif bakterilerdir (19). Oksidaz negatif, indol negatif, nitratları indirgemeyen, katalaz pozitif ve bazen ince kapsüllü bakterilerdir. Fimbriaları vardır ancak flajellaları olmadığı için hareketsizdirler. İdeal olarak aerop ortamda 35-37°C'de ürerler. Bakterinin Gram boyama morfolojisi yaşam döngüsündeki evresine göre değişkenlik gösterir. Üremenin logaritmik fazında boyutlarında basil, duraklama fazında ise kokobasiller şeklinde görülürler. Gram negatif kokobasil, diplokok, Gram labil-kokobasiller şeklinde boyanabilirlerse de, bazen alkol ile dekolorizasyona dirençli olabilmektedirler (19).

*Acinetobacter* türleri klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan koyun kanlı agar, triptik soy agar gibi zengin besiyerlerinde, MacConkey agarda iyi ürerler. Koyun kanlı agarda ve 24. saatin sonunda 0,5-2mm çapında düzgün, saydam veya mat, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden daha küçük, yüzeyden kabarık S tipi koloniler oluştururlar (19). *Acinetobacter haemolyticus* koyun kanlı agarda hemolize neden olurken, diğerleri hemoliz yapmaz. *Acinetobacter* türlerini diğer nonfermentatif Gram negatif bakterilerden ve majör *Acinetobacter* türlerini birbirlerinden net olarak ayıran tek bir metabolik test yoktur.

*Acinetobacter* türlerinin ayrımında kullanılan, zahmetli ve uzun sürede sonuç veren fenotipik tanımlama şeması üreme derecesi, hemoliz oluşturma, jelatin hidrolizi, glikozdan asit oluşturma ve farklı karbon kaynaklarının asimilasyonuna



dayanmaktadır (16). Tablo-2'de en sık *Acinetobacter* türlerini ayırt eden temel özellikler görülmektedir (20).

Tablo 2.2. *Acinetobacter* türlerinin bazı temel özellikleri

<i>Acinetobacter</i> türleri	44° C'de üreme	Glukoz oksidasyonu	Hemoliz
<i>A.baumannii</i>	pozitif	pozitif	negatif
<i>A.calcoaceticus</i>	negatif	pozitif	negatif
<i>A. haemolyticus</i>	negatif	pozitif	pozitif
<i>A.lwoffii</i>	negatif	negatif	negatif

*Acinetobacter* türlerinin rutin laboratuvar tanısında fenotipik testlerin yerini, karbon kaynaklarının asimilasyonuna (API 20NE, Vitek 2) ya da iyonizasyon kütle spektrometrisine (MALDI-TOF MS) dayanan ticari tanımlama sistemleri almaya başlamıştır (21).

### 2.3 Patogenez ve virülans faktörleri

Son on yılda giderek artan bir öneme sahip olmasına karşın, *A. baumannii*'nin virülans faktörlerine dair bilgiler sınırlıdır (22). Genel olarak düşük virülanslı bir mikroorganizma olarak kabul edilmektedir. Konak savunma mekanizması normal olan bireylerde nadiren enfeksiyona neden olmasına karşın özellikle yoğun bakımlarda fırsatçı hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır (24,25). Nadiren toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak da saptanabilmektedir. Özellikle *A. baumannii*'ye bağlı toplum kaynaklı pnömonilerin, yüksek mortalite ile seyrettiği bildirilmiştir (26). Bu durum *A. baumannii*'nin yüksek patojeniteye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

*A. baumannii*'de hücre yüzeyi ile ilişkili ve hücre dışına salgılanan virülans faktörleri tanımlanmıştır.

**i) Pili (fimbria):**

Bakterinin hücrelere bağlanmasını sağlayan yüzeyinde bulunan kısa ve düz yapılardır. *A. baumannii*'nin tutunma mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Fimbiyaların, bakterinin trakeal epitel hücrelerine tutunmasında etkili olmadığı ancak eritrositlere bağlanmasında etkin olduğu gösterilmiştir (27).

**ii) Ekzopolisakkarit:**

*Acinetobacter* türlerinin bir kısmı hidrofilik özelliği sağlayan ve fagositozdan koruyan, L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukuronik asitten oluşan kapsül üretir. Bakteri konakta tutunduktan sonra kapsüller polisakkarit mikroorganizmanın hücre duvarına komplemanın ulaşmasını engeller ve alternatif kompleman aktivasyonunu önler (22). Ekzopolisakkarit üreten *Acinetobacter* türlerinin daha patojen olduğu ve daha sık polimikrobiyal enfeksiyon etkeni olarak bulunduğu gösterilmiştir (26).

**iii) Lipopolisakkarit:**

Dış membranın en dış yüzeyinde yer alan lipopolisakkarit tabaka; diğer Gram negatif bakterilerdeki gibi *A. baumannii*'de de letal toksisiteden sorumludur. Lipopolisakkaritin mitojenik özellikleri ve TNF alfa'yı indükleme potansiyeli patojeniteye katkıda bulunmaktadır (28).

#### iv) Dış Membran Proteini (OmpA):

Porin olarak görev yapmasının yanı sıra epitel hücreleri ile etkileşim, hedef hücrelerde apoptozunun başlatılması gibi etkileri vardır (29). Pnömoni gelişiminde, dış membran proteinleri bronş epitel hücrelerinin invazyonuna yardımcı olmaktadır (22). Dış membran proteini olmayan mutant kökenlerin virülansının azaldığı belirtilmektedir (29).

#### v) Jelatinaz:

Jelatinaz bir proteaz olup doku hasarına neden olur. *A. baumannii* kökenlerindeki sıklığı, önemi ve diğer virülans özellikleri ile ilişkisi ise net olarak bilinmemektedir. Sechi ve arkadaşları inceledikleri klinik kökenlerde jelatinaz sentezinin saptanmadığını belirtirken, Cevahir ve arkadaşları ise kökenlerin %14'ünde jelatinaz aktivitesi saptamışlardır(30,31).

#### vi) Fosfolipaz C:

Fosfolipitleri parçalayan bir enzimdir. Fosfolipaz C' nin inaktif olduğu mutant *A. baumannii* kökenlerinde epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin azaldığı saptanmıştır (32).

#### Vii )Esteraz:

Kısa zincirli yağ asitlerini hidrolize eden bir enzimdir. *A. baumannii*'nin lipit dokulara verdiği hasarın güçlü esteraz aktivitesine bağlı olduğu düşünülmektedir (33).

### viii) Demir Alım Mekanizmaları

Demir, bakterilerin elektron transportu, gen ekspresyonlarının düzenlenmesi gibi yaşamsal fonksiyonların devamında kritik bir rol oynamaktadır (34). *A. baumannii* kökenlerinde siderofor ve asinetobaktin gibi demir bağlayan proteinlerin salgılandığı ve çok sayıda demir alım geninin yer aldığı gösterilmiştir (35,36). Demir alımını düzenleyen ferric iron uptake regulator (fur) proteini ve fur benzeri proteinlerin, diğer bakterilerde olduğu gibi *A. baumannii*'de de patogeneizde önemli rol oynayan genleri düzenliyor olabileceği belirtilmektedir (22).

### ix) Biyofilm

Biyofilm, mikroorganizmaların kendilerinin ürettiği, bir yüzeye ve birbirlerine yapışmalarını sağlayan, organik polimerlerden oluşan bir kalıptır (37). Bu şekilde bakteriler; hem besinlere daha kolay ulaşmakta, hem de kuruluğa, bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere daha dirençli hale gelmektedirler (38). *A. baumannii* kökenlerinin uzun süre cansız yüzeylerde yaşamını sürdürebildiği bilinmektedir (39). Bu özelliğinin biyofilm üretimi sayesinde olduğu gösterilmiştir (40). Bir çalışmada tüm kateter ilişkili üriner ve kan dolaşımı enfeksiyonları ile şant ilişkili menenjit kökenlerinin biyofilm ürettiği gösterilmiştir (41).

## 2.4 Epidemiyoloji, klinik tablo ve risk faktörleri

*Acinetobacter* cinsi bakteriler, doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler (42). Bu bakterilerin sağlıklı kişilerde deri, gastrointestinal sistem ve üst solunum yollarında bulunabildikleri belirlenmiştir (42).

*Acinetobacter* türleri kuruluğa dayanıklı olmaları, cansız yüzeylerde aylarca canlı kalabilmeleri gibi özellikleri ile oldukça sık salgın oluşturabilmektedirler (43-45). Kolonizasyon enfeksiyonun ilk basamağı olarak kabul edilmektedir.

Hastanede yatan hastaların boğaz kültürlerinde %7-18, trakeostomi sürüntülerinde %45 oranında asinetobakter kolonizasyonu bildirilmiştir (43). Yoğun bakımda yatan hastalarda da birçok çalışmada asinetobakter kolonizasyonu solunum yollarında saptanmıştır. Ayrıca gastrointestinal sistem kolonizasyonu da gösterilmiştir (20,41). Hastanelerde kolonizasyon, enfeksiyon ve bulaş için en önemli kaynağın sağlık çalışanlarının derisindeki kalıcı taşıyıcılık olduğu düşünülmektedir (41,42) Sağlık personeli, kolonize veya enfekte hastalar ile hastane çevresindeki cansız eşyalar ve diğer hastalar arasındaki geçişe neden olmaktadır (46).

Salgınlarda hastanede bulunan birçok aletin kontaminasyonu tespit edilmiştir. Bunlar infüzyon setleri, resüsitasyon malzemeleri, aspirasyon cihazları, musluklar, bandajlar, masa, komodin, mekanik ventilatör parçaları, sandalye, yastık, yatak çarşafı, nemlendirici, yeterli sterilize edilmemiş arteriyel kateterler, distile

su, idrar torbası, solunum monitörleri, tansiyon aletleri, solunum tedavi solüsyonları olarak tanımlanmıştır (46).

Asinetobakterlere bağlı enfeksiyon oranlarının yaz mevsiminde diğer mevsimlere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (47-49). Temmuz ile Ekim ayları arasındaki enfeksiyon oranları, yılın diğer zamanlarından yaklaşık %50 daha yüksek tespit edilmiştir (47, 48). Bu mevsimsel değişimin nedeni bilinmemektedir.

Asinetobakter enfeksiyonları genellikle hastane enfeksiyonları şeklinde görülmekle birlikte nadiren altta yatan hastalığı olanlarda toplum kaynaklı enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar içinde en sık ventilatör ilişkili pnömoni ve bakteremiler görülür.

Toplum kaynaklı asinetobakter enfeksiyonları Avustralya ve Asya'nın tropikal bölgelerinde toplum kökenli pnömoni olarak görülmektedir. Genellikle altta yatan kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olanlarda veya alkolizm öyküsü olanlarda enfeksiyona neden olur. Mevsimsel olarak yağışların fazla olduğu yaz sonu ve kış başlarında görülür (48, 50 ). Mortalite oranı %40-60 düzeyinde olan fulminan bir klinik tablo ile karakterizedir (51,52).

Yapılan çalışmalarda nozokomiyal asinetobakter enfeksiyonu için risk faktörleri olarak, malinite, yanık, diyabet, böbrek yetmezliği, altta yatan hastalığın ciddiyeti, cerrahi girişimler, kolonizasyon, YBÜ'nde uzun süre kalma, parenteral beslenme, mekanik ventilasyon, enteral beslenme, trakeostomi, damar içi kateter ve idrar sondası varlığı gösterilmiştir (26,54) . Çoklu ilaç direncine bağlı

asinetobakter enfeksiyonları için risk faktörleri; erkek cinsiyet, altta yatan iskemik kalp hastalığı, ciddi travma ile hastane başvurusu, kan transfüzyonu, alınan antibiyotik sayısı, önceki antibiyotik tedavisi, geniş spektrumlu antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı ve hastane florasında antibiyotik direnci fazla olan bakterilerin varlığı olarak saptanmıştır (55- 58).

Ventilatör ilişkili pnömoni (VİP), *A. baumannii*'nin oluşturduğu en yaygın enfeksiyondur. Son on yılda sıklığı giderek artmaktadır (31). Kapsamlı sürveyans çalışmalarında VİP etkenlerinin %5-10' unun *A. baumannii*' ye bağlı olduğu belirtilmektedir(8,31). Genel olarak *A. baumannii*' ye bağlı VİP, YBÜ'sinde uzun süre yatan hastalarda görülür. Ancak salgın durumlarında çok daha kısa sürede enfeksiyon gelişebilmektedir (8,31).

Asinetobakterlere bağlı bakteremi tek patojen olarak veya diğer enfeksiyon etkenleriyle birlikte görülebilir. ABD sürveyans verilerine göre *A. baumannii* nozokomiyal bakteremilerin %2'sinden sorumludur (59,60). Sıklıkla yoğun bakım kaynaklıdır ve YBÜ'deki mortalite hızı %34-43,4 iken, yoğun bakım dışı ünitelerde bu oran %16,3'tür (5). Bakteremili hastaların %25-30'unda septik şok söz konusudur (61). Hastaların % 50'sinde bakteremi kaynağı tam olarak tespit edilememektedir. Baktereminin en sık kaynağı, solunum sistemi enfeksiyonlarıdır. Yanık, cerrahi alan ve damarıçi kateterler bakteremi kaynağı olabilmektedir. Kateter ilişkili bakteriyemilerde mortalite pnömoniye sekonder bakteriyemilere göre daha düşüktür (61).

Asinetobakter menenjitisi, daha çok beyin cerrahisi işlemlerine veya kafa travmasına sekonder olarak gelişmektedir (62). Hastaların çoğunda lomber ponksiyon, miyelografi, ventrikülografi veya diğer beyin cerrahisi işlemleri yapılmış olup, ventrikülostomi, serebrospinal sıvı fistülü, beş günden uzun süre kalan ventrikül kateteri, risk faktörlerini oluşturmaktadır (62).

Asinetobakterlere bağlı üriner sistem enfeksiyonları sıklıkla YBÜ'de yatan üriner katateri bulunan, yaşlı erkek hastalarda görülür. Bu hastaların idrar kültüründe üreyen bakterilerin kolonizasyona bağlı olabileceği de unutulmamalıdır (63). Asinetobakterlere bağlı enfeksiyonlar vücudun çeşitli bölgelerinde oluşabilir. Konjonktivit, endoftalmit, yumuşak lens kontaminasyonu sonucunda korneal ülserasyon ve perforasyon olguları bildirilmiştir (64). Prostetik kapak endokarditi, osteomyelit, derin boyun enfeksiyonu, psoas absesi ve batin içi apse olguları rapor edilmiştir (65-69). Ayrıca periton diyalizi, ve transhepatik kolanjiografi, perkütan safra drenajı sonrası enfeksiyonlar gelişebilmektedir. (70,71)

## **2.5 *A.baumannii*'de Antibiyotik Direnç Mekanizmaları**

Birçok antimikrobiyal ilaç grubuna karşı dirençli kökenlerin yaygınlaşması ile birlikte, direnç profilini tanımlayan birçok terim ortaya çıkmıştır. *A.baumannii*'de ilaç direncini tanımlamak için konunun uzmanları ortak terminoloji kararlaştırmışlardır. Buna göre, üçten daha fazla antimikrobiyal grubun içinde,



birden fazla gruba direnç "multidrug-resistant " (çoklu ilaç direnci, ÇİD), sadece bir ya da iki ilaç grubuna duyarlı ise "extensively drug-resistant" (XDR) ve tüm ilaç gruplarına dirençli olduğunda ise "pandrug-resistant" (PDR) olarak kabul edilmiştir (72).

*A. baumannii*, tüm dünyada bu kadar hızlı yayılmasını çevresel değişkenlere çok hızlı uyum sağlama yeteneğine borçludur. Birçok ilaca direncini, doğal direnç mekanizmalarının aşırı aktivasyonu ve yabancı direnç elementlerini dışarıdan kazanabilmesiyle elde etmektedir (5).

2006 yılında Fournier ve arkadaşları Fransa'da endemik olarak bulunan, çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* AYE kökenlerin genomu ile insan bitinden izole edilen, tüm antibiyotiklere duyarlı *A. baumannii* SYF kökeninin genomunu, sekans analizi yaparak karşılaştırmışlardır (7). Sonuç olarak virülan kökende, duyarlı kökenin genomunda olmayan, 86 kb (kilobaz) uzunluğunda, 45 direnç geninin küme şeklinde bulunduğu, 'direnç adası' olarak adlandırdıkları bir bölge saptamışlardır. Duyarlı kökende ise aynı bölgede 20 kb 'lık hiçbir direnç geni içermeyen genomik bir ada gösterilmiştir. Sonuç olarak; bu bakterinin genomik yapısını değiştirebilme "switch" yeteneği, yoğun bakımlar gibi antibiyotik baskısının oldukça fazla olduğu ortamlarda, antibiyotiklere direnç kazanma hızını açıklayabilir (5). Sekans benzerlikleri ve filogenetik analizler, virülan kökende bulunan birçok direnç geninin *Pseudomonas*, *Salmonella* ya da *Escherichia* türlerinden alındığını göstermiştir (7).

*A.baumannii*'nin, direnç genlerini diğer bakterilerden kazanımında rol oynayan faktörlerin genetik çeşitliliğini sağlayan üç tip hareketli genetik element tanımlanmıştır. Bunlar, sınıf I integronlar, transpozonlar ve insersiyon sekans (IS) elementleridir. Hareketli genetik elementler kromozom veya plazmitte kromozomun bir yerinden diğer bir yerine hareket edebilen elementlerdir. Kendi kendilerine replike olamazlar, ancak kromozomla veya plazmitle birlikte replike olabilirler (73). Bu genetik elementlerin eklenmesi "insertion" ya da silinmesi "deletion" ile doğal direnç mekanizmalarının ekspresyonunu ya da hücre zarı geçirgenliğini değiştirebilirler. Ayrıca spontan mutasyonlarla ilacın hedef bölgesinde değişikliğe neden olabilirler (74).

### **2.5.1 $\beta$ -laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları**

*A. baumannii* de  $\beta$  -laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları;

i) enzimatik ( $\beta$  -laktamazlar)

ii) enzimatik olmayan (Penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik, por proteinlerinin yapısında ve sayısında değişiklik, atım pompa aktivasyonu) olarak iki gruba ayrılabilir.

#### **2.5.1.1 Enzimatik Mekanizmalar**

$\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde ana mekanizma, kromozomal ya da plazmit kaynaklı  $\beta$ - laktamaz üretimidir. *A.baumannii* türleri doğal olarak genomunda indüklenemeyen kromozomal AmpC sefalosporinaz (AmpC) ve sınıf D

oksasilinaz (OXA-51-benzeri) olmak üzere iki  $\beta$ -laktamaz bulundurmaktadır (75,76).

#### 2.5.1.1.1 Kromozomal Sefalosporinazlar (AmpC)

*A.baumannii*'nin tüm genomik türleri indüklenmeyen kromozomal AmpC sefalosporinazlar diğer adıyla "acinetobacter derivesi sefalosporinazlar (ADCs) " içermektedirler (77). Sınıf C tipi  $\beta$ -laktamazlar olan bu enzimler tüm penisilinleri ve geniş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz ederken,  $\beta$ -laktam/  $\beta$  laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına etkili değildirler. Bu enzimler normalde zayıf etkinlik göstermektedirler. Ancak, AmpC geninin hemen yukarısında ISAbal1 (İnsersiyon Sekans *A.baumannii* 1) bulunması genin yeniden düzenlenmesine neden olur. Diğer bir deyişle AmpC geninin fazla ekspresyonu ve klinik olarak dirence neden olması ISAbal1'in yapısal varlığına bağlıdır (78). Sefepim ve karbapenemler dışındaki  $\beta$ -laktamları hidroliz ederler(3). Günümüzde 56 değişik ADCs tanımlanmıştır (79).

