

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Hastane Kaynaklı *Acinetobacter* spp. Kökenlerinde
Antibiyotik Direnç Profili
ve
Moleküler Tiplendirilmesi**

**Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Programı
Yüksek Lisans Tezi**

Ayça Büyük

İZMİR

2011

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hastane Kaynaklı *Acinetobacter* spp. Kökenlerinde
Antibiyotik Direnç Profili
ve
Moleküler Tiplendirilmesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Programı
Yüksek Lisans Tezi

Ayça Büyük

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU

İZMİR

2011

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU
(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Şafak Ermertcan

Üye : Doç. Dr. Semra Kurutepe

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Bu çalışmamda bana destek olan tez danışmanım Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU'ya çok teşekkür ederim. Çalışmamda büyük emeği geçen, desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. F. Ferda YILMAZ KÖZ'e çok teşekkür ederim. Çalışmam boyunca ilgilerini gösteren F. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve diğer çalışanlara çok teşekkür ederim. Her zaman beni dinleyen Uzm. Biy. Pelin DÜNDAR'a, bir an olsun sevgilerini esirgemeyen, her daim yanımda olan ve beni destekleyen başta aileme ve Mert GÜNGÖR'e ve de tüm dostlarıma teşekkür ederim.

İzmir

2011

Ayça Büyük

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I	1
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Acinetobacter</i>	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Morfolojik ve Mikrobiyolojik Özellikler	3
2.1.3. Epidemiyoloji	4
2.1.4. Patogenez ve Virülans.....	6
2.1.5. <i>Acinetobacter</i> Kaynaklı Enfeksiyonlar	7
2.1.6. Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi.....	8
2.2. Bakterilerde Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri.....	12
2.2.1. Fenotipik Yöntemler	12
2.2.2. Genotipik Yöntemler	14
2.3. Antibiyotik Duyarlılık Belirleme Yöntemleri.....	16
2.4. Sinerji Testleri.....	18
2.4.1. Dama Tahtası Yöntemi	19
2.4.2. Zamana Bağlı Öldürme Eğrisi Yöntemi.....	19
BÖLÜM II	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler, Besiyerleri ve Kimyasalların Hazırlanması	20
3.1.1. Besiyerleri	20
3.1.2. Antibiyotikler	20

3.1.3. Antibiyotiklerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	21
3.1.4. Kimyasallar ve Ayraçlar	21
3.1.5. Diğerleri	22
3.2. Yöntem	23
3.2.1. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	24
3.2.2. Arbitrarily Primed (AP) PZR İle Moleküler Tiplendirme	24
3.2.3. Sinerji Testleri	26
BÖLÜM III	30
BULGULAR	30
BÖLÜM IV	45
TARTIŞMA.....	45
BÖLÜM V	56
SONUÇ VE ÖNERİLER	56
BÖLÜM VI	59
ÖZET	59
ABSTRACT	61
BÖLÜM VII.....	59
KAYNAKLAR	

ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ

Grafik 1. <i>Acinetobacter</i> spp. izolatların kliniklere göre dağılımı.....	30
Resim 1. Dama tahtası yönteminde antibiyotik kombinasyonlarının etkisi..	27
Resim 2. 84 <i>Acinetobacter</i> spp. AP-PZR bant profilleri	34
Resim 3. P _A grubu AP-PZR bant profilleri.....	35
Şekil 1. PZR şematik görünümü	15
Şekil 2. 30 no'lu izolatta; MİK: 0.06/0.25µg/ml, 3., 6. ve 24.saatte kolistin ile rifampisin arasında sinerjik etkileşim	42
Şekil 3. 30 no'lu izolatta; MİK: 0.12/0.5µg/ml, 3., 6. ve 24.saatte kolistin ile rifampisin arasında sinerjik etkileşim	43
Şekil 4. 30 no'lu izolatta; MİK: 0.015/2 µg/ml, 3., 6. ve 24. saatte tigesiklin ile rifampisin arasında aditif etkileşim	43
Şekil 5. 30 no'lu izolatta; MİK: 0.03/04 µg/ml, 3., 6. ve 24.saatte tigesiklin ile rifampisin arasında aditif etkileşim	44
Tablo 1. Bakterileri epidemiyolojik olarak tiplendirmede kullanılan fenotipik ve genotipik yöntemler	13
Tablo 2. <i>Acinetobacter</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık sınır değerleri..	24
Tablo 3. Dama tahtası yönteminde kullanılan kombinasyonlar	26
Tablo 4. <i>Acinetobacter</i> spp. izolatların kliniklere ve örneklere göre dağılımı	31
Tablo 5. 84 <i>Acinetobacter</i> spp. izolatının antibiyotik duyarlılık sonuçları .	31
Tablo 6. İzolatların antibiyotik direnç profillerine göre belirlenen antibiyotipleri	33
Tablo7. AP-PZR'ye göre belirlenen sonuçlar	34

Tablo 8. Antibiyotip grupları ve AP-PZR'ye göre belirlenen moleküler gruplara göre izolat sayılarının dağılımı	36
Tablo 9. MİK değerleri, AP-PZR'a göre genotip (G) ve antibiyotip (A) grupları	38
Tablo 10. Dama tahtası yöntemiyle test edilen 15 <i>Acinetobacter</i> spp. izolatı üzerine antibiyotik kombinasyonlarının etkisi	40
Tablo 11. Antibiyotik kombinasyonlarının dama tahtası yöntemiyle belirlenen ΣFİK değerleri ve etkileşim şekli	41

KISALTMALAR

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

AHSL₅: N-açıl Homoserin Lakton

AK: Amikasin

AP-PZR: Arbitrary Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

AYB: Anestezi Yoğun Bakım

BAL: Balgam

BC: Beyin Cerrahisi

BHIB: Brain-Heart Infusion Broth

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

BSAC: The British Society for Antimicrobial Chemotherapy

ÇDR: Çoklu Dirençli

CIP: Siprofloksasin

CL: Kolistin

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

İÇHST: İç Hastalıkları

DDDMP: Demir Düzenleyici Dış Membran Proteini

DMP_S: Dış Membran Proteinleri

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EMB: Eosin Metilen Blue Agar

EPS: Ekzopolisakkarit

ERIC-PZR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polimeraz Zincir Reaksiyonu

EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Test

FDA: United States Food and Drug Administration
FİK: Fraksiyonel İnhibitör Konstrasyon
GyrA: DNA Giraz A
HK: Hemokültür
İDR: İdrar
KAT: Katater
KEMHB: Katyon Ekli Mueller Hinton Broth
LPS: Lipopolisakkarit
MHA: Mueller Hinton Agar
MHB: Mueller Hinton Broth
MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MXF: Moksifloksasin
MLST: Multiloküs Sekans Tipleme
MP: Meropenem
NYB: Nöroloji Yoğun Bakım
ORT: Ortopedi
PDR: Pan Dirençli
PBP: Penisilin Bağlayan Protein
PFGE: Pulsed Field Jel Elektroforezi
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA
REP-PZR: Repetitive Extragenic Palindromic Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RA: Rifampisin
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA: Ribonükleik asit

TAK: Trakeal Aspirat

TEST: The Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial

TGC: Tigesiklin

TSI: Üç Şekerli Demirli Besiyeri

UDS: Ultra Distile Su

XDR: Ekstrem Dirençli

VİP: Ventilatörle İlişkili Pnömoni

YBÜ: Yoğun Bakım Üniteleri

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Çoklu dirençli gram-negatif basillerin etken olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlar son yirmi yıldır önemli bir problem haline gelmiştir. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin 1970'li yıllardan itibaren yaygın kullanımı sonucunda, dirençli patojenler ile oluşan hastane enfeksiyonları artan oranlarda ve sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Bu patojenlerden nonfermentatif, gram-negatif, oksidaz negatif kokobasil yapısındaki *Acinetobacter* türleri, hastanede yatan hastalarda kolonize olarak, bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları, sekonder menenjit ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde ventilatöre bağlı pnömonilerde önemli rol oynamaktadırlar (12, 56, 83).

Son yıllarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda, *Acinetobacter*'ler diğer nonfermentatif bakterilerle birlikte hastane enfeksiyonlarının en sık saptanan etkenlerinden biri haline gelmiştir. Günümüzde *Acinetobacter*'lerin büyük kısmı sıklıkla kullanılan aminopenisilinler, üreidopenisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefamisinler, aminoglikozitler, florokinolonlar, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi antibiyotiklerin çoğuna yüksek oranda direnç göstermektedirler. Bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların izlenmesi ve tedavisi açısından antibiyotik paternlerinin belirlenmesi ve moleküler olarak tiplendirilmeleri gerekmektedir (4, 12, 43, 99)

Etkin antibiyotiklere karşı gelişen direnç bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde klinisyenler için büyük sorun oluşturduğundan tedavide antibiyotiklerin kombine kullanımı söz konusu olmuştur. *Acinetobacter* türlerinin hastane ortamında uzun süre canlılığını koruması ve insandan insana geçişinin çok kolay olması, sorunu bir kat daha arttırmaktadır (4, 12, 56, 99).

Bu alışmada İzmır Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde izole edilmiş 84 nozokomiyal *Acinetobacter* izolatının antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi, moleküler düzeyde tiplendirmelerinin yapılması ve çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter*

2.1.1. Tarihçe

Acinetobacter cinsinin üyeleri olarak sınıflandırılan bakteriler, uzun bir tarihsel taksonomik değişime uğramıştır (12). 1908’de ilk kez *Diplococcus mucosus* olarak tanımlanan *Acinetobacter*, 1911’de Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calco-aceticus* olarak isimlendirilmiştir (4). 1939 yılında DeBord tarafından üretral örnekten izole edildikten sonra ise günümüzdeki adını almıştır (74). 1984’de Bergey’s Manual of Systemic Bacteriology’de, *Acinetobacter* yalnızca bir tür (*Acinetobacter calcoaceticus*) ve iki alt tür altında gruplandırılmıştır (4, 99). DNA-DNA homolojisine göre şimdiye kadar 19 genomik grup saptanmıştır. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii* arasında benzerlik olduğundan birçok araştırmacı tarafından *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* kompleks olarak tanımlanmıştır. *A. baumannii* hastane enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan genomik türdür. *Acinetobacter iwoffii* ve *Acinetobacter johnsonii* ise *A. baumannii*’den sonra en sık karşılaşılan türlerdir (4, 12, 99).

2.1.2. Morfolojik ve Mikrobiyolojik Özellikler

Acinetobacter cinsi bakteriler; 35-37°C’de üreyen, nonfermentatif, DNaz ve oksidaz negatif, katalaz pozitif, indol negatif, hareketsiz, nitratları redükte etmeyen, zorunlu aerop, gram-negatif mikroorganizmalardır. Flajellaları yoktur, fimbriaları vardır. Üremenin logaritmik fazında 1-1.5 x 1.5-2µm boyutlarında basil, üremenin duraklama fazında ise kok veya kokobasil şeklinde görünmektedirler (4, 99). Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar (106). Rutin laboratuvar koşullarında, biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre *Acinetobacter* tür ayrımı yapılmaktadır. *A. baumannii* glikozu

oksitlememesi ve hemoliz yapmaması ve 44°C’de üreyebilmesi ile diğer *Acinetobacter* türlerinden ayrılır (107).

Acinetobacter türlerini diğer nonfermentatif bakterilerden ayırt etmek için ilk olarak kullanılacak test oksidaz testidir (12). Enterobakterilerden, anaerobik şartlarda ürememesi ve nitratları redükte etmemesi ile kolayca ayrılabilirler (4, 12, 99).

Besiyerinin zenginliğine göre özellikleri değişim göstermektedir. *Acinetobacter* türleri sıvı besiyerinde normalde düzgün, bazen mukoid ya da düz formda, renksiz, soluk sarı ya da grimsi beyaz koloniler oluşturabilirler. Dağılabilir bir kahverengi pigment üreten bazı çevre kaynaklı türler de tanımlanmıştır (12). Hem klinik hem de çevreden bu bakterilerin izole edilmesinde kullanılabilen seçici ve ayırt edici çeşitli besiyerleri geliştirilmiştir (56). Az sayıda bakterinin bulunabileceği çevre ortamlarından alınan örneklerde, üremeyi kolaylaştırmak için amonyum veya nitrat tuzları içeren besiyerleri kullanılabilir (82).

Acinetobacter cinsi bakteriler laboratuarlarda sıklıkla kullanılan Eozin Metilen Blue (EMB) ve Kanlı Agar gibi pek çok besiyerlerinde kolayca ürerler. Genellikle Mac Conkey Agar besiyerinde renksiz koloniler oluştururlar (82). Klinik örneklerden direkt izolasyon için diğer mikroorganizmaların büyümesini baskılayan, Leeds *Acinetobacter* Medium ve Herellea Agar *Acinetobacter*’lerin izole edilmesinde kullanılabilen seçici ve ayırt edici besiyerleridir (12, 56).

2.1.3. Epidemiyoloji

Endemik veya epidemik salgınlar ilk olarak 1970’li yıllarda tanımlanmıştır. Günümüzde *Acinetobacter* spp. diğer nonfermentatif bakterilerle birlikte hastane enfeksiyonlarında ve epidemik salgınlarda en sık saptanan etkenlerden biridir. Çeşitli çalışmalarda epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan ama yüksek oranda benzer özellikler gösteren *Acinetobacter* türlerinin, farklı bölgelerden farklı zamanlarda

izole edildiği gösterilmiştir. Bu klonlar genellikle antibiyotiklere dirençli, genetik olarak stabil ve hastane ortamında kolaylıkla yayılabilen özelliktedirler (70, 113).

Acinetobacter türleri hastane çevresinde bulunan diğer gram-negatif basillerle benzer karakteristik özellik göstermekte, kolonize veya enfekte kişilerden çevreye kolayca yayılabilmekte ve buralarda canlılıklarını günlerce sürdürebilmektedirler. Pastörize sütlerden, dondurulmuş gıdalardan, dökümhane ve hastane havasından, camdan, musluk sularından, peritoneal diyaliz sıvılarından, anjiyografi kateterinden, ventilatrlerden, laringoskoplardan, kontamine eldivenlerden, pamuktan, kullanılmış enjektörlerden, hasta yastıklarından, kuru filtrelerden ve diğer klinik ya da cerrahi aletlerden izole edilmektedirler (4).

Acinetobacter türleri sağlıklı insanların ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner ve alt gastrointestinal sistemlerinde bulunmakta ve bu bölgelerde enfeksiyonlara neden olmaktadır (12, 99). Özellikle aksilla, inguinal bölge ve ayak parmak araları gibi nemli bölgelerde, derinin bakteriyel florasının bir kısmını oluşturabilmektedirler (4, 17).

Çapraz kontaminasyon ile hastadan hastaya geçiş en önemli yayılım yollarından biridir. Özellikle salgınlar sırasında hastanede yatan hastalarda %25'e varan oranlarda taşıyıcılık saptanmaktadır. Salgınların çoğunlukla bu bakterileri derilerinde taşıyan hastane personeli kaynaklı olduğu bildirilmektedir (4, 12, 72, 99). *A. baumannii*'nin evre şartlarına kolayca adapte olabilmesi, günlerce hastane ortamında canlı kalabilmesi, hastanede geniş spektrumlu antibiyotiklerin yoğun olarak kullanılmasına bağlı olarak hızla çoklu ilaç direnci geliştirmesi, hastanedeki salgınların sürekliliğini ve yayılmasını sağlayan önemli faktörlerdendir (70).

2.1.4. Patogenez ve Virülans

Genellikle düşük virülansa sahip oldukları için, hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olan *Acinetobacter*'lerin immün sistemi normal olan bireylerde enfeksiyon oluşturma riski oldukça düşüktür. *Acinetobacter* türleri asidik pH, düşük sıcaklık ve kuru ortamlara dayanıklıdırlar. Cansız dokularda yaşayabilme yeteneğine sahiptirler. *Acinetobacter*'lerde polisakkarit kapsül, fimbria ve/veya kapsül ile ilişkili adezyon yeteneği, doku lipitlerine zarar veren enzimlerin üretimi ve diğer gram-negatiflerde olduğu gibi hücre duvarındaki lipopolisakarit yapısı ve lipit A'nın potansiyel toksik etkisi virülansa katkıda bulunan önemli faktörlerdendir. Hücre duvarında bulunan lipopolisakaritin insanlar üzerindeki endotoksijenik potansiyeli çok az bilinmektedir (4, 12, 70, 49, 99).

A. baumannii ve çevreden izole edilen *A. baylyi* arasında yapılan karşılaştırmalı genomik çalışmalarda pilus biyogenezini, demir alımı ve metabolizması, çoğunluğu algılama (quorum sensing) ve tip 4 sekresyon sistemi gibi virülans faktörlerini kodlayan çeşitli genlerin varlığı belirlenmiştir (49). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Acinetobacter*'lerde PER-1 enziminin virülansı arttırdığı ve klinik olarak daha ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (47).

Lipopolisakarit (LPS): LPS ve Lipit A varlığı potansiyel toksik etkisiyle patojeniteyi arttırmaktadır. *Acinetobacter* türlerinin %30'u bakteriyi konak savunmalarına karşı koruyan ve fimbria ile beraber yüzeylere tutunmayı kolaylaştıran, L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asit yapısından oluşan ekzopolisakarit (EPS) kapsül üretmektedir. LPS, kapsüldeki EPS ile sinerji meydana getirerek serum direncine neden olmaktadır (4, 12, 99).

Çoğunluğu algılama (Quorum-Sensing): Çoğunluğu algılama gram-negatif bakterilerin enzim biyosentezi, biyofilm oluşumu gibi önemli fizyolojik aktivitelerini

düzenleyen bir mekanizmadır (68). Çoğunluğu algılama, bir bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izlemesine olanak veren otoindükleyici veya feromon olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimine bağlıdır. *Acinetobacter* türlerinde gram-negatif bakterilerde yaygın olarak bulunan sinyal molekülleri N-açıl-homoserin lakton (AHSLs) türevlerinin varlığı gösterilmiştir (42, 48, 70).

Biyofilm oluşumu: Ekstrasellüler polimerik bir madde tarafından çevrelenen mikrobiyal hücreler bir araya gelerek biyofilm yapısını oluşturmaktadır. Biyofilm oluşturma özelliği, bakterinin hastane ortamında, medikal cihazlar üzerinde uzun süre canlı kalmasını ve bazı antimikrobiyal ajanlara karşı korunmasını sağlamaktadır. *A. baumannii* plastik ve cam yüzeylerde pilus aracılı biyofilm oluşturabilmektedir (70).

Dış membran proteinleri (DMPs): Dış membran protein A (OmpA) sitotoksosite indüksiyonu ile ilişkilidir. Bu protein ökaryotik hücrelere bağlanarak ve nükleusa transloke olarak *in vitro* hücre ölümünün indüklenmesine neden olmaktadır (16, 70). Ayrıca bakterinin üremesi için gerekli olan demir, konak canlıdan, aerobaktin ve siderofor gibi demir tutucu şelatörlerin salgılanması ve Demir Düzenleyici Dış Membran Proteinleri (DDDMP) olarak adlandırılan dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile temin edilmektedir (12, 47).

Stres cevap mekanizması: *A. baumannii*'nin farklı koşullara adaptasyon yeteneği, etkili stres cevap mekanizmalarına sahip olduğunu göstermektedir (70).

2.1.5. *Acinetobacter* Kaynaklı Enfeksiyonlar

Acinetobacter türleri genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlara, nadiren de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır (12, 99, 106). Hastanede özellikle yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde tedavisi güç olan pnömoni, ventilatörle

ilişkili pnömoni (VİP), üriner sistem enfeksiyonu, kateter enfeksiyonları, bakteriyemi, septisemi ve menenjitlere yol açabilir (4, 12, 72, 99, 106).

Sigara kullanımı ve alkol bağımlılığı, ilerlemiş yaş, kronik akciğer hastalığı, immüsupresyon, cerrahi girişimler, antimikrobiyal kullanımı ve invaziv araç varlığı hastalar için *Acinetobacter* enfeksiyonları açısından risk faktörlerindedir (7, 12). Günümüzde, özellikle mekanik ventilatör uygulamasından beri *Acinetobacter* türleri nozokomiyal pnömoninin en önemli nedenlerindedir. Çoklu dirençli (ÇDR) *A. baumannii* kaynaklı nozokomiyal enfeksiyon salgınları çok yakın zamanda birçok ülkede önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (44).

A. baumannii polimikrobiyal olarak veya tek başına bakteriyemi nedeni olabilmektedir. Polimikrobiyal enfeksiyonlarda mortalite oranı artmaktadır. *A.baumannii* dışındaki türlerle meydana gelen enfeksiyonlarda ise, klinik tablo daha hafif seyretmektedir (4, 12).

Acinetobacter türlerine bağlı menenjitler, çoğunlukla hastane kaynaklı ve beyin ameliyatı sonrası gelişen nadir görülen enfeksiyonlar olup, gelişen nozokomiyal menenjit olgularında beyin omurilik sıvısı (BOS) bulguları pürülan menenjit özelliğindedir (4, 12, 99, 106).

Üriner sistem enfeksiyonları, genellikle immün sistemi baskılanmış, yaşlı, sürekli üriner kateteri olan ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülmektedir (12, 82). Travma yaraları, yanık, cerrahi girişim bölgeleri, damar içi kateter uygulamaları ve bağışıklık sisteminin baskılanması yumuşak doku enfeksiyonları için başlıca risk faktörlerini oluşturmaktadır (12).

2.1.6. Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi

Karbapenemler, sulbaktam, kolistin ve tigesiklin *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kullanılan en etkili antibiyotiklerdir. 1970'li yıllarda *Acinetobacter*

enfeksiyonları gentamisin, minosiklin, nalidiksik asit, ampisilin veya karbenisilin ile kolayca tedavi ediliyorken, bugün *Acinetobacter*'lerin büyük bir kısmı aminopenisilinler, üreidopenisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefamisinler, aminoglikozitler, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi antibiyotiklerin çoğuna yüksek oranda direnç göstermektedir. *Acinetobacter*'lerde antimikrobiyal direncin hızla gelişmesi özellikle hasta sirkülasyonu ve antimikrobiyal kullanımı yüksek olan YBÜ'de ciddi sorunlara yol açmaktadır. Karbapenemlere karşı da artan bir direnç söz konusu olduğundan dirençli *Acinetobacter* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yeni alternatiflerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu alternatiflerden biri olan tigesiklinin klinik olarak önemli bir antimikrobiyal ajan olduğu bildirilmektedir (4, 12, 17, 18, 38, 39, 82).

Kliniklerde nefrotoksik ve nörotoksik ajanlar olan polimiksin grubu antibiyotiklerin kullanımı 1960 ve 1970 yılları arasında durdurulmuştur, fakat ÇDR gram-negatif basillerin artması ile son yıllarda polimiksin antibiyotiği tekrar kullanılmaya başlanılmıştır, daha düşük doz ve farklı ilaç formülasyonlarının uygulanması ve YBÜ'nün dikkatli izlenmesiyle kolistine bağlı toksisitenin azaltılabileceği bildirilmiştir (39).

Tedavide tam başarı elde edilmesi için tek bir antimikrobiyal ajanın kullanılması yerine çeşitli antibiyotiklerin kombinasyonlarının kullanılması önerilmektedir. Kombine antibiyotik kullanımı; özellikle mortalitesi yüksek enfeksiyonların tedavisinde tercih edilmektedir. Dirençli suşlara karşı sinerjik etkili kombinasyonların oluşturulmasında, ilaçların doza bağlı toksisitesinin azaltılmasında ve polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde prognozu etkileyen olumlu bir faktör olarak değerlendirilmektedir (17, 18, 63).

Beta-laktam Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotikler penisilin bağlayan proteinler (PBP) adı verilen enzimler üzerinde etki göstererek bakterilerin hücre duvar sentezini inhibe ederler. Beta-laktam antibiyotiklere dirençte en önemli mekanizma plazmit, kromozom veya transpozon kontrolünde sentezlenen beta-laktamazlar ile beta-laktam antibiyotiklerin hidrolize edilerek etkisiz hale getirilmesidir (14, 66, 86, 99). *Acinetobacter* kökenlerinde beta-laktam direnci, penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişme, dış membran permeabilitesinde azalma ve kromozomal veya plazmit kaynaklı beta-laktamaz üretimi ile gerçekleşmektedir (12). *Acinetobacter* izolatları ortamda indükleyici antibiyotik yoksa düşük düzeyde sentezlenen, varsa sentezleri geçici olarak arttırılan indüklenebilir beta-laktamazlar üreterek penisilin, sefolosporin ve karbapenemleri hidrolize ederler (104).

Aminoglikozitler

Aminoglikozitler, hücre içine hücre duvarındaki porin kanallarından girerek 30S ribozomlarına bağlanmakta ve protein sentezini inhibe etmektedirler (12). *Acinetobacter*'lerde aminoglikozit direnci oldukça yaygın olarak gözlenmektedir ve direnç gelişimi spesifik modifikasyon enzimleri aracılığıyla gelişmektedir (69).

Kinolonlar

Kinolonlar, DNA giraz (topoizomeraz II) ve Topoizomeraz IV'e etki ederek, DNA sentezini hızlı bir şekilde inhibe ederek etki ederler (99). Kinolonlara karşı direnç gelişimi kromozomal mutasyonla gelişebilmektedir ve iki farklı temel mekanizma ile ortaya çıkabilmektedir. Bunlar hedef enzimde değişiklik oluşması ve ilacın hücre içine geçişinin azaltılması şeklindedir (52, 89). *Acinetobacter*'lerdeki kinolon direnci ile ilgili en iyi tanımlanmış mekanizma DNA giraz A (gyrA) ve

topoizomeraz IV'ün A alt birimini kodlayan genlerdeki mutasyonlar olduğu gösterilmiştir (53).

Tetrasiklinler

Ribozomların 30S alt ünitesine bağlanarak mRNA-ribozom kompleksinin akseptör bölgesine tRNA'nın bağlanmasını engeller (99). *Acinetobacter*'lerde yaygın olan tetrasiklin direncinin iki farklı mekanizması tanımlanmıştır. İlk mekanizma, TetA ve TetB spesifik transpozon aracılı eflüks pompalarıdır. TetB tetrasiklin ve minosiklin, TetA ise sadece tetrasiklin direncine neden olan eflüks pompalarıyla ilişkilidir. İkinci mekanizma ribozomları tetrasiklinin etkisinden koruyan ribozomal koruyucu proteindir. Tetrasiklin, minosiklin ve doksisisiklinden ribozomları koruyan bu protein, TetM olarak kodlanmıştır (12, 85).

Yapısal olarak tetrasiklinlere benzeyen ve glisilsiklin sınıfı bir antibiyotik olan tigesiklin tetrasiklinlerin ribozomlardaki bağlanma noktasına bağlanır. Bir minosiklin derivesi olmasına rağmen tigesiklinin, minosiklin ve tetrasikline oranla ribozomlara beş kat daha güçlü bağlanması tetrasiklinlere karşı gelişen ribozomal korunmadan tigesiklinlerin etkilenmemesini sağlamaktadır. Glisilsiklinlerin tetrasiklinler gibi eflüks pompası ile hücre dışına atılımı yapılamadığından tigesiklin bu direnç mekanizmasından da etkilenmemektedir. Tigesiklin direnç mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, diğer tüm antimikrobiyallerde olduğu gibi tigesiklinin de tedavide yaygın olarak kullanılmasıyla direnç gelişiminin söz konusu olabileceği belirtilmektedir (58, 84).