#### 2.5.1.1.2 Oksasilinazlar

Ambler sınıf D oksasilinazlar, kloksasilini, oksasilini ve bazı oksyimino- $\beta$ -laktamları hidroliz etmesi ile tanımlanırlar. Karbapenemleri hidroliz edemezler ve klavulanik asit ile inhibe olabilirler. Ancak *A.baumannii*'de bulunan oksasilinazlar, karbapenemleri hidroliz edebilmeleri nedeniyle, OXA enzimlerinin farklı bir alt grubunu oluştururlar. İmipenem ve meropenemi hidroliz ederler ancak geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama etkisizdirler. Poirel ve Nordmann

tarafından "karbapenemi hidroliz eden sınıf D  $\beta$ -laktamazlar" (CHDL) olarak isimlendirilmiştir (80). 2010 yılında güncellenen,  $\beta$ -laktamazların fonksiyonel olarak sınıflandırıldıkları, Bush sınıflandırmasında da CHDL yeni bir alt sınıflamaya (2df) alınmıştır (81). *A.baumannii*'de sınıf D  $\beta$ -laktamazların bir yapısal (OXA-51-benzeri), dört edinilmiş (OXA-23,OXA-24/40,OXA- 58 ve OXA-143) olmak üzere, beş filogenetik alt grubu tanımlanmıştır.

OXA-51 benzeri genlerin her *A.baumannii*'nin yapısında bulunması nedeniyle, bakterinin tür düzeyinde tanımlamasında önemli bir genetik belirteç haline gelmiştir (76). OXA-51-benzeri enzimler, penisilinleri (benzilpenisillin, ampisillin, tikarsillin and piperasillin) ve karbapenemleri (imipenem ve meropenem) çok zayıf olarak hidroliz edebilirler (5). AmpC yapısal enziminde olduğu gibi, OXA-51-benzeri enzimlerin güçlü bir  $\beta$ -laktam direncine neden olabilmesi için genin yukarısında çok güçlü bir transkripsiyon promoteri olan IS*Aba1* ya da IS*Aba9* insersiyon sekansının bulunması gereklidir (2, 76, 82). OXA-51 enziminin 68'in üzerinde sekans varyantı tanımlanmıştır (79).

Karbapenemaz etkinliği olan, ilk oksasilinaz, OXA-23, İskoçya'da izole edilmiş *A.baumannii* kökenindeki bir plazmitte tanımlanmıştır (83). Yapısal OXA-51 enzimi ile proteinlerinin % 56'sı aynıdır. O zamandan beri, tüm dünyada ve ülkemizde *bla*OXA-23 geni hem kromozomal hem de plazmit kökenli olarak, sadece *Acinetobacter* türlerinde bildirilmiştir (80,84). Bunun tek istisnası

Fransa'dan bildirilen *Proteus mirabilis* izolatıdır (85). OXA-23 enzim kümesi altında OXA-27, OXA-49 ve OXA-73 enzimleri de bildirilmiştir (86)

Avrupa'da ÇİD *Acinetobacter*'in yayılımı sadece bir şehirdeki hastaneler ile sınırlı olmayıp hastaneler arası transfer nedeniyle, (Güneydoğu İngiltere'deki OXA-23 klon 1 ve 2'nin yayılımı gibi) ulusal ölçekli olmuştur (87). Kolonize hastaların uluslararası transferi ise, ÇİD *A.baumannii* türlerinin Avrupa'da epidemik yayılımına neden olmuştur(88).

Edinilmiş sınıf D karbapenemazların ikinci büyük kümesi OXA-40, İspanya'da izole edilen karbapeneme dirençli *A.baumannii*'nin kromozomunda tanımlanmıştır (89). Bu kümenin altında bildirilen diğer enzimler OXA-25,OXA-26 ve OXA-72'dir (86,90). Bu enzimler de plazmit ya da kromozomal kaynaklı olabilmektedirler. OXA-24/40 kümesi, Avrupa, Asya ve Amerika'dan bildirilmiş olmakla birlikte, en yaygın İspanya ve Portekiz'dedir (91).

Üçüncü küme Poirel ve arkadaşlarının tanımladığı OXA-58 CHDL'dir(92). Bu zamana kadar *blaOXA-58* geni sadece *Acinetobacter* türlerinde saptanmıştır. *A.baumannii* dışında, *A. junii*, *A. pittii* ve *A. nosocomialis*'te OXA-58 benzeri oksasilinazlar tanımlanmıştır (90,93). OXA-58 geninin çoğu zaman plazmit ile kodlanması tüm dünyada ve ülkemizde bu kadar yaygın olmasını açıklamaktadır. (94-96). OXA-96 ve OXA-97 benzer hidroliz özellikleri ile bu kümenin içinde yer almaktadır (97).

Yakın zamanda Brazilya'da izole edilen *A.baumannii* kökenunda tanımlanan OXA-143 enzimi dördüncü CHDL kümesini oluşturmaktadır (98). Protein seviyesinde OXA-24/40, OXA-23 ve OXA-58 kümeleriyle sırasıyla %88, %63 ve %52 oranında aynıdır.

Tüm OXA karbapenemazların etkisi doğal olarak ortaya çıkan plazmitteki ISAb1 ve ISAb3 elementlerinin varlığı ile güçlenmektedir (99).

### 2.5.1.1.3 Metallo $\beta$ -laktamazlar

*A.baumannii*'de karbapenem direncine neden olan diğer bir edinilmiş  $\beta$ -laktamaz sınıfı da, Ambler sınıf B metallo- $\beta$ -laktamazlardır (MBL). Monobaktam dışındaki tüm  $\beta$ -laktam antibiyotikleri hidroliz ederler ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler. Etkinlikleri için çinko elementine ihtiyaç duyarlar ve etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ile inhibe olurlar (81).

Sınıf D karbapenemazlar kadar yaygın olmamalarına rağmen, karbapenemlere karşı onlardan 100-1000 kat daha fazla hidrolitik aktiviteleri vardır (80). Günümüze kadar birçok MBL tanımlanmış olup bunlardan sadece IMP, VIM, SIM ve NDM *A.baumannii*'de saptanmıştır. NDM dışındakiler tipik olarak sınıf 1 integron içinde bazı aminoglikozit dirençleriyle birlikte bulunmaktadır (91).

İMP metallo- $\beta$ -laktamaz (imipenem'in kısaltılması kullanılmış) 1990 yılında Japon'ya da bir *Pseudomonas aeruginosa* kökeninde tanımlanmıştır(100). Sonrasında tüm dünyada yaygın olarak *A.baumannii* ve birçok Gram negatif

bakteride bildirilmiştir (101). Asya, Avrupa ve Güney Amerika'da, *A.baumannii*'de şimdiye kadar sekiz MBL (İMP-1,- 2, -4,-5,-6,-8,-11 -19) bildirilmiştir (91).

İlk VIM 1999'da İtalya'nın Verona şehrinde bir *P.aeruginosa*'da tanımlanmış ve "Verona İmipenemazi" olarak adlandırılmıştır (102). *A.baumannii*'de ise ilk kez 2002 yılında tanımlanmıştır (103). Son on yılda *A.baumannii* izolatlarında birçok VIM varyantı (VIM-1, -2, -3,-4,-11), daha çok Avrupa ve Asya ülkelerinden bildirilmiştir (91). *A.baumannii* dışında *A.nosocomialis* ve *A. pittii*'de de VIM MBL saptanmıştır (104).

SİM-1 MBL, Kore, Seul' den bir *A.baumannii* kökeni bildirilmiş olup (Seul İmipenemazi) bu zamana kadar bildirilen *bla*SİM-1 genine sahip tek izolattır (105).

Son yıllarda, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarında saptanan yeni bir MBL "New Delhi MBL" (NDM-1) olarak tanımlandı (106). Bu enzim diğer MBL enzimler gibi, aztrenam dışındaki tüm  $\beta$ -laktamlara karşı direnç sağlamaktadır. *A.baumannii*'de ilk NDM, 2010 yılında, Hindistan'da tanımlanmıştır. Bu köken aynı zamanda *bla*OXA-23 geni ve aminoglikozit direnç geni *armA* geni ile birlikte bulunmaktadır (107). Enzimin ilk varyantı, NDM-1 'den tek aminoasit değişimin olduğu NDM-2 olarak Mısır'dan bir *A.baumannii*'de tanımlanmıştır. Bazı yayınlarda NDM-1 ve NDM-2'nin kromozomal olduğu saptanırken, bazılarında plazmit kökenli olduğu gösterilmiştir(108,109).

#### 2.5.1.1.4 Minör $\beta$ -laktamaz enzimleri

*A.baumannii*'de tanımlanmış Ambler sınıf A  $\beta$ -laktamaz enzimleri, çoğu zaman daha baskın direnç mekanizmaları ile birlikte olduğundan direnç fenotipine etkisi göz ardı edilmiştir (81). *A.baumannii*'de bildirilmiş dar spektrumlu serin  $\beta$ -laktamazlar; TEM-1, SCO- 1, CARB-2,-4,-8, OXA-20, OXA-21 ve OXA-37'dir (91). Ancak genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (ESBL) ve karbapenemaz özelliği olan diğer sınıf A  $\beta$ -laktamazlar da saptanmıştır. PER-1 Vahaboğlu ve arkadaşları tarafından *A.baumannii*'de bildirilen ilk ESBL enzimdir (110). Şimdiye kadar *A.baumannii*'de bildirilen ESBL enzimleri ise VEB-1, TEM varyantları, GES varyantları, SHV, CTX-M ve CARB tipi enzimlerdir. CARB-10 (karbenisilinaz) atipik hidroliz profiline sahip olup, dördüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz ederken sefotaksime ve seftazidime etkisizdir (91). Ayrıca yakın zamanda, Porto Rico'da bir *A.baumannii* izolatında karbapenemaz etkinliği olan KPC-10 bildirilmiştir (111).

*Enterobacteriaceae*'dan farklı olarak *A.baumannii*'de PER ve VEB daha sık saptanmakta hatta bölgesel salgınlara neden olmaktadır(110, 112). CTX-M türevi enzimler ise daha nadir saptanmaktadır(113).

#### 2.5.1.2 Enzimatik olmayan Direnç Mekanizmaları

*A.baumannii*'de karbapenemlere direnç,  $\beta$  -laktamazların yanı sıra, porin kaybı aktif ilaç atımı ve penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklik gibi diğer direnç mekanizmalarının etkileşimi ile ortaya çıkabilmektedir (81).



Birçok yayında dış zar proteinlerinin (OMP) azalmış ekspresyonu ile antimikrobiyal direnç arasında ilişki saptanmıştır (114). *Acinetobacter* türlerinde tanımlanmış OMP, *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunanlara benzemekte ve  $\beta$ -laktamların geçişine izin veren yavaş kanallar olarak bilinmektedir. *A. baumannii*'de karbapenem direncine neden olan üç tane OMP tanımlanmıştır, 33-36 kDa protein, 29 kDa protein (CarO) ve 43 kDa protein. Diğer bir OMP, OmpW'nin ise seftriakson dirençli klinik izolatlarda belirgin derece azalmış ekspresyonu saptanmıştır(114). Bu proteinlerin antibiyotik direncine etkilerinin daha iyi değerlendirilmesi ve genetik temelini anlaşılması için yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Gram negatiflerde eflüks sistemi ile ilişkili antibiyotik direnci yaygın olarak bulunmaktadır. Atım pompaları antibiyotikler de dahil bakteri hücrelerine toksik olan bileşikleri protonlar ile yer değiştirerek dışarı atar. *A.baumannii*'de AdeABC atım pompası iyi tanımlanmış bir pompadır (114). AdeABC' nin fazla ekspresyonu ve CHBL ile birlikteliği karbapenemlere yüksek oranda dirence neden olabilmektedir. Diğer bir atım pompası, AdeIJK'nın ise  $\beta$ -laktam direncine eşlik etmekle birlikte karbapenem direncine neden olduğu gösterilememiştir (114).

### 2.5.2 Kinolonlara Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Florokinolonlar genel olarak DNA giraz (*gyrA* ve *gyrB* genleri ile kodlanır) ve topoizomeraz IV (*parA* ve *parC* genleri ile kodlanır) enzimlerine bağlanarak

etkilerini gösteririler. Kinolonlara karşı direnç, hedef enzimde değişiklik oluşması ve ilacın hücre içine geçişinin azaltılması şeklindedir (115). *A.baumannii*'de *gyrA* (Ser-86-Leu) ve *parC* (Ser-80-Leu) genlerinde kinolon direncine neden olan mutasyonlar olarak bildirilmiştir (115). Bu mutasyonlar sonucunda kinolonların enzim-DNA kompleksine olan afinitesi azalır. Direnç gelişimi kromozomal mutasyonla olup günümüze kadar plazmit ile direnç gelişimi bildirilmemiştir. Ek olarak, kinolon direnci ile ilişkili *A.baumannii*'de beşaktif atım pompası (*AdeABC*, *AdeIJK*, *AdeFGH*, *AbeS*, *AbeM*) tanımlanmıştır (114).

### 2.5.3 Aminoglikozitlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Aminoglikozitler, 30S ribozomlara geri dönüşümsüz olarak bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etkilerini göstermektedirler (116). En önemli direnç mekanizması, başlıca asetilaz, adenilaz ve fosfotransferaz gibi enzimlerin aminoglikozitlerin hidroksil ve amino gruplarını değiştirmesi sonucu oluşur. Bu enzimler plazmit ya da kromozomda kodlanmakta ve aminoglikozit direncinin yayılımında önemli rol oynamaktadır (116). *A.baumannii*'de her üç tür enzim de bulunmaktadır (116). Yakın dönemde tanımlanan enzimlerden biri aminoglikozit asetil transferaz *AAC(6')* olup amikasine karşı dirençten sorumludur (5).

Japonya ve Amerika' da *Acinetobacter* kökenlerinde saptanan plazmit kaynaklı RNA metilaz *ArmA*, 16S rRNA'yı değiştirerek tüm aminoglikozitlere karşı dirence neden olmaktadır (5).

#### 2.5.4 Tetrasiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Tetrasiklinler de aminoglikozitler gibi 30S ribozomlara geri dönüşümsüz olarak bağlanıp protein sentezini inhibe ederler. *A.baumannii*'de yaygın olan tetrasikline direnç mekanizmaları; TetA ve TetB atım pompaları ve ribozomları tetrasiklinin etkisinden koruyan, ribozomal koruyucu TetM proteindir (114).

Glisilsiklinler de tetrasiklin antibiyotiklerin türevleri olup yapısal değişikliği nedeniyle tetrasiklinlere dirençli bakterilere karşı etkindirler. Bu grubun ilk üyesi tigesiklin olup, ÇİD *A.baumannii* kökenlerinde çoğu zaman etkilidir.

Tigesiklin de tetrasiklinlerin ribozomlardaki bağlanma noktasına bağlanır. Ancak tigesiklin bu bağlanma bölgesine tetrasiklinden beş kat daha kuvvetli bağlanır. Bu kuvvetli bağlanma tetrasiklinlere karşı gelişen ribozomal korunmadan tigesiklinlerin etkilenmemesini sağlamaktadır (117). Tigesikline karşı bilinen direnç mekanizması AdeABC, AdeIJK ve AdeFGH atım pompalarıdır. Tigesikline karşı direncin de giderek arttığını gösteren yayınlar mevcuttur(117).

#### 2.5.5 Polimiksinlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Polimiksinler Gram negatif bakterilerin negatif yüklü dış zarına bağlanıp, zarar vererek etki gösterirler (118). Bu antibiyotiklere direnç gelişiminde temel mekanizmalar; (i) bakteriyel polisakkaritin ana yapılarından biri olan lipid A' nın değiştirilerek dış zarın negatif yükünün ortadan kaldırılması ve (ii) antimikrobiyalin proteolitik mekanizmalar ile parçalanarak atım pompalarıyla

dışarı atılmasıdır. *A.baumannii*'de çevresel iyon ve pH ayarlanmasında etkili olan pmrA ve pmrB genindeki mutasyonlarının kolistin direncine neden olduğu gösterilmiştir (119).

## 2.6 *A.baumannii* Enfeksiyonlarının Tedavisi

*A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi, patojenin hemen hemen tüm ilaçlara dirençli doğası nedeniyle giderek zorlaşmaktadır. Tedavide her merkezin kendi direnç profili bilmesi ve hekimlerin kendi tedavi deneyimleri önemlidir. Eldeki tüm antibiyotik sınıflarına direnç gelişimi belirtildiğinden yeni tedavi seçeneklerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır (120).

### 2.6.1 Sulbaktam ve Kombinasyonları

Sulbaktam, penisilin bağlayan protein 2'ye (PBP-2) bağlanarak etkinlik gösterir.  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri arasında *A.baumannii* kökenlerine karşı en yüksek intrinsik bakterisidal aktiviteye sahiptir (120). *A.baumannii* pnömonisi veya bakteremisi olan hastalarda, eğer organizma sulbaktama duyarlıysa, sulbaktam içeren tedavi rejimlerinin diğer ajanlardan üstün olduğu kabul edilmektedir (120). Karbapenem dirençli kökenlerde, karbapenemlerle sulbaktam kombinasyonlarının etkili olduğu gösterilmiştir (121). Sulbaktamın ayrıca sefepim, meropenem, amikasin ve rifampin gibi diğer antibakteriyallerle kombine edildiğinde de etkisinde artış olduğu bulunmuştur(121-123). Ancak günümüzde sulbaktama yüksek oranda direnç gelişimi ve bu direncin yaygınlaşması, bu ilacın kullanımını oldukça sınırlamıştır (91).

### 2.6.2 Rifampin

Rifampinin genellikle Gram pozitif bakterilere etkili olduğu kabul edilmektedir. Ancak in vitro çalışmalar ve deneysel enfeksiyon modelleri, rifampinin tek başına kullanıldığında bile ÇİD *A.baumannii* üzerinde bakterisidal etki oluşturabildiğini göstermiştir. Tek başına kullanıldığında hızla direnç gelişimi görüldüğünden, bir başka antimikrobiyalle kombinasyonu gerekmektedir (124).

Rifampinin, karbapenemler, tigesiklin veya ampisilingibi çeşitli ajanlarla kombinasyonu sonucu aditif veya sinerjik etki elde edilmiş olmasına rağmen en ümit verici kombinasyonu kolistinle olmuştur (125). Pantopoulou ve arkadaşları fareler üzerinde yaptıkları deneysel ÇİD *A.baumannii* enfeksiyonunda rifampin varlığında kolistinin aktivitesinin belirgin olarak arttığını ve kombinasyonun yaşam süresini uzatmada etkili olduğunu göstermişlerdir (126). Ayrıca Bassetti ve arkadaşları sadece kolistine duyarlı XDR *A.baumannii* enfeksiyonu olan 29 (19 pnömoni, 10 bakteriyemi) hastayı kolistin ve rifampin kombinasyonu ile tedavi etmişler, vakaların %76'sında (22/29) klinik ve mikrobiyolojik yanıt elde etmişlerdir. Enfeksiyonla ilişkili mortalite oranını %21 (6/29) olarak bulmuşlar ve tedavi sırasında rifampin veya kolistine direnç gelişimi saptanmamışlardır (127).

### 2.6.3 Karbapenemler

Karbapenemler, duyarlı *A.baumannii* enfeksiyonlarında en etkili tedavi

seçeneğidir. Fakat gün geçtikçe artan karbapenem direnci ilacın kullanımını oldukça kısıtlamıştır (120). Dirençli kökenlerle yapılan in vitro çalışmalarda kolistin ile sinerjistik etkisi gösterilmiştir (128). Tedaviye karar verirken karbapenemlerle ilgili uygun laboratuvar desteğini almak, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini bilmek önemlidir. İmipenem sonuçları meropeneme uygulanamaz. Doripenem, *A.baumannii* izolatlarına karşı imipenem ve meropenemle eşit aktiviteye sahip bir karbapenemdir ve diğer ikisine bir üstünlüğü yoktur (120).

#### 2.6.4 Polimiksinler

Polimiksinler polikatyonik lipopolipeptid yapısında, eski antimikrobiklerdir. Genellikle kullanılan kolistindir ve kolistimetat sodyum (CMS) olarak bilinen ön ilaç formu İV yolla kullanılmaktadır. Kolistin sülfat sadece topikal yolla kullanılır ve laboratuvar da duyarlılık testi için kullanılan formdur. Ayrıca ventilaör ilişkili pnömönide inhale CMS'nin tedavi olarak kullanımı ile ilgili umutlandırıcı veriler mevcuttur (133).

Diğer tüm antibiyotik gruplarına dirençli Gram negatif bakterilerin tedavisinde son seçenek, kurtarıcı ajanlardır. ÇİD ve XDR kökenleri çoğu polimiksinlere duyarlıdır (129). Bu durum ilacın nefrotoksisitesine rağmen tedavide kullanımını arttırmaktadır. Kullanımdaki artışa paralel olarak kolistin direnci giderek artmaktadır(130-132). Tekli kullanımında hızlı direnç gelişebileceğinden sinerjik

etki gösteren antibiyotik kombinasyonları kolistin/rifampisin, kolistin/meropenem, kolistin/minosiklin şeklinde kullanımı denenmiştir (128).

### 2.6.5 Tetrasiklinler

Minosiklin ve doksisiklinin intravenöz formları dirençli asinetobakter enfeksiyonlarında kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Minoksiklin, bakteriyel protein sentezini inhibe ederek hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere etki eden bir tetrasiklin derivativesidir. Son günlerde minosikline duyarlı ÇİD *A.baumannii* izolatlarında kullanımı artmıştır. Minoksiklinin meropenem ve kolistin ile kombinasyonunun sinerjistik etkili olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (128). Mutlaka her ajan için duyarlılık testleri yapılmalıdır. Çünkü tetrasikline dirençli bulunan birçok kökenin minosikline duyarlı olduğu gösterilmiştir (128).

### 2.6.7 Tigesiklin

Semisentetik bir glisilsiklidir. Modifiye minosiklini temsil eder ve bakterinin 30S ribozomal alt ünitesine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek, Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakterilere karşı aktivite gösterir (134). Toplum kökenli pnömoni, komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve intra abdominal enfeksiyonların tedavisinde etkili ve lisanslı bir ajandır. Genellikle ÇİD *A.baumannii*'ye karşı invitro olarak iyi etki göstermektedir. Alternatif tedavi seçeneklerinin olmadığı durumlarda, endikasyonunun dışında kalan kan ve solunum

yolu enfeksiyonlarında da %76 ile %84 arasında klinik cevapların alındığı rapor edilmiştir (135,136). Özellikle ÇİD *A.baumannii*ye karşı tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve çeşitli çalışmalarda MİK değerinin düşük olarak bildirilmesi, bu bakteriye karşı tigesiklin kullanımını oldukça özendirmiştir (136). Olası direnç gelişiminden dolayı diğer antimikrobiyallerle kombine kullanımı önerilmektedir. Karbapenem ve tigesikline dirençli *A.baumannii* ile yapılan in vitro testlerde, tigesiklinin kolistin, levofloksasin ve imipenem ile sinerjik etkisi saptanmıştır (137,138).

## 2.7 Tiplendirme Yöntemleri

Tiplendirme yöntemleri başlıca; enfeksiyon etkenlerinin epidemiyolojik dağılımı, salgın araştırmalarında epidemik kökenlerin kaynağının, yayılım yolunun belirlenmesi, dirençli kökenlerin tanımlanması ve yaygınlığının saptanması, hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların belirlenmesi, reaktivasyonun reenfeksiyondan ayırt edilmesi ve gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemi bulunmaktadır (139).

Ayırım gücü epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatları ayırt etme kabiliyeti olarak tanımlanmaktadır (139). Fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında moleküler yöntemlerin ayırım gücü daha yüksektir ve birçok türe uygulanabilme avantajı sağlamaktadır (139).



### 2.7.1 Fenotipik Yöntemler

Mikroorganizmalar arasındaki ilişkiyi belirlemede birçok farklı fenotipik metot kullanılabilir. Ancak genellikle fenotipik metotların tekrarlanabilirliği, tiplendirme yeteneği ve ayırım gücü yetersizdir (140).

Fenotipik Yöntemler;

- Antibiyotiplendirme
- Serotiplendirme
- Biyotiplendirme
- Bakteriofaj tiplendirme
- Bakteriyosin tiplendirme
- Enzim elektroforezi
- Hücrel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi
- İmmünoblot parmakizi

### 2.7.2. Moleküler Yöntemler

Moleküler tekniklere ilgi, her geçen gün artmakta ve enfeksiyonların epidemiyolojik araştırmalarında giderek artan sıklıkla kullanılmaktadır (139).

Çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiş olmasına karşın bakteriyel türlerin çoğunda kullanılacak en uygun metot PFGE olarak görülmektedir (141).

Moleküler Yöntemler

I. Nükleik asit temelli yöntemler

- Plazmit profilleri

- Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP)
- Pulse field jel elektroforezi (PFGE)
- Segment RNA jel elektroforezi
- Ribozomal RNA jel elektroforezi
- Multiloküs sekans tiplendirme (MLST)

## II. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) temelli yöntemler

- Hedefi bilinen tekrarlayan sekanslar
  - Tekrarlayan Ekstragenik Palindromik Sekans (REP)
  - Çift Tekrarlayan Element (DRE)
  - İnsersiyon Sekans (IS)
  - Polimorfik Guanin/Sitozin-zengin Tekrarlayıcı Sekans (PGRS)
- Random amplifiye polimorfik DNA (RAPD)

En sık kullanılan üç moleküler method aşağıda açıklanmıştır.

### 2.7.2.1. Tekrarlayıcı Ekstragenik Palindromik Sekanslar (REP)-PZR

Bu yöntem genom içerisinde tekrar eden kodsuz DNA parçalarının (amplikon) çoğaltılmasına dayanır. Bu parçaların düzenlenmesiyle analiz edilen organizmanın belirgin farklılıkları ortaya çıkar ve bakteri veya mantarların kökenlerin seviyesinde ayrılması sağlanır.

1. adımda: Genom boyunca dağılmış bulunan tekrar eden seriler rep-PZR primerleriyle bağlanır.

2. adımda: Fragmanlar boyut ve elektrik yükü olarak ayrılabilir. Eksiksiz bir rep-PZR parmak izi profili; boyutları ve yoğunlukları farklı birçok bandın oluşturulması ile elde edilir. Fragmanlar elektroforez özelliği olan bir mikro akışkan ile birbirinden ayrılır. Sistem içerisinde DNA parçalarının bir boya ile boyanması sağlanır ve ayrıldıkça bir ışık yoğunluğu oluştururlar. Bu ışık yoğunluğu, grafiği ortaya koyar. Yakın tarihte ticari olarak bir rep-PCR yöntemi olan DiversiLab (bioMerieux, Fransa) sistemi oluşturulmuştur (142).

#### **2.7.2.2. Multiloküs Sekans Tipleme (MLST)**

Mikroorganizmaların tiplendirmesi için yüksek derecede ayırt edici bir yöntemdir ve klinik olarak önemli bakteriyel patojenlerin epidemiyolojik karakterizasyonu için başarıyla uygulanmaktadır. MLST multilokus enzim elektroforez ile aynı prensiplerden temel almaktadır fakat direkt olarak protein kodlayan yapısal genlerin internal parçalarının DNA sekans karşılaştırmasına dayanmaktadır. Hayati fonksiyonları olan proteinleri kodlayan gen bölgeleri seçilmektedir (143).

#### **2.7.2.3. Pulse field jel elektroforezi (PFGE)**

Yüksek oranda tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olduğundan, bu yöntem birçok araştırmacı tarafından moleküler yöntemler içinde altın standart olarak kabul edilmiştir (144). Bu yöntemde, kökenler eritilmiş agaroz ile karıştırılır, bir deterjan enzim ile lizise uğrattılır ve restriksiyon enzimleri (RE) ile kesilir. Daha sonra agaroz jelde elektroforez uygulanır. Aynı türün farklı alt tiplerindeki

genomik farklılıklar, restriksiyon enzimleri ile kesildikleri bölgelerin de farklı olmasına neden olur.

*Acinetobacter* kökenlerinin DNA'sı izole edildikten sonra *ApaI*, *SmaI* ve *NheI* restriksiyon enzimleri ile parçalanması sonucu oluşan DNA parçalarının uzunluk polimorfizmi gösterilmektedir. PFGE, *A. baumannii* için salgınlarda veya bir hastanın izole edilen farklı kökenlerin tiplendirilmesinde yararlı bir metottur. Dezavantajları, zahmetli, zaman alıcı ve standardizasyonunun zor olmasıdır. Ancak epidemiyolojik çalışmalar için oldukça yararlı bir metottur (144).

#### **2.7.2.3.1. PFGE'de epidemiyolojik yorum**

**Aynı İzolat:** PFGE'de sayı ve boyutları aynı bant paterni sergileyen bakterilerin genetik olarak aynı ve epidemiyolojik olarak ilişkili oldukları kabul edilir. Tek bant farklılığı gösteren izolatlarında klonal olarak ilişkili oldukları gösterilmiştir (141).

**Yakın İlişkili İzolat:** Tek bir nokta mutasyon, insersiyon veya delesyon oluşması nedeniyle aralarında 2-3 bant farkı oluşan izolatlar yakından ilişkili olarak değerlendirilmekte ve epidemiyolojik olarak salgının bir parçası oldukları düşünülmektedir (141).

**Muhtemel İlişkili İzolat:** İnsersiyon veya delesyon ile restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı gibi iki bağımsız genetik değişiklik meydana geldiğinde aralarında 4-6 bant farkı olan izolatlar oluşur. Çok sayıda hastanın kullanıldığı ve 3-6 aydan uzun bir süreyi kapsayan çalışmalarda sıklıkla gözlenir. Bu tür izolatlar muhtemel ilişkili izolatlar olarak değerlendirilir (141)

İlişkısız İzolat: DNA'sında meydana gelen üç ya da daha fazla genetik değişiklikten dolayı yedi ya da daha fazla bant farkı sergileyen bakteriler epidemiyolojik olarak ilişkısız izolatlar olarak kabul edilir (141).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma planı;

1. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Solunumsal Yoğun Bakım Ünitesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi ile Klinik Mikrobiyoloji AD ile görüşülerek çalışmanın alt yapısı planlandı.
2. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alındı.
3. Çalışmaya alınan her hasta için tarafımızca, demografik özellikleri, klinik ve laboratuvar bulguları gibi bilgilerin yer aldığı ve takiplerinin yapıldığı "olgu rapor formu" dolduruldu.
4. Çalışmaya alınan hastaların solunum ve kan örneklerinin bakteriyolojik kültürlerinin takibi yapıldı.
5. Alınan örnekler çalışma gününe dek -80 derecede saklandı.
6. Tüm örnekler Fransa Paris'teki "Universite de Paris SUD-11, Centre Hospitalier Universitaire De Bicetre Service de Microbiologie", Gram negatif bakterilerde direnç için referans laboratuvarına soğuk zincir kurallarına uyarak gönderildi.
7. Prof.Dr. Patrice Nordmann ve Dr.Laurent Poirel danışmanlığında spesifik primerler ile çeşitli direnç genleri araştırıldı. Kökenlerin genotiplendirilmesi PFGE ve MLST yöntemleri ile yapıldı.

### 3.1 Hasta Popülasyonu

1 Şubat 2012 - 1 Ağustos 2012 tarihleri arasındaki altı aylık süre içerisinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi(EÜTFH) Anesteziyoloji ve Reanimasyon ile Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitelerinden EÜTFH Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen solunum veya kan örneğinde karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* saptanan olgular klinik olarak değerlendirildi. Ventilatör ilişkili pnömoni (VIP) ya da bakteremi tanı ölçütlerine uyan hastalar çalışmaya alındı. Klinik ve laboratuvar bulguları ile enfeksiyon düşünülen hastalardan enfeksiyon odağına yönelik mikrobiyolojik incelemelerin istendiği gün enfeksiyonun birinci günü olarak değerlendirildi. Klinik ve laboratuvar bulguları örneğin gönderildiği gün, tedavinin 3-5. günleri arasında ve tedavi sonunda olmak üzere toplam üç kez değerlendirildi. Hastaların demografik özellikleri, hastane ve yoğun bakım yatış/çıkış tarihleri, altta yatan hastalıkları, APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II - Akut Fizyolojik ve Kronik Sağlık Değerlendirmesi) (Bkz Ek 1.) ve SOFA (Sequential Organ Failure Assessment- Ardışık Organ Disfonksiyonu Değerlendirmesi) (Bkz Ek 2.), CPIS (Clinical Pulmonary Infection Score - Klinik Pulmoner Enfeksiyon Skoru) (Bkz Ek 3.), AKIN (Acute Kidney Injury- Akut Böbrek Hasarı Bkz Ek 4.) skorları, enfeksiyon için risk faktörleri (major cerrahi, enteral ve parenteral beslenme, göğüs tüpü, santral venöz

kateter, batın dreni, diyaliz kateteri, immünsüpresyon durumu), etken mikroorganizmanın üreme zamanı, akut faz göstergeleri, süperenfeksiyon, mikrobiyolojik eradikasyon, almakta oldukları antibiyotik tedavileri, tedavi sırasında ve enfeksiyondan sonra 30. gündeki mortaliteleri kaydedildi.

### 3.2 Tanımlar

**Ventilatör ilişkili Pnömoni:** Amerikan Toraks Derneğinin 2005 yılındaki rehberine göre mekanik ventilasyon uygulanmasından 48-72 saat sonra gelişen pnömoni, ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) olarak kabul edildi (145). Pnömoni için ise 1) ateş ( $>38.3^{\circ}\text{C}$ ), 2) lökositoz (lökosit sayısının %25 artması ya da  $\geq 10.000/\text{mm}^3$ ) ya da lökopeni (lökosit sayısının %25 azalması ya da  $\leq 5000/\text{mm}^3$ ), 3) pürülan bronşiyal sekresyon, 4) yeni gelişen veya derinleşen hipoksemi ölçütlerinden en az iki tanesine ek olarak akciğer grafisinde yeni ya da devam eden infiltrasyon bulunması olarak kabul edildi.

### **Hastane Kökenli Bakteremi:**

Hastanın hastaneye yattıktan 48 saat ve sonrasında alınan kan kültürlerinde klinik olarak önemli kan kültür pozitifliğinin olması olarak kabul edildi. Etkenin kan dışında başka bir anatomik bölgeden saptanmaması durumunda ve intravenöz ya da intraarteriyel kateterlere bağlı gelişen bakteriyemiler birincil bakteriyemi olarak değerlendirildi. Etkenin hem kandan hem de başka anatomik bölgeden saptanması durumunda ikincil bakteriyemi olarak kabul edildi (146).



**Ampirik antibiyotik tedavisi:** Klinik ve laboratuvar verileri ile enfeksiyon düşünölen hastada költür sonucu çıkana kadar, olası etkenler ve direnç durumu düşünölerek başlanan antibiyotik tedavisidir (147).

**Uygun ampirik tedavi:** Mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre, duyarlı olduğu en az bir antibiyotiğin uygun dozda başlanmış ve uygun yolla uygulanıyor olmasıdır(145, 147).

**Költür ve antibiyogram sonuçlarına göre uygulanan tedavi:** Költür ve antibiyogram sonuçları gözönüne alınarak düzenlenen tedavidir.

**İmmünsupresif ajan kullanımı:** Enfeksiyon öncesindeki bir ay içinde en az beş gün  $\geq 10$  mg/gün prednizolon veya eşdeğeri steroid alınması veya başka tür immün sistemi baskılayıcı ilaç alınmasıdır (148).

### **3.3. Mikrobiyolojik Yöntemler**

#### **3.3.1. Bakterilerin tanımlanması**

1 Şubat 2012 - 1 Ağustos 2012 tarihleri arasında Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ) ile Göğüs Hastalıkları YBÜ'de yatan hastalardan EÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen kan ve solunum örneği költürleri takibe alındı. Bu örneklerde saptanan ve enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilen karbapenem dirençli *Acinetobacter* kökenleri çalışmaya alındı. Enfeksiyon ataklarında ilk üreyen etken çalışmaya alınmış olup tekrarlayan üremeler laboratuvar çalışmalarına dahil edilmemiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örnekler %5 koyun kanlı agar ve

EMB besiyerlerine ekildi. Besiyerinde saf koloni şeklinde üreyen, Gram-negatif, aerop, hareketsiz, diplokok veya kokobasil morfolojisinde, katalaz pozitif, oksidaz negatif, glukoz ve laktoz fermentasyonu yapmayan bakteriler ileri tanımlama testlerine alındı. Kültür plaklarında saf koloni halinde üremiş olan bakteri kolonilerinden steril öze ile bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland bulanıklığı sağlanacak şekilde süspansiyon edilmiştir. Bakteriler daha sonra otomatize Vitek 2 (BioMerieux, Fransa) identifikasyon sistemi ile tanımlandı ve antimikrobiyal duyarlılıkları belirlendi.

### **3.3.1.2 Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri**

Antibiyotik duyarlılıkları Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemi ile Mueller-Hinton agarda Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'nin önerilerine göre belirlenmiştir (149). Seçilmiş kökenlerin imipenem ve meropenem duyarlılığı E-test (Ab Biodisk) kullanılarak belirlenmiştir.

### **3.3.2 Direnç Genlerinin PZR ile Araştırılması**

#### **DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu için bakteriler beyin kalp infüzyon sıvı besiyerinde (Oxoid) 37°C'de, rotatörde, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen

*A.baumannii* izolatlarının DNA izolasyonu için ticari bir kit olan Qiagen Minikit (ve

Qiacube izolasyon makinesi (QIAGEN, United Kingdom) kullanıldı. İzolasyon üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı.

- Vortekslendikten sonra sıvı besiyerinden 2ml tüplere konarak 10.000 rpm'de 10 dak santrifüj edildi.
- Tüp içindeki sıvı kısım döküldü. Dipte bakteri çökeltisi 200 µl serum fizyolojik ile süspansiyon haline getirildi. 10.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi.
- Tüm sıvı dökülerek 200µl ATL (tissue lysis buffer) tamponu ile dipteki bakteri çökeltisi süspansiyon haline getirildi.
- Qiacube makinasına tüpler ve spin kolonlar yerleştirildi. Bakterilerden DNA izolasyonu protokolüne göre makine çalıştırıldı.

İşlem sonunda bakteri DNA'ları PZR'da kullanılmak üzere -20 derecede saklandı.