Polimiksinler

Polimiksinler polipeptid katyonik antibiyotikler olduğundan deterjanlara benzer biçimde bakteri hücreindeki anyonik fosfolipitlerle birleşerek membran bütünlüğünü bozarlar. Bu sınıfta kolistin (polimiksin E) ve polimiksin B

tanımlanmıştır. Kolistin dahil tüm ilaçlara dirençli izolatlar pan-dirençli (PDR) olarak adlandırılmaktadır (37, 46). Kolistin direnci dünyanın çeşitli ülkelerinde artan oranlarda bildirilmektedir. *Acinetobacter* izolatlarında rutin antimikrobiyal testler sırasında belirlenemeyen, ancak E-test ile saptanabilen heterodirenç, *A.baumannii*'de gelişen kolistin ve karbapenem direncinden sorumlu tutulmaktadır. Özellikle ÇDR *A.baumannii*'ye bağlı enfeksiyonlarda kolistinin tek tedavi seçeneği olarak kullanılması bu tehlikeyi arttırmaktadır (36, 64, 85). *Acinetobacter*'lerin lipopolisakkaritindeki modifikasyon kolistin direncine neden olduğu düşünülen olası mekanizmadır (67, 85).

2.2. Bakterilerde Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri

Tiplendirme yöntemleri başlıca; hastalardaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konulması, re-aktivasyonun re-enfeksiyondan ayırt edilmesi ve salgın araştırmalarında epidemik suşların kaynağının ve yayılım yolunun belirlenmesi, hastane ve toplumsal kaynaklı enfeksiyonların belirlenmesi, dirençli izolatların tanımlanması ve yayılımın belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemi bulunmaktadır. Son yıllarda uzun zaman alan ve çoğunlukla değişken sonuçlar veren fenotipik yöntemler yerine ayırım gücü daha yüksek olan genotipleme yöntemleri tercih edilmektedir (Tablo 1) (12, 28).

2.2.1. Fenotipik Yöntemler

Antibiyotiplendirme

Genetik ve epidemiyolojik ilişkisi olmayan birçok tür aynı plazmiti alarak benzer antibiyotik duyarlılık paternine sahip olabilmektedir fakat enfeksiyon sırasında duyarlılık oranlarında değişiklik meydana gelebilmektedir. Bu nedenle

antibiyotiplendirmenin izolatlar arasındaki ayırım gücü ve epidemiyolojik çalışmalardaki değeri sınırlıdır (6, 102).

Biyotiplendirme

Bakterilerin farklı besiyerlerindeki üreme kabiliyetleri ve biyokimyasal özellikleri kullanılarak yapılan tiplendirme (102).

Serotiplendirme

Bakterilerin yüzeyindeki antijenlere spesifik antikorların kullanılması esasına dayanmaktadır (6, 102).

Tablo 1. Bakterileri epidemiyolojik olarak tiplendirmede kullanılan fenotipik ve genotipik yöntemler (6, 32, 102)

FENOTİPİK YÖNTEMLER	GENOTİPİK YÖTEMLER
<ul style="list-style-type: none">• Antibiyotiplendirme• Serotiplendirme• Bakteriyofaj tiplendirme• Bakteriyosin tiplendirme• Biyotiplendirme• Multilokus enzim elektroforezi• Hücresel proteinlerin poliakrimid jel elektroforezi• Immunoblot fingerprint	<p>1- PZR temelli yöntemler</p> <ul style="list-style-type: none">• Amplified fragment length polymorphism (AFLP)• Repetitive extragenic palindromic PZR (REP-PZR)• Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)• Arbitrarily primed PZR (AP-PZR)• Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)• Enterobacterial repetitive intergenic consensus PZR (ERIC-PZR) <p>2- Nükleik asit temelli yöntemler</p> <ul style="list-style-type: none">• Plazmit profilleri• Restriksiyon endonükleaz analizi (RFLP)• Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)• Çoklu bölge sekans tiplendirme (MLST)• Ribozomal ve parçalı RNA jel elektroforezi

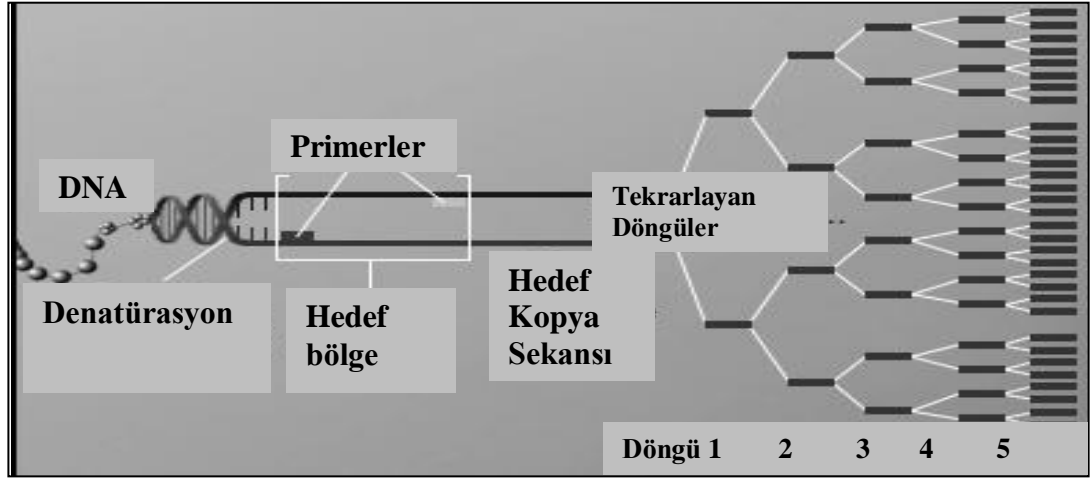
2.2.2. Genotiplendirme Yöntemleri

Ortak genotipik profil oluşturan aynı tür içindeki izolatların, klonal olarak da ortak bir atadan geldikleri kabul edilmektedir. Klonal olarak benzer organizmalarda kromozom, atasal hücreden yeni soylara bir bütün olarak geçmekte, bu organizmalarda sınırlı veya hiç kromozomal rekombinasyon olmadığı kabul edilmektedir. Uygun genotiplendirme yöntemiyle, izolatlarda oluşan değişiklikler ve izolatlar arasındaki genetik yakınlık saptanabilmektedir (30).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temelli Yöntemler

Mikroorganizmaların tiplendirilmesi ve türler arasında kesin ayrımı sağlamak için PZR ile özgül veya rastgele primerler kullanarak DNA dizisinin amplifikasyonuna dayalı yöntemler kullanılmaktadır (12, 23).

PZR, DNA ya da RNA'nın enzimatik olarak *in vitro* şartlarda milyonlarca defa çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Az miktardaki örnekten spesifik bir gen bölgesinin çoğaltılması PZR yöntemi ile mümkündür (12, 34). PZR reaksiyonu, uygulanan farklı ısıların da etkisiyle ayrılma (denatürasyon), bağlanma (annealing), uzama (elongation) olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Bu üç aşama bir 'döngü' olarak kabul edilir. Her döngü sonunda, mevcut primer-genomik DNA kombinasyonu ile çoğalan DNA miktarı geometrik olarak artar (Şekil 1). Reaksiyon sonucunda oluşan PZR ürünleri agaroz jel üzerine yüklenip elektroforezle ayrıştırılarak ve etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağı altında görünür hale getirilmektedir (54, 63).



Şekil 1. PZR şematik görünümü

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PZR (ERIC-PZR)

Bakteriyel genomlarda çok sayıda, kısa, rastgele bulunan tekrarlayıcı sekans aileleri tanımlanmıştır. Genomdaki bu tekrar dizilerinden biri, genler arası tekrarlayıcı parçalar olarak tanımlanan, ERIC sekanslarıdır. ERIC sekansları sadece genler arası ve transkripsiyonun görüldüğü bölgelerde bulunurlar. ERIC sekanslarının kopya sayısı türler arasında değişebilmektedir (111).

Repetitive Extragenic Palindromic PZR (REP-PZR)

Tekrarlayan ekstragenik palindromik REP dizileri terimi, bazı bakteriyel genomlarda, gen dışı boşluklarda bulunan, 21 ve 65 baz uzunluğu arasındaki tekrarlayıcı ve palindromik sekansları ifade etmektedir. REP dizilerinin spesifik sonlandırıcılar olmamalarına rağmen transkripsiyonel azaltıcılar gibi rol aldıkları ileri sürülmektedir. Gen ekspresyonunda düzenleyici oldukları, transpozisyon ve rekombinasyonda bazen hedef oldukları görülmektedirler (105).

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Rastgele bir DNA segmentinin rastlantısal olarak seçilmiş bir nükleotid dizisi ile PZR kullanılarak amplifiye edilmesine dayanmaktadır (76). RAPD-PZR ile bilinen hedef bir sekans gerekmeden yaklaşık 10 nükleotidlik tek bir rastgele primer

kullanılır ve amplifikasyonun ilk siklusu palindromik terminalleri olan tekli dizilerle sonuçlanır (63, 95).

Arbitrarily Primed PZR (AP-PZR)

AP-PZR, epidemiyolojik olarak bağlantılı izolatlar arasındaki benzerliği ortaya koymak için kullanılan PZR bazlı tiplendirme yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde, hedef DNA'nın baz diziliminin bilinmesine gerek kalmadan seçilen, bir veya daha fazla primer kullanılarak, düşük bağlanma derecesinde PZR ile amplifikasyonu gerçekleştirilir. Amplifikasyon ürünü agaroz jel elektroforezi ile görüntüledikten sonra, oluşan bant profilleri karşılaştırılarak izolatlar arasındaki benzerlikler değerlendirilir (27, 110).

AP-PZR yönteminin, PZR koşullarına bağlı olarak her zaman verimli sonuçlar alınamaması, sonuçların laboratuvar içi ve laboratuvar arası tekrarlanabilirlik oranının düşük olması, agaroz jel elektroforezinde birkaç bant oluşumu ile sonuçlanan zayıf profillerin oluşabilmesi gibi dezavantajlarının yanı sıra, hızlı ve kolay uygulanabilir olması, çok miktarda DNA ve DNA dizi bilgilerine gereksinim duyulmaması, tüm genomun incelenmesine olanak sağlaması gibi avantajları bulunmaktadır (77, 92).

Bu tiplendirme yönteminde, düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında, seçilen primerler kromozom üzerinde hem kendilerine özgü bölgelere hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır (77, 92). Böylece, kromozom üzerindeki çok sayıda bölgenin çoğaltılması sağlanır. Kısa, G+C'ce zengin primer, analizi yapılacak DNA kalıbının her iki zincirinin de farklı yerlerine yapışabilir. Reaksiyon sonucunda, bu farklı yapışmalardan dolayı farklı uzunluklarda ürünler ortaya çıkar. Analizi yapılan genomik kalıplar arasında farklılıklar varsa primerlerin yapışma yerleri değişeceğinden agaroz jel üzerinde farklı büyüklükte bantlar görülecektir (79). Elde edilen DNA profil farklılığının yorumlanmasında

kabul görmüş bir kural yoktur. Eğer izolatlar aynı DNA profiline sahipse klonal yönden ilişkili, üç ya da daha fazla DNA bant farklılığı gösteriyor ise klonal yönden ilişkisiz olarak yorumlanır (32).

2.3. Antibiyotik Duyarlılık Belirleme Yöntemleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı *in vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Klinikte antimikrobiyal tedavinin, duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre belirlenmesi esastır. Antibiyotik duyarlılığı belirlemede difüzyon (disk difüzyon, E-test) ve dilüsyon (tüp, agar dilüsyon) testleri olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılmaktadır (87).

Disk difüzyon testi, rutin laboratuarlarda antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında sık kullanılan yöntemdir. Standardize, ucuz ve uygulanması basit olan bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiş olup ve bu isimle anılmaktadır. Bu test, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin duyarlılığı araştırılan bakterinin inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır (19, 87).

E-test, katı besiyerinde difüzyon yoluyla minimum inhibitör konsatrasyon (MİK) değerlerinin saptanmasına olanak sağlayan yöntemlerden biridir. MİK bir mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır(19, 87).

Tüp dilüsyon, makro ve mikro olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Her iki yöntemin ilkesi aynıdır. Makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise U tabanlı mikropaklar, besiyeri olarak da Mueller Hinton Broth (MHB) kullanılır (87).

Agar dilüsyon yönteminde antibiyotik sulandırılmaları Mueller Hinton Agar (MHA) içine konulup, antibiyotik içeren besiyeri petri plaklarına dökülür. Bu

yöntemle her plakta antibiyotiğin farklı konsantrasyonlarının etkisi test edilebilmektedir (87).

2.4. Sinerji Testleri

Antibiyotik kombinasyonlarının etkilerinin anlaşılabilmesi için uygulanan tüm *in vitro* duyarlılık belirleme işlemlerine sinerji testleri denilmektedir. Sinerji testlerinde antibiyotiklerin hem tek başlarına hem de diğer ajanlar ile birlikte etkinlikleri değerlendirilmektedir. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST) ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tanımlarına göre antibiyotik kombinasyonlarının *in vitro* etkinliği aynı ilaçlar tek başına kullanıldığında elde edilen etkinlikler toplamından daha yüksek ise buna sinerjistik etkileşim (sinerjizm), eşit ise aditif etkileşim adı verilmektedir. Kombinasyonla elde edilen sonuç tek başına en etkin ilaç ile elde edilen sonuca eşit ise etkisiz durum (indiferan); daha düşük ise antagonistik etkileşimden (antagonizm) söz edilir. Antibiyotik kombinasyonları direnç gelişiminin önlenmesi veya geciktirilmesi için de kullanılabilir. Bu amaçla çeşitli yöntemler geliştirilmesine rağmen günümüzde standart bir yaklaşım bulunmamaktadır (19, 87).