## **PZR**

İzole edilen DNA örneklerinde  $\beta$ -laktamaz direnç genlerinin (CTX-M, TEM, SHV, GES, KPC, VEB, PER, OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143, OXA-237, NDM, IMP, VIM SIM ) varlığı klasik PZR yöntemi ile araştırıldı. Amplifikasyon 50µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiş olup reaksiyon karışım örneği; (25mM), dNTP (2mM), Taq Polimeraz enzimi (5U/ml)(Fermentas), 10X primer F (forward), primer R (reverse), 10X PCR tamponu (25 mM MgCl<sub>2</sub> içeren), dH<sub>2</sub>O ve izole edilen DNA örneği olacak şekilde hazırlandı.

dNTP	1 µl
Taq Polimeraz enzimi	0.25 µl
Primer F	2.5 µl
Primer R	2.5 µl
10X PCR Tamponu	5 µl
dH <sub>2</sub> O	37 µl
DNA örneği	2 µl

Elde edilen reaksiyon karışımı primerlere uygun DNA parçalarını çoğaltmak için GeneAmp 9700 PCR (Applied Biosystems, USA) cihazına yerleştirildi ve aşağıda belirtilen amplifikasyon proGramı uygulandı.

Amplifikasyon için ısı döngü cihazı (thermocycler) proGramı

Denatürasyon	94°C'de 5 dk	} 30 döngü
Denatürasyon	94°C'de 30 sn	
Primer bağlanması	55°C'de 30sn	
Primer uzaması	72°C'de 1 dk	
Primer uzaması	72°C'de 7dk	

Disk difüzyonla aminoglikozitlerden, amikasin, netilmisin ve gentamisinden hepsine dirençli olan izolatlarda 16 s rRNA metilaz geni daha önce Bercot ve arkadaşlarının tanımlandığı multipleks PZR 1 ve multipleks PZCR 2 protokolleri uygulanarak arandı ve değerlendirildi (150).

PZR sonucunda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için jel elektroforezi yapıldı.

**Agaroz jelin hazırlanması ve elektroforez**

Amplifiye edilmiş PZR ürünlerinin gözlenmesi için jel elektroforez yapıldı. Bunun için aşağıda işlemler sıra ile yapıldı.

- 1) 4 gr agaroz 400 ml 10 X TAE tamponu içeren erlen içerisinde çözüldü ve mikrodalga fırında ısıtılarak (4-6 dakika) agarozun tamamen erimesi sağlandı.
- 2) Agaroz eridikten sonra eli yakmayacak sıcaklığa gelinceye dek soğumaya bırakıldı.
- 3) Çözelti içerisine jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmek için 20 µl etidyum bromid eklendi (stok solüsyon: 10 mg/ml) ve tamamen karışması sağlandı.
- 4) Jel tankına taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan agaroz çözeltisi döküldü ve oda sıcaklığında 30-45 dakika katılaşmaya bırakıldı.
- 5) Daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel havuzuna jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE tamponu eklendi.
- 6) Kuyucuklara, 5µl amplifikasyon ürünü, 2µl bromfenol mavisi (6X Loading Dye Solution, Fermentas) karıştırılarak mikropipet yardımıyla yüklendi. Ayrıca DNA örnekleri ile beraber bir adet marker (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder) ve bir pozitif, bir negatif kontrol jel kuyucuklarına aynı şekilde yüklendi.
- 7) 100 V'da 1 saat elektroforez yapıldı.
- 8) Süre sonunda etidyum bromid içeren jel, tanktan alınarak jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak) bantların varlığı gözlemlendi.

Pozitif DNA örneğinin karşısına denk gelen bantlar pozitif olarak değerlendirildi.

Pozitif örnekler sekans ile analiz yapıldı.

### **Sekans (Dizi) Analizi**

PZR ile amplifiye edilen genin dizi analizinin yapılmasıdır. İşlem öncesi PZR ürünlerinin saflaştırılması gereklidir. Bu çalışmada Qiaquick PZR saflaştırma ticari kiti (QIAGEN, United Kingdom) kullanıldı.

1)Tüp içerisine spin kolon ( silika zar) yerleştirildi. 40 µl PZR ürünü ve 200 µl

(1/5) PBI ( bağlayıcı tampon) kondu. 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

2)Tüp atılarak spin kolon yeni bir tüpe kondu. 750 µl PE (etanollü yıkama tamponu) eklendi v 10.000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.

3)Santrifüj tekrarlandı.

4) Spin kolon yeni bir tüpe alındı, zarın tam ortasına 50 µl Tris ph: 8.5 tamponu eklendi. 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

5) Spin kolon atıldı. Tüp içindeki saflaştırılmış PZR ürünleri sekans için -20 derecede bekletildi.

Sekans reaksiyonu (10 µl için) şu şekilde hazırlandı.

dH <sub>2</sub> O	3 µl
1X primer F/R(tek yön)	3 µl
Big Dye(ddNTP karışımı)	2 µl
PZR ürünü	2 µl

Sekans için ısı döngü cihazı (thermocycler) proGramı ;

96 °C	3 dk	} 25 döngü
96 °C	0.30 sn	
55 °C	0.30 sn	
60 °C	4 dk	
60 °C	7 dk	

İşlem sonrasında elde edilen ürünler ABI3100 sekanser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ile sekanslandı. Nükleotit ve protein analizleri internet veri bankası kullanılarak değerlendirildi.(www.ncbi.nlm.nih.gov).

### 3.3.3 Konjugasyon

PZR ile saptanan, sekans analizi ile doğrulanan direnç genlerinin (kromozom ya da plazmid yerleşimli) yerleşimini, transfer edilebilir olup olmadığını ve fenotipik özelliklerini belirlemek amacıyla katı faz konjugasyon uygulandı.

Alıcı köken olarak; Rifampisin dirençli *A.baumannii* BN4547

Verici olarak: Çalışmamızdaki rifampisin duyarlı kökenler kullanıldı

1. Her iki köken MH (Müller Hungton) agara ekilerek 37°C de enkübe edildi.

2. 1 ml BHI sıvı besiyerine 1 koloni alınarak vortekslendi. Alıcı ve verici kökenlerden eşit sayıda hazırlandı.
3. 37°C rotatörde 4 rpm'de 3 saat enkübe edildi.
4. Yeni bir tüpe 200 µl verici kökenin kültüründen, 800 µl alıcı kökenin kültüründen olmak üzere karışım hazırlandı.
5. Karışım 37°C'de, rotatörde 4 rpm'de 3 saat enkübe edildi.
6. MH agar plağının üzerine 0.45 µm sıklığında filtre kağıdı kondu.
7. Kağıdın üzerine karışımdan 200 µl kondu.
8. Bu şekilde 37°C bir gece enkübe edildi.
9. Ertesi gün filtre kağıdı dikkatlice çıkarıldı. 1 ml H<sub>2</sub>O içeren tüpün içine konarak 5 sn vortekslendi.
10. Bu karışımdan 100 µl alınarak 10ml H<sub>2</sub>O ile süspansiyon yapıldı.
11. Daha önceden tikarsillin (50mg/L) ve rifampisin (100mg/L) ile hazırlanmış, selektif MH agara "T" öze ile ekildi
12. 37°C de bir gece enkübe edildi.
13. Plaklar üzerindeki kolonilerden saf kültür ve antibiyoGram yapıldı. Fenotipik rifampisin dirençli görülen transkonjugat kökenlerde ilgili direnç geninin varlığı PZR ile doğrulandı. Bu durumda direnç geninin transfer edilebilen bir plazmit üzerinde olduğu kabul edildi. Aksi taktirde kromozomal olduğu düşünüldü ya da transfer edilemeyen bir plazmit üzerinde olduğunu göstermek için Kieser yöntemi ile hem transkonjugat kökenlerden hem de



vericiden plazmid izolasyonu yapıldı (151). Agarda yürütülerek plazmid olup olmadığı, varsa boyutu belirlendi.

### **Plazmitlerin tiplendirilmesi**

Konjugasyon sonrasında transkonjugatlarda gösterilen plazmitlerin tiplendirilmesi daha önce tanımlandığı şekilde *A.baumannii* PZR-bazlı Replikon Tiplendirme (AB-PBRT) ile yapıldı (152).

### **3.3.4 PFGE**

#### **PFGE İçin Gerekli Solüsyonlar**

**1) Tampon solüsyonu (1M Tris-0,5mM EDTA-5M NaCl stok solüsyonu):** 10 mM'lık Trizma-baz (Sigma, ABD)'dan 1,211 gr. alınıp 10 ml distile suda karıştırıldı ve 1M'lık Trizma-baz elde edildi. Bu karışımdan tampon solüsyon için 1 ml alındı. 50 mM'lık EDTA (Sigma, ABD)'dan 18,612 gr alınıp 100 ml'de karıştırılıp 0,5 M'lık EDTA elde edildi. Bundan da tampon solüsyon için 10 ml alındı. 5 M'lık NaCl'den (Sigma, ABD) 400 µl alındı. Tampon solüsyon için alınanlar 88,5 ml distile su ile 100 ml'ye tamamlandı, pH: 8,0'a ayarlandı.

**2) Lizozim baz solüsyonu:** 1 M'lık Tris (Sigma, ABD) (pH: 7,2)'ten 1 ml, 5 M NaCl'den 1 ml, %10'luk Na deoksikolattan (Sigma, ABD) 2 ml, %10'luk Na

laurilsarkosinden (Sigma, ABD) 5 ml alınarak hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 20 µl lizozim stoğundan solüsyonun içine katıldı.

**3) Lizozim stok solüsyonu:** 1 ml distile su içine 0,05 gr. lizozim liyofilize (Sigma, ABD) karıştırıldı.

**4) Proteinaz K baz solüsyonu:** 0,5 M EDTA (pH: 8,0)'dan 20 ml, %10 Na deoksikolattan 2 ml, %1 Na laurilsarkosinden 10 ml alınarak hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**5) Proteinaz K stok solüsyonu:** Proteinaz K (Sigma, ABD ) 1 ml'de 20 mg olacak şekilde distile su ile karıştırıldı.

**6) Pmsf çözültisi:** 10 ml etanol içinde 0,174 gr pmsf (Sigma, ABD) çözüldürüldü.

**7) Yıkama tamponu:** 1 M Tris (pH: 8,0)'ten 2 ml, 0,5 M EDTA'dan 10 ml alınarak hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı, pH: 8,0'a ayarlandı.

**8) 1/100 oranında yıkama tamponu + Pmsf:** 10 ml Yıkama Tamponu ile 100 µl Pmsf çözültisi karıştırıldı.

**9) 5 M NaCl solüsyonu:** 5 M'lık hazır solüsyondan kullanıldı.

**10) 10xTBE stok tampon solüsyonu:** Trizma-baz'dan 108 gr, borik asit (Merck, Almanya)'ten 55 gr, 0,5 M EDTA'dan 40 ml alınarak hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda eritildikten sonra pH: 8,0'a ayarlandı.

**11) 0,5 M EDTA:** Cam şişeye 50 mM EDTA'dan 18,612 gr alınıp hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak elde edildi.

**12) 0,5xTBE:** 250 ml 10xTBE'den alıp 4750 ml distile su ile karıştırıldı.

**13) Düşük donma dereceli agaroz:** 100 ml distile su içine 2 gr düşük donma dereceli agaroz (Sigma, ABD)'dan alınıp karıştırılarak mikrodalga fırında eritildi ve kullanılıncaya kadar 55 °C su banyosunda bekletildi.

**14) Etidyum bromür:** 100 ml distile su içinde 1 gr etidyum bromür (Sigma, ABD) çözüldürüldü. Hazırlanan solüsyon ışıktan korunarak +4 °C'de saklandı.

**15) 1xTBE tampon solüsyonu:** Stok olarak hazırlanan 10xTBE solüsyonu distile su ile 1/10 oranında sulandırılarak elde edildi.

**16) %1 agaroz jel:** Agaroz (Sigma, ABD)'dan 1,5 gr, 0,5xTBE tamponundan 150 ml alınıp karıştırılarak mikrodalga fırında eritildi ve kullanılıncaya kadar 55 °C'de su banyosunda bekletildi

### **PFGE Çalışma Yöntemi**

Çalışmada Sigma (ABD) marka kimyasal malzemeler ile Bio-Rad (ABD) firmasının cihazları kullanıldı.

1. Saf kültürden kanlı agara pasaj yapıp 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
2. Ertesi gün 10 ml BHI buyyon içine 2-4 koloni ekim yapılarak rotatörde 35 rpm'de 37 °C'de , bir gece inkübasyona bırakıldı.
3. Bu tüplerden yeni 10 ml buyyon içine 2 ml aktarılıp 37 °C'de rotatörde (35 devir/dk) yaklaşık 1-2 saat inkübe edildi.
4. Spektrofotometri ile optik dansitesi (OD)0,8-1 arasında oluncaya kadar enkübasyona devam edildi.

5. Bu tüplerden; 2 ml'lik dibi yuvarlak ependorf tüplerine 1,8 ml aktarıldı ve 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
6. Üst sıvı atılıp, 1 ml distile su eklendi ve 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
7. Üst sıvı atılıp, dibteki çökeltinin büyüklüğüne göre 50-100-200 µl tampon solüsyonu eklenerek, iyice pipetlenerek yeniden süspanse edildi.
8. Tüpler +4 °C'ye kaldırıldı.
9. Hazırlanan %2'lik düşük donma dereceli agaroz 55 °C su banyosunda en az 15 dk bekletildi.
10. Tüpler buzdolabından alındı ve her tüpe kaç µl tampon solüsyonu eklenmişse aynı miktarda %2'lik düşük donma dereceli agaroz konuldu iyice pipetlenerek, hiç bekletilmeden tıkaç kalıbı kuyularına kuyu ağzına kadar dolacak şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan pipetlendi.
11. Tüplerin hepsi tıkaç kalıbına pipetlendikten sonra tıkaç kalıbı buzdolabına kaldırıldı ve en az 15 dk beklendi.
12. Bu arada lizozim baz solüsyonu içine 1/50 olacak şekilde stok lizozim konup iyice karıştırıldı. Bu lizozim solüsyonundan 2 ml dibi yuvarlak ependorf tüplere 1 ml konuldu.
13. Tıkaç kalıbının her bir kuyusundaki artık donmuş olan jeller teker teker bu lizozimli tüplere aktarıldı.
14. Tüpler 37 °C'de 2 saat enkübe edildi.
15. Bu arada proteinaz K baz solüsyonu içine 1/20 olacak şekilde stok proteinaz

eklenerek, kullanım için pK solüsyonu hazırlandı.

16. İnkübasyonun sonunda steril plastik pastör pipeti ile lizozim solüsyonu aspire edildi.

17. Hazırlanmış olan pK solüsyonundan her tüpe 1ml eklendi.

18. 50 °C'lik su banyosunda bir gece inkübasyona bırakıldı.

19. Ertesi gün tüpler su banyosundan alındı.

20. Tüplerin içindeki sıvılar plastik pastör pipeti ile aspire edildi.

21. Her tüpe 1 ml yıkama tamponu koyup tüpler ters yüz edildi.

22. Yıkama tamponu plastik pastör pipeti ile aspire edilerek 1 ml yıkama tamponu + Pmsf konuldu.

23. Oda ısısında en az 30 dk enkübe edildi.

24. Sıvı aspire edilip 1 ml yıkama tamponu eklendi.

25. Oda ısısında en az 30 dk enkübe edildi.

26. Sıvı aspire edilip 1 ml yıkama tamponu eklendi.

27. Tezgaha bir miktar parafilm konarak tüpün içindeki jel öze ile parafilm üzerine düşürüldü. Bistüri ile 1/3'ü kesildi. Bistüri ile jelin 2/3'lük kısmı tüpün içine geri konarak buzdolabına kaldırıldı.

28. Kesilen 1/3'lük kısım, içinde 0,1x yıkama tamponu olan dibi konik 1,5 ml'lik ependorf tüpün içine kondu. Oda ısısında en az 30 dk enkübe edildi. Bu arada restriksiyon enzim tamponu ve *Apa1* enzimi hazırlandı.

29. Kullanılacak restriksiyon enziminin kendine özel tamponundan 1 ml+9 ml distile su olacak şekilde enzim tamponu hazırlandı.
30. Tüplerdeki 0,1x yıkama tamponu aspire edilerek, enzim tamponundan 3 ml ayırdıktan sonra geri kalanı tüplere 200'er µl konuldu.
31. Tüpler 30-60 dk oda ısısında enkübe edildi.
32. Enkübasyonun sonuna doğru enzim tüp başına 4 IU hesabı ile hazırlandı. Önceden ayrılan 3 ml enzim tamponuna hazırlanan enzim konularak iyice pipetlendi ve sıvı aspire edildi.
33. Her tüpe eşit miktarda 31. madde de hazırlanan enzim + enzim tamponu dağıtıldı.
34. Enzimin çalışma ısısı olan 36 °C'de etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı.
35. Ertesi gün tüplerin içindeki sıvı aspire edildi.
36. Tüplere 1 ml 0,5xTBE konuldu.
37. 30 dk oda ısısında enkübe edildi.
38. Sıvı aspire edilerek yine 1 ml 0,5xTBE konuldu.
39. 30 dk oda ısısında enkübe edildi.
40. İnkübasyon sırasında PFGE jeli hazırlandı. PFGE agarozundan 0,5xTBE ile %1'lik jel hazırlandı. Mikrodalga fırında şişenin ağzı aralık bırakılarak birkaç defa kaynamasına izin verilerek iyice eritildi ve 55 °C'lik su banyosuna konuldu. Bu arada jel taşıyıcı hazırlandı.
41. Enkübasyonun sonunda tüplerdeki sıvı aspire edildi.

- 42.** Tezgaha bir parça parafilm konup, tüp ters çevrilerek parafilm üzerine vurularak jel parafilm üzerine düşürüldü.
- 43.** Kağıt havlu ile jelin etrafındaki sıvı uzaklaştırıldı.
- 44.** Yuvarlak uçlu öze yardımıyla jel tarağın bir dişi üzerine, en uç kısma gelecek şekilde konuldu.
- 45.** Tarağa konulan jelin üstünde hiç sıvı olmaması gerektiğinden jeller tarak üstüne yerleştirildikten sonra kağıt havlu ile iyice kurulandı.
- 46.** Moleküler ağırlık marker tüpünden bir miktar jel alınıp, bakteriler için hazırlanan jel boyutunda kesildi ve diğer jeller gibi tarak dişi üstüne konuldu. CHEF DNA Size Standards Lambda Ladder (48,5-970 kpd) kullanıldı.
- 47.** Tarak dişleri uç kısımlarındaki minik jellerle birlikte yerine oturtuldu.
- 48.** Su banyosunda beklemekte olan PFGE agarının büyük kısmı tarağın karşı tarafından yavaşca jel tankına dökülüp, dipte 3-5 ml bırakıldı ve yeniden su banyosuna konuldu. Dökerken hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi.
- 49.** Agarın donması beklendi. Donduktan sonra tarak yavaşca çıkarıldı.
- 50.** Tarak dişlerinden kalan boşluklar ayrılan 3-5 ml PFGE jeli ile pipet yardımıyla dolduruldu.
- 51.** Bunlar da donunca agar altındaki siyah destek ve siyah dikdörtgen çerçeve ile CHEF II PFGE cihazına yerleştirildi ve 6 volt/sn, blok1: 3-8 sn 10s 30dk, blok2: 12-20sn 10 saat 30dk şeklinde proGramlanarak cihaz çalıştırıldı.

52. Cihazdan çıkarılan jel, etidyum bromür (1 µg/ml) (Sigma) ve 1X TBE ile 30 dk çalkalanarak beletildi. UV transilluminatörde incelendi.

53. Oluşan bantlar 'Gel-doc' sistemi (BioRad) yardımıyla bilgisayarda görüntülendi.

PFGE'da oluşan bantların yorumu Tenover ve arkadaşlarının önerilerine göre yapıldı (141).

### 3.3.4 Multiloküs Sekans Tipleme (MLST)

Çalışmamızda seçilmiş *A.baumannii* kökenlerinde MLST ile kolonal ilişki değerlendirilmesi yapıldı. MLST protokü ve analizi internetteki *A.baumannii* veri bankası kullanılarak gerçekleştirildi.

(<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>)

Sekans reaksiyonu ve termosiklus daha önce anlatıldığı gibi uygulandı.

*A.baumannii*'de MLST için sekansı yapılan yedi yapısal gen;

- *cpn60* (60-KDa şaperon)
- *fusA* (uzama faktörü EF-G)
- *gltA* (sitrata sentezi)
- *pyrG* (CTP sentezi)
- *recA* (homolog rekombinasyon faktörü)
- *rplB* (50S ribozomal protein L2)
- *rpoB* (RNA polimeraz altünitesi B)



### 3.4 İstatistiksel değerlendirme

Mortalite ile sonuçlanan ve sağ kalan hastalar arasındaki farklılıklar, kategorik değişkenler için ki-kare (ve gerektiğinde Fisher's exact test), devamlı değişkenler için Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Mortalite üzerine etkili faktörleri değerlendirmek amacıyla, tekli ve çoklu analiz (logistik regresyon analizi) yapılmıştır. Takip sırasında artan ya da azalan parametreleri McNemar- Bowker testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz SPSS 18.0 proGramı kullanılarak yapılmıştır,  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Hastaların Genel Özellikleri ve Enfeksiyon Tipleri

Çalışmaya EÜTF Göğüs Hastalıkları Solunumsal YBÜ' den 24 (%40), Anesteziyoloji ve Reanimasyon YBÜ' den 36 (%60) olmak üzere toplam 60 hasta alınmıştır. Hastaların 6 (%10)'sında altta yatan hastalık bulunmazken, 54 (%90)'ünde en az bir altta yatan hastalık bulunmaktadır. Hastaların 22 (%36)'sinde bir, 15 (%25)'inde iki, 11 (%18,3)'inde üç, 3 (%5)'ünde dört veya daha fazla altta yatan hastalık bulunmaktadır. CPIS; pnömonisi olan 46 hastada, CRP; 52, prokalsitonin;45, mekanik ventilasyon süresi; 56 hastada değerlendirilmiştir. Çalışmamızdaki hastaların genel özellikleri, altta yatan hastalıkları ve enfeksiyonun birinci günündeki laboratuvar bulguları tablo 4.1.1'de verilmiştir. Klinik, laboratuvar ve mikrobiyolojik verilere göre 37 (%61,7) hasta ventilatör ilişkili pnömoni, 15 (%33,6) hasta bakteremi ve 8 (%4,7) hasta eş zamanlı ventilatör ilişkili pnömoni ve bakteyemi tanısı almıştır. Bakteremi olgularından 11 (%73,4)'i birincil, 4 (%26)'ü ikincil bakteremi olarak değerlendirilmiştir. İkincil bakteremi olgularından üçünde, batın içi enfeksiyon, birinde üriner sistem enfeksiyonu odak olarak saptanmıştır.

**Tablo 4.1.1** Çalışmamızdaki hastaların enfeksiyonun ilk günündeki genel özellikleri

Hasta sayısı n	60	25-75 persentil ortancası
Erkek n (%)	34 (56,7)	
Yaş ortalama	63,3	(50,2-79)
APACHE II ortalama	18,9	(15-23)
SOFA ortalama	7,8	(3,35-11)
CPIS (46) ortalama	7	(6-8)
AKIN	n(%)	
Evre 0	35(58)	
Evre 1	6 (10)	
Evre 2	8 (13,3)	
Evre 3	12 (21)	
Yoğun Bakıma Yatış Nedenleri	n(%)	
Medikal	34(56,7)	
Cerrahi	19(31,7)	
Travma	7 (11,7)	
Altta yatan hastalıklar (54)	n(%)	
KVH/HT	19 (31,7)	
Kronik Akciğer Hastalıkları	15 (25)	
KBY/ABY	12 (20)	
Solit Organ Malinitesi	13 (21,7)	
DM	10 (16,7)	
SVH	10(16,7)	
Bağ Dokusu Hastalığı	8 (13,3)	
Hematolojik Malinite	6 (10)	
Diğer*	4 (6,6)	
CRP (52) (ortalama mg/dl)	13,9	(7,6-20,8)
Prokalsitonin (45) (ortalama mg/dl)	14,9	(0,6-15,3)
Lökosit (ortalama/mm <sup>3</sup> )	13913	(8250-16997)
Ateş (ortalama derece)	38	(38-38,6)
Mekanik ventilasyon süresi (56) (ortalama gün)	20,1	(8-26)
Enfeksiyon öncesi YBÜ kalış süresi (ortalama gün)	11	(4-11)
Toplam YBÜ kalış süresi (ortalama gün)	27	(8,2-34,5)
Toplam Hastanede kalış süresi (ortalama gün)	39,3	(14,2-50)

APACHE II: Akut fizyolojik ve kronik sağlık değerlendirme, SOFA: Ardışık organ disfonksiyonu değerlendirme, CPIS: Klinik pulmoner enfeksiyon skoru, AKIN Akut böbrek hasarı değerlendirme, KVH:Kardiyovasküler Hastalık, HT:Hipertansiyon, KBY: kronik Böbrek Yetmezliği, ABY: Akut Böbrek Yetmezliği,Diğer: 2 hastada siroz, 2 hastada alkolizm mevcuttu. DM:Diyabet, SVH: Serebrovasküler Hastalık, CRP: C-reaktif protein.

## 4.2 Acinetobacter Enfeksiyonu Gelişimi Açısından Olası Risk Faktörleri

*Acinetobacter* enfeksiyonu açısından olası risk faktörlerinin dağılımı Tablo 4.2.1' de verilmiştir. Hastaların hepsinde en az bir risk faktörü saptanmıştır. Sekiz hastada (%13,3) bir risk faktörü bulunurken, hastaların 18(%30)'inde iki, 18 (%30) 'inde üç, 16(%26,7)'sında dört veya daha fazla risk faktörü saptandı.

**Tablo 4.2.1** Enfeksiyon açısından olası risk faktörlerinin dağılımı

	n (%)
TPN ile beslenme	43(71,7)
NG varlığı	39(65)
SVK varlığı	37(61,7)
İmmünsüpresif tedavi (steroit ve diğer)	19(31,7)
Cerrahi	19(31,7)
Dren varlığı	12(20)
Diyaliz katateri	10(16,7)
Nötropeni	6(10)
Arteriyel katater varlığı	5(8,3)
Göğüs tüpü varlığı	4(6,7)
Septik şok	23(38,3)
Başka hastaneden transfer	18(30)
90 gün içinde hastanede yatış	34(56,7)
30 gün içinde antibiyotik kullanımı	35(58,3)

TPN: total parenteral nutrisyon, NG; Nazogastrik, SVK; santral venöz katater.

## 4.3 *Acinetobacter* Üremesi Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya alınan 60 karbapeneme dirençli *A. baumannii* kökeninin, disk difüzyon ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 4.3.1'de verilmiştir. Test

edilen tüm antibiyotiklere dirençli (PDR) kökenleri saptanmamıştır. Kökenlerin en duyarlı olduğu antibiyotikler sırasıyla; kolistin (%100), rifampisin (%93), netilmisin (%63,3), doksisisiklin (%39,7) ve tigesiklin (%48,3)'dir. Altmış izolattan 55 tanesi XDR, 5 tanesi ÇİD olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.3.1** *A.baumannii* izolatlarının antibiyotik direnci

Antibiyotik	Dirençli n,(%)
Piperasilintazobaktam	60 (100)
İmipenem	60 (100)
Meropenem	60 (100)
Ampisilinsulbaktam	60 (100)
Seftazidim	60 (100)
Sefepim	60 (100)
Siprofloksasin	59 (98,3)
Sefaperazonsulbaktam	53 (88,3)
Kotrimaksazol	51 (85)
Amikasin	51 (85)
Doksisisiklin	35 (60,3)
Tigesiklin*	31 (51,6)
Netilmisin	22(36,7)
Rifampisin	4 (6,7)
Kolistin	0 (%0)

\* Orta duyarlı kökenler dirençli olarak kabul edimiştir.

#### 4.4 Acinetobacter Enfeksiyonlarında Ampirik Tedavinin Değerlendirilmesi

Çalışmada kültür ve antibiyotik duyarlılık sonuçları çıktığında hastaların almakta olduğu ampirik antibiyotik tedavileri değerlendirilmiştir. AntibiyoGram sonuçlarına göre uygun ampirik tedavi alan (en az bir duyarlı antibiyotiği alan) beş (%9) hasta bulunmaktadır. Uygun olmayan ampirik tedavi alan hasta sayısı ise 55 (%91)'dir (Tablo 4.4.1). Uygun ampirik tedavi alan beş hastanın üçü VİP, ikisi

bakteremi olgusu olarak izlenmiştir. Uygun ampirik tedavi alan hastaların tedavisi; iki hasta tigesiklin+ sulbaktam, bir hasta tigesiklin+kolistin, bir hasta tigesiklin+meropenem ve bir hasta tigesiklin şeklindedir. Bu beş hasta tedavi sırasında mortalite ile seyretmiştir.

**Tablo 4.4.1** Hastaların almakta olduğu Ampirik Tedaviler

Antibiyotik	n (%)
Karbapenem	28 (46,7)
3.kuşak sefalosporin	10 (16,7)
Piperasilintazobaktam	6 (10)
Kinolon	4 (6,7)
Tigesiklin	3 (5)
Tigesiklin+Sulbaktam	2 (3,3)
Tigesiklin+Meropenem	1 (1,)
Tigesiklin+Kolistin	1 (1,6)
Gram negatif etkinliği olmayan antimikrobiyal alan	5 (8,4 )
Toplam	60(100)

#### 4.4 Kültür ve Antibiyogram Sonuçlarına göre Uygulanan Tedavi

Kültür, antibiyotik duyarlılık sonuçları çıktığında ampirik tedavileri uygun olan beş hastanın tedavilerine devam edilmiştir. Diğer 55 hastanın 40'ında duyarlılık sonuçlarına göre değişiklik yapılmış olup kalan 15 hasta ise tedavi değişikliği yapılamadan kaybedilmiştir. Tedavide kullanılan antibiyotiklerin dağılımı tablo 4.4.1'de gösterilmiştir. Kültür sonuçlarına göre tedavi alan 45 hastanın hepsi mikroorganizmanın duyarlı olduğu en az bir antibiyotik ile tedavi edilmiştir.

Hastaların 41 (%91)'inde kombinasyon tedavisi tercih edilirken, sadece dört (%9) hastaya tekli tedavi başlanmıştır. Kombinasyon tedavileri kolistin ve tigesiklin

temelli olarak incelendiğinde, 26 (%58) hasta duyarlı iki ilacı alırken, 15(%33) hasta bir duyarlı ve bir dirençli ilacı kullanmıştır (Tablo 4.4.2). Kolistin kombinasyon ya da tekli olarak, etkene yönelik tedavide en sık kullanılan antibiyotik olmuştur (40, % 89).

**Tablo 4.4.1** Kültür sonucuna göre başlanan tedaviler

	n (%)
Tedavi başlanamadı	15 (25)
Kolistin+Tigesiklin	21 (35)
Kolistin+Netilmisin	12 (20)
Kolistin+Sulbaktam/Meropenem	3 (5)
Tigesiklin+Sulbaktam/Meropenem	5 (6,7)
Kolistin	4 (8,3)
Toplam	60(100)

**Tablo 4.4.2** Kombinasyon Tedavileri

	n (%)
Kolistin+Duyarlı antibiyotik	23 (51,4)
Kolistin+Dirençli antibiyotik	13 (28,8)
Tigesiklin+Duyarlı antibiyotik	3 (6,6)
Tigesiklin+Dirençli antibiyotik	2 (4,4)
Tekli tedavi (kolistin)	4 (8,8)
Toplam	45 (100)

#### 4.6 Mortalite ve Etki Eden Faktörler

Çalışmamızdaki hastaların kaba mortalitesi %66,7 (n=40), 30. gün mortalitesi ise %71,7 (n=43) dir. Kültür sonuçları çıktığında tedavi modifikasyonu

yapılamayan hastalar erken dönem mortalite olarak değerlendirilmiş olup oran

%25 (n=15) olarak saptanmıştır. Ölen ve yaşayan hastaların klinik özellikleri Tablo

4.6.1' de verilmiştir

**Tablo 4.6.1** Ölen ve yaşayan hastaların klinik özellikleri

	ÖLEN	YAŞAYAN
n (%)	40 (66)	20 (34)
Erkek n (%)	21(53)	13 (65)
Yaş ortalama	63,6	62,7
APACHE II ortalama	20,1	16,7
SOFA* ortalama	9,8	3,9
AKIN* evre3 n (%)	13 (100)	0
Septik şok n (%)	22 (95,6)	1 (4,4)
CRP* ortalama	13,7	14,2
Prokalsitonin*ortalama	21	2,7
Albumin* ortalama	2,4	2,4
Lökosit* ortalama	12708	14162
Anestezi YBÜ n (%)	24	12
Göğüs YBÜ n (%)	16	8
VİP n (%)	29 (66,6)	16 (33,4)
Bakteremi n (%)	11 (73,3)	4 (26,7)
Kronik Akciğer Hastalığı n (%)	9 (60)	6 (40)
Hematolojik malinite n(%)	5 (83,3)	1 (16,7)
DM n (%)	7 (70)	3 (30)
Bağ doku hastalığı n (%)	8 (100)	0 (0)
Böbrek yetmezliği n (%)	12 (92,3)	1 (7,7)
KVH n(%)	15 (%80)	4 (20)
İmmünsüpresif tedavi n (%)	14 (74)	5 (26)
Nötropeni	6 (100)	0 (0)
Cerrahi girişim	13 (68,4)	6 (31,6)
SVK	25 (67,5)	12 (32,5)
TPN	29 (67,4)	14 (32,6)
NG	25 (62,5)	15 (37,5)
Diyaliz katateri	10 (100)	0 (0)
Başka hastaneden transfer	15 (83,3)	3 (16,7)
Koenfeksiyon	7 (46,7)	8 (53,3)
Süperenfeksiyon	13 (52)	12 (48)
Tedavi süresi (ortalama gün)	5,7	14,2
Mekanik Ventilasyon süresi (ortalama gün)	13,4	32,3
YBÜ kalış (ortalama gün)	20,8	39,1
Hastanede kalış (ortalama gün)	30,2	57,6
Klinik yanıt var	8 (31)	18 (69)
Mikrobiyolojik eradikasyon var	13(46,4)	15 (53,6)

APACHE II: Akut fizyolojik ve kronik sağlık değerlendirmesi, SOFA: Ardışık organ disfonksiyonu değerlendirilmesi, AKIN Akut böbrek hasarı değerlendirilmesi, KVH:Kariyovasküler Hastalık, DM:Diyabet, SVH: Serebrovasküler Hastalık, CRP: C-reaktif protein, VİP: Ventilator ilişkili pnömoni, YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi,TPN: total parenteral nutrisyon, NG: Nazogastrik, SVK: santral venöz katater \* Enfeksiyonun birinci günü değerlendirilen sonuçlar



Genel olarak değerlendirildiğinde, ölen hastalarda enfeksiyonun birinci günündeki ortalama SOFA skoru (p:0,000), prokalsitonin değeri (p:0,01) ve tedavinin üçüncü günündeki SOFA skoru (p:0,001) daha yüksek saptanmıştır. Eşlik eden durumlar değerlendirildiğinde ise, enfeksiyonun birinci gününde septik şok (p:0,000), bağı dokusu hastalığı (p:0,03), böbrek yetmezliği (p:0,006), diyaliz katateri varlığı (p:0,01) mortalite ile ilişkili saptanmıştır. Diğer etkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Lojistik regresyon analizi ile mortaliteye etki eden birden fazla değişken birlikte değerlendirildiğinde ise sadece enfeksiyonun birinci günündeki SOFA skorunun mortalite üzerine etkili olduğu saptanmıştır (p:0,012).

McNemar- Bowker testi ile tedavi öncesi AKIN (1)ve tedavi sırasındaki AKIN(3) skorları arasındaki ilişki 42 hastada değerlendirildi. Hastaların % 50' (21) sinde de başlangıçtaki AKIN değeri aynı kalırken, %4 (2) 'ünde gerileme saptandı. Hastaların %46(19)'da ise bazal AKIN düzeyleri tedavi ile belirgin olarak arttı (P:0,018). Tedavi sırasında bazal renal fonksiyonları bozulan 19 hastanın hepsi kolistin ile kombinasyon tedavisi almaktaydı. Beş tanesinde (%26) kolistin tedavisi bu yan etki nedeniyle kesildi. Hastaların 14 tanesinde ise doz azaltıldı.

Ölen hastaların alt analizinde; tedavi alamadan ölen 15 hastada, tedavi sırasında mortalite ile seyreden 25 hastaya göre; enfeksiyonun birinci gününde daha yüksek prokalsitonin ortalaması (p:0,001), daha yüksek SOFA ortalaması

(p:0,000), daha düşük albumin ortalaması (p:0,005), daha yüksek oranda septik şok (p:0,002) saptandı.

Tedavide kullanılan antibiyotiklere göre mortalite oranları tablo 4.4.1' de verilmiştir. Kolistin ve tigesiklin kombinasyonu en sık tercih edilen tedavi şekli olup mortalite oranları diğer tedavilere göre bir miktar daha düşük olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

**Tablo 4.6.2** Tedavide kullanılan antibiyotikler ve mortalite

Tedavi	Hasta sayısı	Mortalite n(%)
Kolistin+Tigesiklin	20	9 (45)
Kolistin+Netilmisin	12	8 (67)
Kolistin+Sulbaktam/meropenem	3	2 (67)
Tigesiklin+Sulbaktam/meropenem	6	4 (67)
Kolistin tekli	4	2 (50)
Toplam	45	25 (55)

Hastaların eşlik eden enfeksiyonları değerlendirildiğinde, 15 (%25) hastada koenfeksiyon, 25 (%55) hastada ise süperenfeksiyon saptandı. Ne koenfeksiyon varlığı, ne de süperenfeksiyon varlığı mortalite ile ilişkili bulunmadı. Tedavi verilemeden kaybedilen 15 hastanın 4' (%27) ünde koenfeksiyon bulunmaktaydı. Hem koenfeksiyon hem de süperenfeksiyon etkeni olarak en sık dirençli Gram pozitifler saptandı. Üç hastada vankomisine dirençli enterokok (VRE), üç hastada ise karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* saptandı. Etkenlerin dağılımı tablo 4.6.3 ve 4.6.4'te görülmektedir.