Antibiyotik kombinasyonlarının *in vitro* etkinliğinin ölçümünde dört farklı yöntem kullanılmaktadır (19, 87).

1. Dama Tahtası (Checkerboard) yöntemi
2. E-test
3. Zamana Bağlı Öldürme Eğrisi (Time-Kill) yöntemi
4. Disk difüzyon yöntemi

2.4.1. Dama Tahtası Yöntemi

Bu yöntemde, kombinasyonda yer alan iki antibiyotığın dilüsyonlarının bir mikrotitrasyon plağında farklı düzlemlerde dağılımı ve bu antibiyotiklerin plaktaki her kuyucukta değişen konsantrasyonlarda bir araya gelmeleri söz konusudur. Bu sulandırım şekli nedeniyle mikrodilüsyon tekniğine dama tahtası (checkerboard) yöntemi denmektedir (19, 87).

2.4.2. Zamana Bağlı Öldürme Eğrisi Yöntemi

Antibiyotik kombinasyonlarının zamana ve konsantrasyona bağlı bakterisidal aktivitelerinin incelenmesinde kullanılır. Yeni antimikrobik ajanların veya ilaç kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılmasında diğer *in vitro* testlerde görülen paradoksal etki, persistan ve tolerans fenomenlerinin doğrulanmasında, tedavide bakterisidal etkinliğin önemli olduğu özel durumlarda tedavideki başarısızlığı açıklamada yardımcı bir yöntemdir (87).

Logaritmik üreme fazındaki test suşu antibiyotik içermeyen ve çeşitli yoğunluklarda antibiyotik veya antibiyotiklerin kombinasyonlarını içeren sıvı besiyerine aktarılır. MİK ve MİK'in 1/4, 1/2, 1, 2, 4 katı gibi konsantrasyondaki antimikrobik dilüsyonları ile çalışılır. Dilüsyon tüplerinden alınan örneklerden 0. saatten başlayarak belirli aralıklarla örnekler alınır ve dilüsyonlar (10^{-1} - 10^{-8}) hazırlanıp katı besiyerine ekim yapılır. Katı besiyerinde inkübasyondan sonra üreyen bakteri sayısı belirlendikten sonra grafiğe aktarılarak canlı organizma sayısının zaman içindeki değişimi izlenebilmektedir (87).

BÖLÜM II

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler, Besiyerleri ve Kimyasalların Hazırlanması

3.1.1. Besiyerleri

1. Eosine Methylene Blue Agar (EMB) (Merck)
2. Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck)
3. Mueller Hinton Broth (MHB) (Oxoid)
4. Mac Conkey Agar (Merck)
5. Brain-Heart Infusion Broth (BHIB) (Oxoid)
6. %10 Gliserinli BHIB

Toz halindeki besiyerleri distile su ile çözüldü ve otoklavda steril edildi.

Kasyon ekli MHB (KEMHB) için $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ stok solüsyonu 0.75M ve $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ stok solüsyonu 0.82M olarak hazırlandı.

3.1.2. Antibiyotikler

1. Siprofloksasin (CIP) (Koçak)
2. Amikasin (AK) (Eczacıbaşı)
3. Meropenem (MP) (Zeneca)
4. Rifampisin (RA) (Koçak)
5. Moksifloksasin (MXF) (Bayer)
6. Kolistin (CL) (Sigma)
7. Tigesiklin (TGC) (Pfizer)

3.1.3. Antibiyotiklerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Toz halindeki tigesiklin, amikasin, kolistin, meropenem, rifampisin, moksifloksasin ve siprofloksasinin stok çözeltilerinin hazırlanması CLSI kriterlerine uygun olarak yapıldı.

Stok solüsyon hazırlama formülü;

$$\frac{1000 \times V \times C}{P} = W$$

P= Potens ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

V= Hacim (ml)

C= Final konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

W= Antibiyotik ağırlığı (mg)

Antibiyotik stok solüsyonları 0.2 μm por çapındaki membran filtrelerden (Sartorius) geçirilerek steril edildi ve kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.1.4. Kimyasallar ve Ayıraçlar

1. TBE (5X) tamponu

Tris base 53.91 g

Borik asit 27.52 g

EDTA 3.72 g

Karışım, distile su ile 1000ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi ve +4°C'de saklandı. Çalışmalarda, 1X TBE elde etmek için distile su ile dilüe edildi.

2. Agaroz (Sigma A9539)

Jel hazırlamak için, gereken miktar tartılarak, 1X TBE tamponunda çözüldü ve eritildi.

3. Etidyum bromür (1000X, 5mg/ml) (Sigma E8751)

Etidyum bromür distile suda çözüldükten sonra, ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı ve +4°C’de saklandı.

4. dNTP karışımı (2µmol her biri) (Fermentas R0181)

(2.5 mM/her biri, toplam 10mM) -20°C’de saklandı.

5. Marker

Gene Ruler 50bp DNA Ladder (Fermentas SM0323)

6. Taq DNA polimeraz, (Fermantas EP0402) 5U/ µl

10X Taq buffer

25 mM MgCl₂

7. Primerler

M13 Revers; 5’-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA-3’

M13 Forward; 5’-GTA AAA CGA CGG CCA GTG AA-3’

Primerler üretici firmanın önerileri doğrultusunda 100pmol konsantrasyonda hazırlandı. PZR tüplerine 50’şer µl dağıtıldı ve kullanılmaya kadar -20°C’de saklandı.

3.1.5. Diğerleri

1. %0.9 NaCl çözeltisi
2. Distile su
3. 2 ve 1.5ml’lik ependorf tüpleri
4. Steril eküvyon çubuğu

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları CLSI kriterlerine göre steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plaklarında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi.

Bakteri kökenleri ve İnokulum Hazırlanması

İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2009–2010 Şubat tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 84 adet *Acinetobacter* spp. izolatu çalışmaya alındı. Kontrol kökeni olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. İzolatlar, kullanılmaya kadar -80°C de %10'luk gliserinli Brain-Heart Infusion Broth (BHIB) içerisinde stoklandı.

Çalışma sırasında, stoktaki *Acinetobacter* spp. izolatları, EMB ve Mac Conkey Agar besiyerlerine ekildikten sonra 35°C de 18-20 saat inkübe edilerek canlandırıldı. Taze kültürlerden %0.9 NaCl solüsyonu içinde bakteri süspansiyonları hazırlanıp, Mc Farland 0.5'e ayarlandı. Mikrodilüsyon plağındaki son inokulum konsantrasyonunun $1-2 \times 10^5$ CFU/ml olması için kullanmadan önce 1/100 oranında dilüe edildi.

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Steril mikropatlardaki kuyucuklara 50µl MHB dağıtıldı. Yukarıdan başlayarak ilk sıradaki kuyucuklara 50µl antibiyotik çözeltisi eklendi ve yan kuyucuklara aynı hacimde aktararak, çift katlı seri dilüsyonları hazırlandı. Son olarak 50µl bakteri süspansiyonu tüm kuyucuklara ilave edildikten sonra, 35°C de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi. Her mikropakta, besiyeri ve bakteri üreme kontrollerine yer verildi. Değerlendirme için kullanılan

Acinetobacter spp. izolatları için antibiyotiklerin duyarlılık sınırları Tablo 2’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre izolatların antibiyotiplendirmeleri yapıldı.

Tablo 2. *Acinetobacter* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sınır değerleri

Antibiyotik	Dirençli	Orta Duyarlı	Duyarlı
Amikasin	≥ 64	32	≤ 16
Meropenem	≥ 16	8	≤ 4
Siprofloksasin	≥ 4	2	≤ 1
Moksifloksasin*	-	-	-
Rifampisin	> 2	-	2
Kolistin	≥ 4	-	≤ 2
Tigesiklin*	-	-	-

*; CLSI’de sınır değerler verilmemiştir (19, 91).

3.2.2. Arbitrarily Primed (AP) PZR ile Moleküler Tiplendirme

DNA Ekstraksiyonu

Taze kültürden alınan bakteri kolonileri steril ependorflar içerisindeki 400µl ultra distile su (UDS) ile süspanse edildikten sonra, 10dk vortekslendi. Daha sonra 95⁰C’de 10dk bekletildi ve 14.000rpm’de 4dk santrifüj edildi. DNA içeren süpernatant, steril boş ependorfa alındıktan sonra, -20⁰C’de stoklandı.

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Her bir örnek için toplam hacim 50µl olacak şekilde PZR reaksiyon karışımı hazırlandı.

PZR reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar(μ l)
Enjeksiyonluk su	27.5
10X Taq buffer	5
MgCl ₂ (25 mM)	8
dNTP (2 μ mol)	5
Primer M13 Forward (100 pmol/ μ l)	1
Primer M13 Revers (100 pmol/ μ l)	1
Taq polimeraz (5U/ μ l)	0.5
Ekstraksiyon ürünü (50ng/ μ l)	2

Isı Döngü Programı

PZR tüpleri ısı döngü cihazına (Techne) yerleştirilerek aşağıdaki amplifikasyon programı uygulandı.

94°C'de 5 dk. denatürasyon
40°C'de 5 dk. primer bağlanması
72°C'de 5 dk. primer uzaması

} 2 döngü

40°C'de 1 dk. denatürasyon
40°C'de 1 dk. primer bağlanması
72°C'de 1 dk. primer uzaması

} 40 döngü

Jel Elektroforezi

Agaroz %1.5 oranında tartılarak 1X TBE içerisinde eritildi. Katılaştırmadan önce jel içine %1 oranında etidyum bromür çözeltisi eklendi ve karışım homojen hale geldikten sonra jel taşıyıcıya aktarıldı. Katılaştıktan sonra tarak çıkarılarak, jel elektroforez tankına (Bio-Rad) yerleştirildi.

PZR ürünleri, 1/6 oranında 6X DNA boyası ile karıştırılıp, jel içindeki kuyucuklara yüklendi ve elektroforez cihazında (Bio-Rad) 80 V 60 dk yürütüldü. Oluşan bantlar görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat) ile görüntülendi.

3.2.3. Sinerji Testleri

Dama Tahtası Yöntemi

AP-PZR sonuçlarına göre belirlenen 15 grubun her birinden bir adet izolat seçilerek Tablo 3’de belirtilen antibiyotik kombinasyonlarının etkisi dama tahtası yöntemi ile araştırıldı.

Tablo 3. Dama tahtası yönteminde kullanılan antibiyotik kombinasyonları

Kombinasyon 1	Kombinasyon 2
Kolistin-Meropenem	Tigesiklin-Meropenem
Kolistin-Rifampin	Tigesiklin-Rifampin
Kolistin-Amikasin	Tigesiklin-Amikasin
Kolistin-Siprofloksasin	Tigesiklin-Siprofloksasin
Kolistin-Moksifloksasin	Tigesiklin-Moksifloksasin
	Tigesiklin-Kolistin

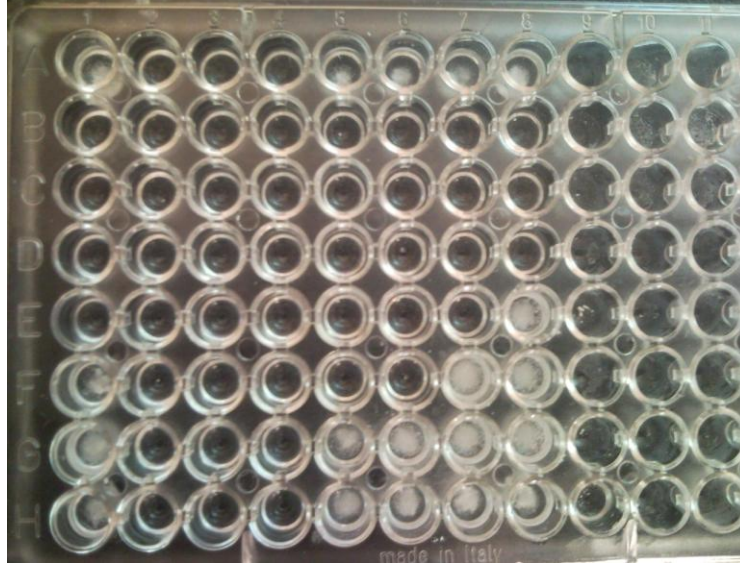
İnokulum Hazırlanması

Taze bakteri kültürleri % 0.9’luk steril tuzlu su içerisinde Mc Farland 0.5 ($1-2 \times 10^8$ CFU/ml) standardına ayarlandıktan sonra hazırlanan süspansiyon 1/100 oranında KEMHB ile dilüe edildi.

Antibiyotik Dilüsyonu

Seçilen 15 izolat için her bir antibiyotiğin MİK_{1/8}–8xMİK arasındaki yedi konsantrasyonunun kombinasyonu test edildi. Antibiyotik dilüsyonları antibiyotiklerin stok solüsyonlarının KEMHB ile sulandırılmasıyla hazırlandı. Kuyucuk hacmi 0.2ml olan mikrolaklara, kombinasyonlardaki iki antibiyotikten birincisi için ilk yatay sıra (A sırası), ikincisi için ise ilk dikey sıra (1 no’lu sütun)

kullanıldı. Birinci antibiyotiğin dört katlı dilüsyonlarından 50µl alınarak, mikrodilüsyon plağının 2 no'lu sütunundan başlayarak 8. sütununa kadar dağıtıldı. İkinci antibiyotiğin her dilüsyonu bir satırın tüm kuyucuklarında 50µl hacimde olacak şekilde diğer antibiyotiğin üzerine ilave edildi. Son olarak tüm kuyucuklara 100µl bakteri süspansiyonu eklenerek, final konsantrasyonunun 5×10^5 CFU/ml olması sağlandı. 35°C de 18-24 saat inkübasyondan sonra her iki antibiyotiğin kombinasyondaki MİK değeri belirlendi. A1 kuyucuğu üreme, H9 kuyucuğu besiyeri kontrolü olarak kullanıldı ve bu kuyucuklara antibiyotik eklenmedi (Resim 1).



Resim 1. Dama tahtası yönteminde antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

Kombinasyonların Etkinliğinin Değerlendirilmesi

In vitro etkileşimler fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksi ile değerlendirilirildi. Bu indekse göre, kombinasyon ile elde edilen antibakteriyel etkinlik, her antibiyotik tek başına iken saptanan MİK değerleri ile kıyaslandı. Elde edilen FİK değerleri toplamına (Σ FİK) göre kombinasyonların etkisi sinerjistik, etkisiz veya antagonistik olarak yorumlandı. (87).

$\Sigma FİK$ indeksinin hesaplanması ; $\Sigma FİK = FİK_A + FİK_B$

$$FİK_A = \frac{\text{B'nin varlığında A'nın MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına A'nın MİK sayısal değeri}}$$

$$FİK_B = \frac{\text{A'nın varlığında B'nin MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına B'nin MİK sayısal değeri}}$$

$\Sigma FİK \leq 0.5$: Sinerji

$\Sigma FİK > 0.5 - 1 \leq$: Aditif

$\Sigma FİK > 1 - 4 \leq$: Etkisiz

$\Sigma FİK > 4$: Antagonizma

Zamana Bağlı Öldürme Eğrisi Yöntemi

Dama tahtası testinin sonuçlarına göre seçilen bir izolat üzerinde tigesiklin-rifampisin ve kolistin-rifampisin kombinasyonlarının etkisi zamana bağlı öldürme yöntemi ile araştırıldı.

İnokulum Hazırlanması

Taze kültürlerden, 2ml %0.9'luk tuzlu suda Mc Farland 0.5 ($1-2 \times 10^8$ CFU/ml) standardına göre bakteri süspansiyonları hazırlandı ve 1/100 KEMHB ile dilüe edildi ($1-2 \times 10^6$ CFU/ml). Kontrol tüpü ve antibiyotik içeren tüplere bakteri süspansiyonları dilüsyon oranı 1/20 oranında seyreltilerek inoküle edildi, böylece başlangıç inokulumunun yaklaşık 5×10^6 CFU/ml olması sağlandı.

Antibiyotik Dilüsyonlarının Hazırlanması

Daha önce belirlenen MİK değerlerine göre her bir antibiyotik için ayrı ayrı seri dilüsyonlar hazırlandı. Kolistin, rifampisin ve tigesiklinin MİK ve $2 \times$ MİK konsantrasyon oranında stok solüsyonları hazırlandı. Her köken için kolistin ve tigesiklinin etkinliği tek başına ve rifampisin ile kombine edilerek çalışıldı.

Zamana Bağlı Olarak Bakteri Konsantrasyonunun Değişiminin İzlenmesi

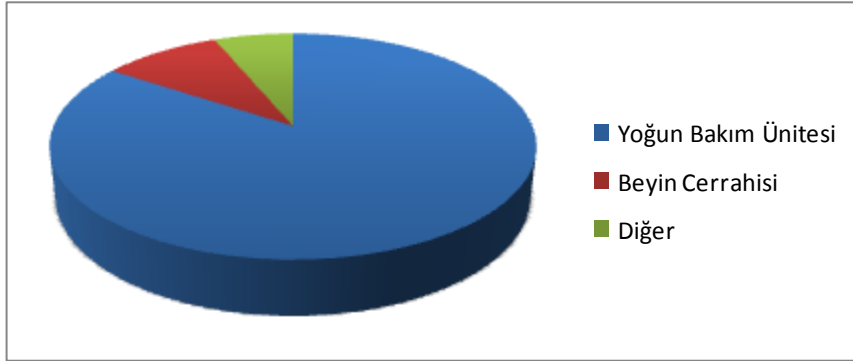
35⁰C’de inkübe edilen antibiyotik-bakteri karışımlardan, 0., 3., 6. ve 24. saatlerde alınan örnekler %0.9’luk tuzlu su ile 1/100 ve 1/1000 oranında dilüe edildi ve buradan 100’er µl alınarak MHA plaklarına ekildi. 35⁰C’de 24 saat inkübasyondan sonra koloniler koloni sayacı (Suntex) ile sayıldı. Ayrıca, antibiyotik içermeyen kontrollere de yer verildi. Çalışma üç kez tekrarlandı. Sonuçlar değerlendirilirken, kombinasyondaki iki antibiyotikten en etkili olana göre; etkinliğin en az 100 kat artması sinerji, 100 kattan daha az bir artış olması aditif etkileşim, en az 100 kat azalması antagonizma olarak kabul edildi.

BÖLÜM III

BULGULAR

Çalışmada 2009-2010 Şubat tarihleri arasında İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen çoklu dirençli 84 *Acinetobacter* spp. izolatı kullanıldı (Grafik 1, Tablo 4). Bu izolatların antibiyotik direnç profilleri belirlenerek, antibiyotiplendirmeleri yapıldı. 25 antibiyotip grubu, AP-PZR sonuçlarına göre genotipik olarak 15 gruba ayrıldı. Bu 15 grubun her birinden rastgele seçilen birer izolat üzerinde dama tahtası yöntemi ile çeşitli antibiyotik kombinasyonları sinerji açısından test edildi. Son olarak dama tahtası testlerinden elde edilen veriler doğrultusunda seçilen bir izolat üzerinde antibiyotik kombinasyonlarının etkisi zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemi ile antibiyotiklerin sinerjik etkileşimleri araştırıldı.

Grafik 1. *Acinetobacter* spp izolatların kliniklere göre dağılımı



Tablo 4. *Acinetobacter* spp. izolatların kliniklere ve servislere göre dağılımı

KLİNİK	ÖRNEK							Toplam (%)
	TAK	BAL	YARA	HK	BOS	İDR	KAT	
AYB	23	22	2	1	1	3	0	52(62)
NYB	4	6	0	0	0	2	3	15(18)
BC	1	1	1	0	2	1	1	7(8)
İÇHST	1	1	1	0	0	0	0	3(4)
ORT	0	0	4	0	0	0	0	4(5)
Diğer	1	0	0	0	0	0	2	3(3)
Toplam (%)	30(36)	30(36)	8(10)	1(1)	3(4)	6(7)	6(7)	84(100)

BAL; Balgam, KAT; Katater, İDR; İdrar, HK; Hemokültür, TAK; Trakeal aspirat, BOS; Beyin-Omurilik sıvısı, NYB; Nöroloji yoğun bakım, AYB; Anestezi yoğun bakım, ORT; Ortopedi, İÇHST; İç Hastalıkları, BC; Beyin cerrahisi.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle amikasin, siprofloksasin, moksifloksasin, rifampisin, meropenem, kolistin ve tigesiklin antibiyotiklerinin MİK değerleri belirlendi. En yüksek direnç oranı %90.48 ile siprofloksasine, en düşük direnç oranı ise %3.57 ile tigesikline karşı izlendi (Tablo 5).

Tablo 5. 84 *Acinetobacter* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

ANTİBİYOTİKLER	MİK	Direnç Profili n(%)			MİK ₅₀	MİK ₉₀
	Aralığı (µg/ml)	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli		
AK	0.5–256	27(32.14)	15(17.86)	42(50)	32	128
CIP	0.015–256	8(9.52)	0(0)	76(90.48)	32	64
RA	0.5–512	15(17.86)	29(34.52)	40(47.62)	2	512
MP	0.015–128	24(28.57)	11(13.10)	49(58.33)	16	64
MXF*	0.015–64	21(25)	44(52.38)	19(22.62)	4	8
CL	0.25–1024	79(94.05)	0(0)	5(5.90)	1	2
TGC*	0.12–8	73(86.90)	8(9.53)	3(3.57)	1	4

n= İzolat sayısı. AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, RA: Rifampisin, MP: Meropenem, MXF: Moksifloksasin, CL: Kolistin, TGC: Tigesiklin. *: 59,91 no'lu literatürlerde verilen MİK aralıklarına göre değerlendirildi.

84 *Acinetobacter* spp. izolatının 26'sı (%30.95) ekstrem-dirençli (XDR) ve antibiyotip E profili, bir tanesi (%1.19) PDR ve antibiyotip A profili, 57'si (%67.86) ÇDR ve farklı antibiyotip profilleri olarak bulundu (Tablo 6).

Acinetobacter spp. izolatlarının antibiyotik direnç profillerine göre 25 antibiyotip grubu belirlendi. Bu gruplandırmada orta duyarlı kökenler de dirençli olarak kabul edildi. Yalnızca bir izolatın tüm antibiyotiklere dirençli olduğu ve A_A grubunda yer aldığı görüldü (Tablo 6).

Tablo 6. İzolatların antibiyotik direnç profillerine göre belirlenen grupları

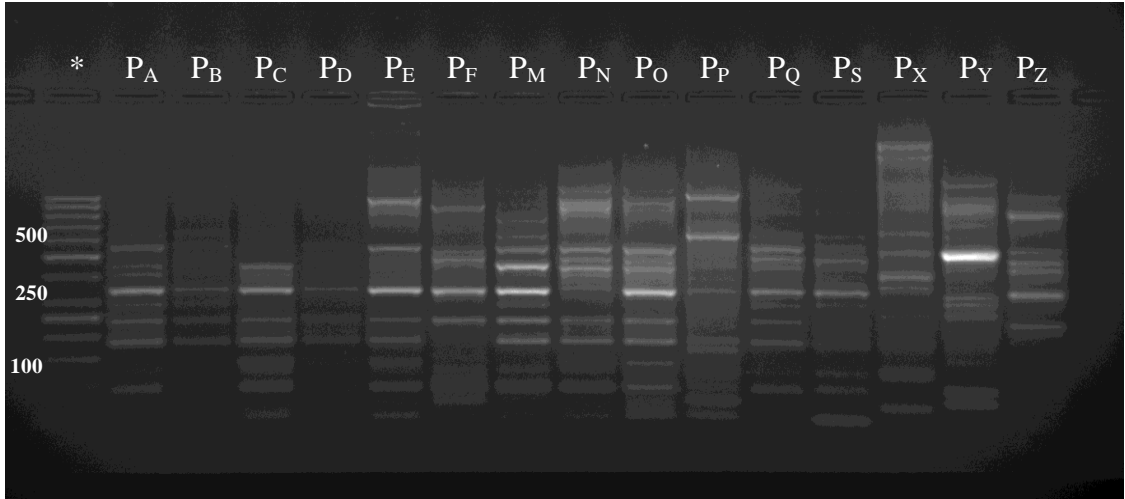
Antibiyotip	Antibiyotikler							İzolatlar n (%)
	AK	CIP	RA	MP	MXF*	CL	TGC*	
A _A	R	R	R	R	R	R	R	1(1.19)
A _B	R	R	R	R	R	S	R	6(7.14)
A _C	R	R	R	R	S	S	R	1(1.19)
A _D	R	R	R	R	R	R	S	3(3.57)
A _E	R	R	R	R	R	S	S	26(30.95)
A _F	R	R	R	R	S	S	S	3(3.57)
A _G	R	R	R	S	S	S	S	2(2.38)
A _H	R	R	R	S	R	S	S	5(5.95)
A _I	R	R	S	R	R	S	S	3(3.57)
A _J	R	R	S	R	S	S	S	1(1.19)
A _K	R	R	S	S	R	S	S	3(3.57)
A _L	R	S	R	R	R	S	R	1(1.19)
A _M	R	R	S	S	S	S	S	2(2.38)
A _N	S	R	R	R	R	S	S	8(9.52)
A _O	S	R	R	R	R	S	R	1(1.19)
A _P	S	R	R	R	S	S	S	2(2.38)
A _Q	S	R	R	S	R	S	S	3(3.57)
A _R	S	R	S	R	R	S	S	3(3.57)
A _S	S	R	S	S	R	S	S	1(1.19)
A _T	S	R	S	R	S	S	S	2(2.38)
A _X	S	R	S	S	S	S	S	1(1.19)
A _U	S	S	R	S	S	R	S	1(1.19)
A _V	S	S	R	S	S	S	R	1(1.19)
A _Y	S	S	R	S	S	S	S	4(4.76)
A _Z	S	S	S	S	S	S	S	1(1.19)

n= İzolat sayısı. AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, RA: Rifampisin, MP: Meropenem, MXF: Moksifloksasin, CL: Kolistin, TGC: Tigesiklin. *: 56, 91 no'lu literatürlerde verilen MİK aralıklarına göre değerlendirildi

AP-PZR yöntemi ile 15 farklı grup elde edildi (Tablo 7) (Resim 2). P_A grubundaki 36 kökenden 22'si antibiyotiplendirme sonuçlarına göre aynı grupta (A_E antibiyotip) yer aldı. Resim 3'de P_A grubuna dahil olan bazı izolatların AP-PZR bant profilleri örnek olarak verilmiştir. Tablo 8'de antibiyotip grupları ile AP-PZR sonucu oluşturulan gruplar arasındaki ilişki görülmektedir. İzolatların, MİK değerleri, genotip ve antibiyotip grupları arasındaki ilişki Tablo 9'da özetlenmiştir.