**Tablo.4.6.3** Koenfeksiyon ve süperenfeksiyon etkenlerinin dağılımı

Etken	Koenfeksiyon n (%)	Süperenfeksiyon n (%)
Dirençli Gram pozitif	8 (54)	12 (48)
Dirençli Gram negatif	4 (28)	5 (20)
Duyarlı Gram pozitif	1 (6)	2 (8)
Duyarlı Gram negatif	1 (6)	0
Polimikrobiyal	0	3 (12)
Maya	1 (6)	3 (12)
Toplam	15 (100)	25 (100)

**Tablo.4.6.4** Koenfeksiyon ve süperenfeksiyon etkeni bakterilerin dağılımı

Etken	Koenfeksiyon n (%)	Süperenfeksiyon n (%)
Enterokok	7 (50)	5 (23)
MRSA	2 (14)	6 (27)
<i>Enterobacteriaceae</i>	4 (28)	5 (23)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	5 (23)
KNS	1 (7)	1 (4)
Toplam	14	22

MRSA; Metisiline Dirençli *S.aureus*, KNS: Koagulaz negatif Stafilokok

## 4.7 Mikrobiyolojik sonuçlar

### Bakterilerinin izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlılık testleri

İncelenen 60 *A. baumannii* kökeni, 31'i (%41,6) derin trakeal aspirat, 13'ü (%21,7) kan, 11'i (%18,3) minibal, 3'ü (%5) bronkoalveolar lavaj, 2'si (%3,3) plevral sıvı örneğinden izole edildi. *Acinetobacter* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Çalışılan kökenlerin tümü test

edilen beta laktam antibiyotiklerin tamamına ve farklı gruptan birçok antibiyotiğe dirençli olarak saptandı. (Tablo 4.3.1)

### **PCR ile direnç genlerinin saptanması**

Altmış izolatin hepsinde PZR ile *blaOXA-23* geni saptandı (Resim 1-5). Diğer B-laktamaz genleri açısından tarandı ve *blaOXA-58*, *blaOXA-143*, *blaOXA-237*, *blaOXA-40*, *blaNDM-1*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaSIM-1*, *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*, *blaVEB-1*, *blaPER-1* genleri saptanmadı. Beş izolatta *blaGES* geni pozitif saptandı (Şekil 6). Sekans analizi ile beş enzimin de GES-11 olduğu belirlendi.

AntibiyoGramda amikasin, netilmisin ve gentamisine dirençli saptanan 10 izolata, 16 s rRNA metilaz genleri (*arma*, *rmt B*, *npm A*, *rmt A*, *rmt D*, *rmt C*) için multipleks PZR uygulandı ve hepsinde negatif saptandı.

### ***blaGES-11* geninin genetik yerleşimi ve $\beta$ -laktam direncinin transferi**

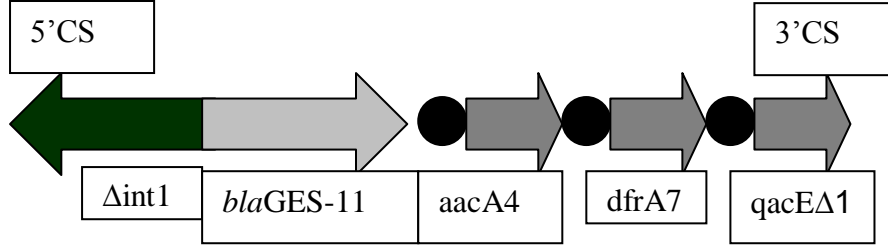
Beş *blaGES-11* geni pozitif *A. baumannii* klinik izolatlarının hepsinin Kieser yöntemi plazmit izolasyonu sonrası agaroz jelde 100kb büyüklüğünde plazmit taşıdığı gösterildi (Şekil 7). Alıcı *A. baumannii* BM4547 izolatlarının (rifampisin dirençli, diğer antibiyotiklere duyarlı), verici (rifampisin duyarlı, tüm  $\beta$ -laktamlara dirençli) ile konjugasyonu sonrası elde edilen transkonjugatların tüm

B-laktam antibiyotiklere dirençli olduğu ve eşlik eden aminoglikozit direnci olduğu görüldü (Şekil 8). Ayrıca transkonjugatlarda GES ve OXA-23 genlerinin varlığı PZR ile gösterildi (Şekil 9-10). Sonuç olarak; hem OXA-23 hem de GES-11 genlerinin tek bir plazmit üzerinde taşındıkları ve birlikte transfer edildiği tanımlandı.

Plazmitlerin tip tayini AB- PBRT ile yapıldı. Tüm plazmitlerin grup 6'ya ait olduğu belirlendi (Şekil 11).

### ***bla*GES geninin genetik çevresinin belirlenmesi**

*bla*GES geninin genetik yapısını değerlendirmek için GES 1A Forvard ve 3'CS Revers, 5'CS Forvard ve GES1B Revers, primerleri ile genin sekans analizi yapıldı. *bla*GES-11 geninin hemen aşağısında AAC(6')-Ib aminoglikozit asetiltransferaz enzimini kodlayan the *aacA4* gen kaseti saptandı. Onun yanında trimetoprim direncini kodlayan *dfrA7* gen kaseti ve sınıf 1 integronun 3' parçası (*qacEΔ1*) bulunmaktaydı. *bla*GES geninin hemen yukarısında integras geni 5' parçası kopuk olarak yer almaktaydı (Şekil 12).



Şekil 12. *bla*GES-11 genini taşıyan integronun şematik çizimi. Genler ve yönleri oklar ile belirtilmiştir. 59-bazlık elemanlar siyah daire ile gösterilmiştir.

### Klinik izolatların genotipik analizi

Önce beş GES-11 pozitif izolata DiversiLab ile genotiplendirme yapıldı. İki genotipe ve bir alt tipe ait olduğu görüldü (Şekil 13). Aynı izolatların yedi gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı ve multilokus sekans tipleme (MLST) yapıldı (Şekil 14-18). İnternet veri tabanında değerlendirildi. Dünyada en endemik olarak bulunan klon 2'ye ait olduğu görüldü (allel 2-2-2-2-2-2-2). Klinik izolatların genotipik analizi pulse field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi yapılarak değerlendirildi (Şekil 19). Temsili kökenler dendogram ile altı farklı pulse tip (ABCDEF) olarak gruplandı (Şekil 20). Kökenlerin %82'si üç genotip (A,B,F)'de yer almaktaydı. Göğüs Hastalıkları ve Anestezi YBÜ' lerindeki genotip dağılımı açısından belirgin fark saptanmadı.

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde yoğun bakım enfeksiyonlarının sıklığındaki artış ve mevcut antimikrobiyal ilaçların çoğuna veya hepsine dirençli mikroorganizmaların yaygınlaşması ile bu enfeksiyonların yönetimi giderek zorlaşmaktadır. Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA), 2009 yılında hastane ve yoğun bakımlarda direnç ve tedavi yönünden en sorunlu patojenleri "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter türleri*) olarak belirtmiştir (153). Bu altı patojen içinde *Acinetobacter baumannii* hastanedeki yüzeylerde uzun süre canlı kalması, dezenfektanlara karşı dirençli olması ve antibiyotiklere çok hızlı direnç geliştirme yeteneği ve giderek artan sıklığı ile öne çıkmaktadır. *A. baumannii*'nin, en etkili tedavi seçeneği olan karbapenemlere karşı geliştirdiği direnç endişe vericidir. Son on yılda dünyanın birçok ülkesinden karbapeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları bildirilmektedir. Geniş çaplı sürveys çalışmaları göre Amerika'da yoğun bakımlarda 2000 yılında % 4.8 olan karbapeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları sıklığı 2009 yılında %21'e yükselmiştir (154). Asya ülkelerinde de benzer artış olup, Tayvan'da 2003'te karbapeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu oranı %18'den 2009'da %63.5'e yükselmiştir (155). Ülkemizde ulusal sürveys verileri bilinmemekle birlikte, Avrupa'da uluslararası sürveys çalışmalarına Türkiye'den gönderilen verilere göre 2000 ve 2006 yıllarında *A. baumannii* kökenlerinde karbapenem direnci %

19.4'den % 60'a yükselmiştir (84). 2008 yılında Türkiye'den çeşitli merkezlerden gönderilen *A. baumannii* kökenlerinin karbapenem MİK'lerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise değerlendirilen 53 kökenden %74'ünün imipeneme dirençli olduğu bildirilmiştir (156). Çalışmamızda alınan 60 karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatının diğer antibiyotik gruplarına karşı da yüksek oranda dirençli olduğu görüldü. Hastanemiz Göğüs Hastalıkları YBÜ'de 2007-2009 yılları arasında 37 ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonunun değerlendirildiği çalışmada, netilmisin direnci %35, sefoperazon-sulbaktam direnci % 43, meropenem direnci % 55 olarak saptanmıştır (157). O dönemde tigesiklin ülkemizde bulunmadığı için antibiyotik duyarlılığı bakılmamıştır. Aynı klinikten 2009-2011 yılları arasında 72 ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonu değerlendirildiğinde ise direnç oranlarında belirgin artış görülmüş olup; netilmisine direnç % 54.2, sefoperazon-sulbaktama direnç % 63.9, meropeneme direnç %91 olarak saptanmıştır. O tarihte yeni kullanıma giren tigesikline ise direnç saptanmamıştır (158). Bizim çalışmamızda ise netilmisine direnç % 36, sefaperazon-sulbaktama direnç % 88, tigesikline direnç ise %51.6 olarak saptanmıştır. Hastanemizde 2010 yılından itibaren kullanıma giren kolistine ise direnç saptanmamıştır. Bu sonuçlara göre son dört yılda sefaperazon-sulbaktama ve karbapenemlere karşı gelişen direnç bu ilaçları tedavi seçeneği olmaktan çıkarmıştır. Diğer önemli bir sonuç ise, sadece iki yılda tigesikline karşı gelişen yüksek direnç olup, önümüzdeki yıllarda bu antibiyotiğin ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımını kısıtlayabileceğini



düşündürmektedir. Çalışmamızda aminoglikozitler arasında netilmisine dirençte bir miktar düşme görülmektedir ancak amikasin direnç % 85 saptanmıştır. Bu durum, netilmisin kullanımının diğer aminoglikozitlere göre daha az olmasına bağlı olabilir.

Literatürde karbapeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu gelişimi için risk faktörlerini araştıran birçok yayın bulunmaktadır. Uzun süreli YBÜ'de yatış, YBÜ'ye yatış öncesinde hastane yatışının bulunması, cerrahi girişim, öncesinde uygunsuz antibiyotik kullanımı, hastane florasında dirençli kökenlerin sıklığı, enfeksiyon kontrol önlemlerine uyulmaması sayılmaktadır (159, 160) . Özellikle altta yatan hastalığı nedeniyle bağışıklık sistemi baskılanmış, organ yetmezliği bulunan, invaziv kataterleri olan, YBÜ'de izlenen hastalar, karbapeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu gelişimi için daha riskli durumdadırlar (159,161). Bizim çalışmamızda, enfeksiyon grubunu karşılaştıracığımız bir kontrol grubu olmadığından karbapeneme dirençli

*Acinetobacter* enfeksiyonu gelişimi açısından risk faktörleri

değerlendirilememiştir.

Düşük virülanslı bir bakteri olarak bilinen *A. baumannii*'ye bağlı enfeksiyonlarda mortalite artışının enfeksiyonun kendisinden mi yoksa altta yatan hastalıklarının ciddiyetinden mi kaynaklandığı tartışma konusu olmuştur. Falagas ve arkadaşlarının *A. baumannii* 'ye bağlı mortalite ile ilgili vaka-kontrol ya da kohort

kontrollü beş yayını değerlendirdikleri derlemede enfeksiyona atfedilen mortalitenin %8.4 ile %36.5 arasında değiştiği görülmüştür (162).

Türkiye'den yapılan karbapeneme dirençli *A. baumannii* 'ye bağlı nozokomiyal enfeksiyonlarda kaba mortalite, bakteriyemilerin değerlendirildiği bir çalışmada % 54.4, tüm nozokomiyal enfeksiyonların değerlendirildiği başka bir çalışmada ise % 61.8 olarak saptanmıştır (163,164). Taşbakan ve arkadaşlarının hastanemiz göğüs hastalıkları YBÜ ÇİD *A. baumannii* pnömoni olgularını değerlendirdikleri çalışmada 30. gün mortalitesi %46.1 olarak saptanmıştır (4). Bizim çalışmamızda ise kaba mortalite %66.7 ve 30. gün mortalite %71.7 oranında saptanmış olup literatüre göre daha yüksek bulunmuştur. Mortalite ile ilişkili faktörlere bakıldığında; hastaların altta yatan hastalıklarının ciddiyeti ve uygunsuz antimikrobiyal tedavi ön plana çıkmaktadır. Metan ve arkadaşlarının ÇİD *A. baumannii* 'ye bağlı bakteriyemi hastalarının prospektif izlem çalışmasında, diyabet, hematolojik malinite, septik şok ile uygunsuz antimikrobiyal tedavi 14 günlük mortalite ile ilişkili saptanmıştır (163). Benzer şekilde Aydemir ve arkadaşlarının çalışmasında da uygunsuz antimikrobiyal tedavinin mortalite üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (165). Tüm hastaların uygun ampirik antimikrobiyal tedavi aldıkları, Taşbakan ve arkadaşlarının çalışmasında ise; yüksek APACHE II skoru, yüksek CRP ve düşük albumin değerleri ile 30 günlük mortalite arasında ilişki saptanmıştır(158). Uygun antimikrobiyal tedavinin başlanma zamanının değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise; YBÜ'de sadece

kolistine duyarlı *A. baumannii* enfeksiyonu olan hastalarda tanı sonrası ilk 24 saat içinde kolistin başlanan grup ile daha geç başlanan grup karşılaştırıldığında, geç başlanan grupta daha yüksek mortalite saptanmıştır (166). Diğer bir çalışmanın çoklu analiz değerlendirmelerinde APACHE II skorunun 20'nin üzerinde olması, altta yatan hastalığın ciddiyeti ve kolistinin geç başlanması mortalite ile ilişkili bulunmuştur (14). Bizim çalışmamızda tekli analiz değerlendirilmesinde, septik şok varlığı, bağdoku hastalığı, diyaliz katateri varlığı, böbrek yetmezliği, enfeksiyonun ilk gününde ve tedavinin üçüncü gününde yüksek SOFA skoru ve yüksek prokalsitonin, mortalite ile ilişkili saptanmıştır. Çoklu analizde ise sadece SOFA skoru ile mortalite arasında ilişki saptanmıştır. Ölen hastalarda daha yüksek APACHE II skoru, daha az mikrobiyolojik eradikasyon saptanmakla birlikte fark, istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışmamızda mortalite ile seyreden hastaların alt analizinde olguların % 37,5'i kültür sonucuna göre uygun tedavi başlanamadan kaybedilmiştir. Tedavi başlanamadan erken dönemde kaybedilen hastalarda, tedavi başladıktan sonra kaybedilen hastalara göre anlamlı olarak SOFA skoru ve prokalsitonin ortalaması daha yüksek, albümin ortalaması ise daha düşük saptanmıştır.

Literatürde *A. baumannii* enfeksiyonlarında bildirilen uygun ampirik antimikrobiyal tedavi başlama oranları %23 ile %40 arasında değişmekte ve uygunsuz ampirik antimikrobiyal tedavi veya gecikmiş tedavi mortalite ile ilişkili saptanmıştır (159, 160, 163,168). Hastalarımıza uygun ampirik antimikrobiyal

tedavi başlama oranı %9 gibi literatüre göre oldukça düşük bir orandadır. Bu sonuç izolatların çoğunun kolistin dışındaki antibiyotiklere karşı yüksek dirençli olması ve hastanemizde kolistinin ampirik tedavide kullanılmamasına bağlı olabilir. Çalışmamızdaki kaba ve 30. gün mortalitelerinin daha önce bildirilen mortalite oranlarından daha yüksek olması, uygun ampirik antibiyotik tedavi oranlarımızın düşük olması ile açıklanabilir. Kültür sonucuna göre uygun tedaviler ortalama 3. günde başlanmış olup, literatür ile uyumlu olarak ilk üç günde başlananlar ile daha geç başlananlar arasında mortalite açısından anlamlı fark bulunmaktadır (p:0,03). Çalışmamızda kültür sonucuna yönelik tedavide kolistin, tigesiklin kombinasyonu ve kolistin, netilmisin kombinasyonlarının ön planda tercih edildiği, daha önceki yıllarda sıkça tercih edilen tigesiklinin sulbaktam ya da netilmisin ile kombinasyonlarının ise azaldığı görülmüştür. Tedavi gruplarında hasta sayılarının az olması nedeniyle kullanılan antibiyotiklerle, mikrobiyolojik yanıt ve mortalite arasında net bir ilişki tespit edilememiştir.

Kolistin, karbapeneme dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında, görece daha düşük direnç saptanması nedeniyle elimizdeki en önemli tedavi seçeneği olarak görülmektedir. Eski bir ilaç olan kolistinin en önemli yan etkisi nefrotoksisite olup, literatürdeki yayınlarda bu oran %11-%45 oranlarında bildirilmiştir(169-171). Türkoğlu ve arkadaşlarının kolistin tedavisinin kronik böbrek yetmezliği olan ve olmayan hastalarda etkinliklerini değerlendirdikleri çalışmada, başlangıçta renal fonksiyonları normal olan hastalarda kolistin kullanımı sonrası % 23.6

oranında nefrotoksisite saptamışlardır (172). Taşbakan ve arkadaşlarının hastanemizin Göğüs Hastalıkları YBÜ'de kolistin ile tedavi ettikleri 9 hastanın sadece birinde nefrotoksisite gelişmiştir (173). Bizim çalışmamızda 19 (%46) hastada kolistin tedavisi sırasında başlangıçtaki renal fonksiyonlarda artış saptandı. Bu hastalardan beş tanesi diyalize alındı, diyalize alınmayan hastalardan beş hastada ise nefrotoksisite nedeniyle kolistin tedavisi kesildi, 14 hastada ise doz azaltılmasına gidildi. Sonuç olarak, çalışmamızdaki kolistin ile ilişkili nefrotoksisitenin, ülkemizden bildirilen çalışmalara oranla daha yüksek saptanmıştır. Bu durum eşlik eden diğer nefrotoksik etkenlere bağlı olabilir.

Türkiye'den yapılan yayınlarda *A. baumannii*de kazanılmış karbapenem direncinin en sık nedeni karbapenem hidrolize eden beta laktamazlar olan OXA-58 ve OXA-23 olarak bildirilmiştir (84, 174, 175). Gür ve arkadaşlarının 2008 yılında Ankara ve İstanbul'da izole edilen 321 *A. baumannii* izolatı ile yaptıkları çalışmada, 2006 yılında izole edilen 75 kökenin 44 (%58.6) ünde karbapenem direnci tespit ettikleri, kökenlerin 26 (%59.1) inin OXA-23, 18(%40.9)'ünün OXA-58 kodlayan gen taşıdıkları gösterilmiştir (84). Ankara'da izole edilen 18 kökenin biri (OXA-23) hariç hepsinin OXA58-like tipi, İstanbul'da izole edilen 26 kökenin 25'inin OXA-23 ve birisinin OXA58-like tipi gen taşıdıkları belirlenmiştir (84). Buna göre OXA tipi karbapenemazların dağılımında bölgesel farklılıkların olabileceği görülmektedir. Bizim de çalışmamızdaki 60 karbapeneme dirençli *A. baumannii* izolatının hepsinde OXA-23 geninin pozitif olduğunu saptanırken daha

yaygın olan OXA-58 saptanmadı. PZR ile direnç genlerinin taranmasında diğer oksasilinazlar ve metallo beta laktamazlar (MBL) negatif saptandı. Çalışmamızla benzer olarak, Türkiye'den *A. baumannii* kökenlerinde metallo beta laktamazları, moleküler olarak saptayan (VIM, SIM, IMP, GIM, NDM) yayın bulunmamaktadır. Ancak fenotipik tarama testi olan imipenem-EDTA disk yöntemi ile MBL taraması ile pozitif saptanan kökenler bildirilmiştir (176). Ülkemizden yapılan çalışmalarda, *A. baumannii* 'de genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardan olan PER-1 geni sırasıyla, %31, %35.9, %46 oranında bildirilmiştir (110, 177, 178). PER-1 enzimi penisilinler, sefotaksim, seftazidim ve aztreonama direnç sağlarken karbapenem ile sefamisinlere etkisizdirler. Aktiviteleri klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile inhibe olmaktadır. Bu verilerin aksine bizim çalışmamızdaki izolatlarda, PER-1 geni saptanmamıştır.