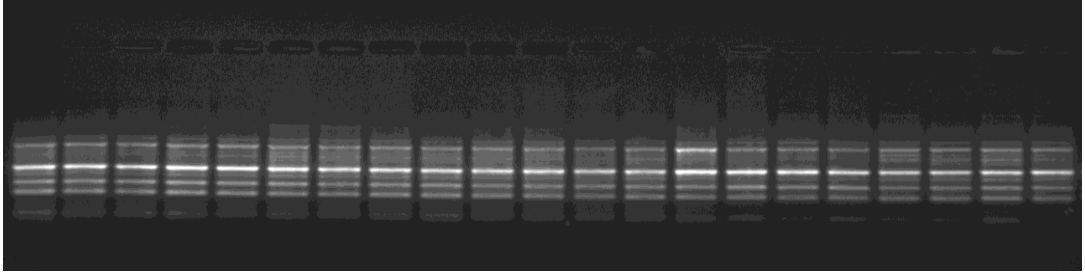
Tablo 7. AP-PZR'ye göre belirlenen genotipik gruplar

Gruplar	n (%)	Gruplar	n (%)	Gruplar	n (%)
P _A	36(42.85)	P _F	5(5.95)	P _Q	1(1.19)
P _B	10(11.90)	P _M	3(3.57)	P _S	3(3.57)
P _C	1(1.19)	P _N	3(3.57)	P _X	1(1.19)
P _D	10(11.90)	P _O	4(4.76)	P _Y	2(3.57)
P _E	1(1.19)	P _P	2(2.38)	P _Z	2(3.57)



Resim 2. 84 *Acinetobacter* spp. AP-PZR bant profilleri, *; 50bp DNA marker

P_A grubundaki 36 kökenden 22'si antibiyotiplendirme sonuçlarına göre aynı grupta (A_E antibiyotip) yer aldı. Resim 3'de P_A grubu AP-PZR bant profilleri ve antibiyotip grupları ile AP-PZR sonucu oluşturulan gruplar arasındaki ilişki Tablo 8'de görülmektedir.



Resim 3. P_A grubu AP-PZR bant profilleri

Tablo 8. Antibiyotip grupları ve AP-PZR'ye göre belirlenen moleküler gruplara göre izolat sayılarının dağılımı

Antibiyotipler	Genotipler														
	P _A	P _B	P _C	P _D	P _E	P _F	P _M	P _N	P _O	P _P	P _Q	P _S	P _X	P _Y	P _Z
A _A	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
A _B	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _C	3	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _D	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
A _E	22	-	-	-	-	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-
A _F	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _G	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _H	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2	-	-	1
A _I	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
A _J	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _K	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
A _L	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _M	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
NA	6	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
A _O	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _P	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _Q	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _R	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
A _S	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _T	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _X	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A _U	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
A _V	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	-
A _Y	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
A _Z	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-

-; bu özelliğe uygun izolat bulunamamıştır

Tablo 9. MİK değerleri, AP-PZR'a göre genotip (G) ve antibiyotip (A) grupları

MİK(µg/ml)											
	Klinik	Örnek	AK	CIP	RA	MP	MXF	CL	TGC	G	A
1	AYB	TAK	128	64	256	16	8	1	1	P _A	A _E
2	NYB	TAK	128	64	1024	32	4	0.5	1	P _A	A _E
3	BC	BOS	128	32	16	64	4	128	0.5	P _P	A _D
4	AYB	BAL	64	64	16	128	4	64	1	P _P	A _D
5	NYB	BAL	128	32	256	32	8	1	0.5	P _A	A _E
6	AYB	TAK	64	64	512	16	8	1	0.5	P _A	A _E
7	NYB	TAK	16	64	2	4	4	1	2	P _D	A _Q
8	NYB	BAL	128	64	1	4	8	1	2	P _N	A _K
9	AYB	BAL	128	32	32	64	4	0.5	1	P _A	A _E
10	AYB	TAK	32	32	4	4	8	1	1	P _Z	A _H
11	AYB	TAK	128	32	2	8	4	1	1	P _O	A _E
12	AYB	TAK	128	32	512	32	2	1	1	P _A	A _F
13	AYB	BAL	128	64	512	32	8	1	0.5	P _A	A _E
14	BC	BOS	128	32	128	16	2	1	0.125	P _F	A _F
15	AYB	KAT	256	256	512	32	8	4	1	P _B	A _D
16	AYB	TAK	1	128	1	0.06	4	1	0.125	P _B	A _S
17	AYB	BAL	2	0.125	2	0.5	0.125	1	4	P _N	A _Y
18	AYB	BAL	128	64	512	32	16	1	0.125	P _A	A _E
19	POL	İDR	1	0.13	0.5	0.25	0.125	2	1	P _O	A _Z
20	ORT	YARA	0.5	32	512	1	4	0.5	2	P _F	A _Q
21	NYB	BAL	64	32	512	64	4	1	0.5	P _A	A _E
22	AYB	BAL	64	64	1	8	4	0.5	1	P _D	A _I
23	AYB	BAL	1	0.25	32	0.015	0.25	1024	1	P _Y	A _U
24	AYB	KAT	1	0.015	2	0.125	0.015	0.25	0.125	P _M	A _V
25	AYB	BAL	32	64	2	32	4	0.25	1	P _A	A _E
26	AYB	TAK	64	64	1	8	4	0.25	1	P _D	A _I
27	AYB	BAL	64	32	2	0.5	4	0.25	0.125	P _B	A _H
28	AYB	BAL	64	32	2	0.5	4	0.25	0.25	P _S	A _H
29	NYB	İDR	64	16	2	8	2	2	0.5	P _B	A _F
30	AYB	TAK	64	16	2	0.5	4	0.25	0.125	P _S	A _H
31	AYB	TAK	64	16	1	0.5	2	0.25	0.125	P _S	A _M
32	AYB	TAK	1	16	1	16	2	1	2	P _B	A _T
33	AYB	BAL	64	32	2	0.5	4	1	1	P _B	A _K
34	AYB	BAL	32	64	1	8	2	0.5	2	P _C	A _J
35	AYB	BAL	64	16	128	16	4	1	1	P _F	A _E
36	AYB	TAK	16	64	64	32	4	0.5	2	P _A	A _N
37	AYB	KAT	1	128	1	8	4	2	2	P _D	A _R
38	AYB	BAL	16	32	512	128	4	0.5	1	P _A	A _N
39	AYB	TAK	0.5	64	1	16	8	1	2	P _D	A _R
40	AYB	BAL	32	64	512	128	4	1	1	P _A	A _E
41	AYB	TAK	32	32	512	64	4	1	0.5	P _A	A _E
42	AYB	TAK	16	64	2	0.5	4	1	0.5	P _Z	A _Q
43	AYB	BAL	64	16	2	0.5	4	1	0.5	P _Q	A _H
44	AYB	TAK	16	32	2	16	8	0.5	1	P _A	A _N

Tablo 9'un devamı

MİK (µg/ml)											
	Klinik	Örnek	AK	CIP	RA	MP	MXF	CL	TGC	G	A
45	NYB	BAL	16	32	2	8	8	0.5	2	P _A	A _N
46	AYB	TAK	64	32	32	64	4	2	0.25	P _A	A _E
47	AYB	BOS	16	128	2	32	8	2	2	P _A	A _N
48	AYB	BAL	32	32	512	64	4	0.5	1	P _A	A _E
49	AYB	BAL	32	32	512	64	4	1	1	P _A	A _E
50	NYB	TAK	64	16	2	4	2	1	1	P _B	A _G
51	AYB	YARA	32	64	16	16	4	2	4	P _E	A _C
52	AYB	TAK	64	32	1	0.5	4	1	0.25	P _M	A _K
53	CER	İDR	64	32	2	8	4	1	0.5	P _F	A _E
54	İÇHST	BAL	128	32	2	32	4	1	0.5	P _A	A _E
55	AYB	TAK	64	64	2	16	4	2	4	P _D	A _C
56	İÇHST	TAK	16	64	4	128	8	1	2	P _A	A _N
57	AYB	BAL	32	128	1	16	8	1	0.5	P _M	A _I
58	ORT	YARA	32	32	512	32	8	1	4	P _A	A _E
59	AYB	BAL	64	64	256	64	4	1	2	P _A	A _C
60	BC	İDR	32	32	256	16	4	1	2	P _F	A _E
61	AYB	TAK	32	32	2	16	2	1	4	P _D	A _B
62	AYB	TAK	32	64	2	8	4	1	4	P _D	A _C
63	NYB	TAK	1	0.125	2	1	0.015	1	0.5	P _N	A _V
64	AYB	TAK	128	4	16	64	4	4	8	P _X	A _A
65	NYB	BAL	32	64	256	64	8	1	2	P _A	A _E
66	AYB	BAL	128	64	2	32	4	1	2	P _A	A _E
67	AYB	TAK	256	32	256	128	4	1	2	P _A	A _E
68	NYB	BAL	64	32	32	32	4	1	1	P _A	A _E
69	AYB	BAL	128	32	256	64	4	1	1	P _A	A _E
70	AYB	TAK	128	64	256	32	4	1	1	P _A	A _E
71	AYB	YARA	16	64	1	64	0.25	0.5	1	P _A	A _T
72	ORT	YARA	32	0.06	256	32	8	1	8	P _A	A _L
73	BC	KAT	64	64	256	32	4	1	4	P _A	A _C
74	KDC	TAK	2	0.06	4	0.25	0.03	1	2	P _A	A _V
75	BC	YARA	64	8	1	4	0.25	1	1	P _O	A _M
76	NYB	İDR	128	128	4	8	64	1	4	P _A	A _C
77	NYB	KAT	16	64	4	16	8	1	4	P _A	A _O
78	NYB	KAT	0.5	32	2	16	4	1	2	P _D	A _N
79	AYB	HK	64	4	2	4	0.25	0.5	1	P _O	A _G
80	ORT	YARA	0.5	32	1	0.5	2	0.5	1	P _B	A _X
81	NYB	İDR	0.5	32	2	32	2	1	0.5	P _B	A _P
82	AYB	BAL	0.5	32	2	32	2	1	0.5	P _B	A _P
83	İÇHST	YAR	0.5	128	2	8	4	1	2	P _D	A _N
84	BC	TAK	1	1	2	0.25	2	1	1	P _Y	A _V

AP-PZR ile elde edilen 15 grubun her birinden bir izolat rastgele seçilerek dama tahtası yöntemi ile test edildi. Çalışmaya alınan 15 ÇDR *Acinetobacter* spp. izolatı için 11 kombinasyon denendi ve 365 kuyucuğun Σ FİK değeri hesaplandı. Tigesiklinin tüm antibiyotiklerle kombinasyonunun sonucunda; %23 (49) sinerjik ve %27 (58) aditif etkileşim, %3 (5) oranında antagonizma, kolistinin tüm antibiyotiklerle kombinasyonunun sonucunda ise; %50 (77) sinerjik ve 24 (%36) aditif etkileşim, %1 (1) oranında antagonizma saptandı. Her iki antibiyotiğin de sırasıyla, diğer antibiyotiklerle %47 (99) ve %25 (40) oranlarında etkileşim göstermediği gözlemlendi.

Değerlendirmeye alınan kombinasyonların etkinlikleri incelendiğinde en yüksek sinerji kolistin-rifampisin (%100) ve kolistin-meropenem (%100) kombinasyonunda saptandı. En düşük sinerji tigesiklin-amikasin (%27) kombinasyonunda izlendi. En yüksek antagonisitik etki tigesiklin-kolistin (%20) kombinasyonunda görüldü (Tablo 10). Çalışılan 15 izolat için antibiyotik kombinasyonlarının Σ FİK değerleri ve etkileşim sonuçları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 10. Dama tahtası yöntemiyle test edilen 15 *Acinetobacter* spp. izolatu üzerine antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

Antibiyotik kombinasyonu	Sinerji n(%)	Aditif n(%)	Etkisiz n(%)	Antagonizma n(%)
CL/MP	15(100)	0	0	0
CL/RA	15(100)	0	0	0
CL/CIP	9(60)	1(6)	4(27)	1(6)
CL/MXF	9(60)	3(20)	3(20)	0
CL/AK	7(47)	8(53)	0	0
TGC/MP	7(46)	6(40)	2(14)	0
TGC/RA	8(53)	2(14)	5(33)	0
TGC/CIP	3(20)	3(20)	9(60)	0
TGC/MXF	6(40)	4(27)	4(27)	1(6)
TGC/AK	4(27)	6(40)	4(27)	1(6)
TGC/CL	7(46)	1(6)	4(27)	3(20)

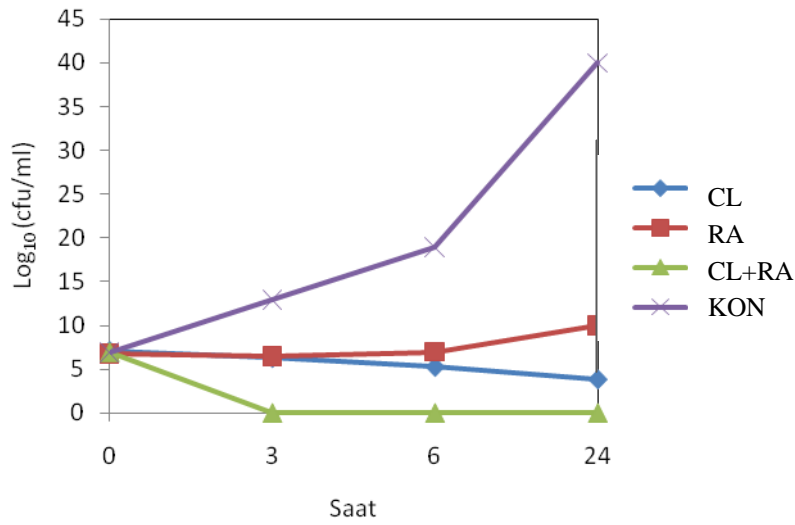
Tablo 11. Antibiyotik kombinasyonlarının dama tahtası yöntemiyle belirlenen Σ FİK değerleri ve etkileşim şekli