Yakın dönemde *A. baumannii*'de GES-tipi genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar tanımlanmıştır (179, 180). GES-tipi beta laktamazlar daha önce *Enterobacteriaceae*'da bildirilmiş olup, diğer genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar gibi penisilinleri, 3. ve 4. kuşak sefalosporinleri hidroliz ederler (181). Ancak diğer GSBL'dan farklı olarak değişik varyantları karbapenemleri hidroliz edebilmektedir. B-laktamaz inhibitörleri ile inhibisyon durumları da varyantına göre değişmektedir. Aktif bölgesindeki aminoasit değişimi olan GES-4, GES-5 ve GES-6, GES-11, GES-14 varyantları sefamisinleri ve karbapenemleri değişen oranlarda hidroliz edebilmektedir (179, 182, 183). *A. baumannii* 'de ilk GES,

Fransa'dan bildirilmiş olup, daha sonra Belçika ve Kuveyt'en izole edilen kökenlerde bildirilmiştir (179, 182, 183) Bogaerts ve arkadaşlarının çalışmasında Belçika'nın 18 hastanesinden elde edilen 125 ÇİD *A. baumannii* kökeni GES tipi GSBL için PZR ile taranmış, 9 izolatta GES enzimi (4 GES-11, 4 GES-12 ve 1 GES-14) saptanmıştır. Bu izolatlar kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere karşı dirençli bulunmuştur. GES pozitif saptanan altı hastada (2 hasta Mısır, 2 hasta Filistin, 2 hasta Türkiye) yurtdışı seyahat öyküsü bulunmaktadır. GES-11 ve GES-12'nin enzim analizinde karbapenemlere karşı zayıf hidrolitik aktivite saptanmakla birlikte, GES-14'ün karbapenemleri yüksek oranda hidroliz ettikleri gösterilmiştir. GES enzimi taşıyan izolatların hiçbirinde karbapenemi hidroliz eden diğer  $\beta$ -laktamazlar saptanmamıştır. Bunun sonucunda GES-tipi genişlemiş spektrumlu beta laktamazların eşlik eden ek direnç mekanizmalar ile birlikte karbapenem direncine neden olabileceği belirtilmiştir (182). Bonnin ve arkadaşları ise Kuveyt'in farklı hastanelerinden izole edilen 63 ÇİD *A. baumannii* kökeninin hepsinde GES tipi  $\beta$ -laktamaz saptamışlardır. 62 izolatta GES-11 ve bir izolatta ise GES-14 tanımlanmıştır. Diğer  $\beta$ -laktamazlar tarandığında, 33 izolatta eşlik eden OXA-23 enzimi saptanmış olup diğer direnç genleri negatif saptanmıştır (183). Bizim çalışmamızda da moleküler olarak direnç genlerini taradığımız 60 karbapenem dirençli izolatin hepsinde OXA-23 pozitif saptanmıştır. İzolatlarımızın beşinde ise eşlik eden GES-11 GSBL enzimi saptanmıştır. Hastaların hiçbirinde seyahat öyküsü bulunmamaktadır. Bildiğimiz kadarıyla

çalışmamız Türkiye'den *A. baumannii* kökenlerinde GES-tipi  $\beta$ -laktamaz enzimini bildiren ilk çalışmadır. GES-11 enziminin genetik yerleşimini belirlemek amacıyla konjugasyon yapılmış ve hem OXA-23 hem de GES-11 genlerini içeren transkonjugatlar elde edilmiştir. Transkonjugatlarda plazmit varlığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda GES-11 geninin plazmit ile taşındığı, kökenler arasında transfer edildiği ve OXA-23 geni ile aynı plazmitte bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca plazmitin tiplendirilmesi PZR ile yapılmış ve daha önce *A. baumannii*'de tanımlanan plazmit gruplarından, grup 6'ya ait olduğu tespit edilmiştir. Bu plazmit türü *A. baumannii* 'de sıkça bulunmakta ve OXA-23 karbapenem geninin transferi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (184). Bulgularımız Bonnin ve arkadaşlarının çalışmasını destekler niteliktedir (183). GES-11 geninin çevresini belirlemek amacıyla daha önce literatürde belirtildiği şekilde PZR ile haritalandırma yapılmıştır. Diğer yayınlarda belirtilen GES-11'in genetik çevresi ile uyumlu olarak saptanmıştır (180, 183). Farklı bir çevresel genetik eleman tespit edilmemiştir. GES-11 geni taşıyan beş izolatın birbirleriyle olan genotipik ilişkinin değerlendirilmesi Diversilab (REP -PZR) ile yapılmış ve iki genotipe ve bir alt tipe ait oldukları görülmüştür. Dünyadan bildirilmiş diğer klonlar ile ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla MLST yapılmıştır. Bu kökenlerin Avrupa'da yaygın olarak bulunan klon II (ST 2) 'ye ait oldukları belirlenmiştir. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, Bonnin ve arkadaşlarının çalışmasında Kuveyt'ten bildirilen GES-11 taşıyan izolatların daha çok ST 3, ST 113 ve ST 178'e ait



oldukları bildirilmiştir. Klon 113 ve 178 Suudi Arabistan'da yaygın olup Avrupa'dan bildirilmemişlerdir (183). Erciyes Üniversitesi'nden, 2013'te yayınlanan makalede, 100 *A. baumannii* kökenini temsil eden izolatların uluslararası klonitesi MLST ile değerlendirilmiştir. Kökenlerin çoğunluğu (41) ST 84, 22 tanesi ST 2, 10 tanesi ST 109 ve 18 tanesi de yeni bir ST grubu olarak tanımlanmıştır (185). Bizim çalışmamızda 60 izolattan sadece GES-11 pozitif olan beş tanesine MLST ile değerlendirilmesi yapılmıştır. Diğer izolatların klonitesi ile ilgili yorum yapılamamaktadır.

Çalışmamızdaki izolatların birbiriyle ilişkisini değerlendirmek amacıyla literatürde altın standart olarak tanımlanan pulse field jel elektroforezi (PFGE) ile genotiplendirme yapılmıştır. GES pozitif olan beş izolatın tiplendirmesine kullanılan DiversiLab (PEP-PZR) yöntemi daha az zaman alıcı ve kolay olmasına rağmen yüksek maliyeti nedeniyle ancak az sayıda izolatlarla kullanılabilir. PFGE sonuçlarının dendogramında izolatların %82'sinin üç genotipte (A,B,F) toplandığı, toplamda 6 genotip (A,B,C,D,E,F) olduğu görüldü. GES pozitif olanların, diğer izolatlarla aynı genotip grubunda (A ve B) yer aldığı görüldü. Sonuç olarak, başlangıçta aynı genotipte olan izolatların bazılarının GES geni sonradan edindiği düşünüldü. Altı farklı genotipin hastanemiz Anestezi YBÜ ve Göğüs Hastalıkları YBÜ'de endemik olduğu saptandı. Her iki yoğun bakım arasında genotipler açısından fark yoktu. Bu durum farklı binalarda bulunan bu iki yoğun bakım ünitesi arasında hasta transferi ya da sağlık personeli ile bulaş olduğunu düşündürdü.

Ayrıca üçüncü basamak üniversite hastanesi olması dolayısıyla yoğun bakım ünitelerimize çevre hastanelerden oldukça sık hasta transferi olmaktadır. Çalışmamıza alınan hastaların % 30'u başka hastaneden transfer edilmişti. Bu durum çalışmamızda poliklonal kökenlerin endemik olması ile ilişkili olabilir.

Ülkemizde bu zamana kadar değişik hastanelerden *A. baumannii* kökenlerinin moleküler epidemiyolojisinin PFGE ile değerlendirildiği dört çalışma bulunmaktadır. İlk çalışmada, Van'da bir eğitim araştırma hastanesi YBÜ' de *A. baumannii* salgınını değerlendirmek amacıyla 8 klinik örnek ve 18 çevresel örnek (YBÜ ekipmanları, personelin elleri ve eldivenlerden) PFGE ile değerlendirilmiştir. Sonuçta tek bir genotipe ait oldukları belirlenerek, YBÜ' da bulaşın tek bir kaynaktan olduğu ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasında belirgin eksiklik olduğunu belirtmişlerdir (186). Erciyes Üniversitesi'nden yayınlanan çalışmada ise 1 yıl içindeki *A. baumannii*'ye bağlı nozokomiyal bakteremi hastaları izlenmiştir. Toplam 41 (%80'ni YBÜ'den) köken arasındaki klonal ilişki PFGE ile değerlendirilmiştir. İzolatların %80.5'inin üç genotipe ait olduklarını saptamışlardır. Sonuç olarak YBÜ'de çapraz kontaminasyon olduğunu, izolasyon önlemlerinin yeterince uygulanmadığını belirtmişlerdir (187). Malatya'dan bildirilen çalışmada bir yıl içinde hastanedeki tüm kliniklerde enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen tüm *A. baumannii* izolatlarının PFGE ile moleküler tiplendirilmesi yapılmıştır. Değerlendirilen 66 izolattan 23 PFGE tipi bulunmuş ve izolatların büyük çoğunluğunun (% 80.5) iki genotipe ait olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu iki genotipin bölgede endemik olarak bulunduğunu ve çevre hastanelerden hasta transferi ile yayılabileceğini öne sürmüşlerdir (188). 2012 yılında Trabzon'dan yayınlanan son çalışmada ise; Beyin Cerrahisi YBÜ'deki hastaların BOS kültüründe üreyen *A. baumannii* izolatları ile sağlık personelinin ellerinden elde edilen *A. baumannii* izolatlarının klonal ilişkisi PFGE ile araştırılmıştır. Toplam 68 (32 BOS'tan, 36 personelin elinden) izolatın %77.9'u 15 farklı genotip olarak belirlenmiştir. Personel ellerinden elde edilen izolatlarla klinik izolatların aynı olduğu üç genotip belirlenmiştir. Sonuç olarak, hastaların bir kısmında enfeksiyon etkeninin, personelin elleri ile bulaştığı gösterilmiştir (189). Bizim çalışmamızdaki *A. baumannii* kökenlerinin poliklonal sonuçlanması, enfeksiyon kaynağı olarak tek bir odak olmadığını poliklonal kökenlerin saptandığı diğer çalışmalara benzer olarak hastaneler arası transfer, servisler arası transfer ve hastalar arası çapraz bulaş gibi birçok faktörün bulaşta sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda karbapeneme dirençli *A.baumannii*ye bağlı VİP ve bakteriyemi hastaları prospektif izlenmiş olup kaba mortalite oranı % 66.7 olarak bulunmuştur.
2. Uygun ampirik tedavi başlama oranımız %9 gibi düşük bir orandadır.
3. Enfeksiyonun birinci gününde yüksek SOFA skoru ve yüksek prokalsitonin, bağ doku hastalığı varlığı, septik şok varlığı, böbrek yetmezliği varlığı ve kültür sonucuna göre uygun tedavinin üçüncü günden geç başlanması tekli analizde mortalite ile ilişkili bulunmuştur. Çoklu analizde enfeksiyonun birinci günündeki SOFA skoru mortalite ilişkili saptanmıştır.
4. Tedaviler arasında klinik yanıt, mikrobiyolojik yanıt ve mortalite açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durum tedavi gruplarındaki hasta sayılarının az olmasına bağlı olabilir.
5. Tedavide en sık tercih edilen antibiyotik kolistin olup, tedavi sırasında hastaların %46'sında nefrotoksisite gelişmiştir.
6. Hastalardan izole edilen *A. baumannii* kökenlerinde karbapenem direncinin OXA-23 karbapenemaz varlığına bağlı olduğu saptanmıştır.
7. Beş izolatta ülkemizdeki kökenlerde ilk kez GES-11 tipi beta laktamaz enzimi saptanmıştır. Bu genin yerleşimi, etrafındaki yapılar değerlendirilmiştir. Dünyadaki diğer kökenlerle MLST ile kıyaslanmış ve Avrupa'da endemik olan ST2 klonu olduğu görülmüştür.

8. Çalışmamızdaki kökenlerin kendi aralarındaki klonal ilişkiyi değerlendirmek amaçlı PFGE yapılmıştır. Altı genotip tanımlanmıştır. Göğüs Hastalıkları ve Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitelerinde *A. baumannii* kökenlerinde üç genotipin poliklonal olarak endemik olduğu saptanmıştır.

9. Çalışmamızda üç genotipin endemik (% 82) saptanması, poliklonal bir yayılımın olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada enfeksiyon kontrolü ve enfeksiyon kaynağına yönelik bir araştırma yapılmamış olmakla birlikte temas izolasyonu başta olmak üzere enfeksiyon kontrol yöntemlerine uyumun artırılması tedavisi zor olan bu enfeksiyonların kontrolünde en önemli basamağı oluşturmaktadır.

10. Çalışmamızda 15 hastanın (%25) uygun antimikrobiyal tedavi başlanamadan kaybedilmesi ve üç günden sonra başlanan uygun antimikrobiyal tedaviye rağmen mortalitenin yüksek olması ampirik tedavi ve etkene yönelik tedavi zamanlamasının değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Çalışmamız sonucunda hastanemiz yoğun bakım ünitelerinde, SOFA skoru yüksek, septik şok ile seyreden, çok yüksek prokalsitonin seviyesi olan 8 günden fazla YBÜ'de yatan hastalarda, karbapenem dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu düşünülerek ampirik olarak erken dönemde kolistin içeren tedavi kombinasyonlarının başlanması hayat kurtarıcı olabileceğini düşünmekteyiz.

EK 1. SOFA SKORU

SOFA Skoru					
	0	1	2	3	4
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	>400	≤400	≤300	≤200	≤100
Plt sayısı	>150 000	≤150 000	≤100 000	≤50 000	≤20 000
Bilirubin (mg/dl)	<1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	>12,0
KVS desteği	Yok	MAP <70	dop <5 dobutamin	dop >5 epi ≤0,1 ne ≤0,1	dop >15 epi >0,1 ne >0,1
GKS	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	<6
Krea/ İdrar Çıkışı (mg/dl/cc)	<1,1	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 ya da <500 cc	>5 ya da <200 cc ya da RRT

RRT= Renal replasman tedavisi

## EK 2. APACHE II SKORU

KRONİK HASTALIK	2	5	5	SKOR
	Elektif Postop	Acil Postop		
			<p><b>Karaciğer</b> : Biyopsi ile kanıtlanmış siroz Dokümanite portal hipertansiyon Portal hipertansiyona bağlı GIS kanama Ensefalopati / koma öyküsü</p> <p><b>Kardiyak Solunum Sistemi</b> : "New York Heart Association" Sınıf IV Ciddi egzersiz kısıtlayan kronik restriktif / obstrüktif / vasküler hastalık Ev işlerini yapamama veya merdiven çıkamama Kronik hipoksi veya hiperkapni Sekonder polisitemi Ciddi pulmoner hipertansiyon (&gt; 40 mm Hg) Ventilatör bağımlılığı</p> <p><b>Böbrek İmmün Yetmezlik</b> : Kronik diyaliz programında olma İmmünsüpresif tedavi (Uzun süreli veya yüksek doz steroid, vb.) Kemoterapi / radyoterapi İnfeksiyona yatkınlıkla seyreden hastalık (Lösemi / lenfoma / AIDS)</p>	

### RISK KATSAYISI

Nonoperative Patients		Postoperative Patients	
<b>Solunum Yetmezliği</b>	Astma / allerji KOAH Kardiyojenik olmayan pulmoner ödem Solunum arresti Aspirasyon / zehirlenme Pulmoner emboli İnfeksiyon Kanser	- 2.108 - 0.367 - 0.251 - 0.168 - 0.142 - 0.128 0	- 1.684 - 1.376 - 1.315 - 1.261 - 1.245 - 1.204 - 1.042 - 0.955 - 0.802 - 0.788 - 0.699 - 0.682 - 0.617 - 0.248 - 0.140 0.060 0.113 0.393
<b>Kardiyovasküler Yetmezlik</b>	Hipertansiyon Aritmi KKY Hemorajik şok / ihpovolemi KAH Sepsis Postkardiyak arrest Kardiyojenik şok Aort diseksiyonu	- 1.798 - 1.368 - 0.424 0.493 - 0.191 0.113 0.393 - 0.259 0.731	- 1.042 - 0.955 - 0.802 - 0.788 - 0.699 - 0.682 - 0.617 - 0.248 - 0.140 0.060 0.113 0.393
<b>Travma</b>	Multiple Kafa	- 1.228 - 0.517	- 0.140 0.060
<b>Nörolojik</b>	Nöbet Kanama İlaç zehirlenmesi DKA GIS Kanaması	- 0.584 0.723 - 3.353 - 1.507 0.334	0.060 0.113 0.393 - 1.150 - 0.797
<b>Diğer</b>	Nörolojik Kardiyovasküler Solunumsal Gastrointestinal Metabolik / Renal	- 0.759 0.470 - 0.890 0.501 - 0.885	- 0.797 - 0.610 - 0.613 - 0.196

## EK 3 CPIS SKORLAMA SİSTEMİ

Klinik Pulmoner İnteksiyon Skoru		Toplam Skor	
	0	1	2
Trakeal sekresyon	az	yoğun	yoğun ve pürülan
Vücut ısısı (°C)	36.1-38.4	38.5-38.9	≥39 veya ≤36
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /F <sub>i</sub> O <sub>2</sub>	>240 veya ARDS		≤240 ve ARDS yok
Akciğer grafisinde infiltrasyon	yok	yaygın	lokalle
Beyaz küre sayısı (/mm <sup>3</sup> )	4000-11000	<4000 veya >11000	<4000 veya >11000+
			band form %50



#### EK 4 AKIN SKORU

Stage 0	Serum kr.başlangıç düzeyine göre artış yok
Stage 1	Serum kr. Başlangıç düzeyine göre $\geq 0.3$ mg/dl veya $\geq\%150-2000$ artış
Stage 2	Serum kr. Başlangıç düzeyine göre $>\%200-299$ artış
Stage 3	Serum kr.başlangıç düzeyine göre $\geq \%300$ artış veya $>0.5$ mg/dl akut artışla serum kr. düzeyinin $\geq 4.0$ mg/dl veya diyaliz başlanması

Bazal kreatinin düzeyi:  $0.74-0.2$  (eğer kadınsa)+ $0.003X$  yaş

## KAYNAKLAR

1. Montefour K, Frieden J, Hurst S et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Crit Care Nurse* 2008; 28:15-25
2. Turton JF, Kaufmann ME, Gill MJ et al. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *J Clin Microbiol* 2006;44:2630-4
3. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clin Infect Dis* 2008;47:444-9
4. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life* 2011;63:1055-60
5. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:538-82
6. Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M. New treatment options against Gram-negative organisms. *Crit Care* 2011;15:215
7. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2006; 2:7
8. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane Enfeksiyon Kontrol Kayıtları 2012-2013.
- 9- Robenshtok E, Paul M, Leibovici L et al. The significance of *Acinetobacter baumannii* bacteremia compared with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: risk factors and outcomes. *J Hosp Infect* 2006; 64:282-287
- 10- Abbo A, Carmeli Y, Navon-Venezia S, Siegman-Igra Y, Schwaber MJ. Impact of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:793-800
11. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical Findings. *Intensive Care Med* 2005; 31:649-55

12. Beijerinck M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl. Koninklijke Akad. Wetensch 1911;19:1092-103.
- 13- Brisou J, Prevot AR. Studies on bacterial taxonomy X. The revision of species under *Achromobacter* group. Ann Inst Pasteur (Paris) 1954;86:722-8
14. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidativenegative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol 1968; 95: 1520-41
15. Rossau R, Landschoot AV, Gillis M, et al. Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. Int J Syst Evol Microbiol 1991;41(2):310-9
16. Bouvet PJ, Grimont PA. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* spp. *Acinetobacter haemolyticus* spp. *Acinetobacter johnsonii* spp. and *Acinetobacter junii* spp. and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol 1986; 36:228-40
17. Nishimura Y, Ino T, Iizuka H. . *Acinetobacter radioresistens* spp. isolated from cotton and soil. Int J Syst Bacteriol 1988;38:209-11
18. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS 1989; 97:595-605
19. Koneman WE, Procop WG, Schreckenberger CP, Woods LG. Nonfermentative Gram negative bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006:8th ed Chapter 7: 303-91.
20. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Tenover JC, Tenover FC (Eds.). Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington ASM Press 2007;770- 802

21. Ford BA, Burnham CA. Optimization of Routine Identification of Clinically Relevant Gram-Negative Bacteria Using MALDI-TOF MS and the Bruker Biotyper. J Clin Microbiol 2013. Epub ahead of print.
22. Bergogne -Bérézin E, Friedman H, Bendinelli M. *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis. Springer 2008, New York, USA.
23. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. International Journal of Antimicrobial Agents 2010, 35: 219-26
24. Speller DCE, Humphreys H. Hospital acquired infection. In: Collier L, Balows A, Sussman M. (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. 9th ed. London Arnold. 1998; 187-229
25. Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar IH. Nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonları. Flora 1999;4: 170-6.
26. Joly Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2005;11(11):868-73
27. Gospodarek E, Grzanka A, Dudziak Z et al. Electronmicroscopic observation of adherence of *Acinetobacter baumannii* to red blood cells. Acta Microbiol Pol 1998; 47(2):213-7
28. Ysakowska M, Sienkiewicz M, Denys A. *Acinetobacter* pneumonia and immune response to this infection. Int Rev Allergol Clin Immunol 2010;16 (1):48-53
29. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. BMC microbiology 2008; 8(1):216-27
30. Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M, Tikvesli S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. J Microbiol Immunol Infect 2008;41(6):513-8
31. Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Med Sci Monit 2004;10(6):180-4

32. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. Molecular mechanisms of ethanol induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog* 2010; 6(4):1520-41
33. Poh C, Loh G. Enzymatic profile of clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Med Microbiol Immunol* 1985; 174(1): 29-33
34. Raymond KN, Dertz EA. Biochemical and physical properties of siderophores. Ed: Crosa JH, Mey AR, Payne SM, Iron transport in bacteria. pp.3-18 ASM Press Washington DC, 2004
35. Echenique JR, Arienti H, Tolmasky ME et al. Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 1992;174(23): 7670-79
36. Nucleo E, Stefannoni L, Fugazza G et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 2009;9(1):270-84
37. Lemon KE, Vlamakis A, Aguilar H, et al. Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. Ed: Romeo T. Bacterial biofilms pp. 2-14, Springer, Berlin, Germany, 2008.
38. Pace JL, Rupp ME, Finch RG. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. CRC Press Taylor & Francis Group. Broken Sound Parkway, United States of America, 2006.
39. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36(7):1938-41
40. Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios* 1996;86(346): 49-58
41. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(3):276-8
42. Gündeş S, Vahaboğlu H. *Acinetobacter* türleri ve *Acinetobacter* ile gelişen enfeksiyonlar, Enfeksiyon Hastalıkları Serisi 147-56,2003

43. Simor AE, Lee M, Vearncombe M et al. An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: Risk factors for acquisition and management, *Infect Cont & Hosp Epidemiol* 2002;23: 261-7
44. Alp E, Ese D, Yıldız O, Andreas Voss A, Melchers W, Doğanay M. Genotypic analysis of *Acinetobacter* blood stream infection isolates in a Turkish university hospital. *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 335-40
45. Fillaux J, Dubouix A, Conil JM, Laguerre J, Marty N. Retrospective Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated During a 4-Year Period in a University Hospital. *Infect Cont & Hosp Epidemiol* 2006;27:647-53
46. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 2006 Mar 1;42(5):692-9
47. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* Infection. *N Engl J Med* 2008;358(12): 1271-81
48. Mc Donald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections:1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance system. *Clin Microbiol Infect* 1999; 9: 1133-7
49. Smith PW. Seasonal incidence of *Acinetobacter* infection. *J Antimicrob Chemother* 1979;140: 275-6
50. Anstey NM: Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at risk groups. *J Clin Microbiol* 2002;40(2):685-6
51. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest* 2006;129:102-9
52. Chen MZ, Hsueh PR, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Luh KT . Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest* 2001;120:1072-7

53. Tilley PA, Roberts FJ. Bacteremia with *Acinetobacter* species: risk factors and prognosis in different clinical settings. *Clin Microbiol Infect* 1994;18(6): 896-900
54. Jang TN, Lee SH, Huang CH, Lee CL, Chen WY. Risk factors and impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study. *J Hosp Infect* 2009;73(2): 143-50
55. Wróblewska M. Novel therapies of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. infections: the state of the art. *Arch Immunol Ther Exp* 2006; 54: 113-20
56. Wareham DW, Bean DJ, Khanna P et al. Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multidrug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:607-12
57. Katsaragakis S, Markogiannakis H, Toutouzas KG et al. *Acinetobacter baumannii* Infections in a Surgical Intensive Care Unit: Predictors of Multi-drug Resistance. *World J Surg* 2008; 32:1194-1202
58. Brahmi N, Beji O, Abidi N et al. Epidemiology and risk factors for colonization and infection by *Acinetobacter baumannii* in an ICU in Tunisia, where this pathogen is endemic. *J Infect Chemother* 2007; 13:400-404
59. Emory TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:428-42
60. Valero C. *Acinetobacter* bacteraemia in a teaching hospital, 1989- 1998. *Eur J Intern Med.* 2001; 12(5):425-9
61. Seifert H, Strate A, Pulverer G: Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: clinical features epidemiology and predictors of mortality. *Medicine* 1995;74:340-9
62. Karaiskos I, Galani L, Baziaka F, Giamarellou H. Intraventricular and intrathecal colistin as the last therapeutic resort for the treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventriculitis and meningitis: a literature review. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Mar 15. Epub ahead of print

63. Taneja N, Singh G, Singh M, Sharma M. Emergence of tigecycline & colistin resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with complicated urinary tract infections in north India. *Indian J Med Res* 2011;133:681-4
64. Levy J, Oshry T, Rabinowitz R, Lifshitz T. *Acinetobacter* corneal graft ulcer and endophthalmitis: report of two cases. *Can J Ophthalmol* 2005;40(1):79-82
65. Kumar SS, Vengadassalapathy L, Menon T. Prosthetic valve endocarditis caused by *Acinetobacter baumannii* complex. *Indian J Pathol Microbiol* 2008;51(4):573
66. Schafer JJ, Mangino JE. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* osteomyelitis from Iraq *Emerg Infect Dis* 2008; 14(3):512-4
67. Marioni G, Marchese-Ragona R, Boldrin C et al. Deep neck abscess due to *Acinetobacter baumannii* infection *Am J Otolaryngol* 2010;31(4):304-7
68. Turunç T, Demiroğlu YZ, Çolakoğlu S. Retrospective evaluation of 15 cases with psoas abscesses. *Mikrobiyol Bul* 2009;43(1):121-5
69. Goh BK, Alkouder G, Lama TK, Tan CE. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* intra-abdominal abscess. *Surg Infect (Larchmt)* 2005;6(3):345-7
70. Fitzpatrick MA, Esterly JS, Postelnick MJ, Sutton SH. Successful treatment of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* peritoneal dialysis peritonitis with intraperitoneal polymyxin B and ampicillin-sulbactam. *Ann Pharmacother* 2012;46(7-8):e17
71. Lin GM, Lin JC, Chen PJ, Siu LK, Huang LY, Chang FY. Pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia following endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Am J Gastroenterol* 2008;103(2):498-9
72. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18, 268-281
73. Georgopapadakou, N. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, eds. *Principles and Practice of Infectious*



Diseases, 2nd ed, Churchill Livingstone, Philadelphia 1432-42, 2003

74. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. IUBMB Life 2011 ;63(12):1061-7

75. Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44, 428-32

76. Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin Microbiol Infect 2005; 11, 15-23

77. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:2941-8

78. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J Antimicrob Chemother 2003; 52:629-35

79. Zhao WH, Hu ZQ. *Acinetobacter*: a potential reservoir and dispenser for  $\beta$ -lactamases. Crit Rev Microbiol 2012; 38, 30-51

80. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12, 826-36

81. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54, 969-76

82. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. Overexpression of the naturally occurring blaOXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAba9. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 4045-7

83. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG.  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 1993;81-7

84. Gur D, Korten V, Unal S, Deshpande LM, Castanheira M. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY ProGram sites. *J Med Microbiol* 2008;57:1529-32
85. Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P. AbaR-type transposon structures in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob Chemother* 2012;67:234-6
86. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 583-8
87. Turton JF, Kaufmann ME, Warner M et al. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. *J Hosp Infect* 2004; 58:170-9
88. Schulte B, Goerke C, Weyrich P et al. Clonal spread of meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in hospitals in the Mediterranean region and transmission to South-west Germany. *J Hosp Infect* 2005; 61:356-7
89. Bou G, Oliver A, Martínez- Beltran J. OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1556-61
90. Wang H, Guo P, Sun H et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem resistant *Acinetobacter* spp. From Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4022-8
91. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol.* 2012;3:148
92. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA- 58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 202-8
93. Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ - lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 399-400

94. D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N et al. Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European Clonal Types I and II in Rome (Italy). *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 347-57
95. Papa A, Koulourida V, Souliou E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a newly established Grek hospital. *Microb Drug Resist* 2009; 15:257-60
96. Kulah C, Mooij MJ, Comert F et al. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36(2):114-8
97. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:627-32
98. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem hydrolyzing class D  $\beta$ - lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 5035-8
99. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:123-30
100. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 147-51
101. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ - lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58
102. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al. Cloning and characterization of blaVIM a new integron borne metallo- $\beta$ - lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43: 1584-90
103. Yum JH, Yi K, Lee H et al. Molecular characterization of metallo-  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genome species from Korea: identification of two new integrons carrying the blaVIM-2 gene cassettes. *J. Antimicrob Chemother* 2002; 49:837-40

104. Espinal P, Roca I, Vila J. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-baumannii *Acinetobacter*. *Future Microbiol* 2011; 6:495-511
105. Lee K, Yum JH, Yong D et al. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4485-91
106. Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1 and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 5046-54
107. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2253-4
108. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E et al. Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1998-2001
109. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1255-9
110. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G et al. Wide spread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey : a nation wide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:22 65-8
111. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1354-7
112. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006;58(1):178-82
113. Potron A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 5: 5946-8
114. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob*

Chemother 2007; 59:1210-5

115. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 463-69

116. Weifeng S, Jianping J, Tuhuang M. Relationship between antimicrobial resistance and aminoglycoside-modifying enzyme gene expression in *Acinetobacter baumannii*. *Chinese Medical Journal* 2005; 118 (2): 141-5

117. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:1001-4

118. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 449-65

119. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S et al. (Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3628-34

120. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51:79-84

121. Ko WC, Lee HC, Chiang SR et al. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 393-5

122. Song JY, Kee SY, Hwang IS et al. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 317-22

123. Kiffer CR, Sampaio JL, Oplustil CP et al. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52:317-22

124. Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Utili R, Zarrilli R. Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in

combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 537-40

125. Rodriguez CH, De Ambrosio A, Bajuk MA et al. In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. *J Infect Dev Ctries* 2010; 4:164-7

126. Pantopoulou A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogannis M et al. Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:51-5

127. Bassetti M, Repetto E, Righi E et al. Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J Antimicrob Chemother* 2008;61: 417-20

128. Liang W, Liu XF, Huang J, Zhu DM, Li J, Zhang J. Activities of colistin and minocycline based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis* 2011;11: 109

129. Park YK, Jung SI, Park KH et al. Independent emergence of colistin resistant *Acinetobacter* spp isolates from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64:43-51

130. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram (Latin America, 2008-2010) . *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:354-60

131. O'Hara JA, Ambe LA, Casella LG et al. Activity of Vancomycin Containing Regimens against Colistin Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Feb 19. Epub ahead of print.

132. Queenan AM, Pillar CM, Deane J et al. Multidrug resistance among *Acinetobacter* spp. in the USA and activity profile of key agents: results from CAPITAL Surveillance 2010. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 ;73(3):267-70.

133. Kuo SC, Lee YT, Yang SP et al. Eradication of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from the respiratory tract with inhaled colistin

methanesulfonate: a matched case-control study. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(9):870-6

134. Stein GE, Babinchak T. Tigecycline: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013 Jan 25. Epub ahead of print.

135 Schafer JJ, Goff DA, Stevenson KB, Mangino JE. Early experience with tigecycline for ventilator-associated pneumonia and bacteremia caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Pharmacotherapy* 2007;27:980-7

136. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 45-55

137. 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; 21: 8-18

138. Ozbek B, Senturk A. Post antibiotic effects of tigecycline colistin sulfate, and levofloxacin alone or tigecycline-colistin sulfate and tigecycline-levofloxacin combinations against *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy* 2010;56: 466-71

139. Andrei A, Zervos MJ. The Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 662-8

140. Huang XZ, Frye JG, Chahine MA et al. Genotypic and phenotypic correlations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-*A. calcoaceticus* complex strains isolated from patients at the National Naval Medical Center. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):4333-6

141. Tenover CF, Arbeit RD, Goering VR et al. Interpreting chorosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9

142. Deplano A, Denis O, Rodriguez-Vilalobos H, De Ryck R, Struelens MJ, Hallin M. Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 2011;49(10):3616-20

143. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4382-90
144. Sambrook J, Russel DW. Pulsed-field Gel Electrophoresis. *Molecular Cloning* 2001;5:55-5.
145. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:388-416
146. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1998; 16(3):128-40
147. Zaragoza R, Artero A, Camarena JJ et al. The influence of inadequate empirical antimicrobial treatment on patients with bloodstream infections in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 412-418
148. Poutanen S, Louie M, Simor A. Risk factors, clinical features and outcome of *Acinetobacter* bacteremia in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997; 16:737-740
149. CLSI. 2012. Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA
150. Bercot B, Poirel L, Nordmann P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71:442-5
151. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984;12:19-36
152. Bertini A, et al. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4168-77



153. The Center of Disease Dynamics, Economics and Epidemiology (CDDEP) Resistance Map 2009. <http://www.cddep.org>
154. Jean SS, Hsueh PR. Antimicrobial drug resistance in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2011;110(1):4-13
155. Jean SS, Hsueh PR. Antimicrobial drug resistance in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2011;110 (1):4-13
156. Leblebicioglu H, Cakir N, Celen M, Kurt H, Baris H, Laeuffer J. Comparative activity of carbapenem testing (the COMPACT study) in Turkey. *BMC Infect Dis* 2012; 12:42
157. Bacakoğlu F, Korkmaz Ekren P, Taşbakan MS et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in respiratory intensive care unit. *Mikrobiyol Bul* 2009 ;43(4):575-85
158. Tasbakan MS, Pullukcu H, Sipahi OR, Tasbakan MI, Aydemir S, Bacakoglu FJ. Is tigecyclin a good choice in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia? *Chemother* 2011;23(6):345-9
159. Zheng YL, Wan YF, Zhou LY Risk factors and mortality of patients with nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Am J Infect Control* 2013 Mar 21. Epub ahead of print.
160. Baran G, Erbay A, Bodur H et al. Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Infect Dis*. 2008 Jan;12(1):16-21
161. Dizbay M, Tunccan OG, Sezer BE, Hizel K. Nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and risk factors. *Scand J Infect Dis* 2010;42(10):741-6
162. Falagas ME, Rafailidis PI. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care* 2007;11(3):134.
163. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B. Factors influencing survival in patients with multi-drug-resistant *Acinetobacter* bacteraemia. *Eur J Intern Med* 2009 Sep;20(5):540-4.

164. Guner R, Hasanoglu I, Keske S, Kalem AK, Tasyaran MA. Outcomes in patients infected with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and treated with tigecycline alone or in combination therapy. *Infection*. 2011;39(6):515-8
165. Aydemir H, Akduman D, Piskin N et al. Colistin vs. the combination of colistin and rifampicin for the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Epidemiol Infect* 2012;7:1-9
166. Tigen ET, Koltka EN, Dogru A, Orhon ZN, Gura M, Vahaboglu H. Impact of the initiation time of colistin treatment for *Acinetobacter* infections. *J Infect Chemother* 2013 Feb 8. Epub ahead of print.
167. Aydemir H, Celebi G, Piskin N et al. Mortality Attributable to Carbapenem-Resistant Nosocomial *Acinetobacter baumannii* Infections in a Turkish University Hospital. *Jpn J Infect Dis* 2012;65: 66-71
168. Erbay A, Idil A, Gözel MG, Mumcuoğlu I, Balaban N. Impact of early appropriate antimicrobial therapy on survival in *Acinetobacter baumannii* blood stream infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34(6):575-9
169. Pintado V, San Miguel LG, Grill F et al. Intravenous colistin sulphomethate sodium for therapy of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *J Infect* 2008;56: 185-90.
170. Cheng CY, Sheng WH, Wang JT, Chen YC, Chang SC. Safety and efficacy of intravenous colistin (colistin methanesulphonate) for severe multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35: 297-300
171. Hartzell JD, Neff R, Ake J et al. Nephrotoxicity associated with intravenous colistin (colistimethate sodium) treatment at a tertiary care medical center. *Clin Infect Dis* 2009;48 :1724-8
172. Turkoglu M, Dizbay M, Ciftçi A, Aksakal FN, Aygencel G. Colistin therapy in critically ill patients with chronic renal failure and its effect on development of renal dysfunction. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39: 142- 5
173. Taşbakan MS, Pullukçu H, Ekren PK et al. Colistin use in ventilator-associated pneumonia due to panresistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyol Bul* 2009;43(1):61-70

174. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M 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: 537-42
175. Kulah C, Mooij MJ, Comert F et al. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(2):114-8
176. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns* 2005;31(6):707-10
177. Kolayli F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboglu H. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 15: 241-5
178. Eraç B, Gülay Z. Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum beta-lactamase among Gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. *Folia Microbiol (Praha)* 2007;52(5):535-41
179. Moubareck C, Bremont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3579-81
180. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:349-54
181. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:622-32
182. Bogaerts P, Naas T, El Garch F et al. GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 ;54(11):4872-8.

183. Bonnin RA, Rotimi VO, Al Hubail M, Gasiorowski E, Al Sweih N, Nordmann P, Poirel L. Wide dissemination of GES-type Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Kuwait. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(1):183-8
184. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4168-4177.
185. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B, Reijden TV, Dijkshoorn L. Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey. *Infect Genet Evol* 2012;14:92-97
186. Güdücüoğlu H, Durmaz R, Yaman G, Cizmeci Z, Berktas M, Durmaz B. Spread of a single clone *Acinetobacter baumannii* strain in an intensive care unit of a teaching hospital in Turkey. *New Microbiol* 2005;28(4):337-43
187. Alp E, Esel D, Yildiz O, Voss A, Melchers W, Doganay M. Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream infection isolates in a Turkish university hospital. *Scand J Infect Dis* 2006;38(5):335-40
188. Cetin ES, Durmaz R, Tetik T, Otlu B, Kaya S, Caliskan A. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *Am J Infect Control* 2009;37:56-64
189. Bayramoglu G, Kaya S, Besli Y et al. Molecular epidemiology and the clinical significance of *Acinetobacter baumannii* complex isolated from cerebrospinal fluid in neurosurgical intensive care unit patients. *Infection* 2012;40(2):163-72