İzolat No	CL/MP	CL/RA	CL/CIP	CL/MXF	CL/AK	CL/TGC	TGC/MP	TGC/RA	TGC /CIP	TGC/MXF	TGC/AK
4	0.19-Sin	0.19-Sin	0.19-Sin	0.37-Sin	0.19-Sin	0.24-Sin	0.30-Sin	0.30-Sin	0.18-Sin	0.37-Sin	0.28-Sin
8	0.18-Sin	0.27-Sin	0.37-Sin	1.24-Etk	0.74-Adt	0.19-Sin	0.50-Sin	0.50-Sin	1.01-Etk	0.50-Sin	0.50-Sin
10	0.24-Sin	0.07-Sin	0.37-Sin	0.31-Sin	0.18-Sin	0.37- Sin	0.56-Adt	0.28-Sin	0.56-Adt	0.37-Sin	0.31-Sin
30	0.37-Sin	0.31-Sin	0.28-Sin	0.14-Sin	0.31-Sin	0.53-Adt	0.28-Sin	0.28-Sin	0.53-Adt	0,37-Sin	1.03-Etk
32	0.18-Sin	0.09-Sin	0.16-Sin	0.18-Sin	0.18-Sin	8.25-Ant	0.16-Sin	0.15-Sin	0.28-Sin	4.05-Ant	0.18-Sin
34	0.31-Sin	0.30-Sin	4.31-Ant	1.03-Etk	0.56-Adt	2.06-Etk	0.28-Sin	0.56-Adt	2.06-Etk	1.06-Etk	0.90-Adt
43	0.31-Sin	0.12-Sin	1.03-Etk	1.06-Etk	0.62-Etk	0.48-Sin	0.53-Adt	0.56-Adt	1.03-Etk	2.12-Etk	0.53-Adt
45	0.25-Sin	0.13-Sin	1.06-Etk	0.53-Adt	0.25-Sin	4.06-Ant	0.26-Sin	2.03-Etk	1.03-Etk	0.15-Sin	4.06-Ant
51	0.31-Sin	0.31-Sin	0.13-Sin	0.31-Sin	0.52-Adt	1.06-Etk	1.12-Etk	0.18-Sin	1.03-Etk	1.00-Etk	0.53-Adt
60	0.42-Sin	0.18-Sin	1.12-Etk	0.14-Sin	0.98-Adt	1.24-Etk	0.28-Sin	1.06-Etk	2.06-Etk	0.56-Adt	2.06-Etk
61	0.18-Sin	0.30-Sin	0.18-Sin	0.49-Sin	0.63-Etk	8.06-Ant	0.53-Adt	1.06-Etk	2.33-Etk	0.56-Adt	2.12-Etk
64	0.31-Sin	0.28-Sin	1.06-Etk	0.56-Adt	0.63-Etk	0.18-Sin	0.56-Adt	1.03-Etk	0.18-Sin	1.06-Etk	1.06-Etk
75	0.19-Sin	0.14-Sin	0.37- Sin	0.64-Adt	0.37-Sin	0.18-Sin	0.63-Adt	0.50-Sin	2.06-Etk	0.56-Adt	0.56-Adt
84	0.18-Sin	0.37-Sin	0.18-Sin	0.15-Sin	0.56-Adt	0.56-Adt	0.56-Adt	0.50-Sin	1.06-Etk	0.31-Sin	0.56-Adt
57	0.31-Sin	0.37-Sin	0.53-Adt	0.38-Sin	0.49-Sin	2.05-Adt	1.25-Etk	1.06-Etk	0.53-Adt	0.53-Adt	0.53-Adt

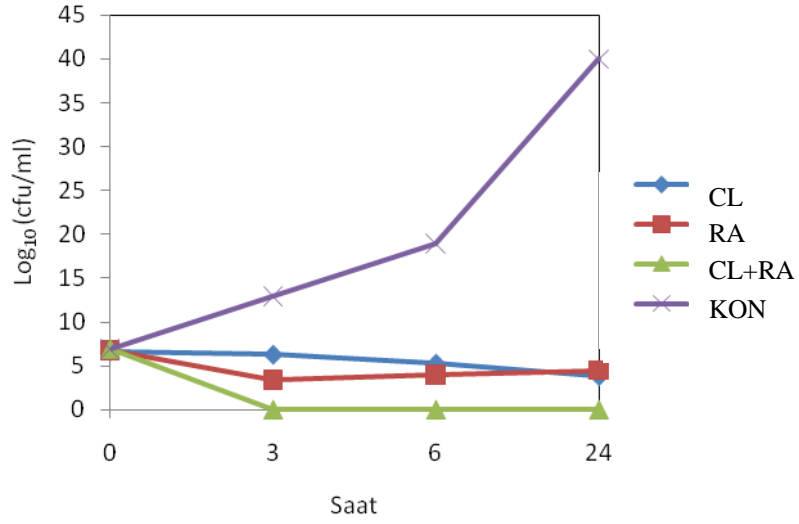
Sin; Sinerji, Etk; Etkisiz, Adt; Aditif, Ant; Antagonizma

Dama tahtası yöntemine göre en yüksek sinerji görülen 10 ve 30 numaralı izolatlardan 30 no'lu izolat zamana bağılı öldürme eğrisi yöntemi ile de test edildi. Dama tahtası yöntemiyle elde edilen sonuçlarda, en iyi etki kolistin-meropenem, kolistin-rifampisin ve tigesiklin-rifampisin kombinasyonlarında görüldü. 30 no'lu köken için kolistin-rifampisin ve tigesiklin-rifampisin kombinasyonları test edildi. MİK konsantrasyonları, dama tahtasında sinerji görülen konsantrasyon ve bu konsantrasyonun iki katı olarak belirlendi.

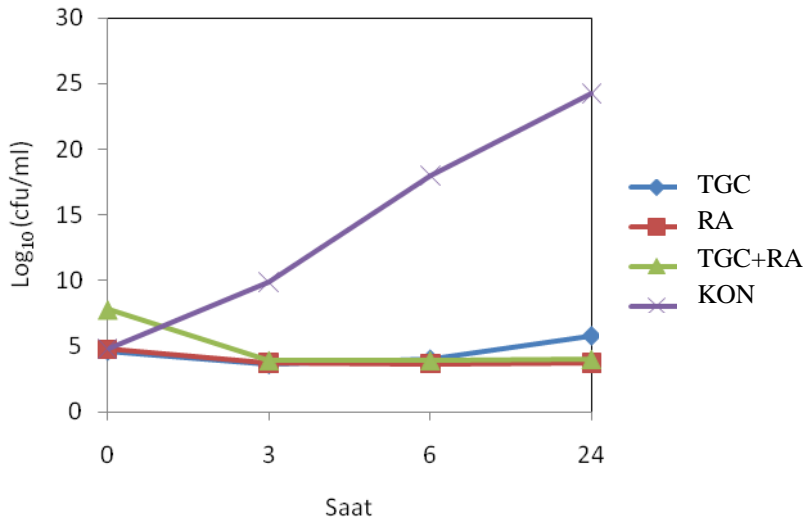
30 no'lu kökende kolistin ile rifampisin arasında, 3., 6. ve 24. saatte, çalışılan her iki konsantrasyonda da sinerjik etkileşim, tigesiklin ile rifampisin arasında ise çalışılan her iki konsantrasyonda da aditif etkileşim görüldü (Şekil 2, 3, 4, 5).



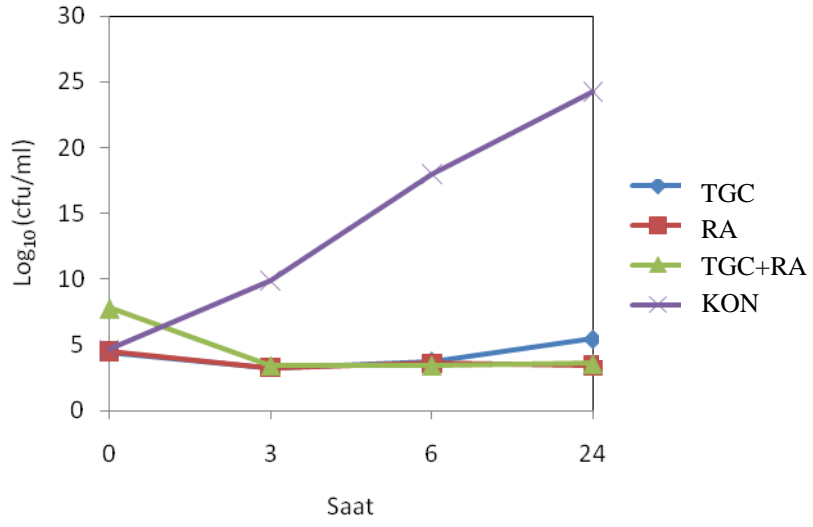
Şekil 2. 30 no'lu izolatta; MİK: 0.06/0.25µg/ml, 3., 6. ve 24.saatte kolistin ile rifampisin arasında sinerjik etkileşim, (CL: Kolistin, RA: Rifampisin, CL+RA: Kolistin / Rifampisin kombinasyonu, KON: Kontrol)



Şekil 3. 30 no'lu izolatta; MİK: 0.12/0.5µg/ml, 3., 6. ve 24.saatte kolsitin ile rifampisin arasında sinerjik etkileşim, (CL: Kolistin, RA: Rifampisin, CL+RA: Kolistin / Rifampisin kombinasyonu, KON: Kontrol).



Şekil 4. 30 no'lu izolatta; MİK: 0.015/2 µg/ml, 3., 6. ve 24.saatte tigesiklin ile rifampisin arasında aditif etkileşim, (TGC: Tigesiklin, RA: Rifampisin, TGC+RA: Tigesiklin / Rifampisin kombinasyonu, KON: Kontrol).



Şekil 5. 30 no'lu izolatta; MİK: 0.03/4 µg/ml, 3., 6. ve 24.saatte tigesiklin ile rifampisin arasında aditif etkileşim, (TGC: Tigesiklin, RA: Rifampisin, TGC+RA: Tigesiklin / Rifampisin kombinasyonu, KON: Kontrol).

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Acinetobacter türleri son 20-30 yıldır özellikle hastalardan ve hastane çevresinden sık izole edilen önemli fırsatçı patojenlerdir. Birçok antimikrobiyal ilaca ve kuruluğa karşı dirençli olduklarından kuru ve cansız yüzeylerde günlerce canlı kalabilirler. Ayrıca, hastane ortamında hastaların ve hastane çalışanlarının cildindeki kolonizasyonları sonucunda kolayca yayılarak salgınlara neden olurlar ve bu salgınlarda tanımlanamayan etken olarak görülebilirler (9, 12, 24, 57, 95, 116). *Acinetobacter*'ler özellikle YBÜ'de yatan hastalar için ciddi enfeksiyon etkenleridir (20, 21). Bu çalışmaya alınan 84 ÇDR *Acinetobacter* spp. izolatının 68'i (%81) YBÜ'den izole edilmiştir. Türkiye'de yedi üniversite ve bir eğitim araştırma hastanesinde YBÜ'den izole edilen gram-negatif bakteriler ile yapılan iki ayrı çalışmada enfeksiyon etkeni olarak *Acinetobacter* türlerinin 1999 yılında dördüncü ve 2000 yılında ikinci sırada, 2003 yılında bir eğitim araştırma hastanesinin YBÜ'nde yapılan sürveyans çalışmasında ise enfeksiyon etkenleri arasında ilk sırada yer aldığı görülmüştür (3, 33, 50).

Acinetobacter spp.'nin öncelikli olarak tercih edilen karbapenemler de dahil birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesi *Acinetobacter* enfeksiyonlarındaki en önemli sorundur (117). *Acinetobacter* türleri sıklıkla birçok antibiyotiğe, birden fazla mekanizma ile direnç göstermektedir (10). Bu çalışmada 84 ÇDR *Acinetobacter* spp. izolatının altı farklı antibiyotik grubu ve yedi farklı antibiyotiğe olan direnç oranları sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir. Bu izolatlarda en yüksek direnç siprofloksasine karşı %90.47 olarak belirlenirken, kinolon grubu yeni antibiyotiklerden biri olan moksifloksasine karşı ise, %22.62 olarak bulunmuştur. Siprofloksasinden sonra en yüksek direnç oranı %58.33 ile karbapenem grubu

antibiyotiklerden meropeneme karşı saptanmış ve bunları %50 direnç oranı ile amikasin, ardından da %47.62 ile rifampisin izlemiştir. Çalışmamızda görülen yüksek meropenem direnci karbapenem direncinin giderek artmakta olduğu fikrini desteklemektedir. 2003 yılında yürütülen Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) çalışmasında, ülkemizdeki *Acinetobacter* türlerinde karbapenemlere direnç oranı %27-38 olarak bulunmuştur (107). Köseoğlu ve ark. (36) meropenem direncini %69.3, imipenem direncini ise %65.3 olarak, Kuşçu ve ark. (62) ise karbapenem direncini yaklaşık %80 olarak bildirmişlerdir. *A. baumannii* ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde yürütülen çalışmalarda, 2006 yılında siprofloksasin direnç oranı %75, amikasin direnç oranı ise %61 olarak, 2007'de siprofloksasin, amikasin ve imipenem için direnç oranları sırasıyla, %51, %45, %38 olarak bildirilmiştir (116, 117). *Acinetobacter* spp. ile 2009 yılında yapılan bir çalışmada ise siprofloksasin direnci %86, amikasin direnci %76 olarak saptanmıştır (78). 2011 yılında İtalya'da yapılan çalışmada imipenem direnç oranı %93.8, siprofloksasin direnç oranı %94.7, amikasin direnç oranı %97.4 ve meropenem direnç oranı %86 olarak bildirilmiştir (22). Çalışmamızda, çoklu dirençli *Acinetobacter* izolatlarında saptadığımız yüksek direnç oranları, son yıllarda giderek artan antibiyotik direncinin dikkate alınarak, gerekli önlemlerin alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Hastanelerde geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı olarak meydana gelen dirençli kökenlerin neden olduğu tedavisi güç enfeksiyonlar, hastalar için ciddi tehdit oluşturmaktadır (10). Bu nedenle tedavide yeni alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni seçenek ilaçların başında tigesiklin gelmektedir (62). Geniş spektrumlu bu antibiyotiğin, ÇDR *Acinetobacter* spp. izolatlarında oldukça etkili olduğu yurt içi ve yurt dışında yürütülen çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (73, 78,

117). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), European Committee for Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST), The British Society for Antimicrobial Chemotherapy'de (BSAC) *Acinetobacter* spp. için tigesiklin direnci ile ilgili olarak MİK aralığı belirtilmemiştir. Ancak çalışmamızda 2005 yılında United States Food and Drug Administration (FDA) tarafından *Enterobacteriaceae* için önerilen duyarlılık sınır değerleri kullanılmıştır. Buna göre çalışmada izolatların %3.57'si tigesikline dirençli bulunmuştur. Tigesiklin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, sırasıyla 1µg/ml ve 4µg/ml olarak belirlenirken, MİK değeri ≤2µg/ml olan izolatların oranının %86.9 olduğu görülmüştür. Türkiye'de genel olarak *Acinetobacter* izolatlarında tigesiklin duyarlılığının araştırıldığı çalışmalar değerlendirildiğinde MİK değeri ≤2µg/ml olan izolatların oranı %80.6 olarak bildirilmiştir (5, 117). Kuşcu ve ark. (62) tigesiklin için %21 oranında direnç saptadıklarını bildirmişlerdir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda tigesiklin MİK değerleri; 2.31-2.80µg/ml arasındayken, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla, 1-4µg/ml ve 1.5-12µg/ml arasında bulunmuştur (26, 35, 36, 62). Antibiyotik duyarlılıklarının araştırıldığı The Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) çalışmasının 24 Avrupa ülkesini içeren bölümünde 1560 *A. baumannii* izolatının tigesiklin MİK₅₀ değeri 0.25µg/ml, MİK₉₀ değeri ise 1µg/ml olarak bulunmuş, bu izolatlardan ÇDR olanların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 1µg/ml ve 2µg/ml olarak gözlenmiştir (75). İspanya'da yapılan bir çalışmada imipenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında tigesiklin direnci %8 olarak bulunmuştur (80). Navon-Venezia ve ark. (73) tarafından ÇDR *A. baumannii* izolatlarında yapılan bir çalışmada ise suşların %78'inin tigesikline dirençli olduğu bildirilmiştir.

Tigesiklinin henüz kullanılmadığı birçok ülkede yapılan araştırmalarda, kolistin ÇDR *A. baumannii*'ye etkili tek antibiyotik olduğu sıklıkla belirtilmektedir

(36, 62, 64). Son yıllarda kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere dirençli *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda kolistin tedavisi yeniden gündeme gelmiştir (2). Kolistin bugüne kadar ciddi yan etkileri nedeniyle tedavide çok sık tercih edilmemiştir. Bu çalışmada izolatların %5.9'u kolistine dirençliken, bunlardan sadece biri, test edilen diğer tüm antibiyotiklere de dirençli bulunmuştur. Kolistin MİK değerleri genel olarak düşük olduğu halde sadece bir izolatın MİK değerinin 1024µg/ml olduğu görülmüştür. Türkiye'de son yıllarda yapılan çalışmalarda ÇDR *A.baumannii* izolatlarında kolistin direnci saptanmamıştır (26, 78, 108). Bassetti ve ark. (11) da 2008 yılında yaptıkları çalışmalarında kolistin direncine rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Kallel ve ark. (60) *in vivo* çalışmalarında kolistin, nozokomiyal ÇDR *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde yeterli ve etkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *Acinetobacter*'lerin kolistine dirençliken diğer antibiyotiklere duyarlı olabildiği de çeşitli araştırmalarda görülmüştür (41, 96, 97).

Çalışmamızda her iki antibiyotiğin ÇDR *Acinetobacter*'ler üzerinde etkileri karşılaştırıldığında kolistin direncinin %5.9, tigesiklin direncinin ise orta duyarlı kökenler de dahil edildiğinde %13.10 olarak belirlenmesi, kolistin tigesikline oranla daha etkili olduğunu göstermektedir. Fakat tigesiklin için orta duyarlı grubu dirençli gruptan ayırdığımızda direnç oranı %3.57 olmaktadır. Zer ve ark. (117) *Acinetobacter* izolatlarında tigesiklin direncini %6.45, Özdemir ve ark. (78) %1 oranında saptarken, her iki araştırmacı da kolistine direnç gözlemediklerini bildirmişlerdir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada kolistin direnci %5, tigesiklin direnci ise %16 olarak bulunmuştur (61). Yurt içi ve yurt dışı çalışmalardan elde edilen verilere göre kolistin ve tigesiklin direnç oranlarının değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Gram-negatif bakterilerde direnci tanımlayan terimlerde uluslararası bir uzlaşım henüz sağlanmamış görünmekle beraber, genel eğilim en az 3 ilaç grubuna karşı dirençli bulunan kökenlerin ÇDR olarak tanımlanması yönündedir. Tigesiklin ve kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere direnç için XDR terimi benimsenmiştir. Tigesiklin ve kolistin dahil var olan tüm antibiyotiklere karşı direnç için ise PDR terimleri kullanılmaktadır (37, 46). Çalışmamızdaki 84 izolattan 26'sı (%30.95) XDR olup antibiyotip A_E profilini, biri (%1.19) PDR olup antibiyotip A_A profilini, 57'si (%67.86) ise ÇDR olup farklı antibiyotip profillerini göstermiştir. Çalışmamız, yurtiçi ve yurtdışı çalışmalarda bildirilen antibiyotik direnç oranları dikkate alındığında, *Acinetobacter* spp.'lerdeki antibiyotik direncinin giderek artmakta olduğunu desteklemektedir.

Aynı türden izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi göstermek amacıyla yapılan moleküler tiplendirme yöntemlerinde DNA parmak izleri (DNA fingerprinting) belirlenerek DNA parmak izi aynı olan suşların klonal yönden ilişkili oldukları ve ortak bir atadan köken aldıkları kabul edilmektedir. Dirençli suşlar arasındaki klonal ilişki belirlendiğinde, hastanelerde ve toplumda dirençli klonların yayılma derecesi anlaşılabilen, yayılma kontrol altına alınabilmekte ve enfeksiyon kontrol stratejilerinin etkinliği artırılabilir (30). Moleküler genotipik yöntemlerden AP-PZR, kolay uygulanabilen, yüksek ayırt etme yeteneği olan ve hızlı sonuç veren bir yöntem olduğundan bu güne kadar oldukça sık kullanılan PZR temelli epidemiyolojik bir yöntem olmuştur (114). Bu çalışmada, M13 universal primerleri ile yapılan AP-PZR'ye göre 15 farklı bant paterni saptanmıştır. Birbiriyle ilişkili olan izolatları belirlemek için elde edilen bant profillerinin oldukça belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçlarının tekrarlanabilirliğini görmek için denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Tekrarlar sırasında bant paternlerinde görülen

farklılıkların, PZR karışımına eklenen kalıp DNA miktarı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Çalışmamızdaki 84 *Acinetobacter* spp.'de direncin klonal yayılımı, bu konuda yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu olarak YBÜ'den sağlanan izolatlarda daha yoğun olarak tespit edilmiştir (51, 90, 93). AP-PZR sonuçlarımıza göre en büyük klon olan P_A grubundaki 36 izolatın 22'si antibiyotip A_E profilini, üçü antibiyotip A_C profilini, altısı antibiyotip A_N profilini, ikisi antibiyotip A_V profilini ve diğerleri A_F, A_K, A_O antibiyotip profillerini göstermiştir. AP-PZR ile yapılan klonal sınıflamada, antibiyotip paternleri aynı ya da birbirine yakın olan izolatların genellikle aynı klonal grupta yer aldığı gözlenmiştir. İzolatların farklı AP-PZR grupları içinde yer alması, farklı kliniklerden farklı tarihlerde izole edilmelerinden kaynaklanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

Kaynak araştırmalarımızda, antibiyotiplendirme ile genotiplendirmenin birlikte değerlendirilmesine ilişkin yalnızca bir çalışma bulunmuştur (90). Fakat antibiyotik duyarlılık profili ile genotiplendirmenin çalışıldığı çeşitli araştırmalara da rastlanılmış, bu çalışmalarda antibiyotip grubu oluşturulmamıştır (93, 101). Prashant ve ark. (90) 21 *Acinetobacter* izolatında, %52 (n=11) oranında A ve %29 (n=6) oranında E antibiyotipi belirlemişler, AP-PZR yöntemine göre, A antibiyotipinin %36 oranında g paterninde, E antibiyotipinin ise %66 oranında e paterninde bulunduğunu göstermişlerdir. Ranjbar ve ark. (93) tarafından yürütülen bir çalışmada 21 *A. baumannii* izolatının, ARB11 primerleri ile yapılan AP-PZR sonucunda %57.1'i E grubunda olmak üzere 7 farklı klonal grupta (A-I) toplandığı ve aynı bant paternine sahip izolatların antibiyotik direnç profillerinin de aynı olduğu görülmüştür. Siau ve ark. (101) 18 hastadan alınan farklı örneklerden izole edilen *Acinetobacter* izolatının AP-PZR sonuçlarına göre epidemiyolojik olarak ilişkili

bulduğunu ve benzer antibiyotik duyarlılık paterni gösterdiklerini, yalnızca iki izolatın farklı genotipik ve fenotipik özelliğe sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Bazı çalışmalarda AP-PZR' de kullanılan M13 universal primerlerinin daha belirgin bant paternleri oluşturduğu, iyi sonuçlar verdiği ve ayırt edebilme yeteneğinin oldukça iyi olduğu bildirilmiştir (114). Villa ve ark. (115) M13 primerlerini kullandıkları çalışmalarında 26 *Acinetobacter* izolatı için on farklı bant paterni belirlediklerini ve salgınla ilişkili yedi izolatın aynı bant paternini gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca ribotipleme ile AP-PZR yöntemini karşılaştırdıklarında iki yöntemin ayırt etme yeteneğinin birbirine yakın olduğunu görmüşlerdir. Işık ve ark. (55) tarafından yapılan bir çalışmada hastane enfeksiyonu kaynaklı 74 ve VİP kaynaklı 25 *Acinetobacter* izolatının neden olduğu salgınlarda klonal ilişki, M13 primerleri kullanılarak değerlendirilmiştir. İncelenen 74 izolat için, bir ana genotip olmak üzere beş ayrı genotip, diğer 25 köken için ikisi ana genotip olmak üzere toplam altı genotip saptanmıştır. Grudmann ve ark. (51) dört farklı primer seti ile gerçekleştirdiği PZR temelli genotiplendirme çalışmalarında, M13 primerlerinin diğer primer setlerine kıyasla daha az soluk bant profili ve çok daha belirgin bant izleri oluşturduğunu bildirmişlerdir. Diğer primer setleri ile yapılan çalışmaların tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu ancak deney sonucunda agaroz jel üzerinde birbirine yakın mesafede bantlar ve karışık bant profilleri görüntülendiğini rapor etmişlerdir.

Ayan ve ark. (8) 2003 yılında PFGE ve AP-PZR moleküler tiplendirme yöntemleri ile salgın boyunca izole edilen *A. baumannii* suşları arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi araştırmışlardır. AP-PZR ile PFGE arasındaki uyumun, antibiyogram ile PFGE arasındaki uyumdan daha yüksek olduğunu, PFGE sonuçlarının epidemiyolojik ve klinik bilgi ile birlikte en iyi korelasyonu gösterdiğini

bildirmişlerdir. Bou ve ark. (13) *Acinetobacter* izolatları ile yaptıkları moleküler tiplendirme çalışmalarında AP-PZR, REP-PZR ve PFGE yöntemini kullanmışlar ve bu üç moleküler tiplendirme yönteminin de *Acinetobacter* izolatlarının genotiplendirilmesinde yararlı olduğunu vurgulamışlardır. Yine aynı çalışmada, imipenem dirençli ve duyarlı *A. baumannii* izolatlarının AP-PZR bant paternlerinin REP-PZR ile iyi korelasyon gösterdiği, REP-PZR tekniğinin AP-PZR'den daha yüksek ayırt edebilme gücüne sahip olduğu, AP-PZR bant paternlerinin REP-PZR bant paternleri ile benzer olduğu fakat REP-PZR ile daha fazla grup elde edildiğini bildirmişlerdir. PFGE ile elde edilen tanımlayıcı sonuçlar *A. baumannii* salgınlarının karakterizasyonunda, REP-PZR'nin çok iyi performans gösterdiğini desteklemektedir. 2005 yılında Hindistan'da yapılan bir çalışmada 21 *Acinetobacter* spp. izolatında AP-PZR ile sekiz bant profili, PFGE ile dokuz bant profili elde edilmiştir. Araştırmacılar bant yoğunluklarında ara sıra farklılıklar olsa da AP-PZR'nin tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini, ancak AP-PZR ile epidemiyolojik olarak ilişkisiz grupların birbirinden kolaylıkla ayırlamadığını tespit etmişlerdir. PFGE'nin AP-PZR'ye göre ayırtetme yeteneğinin daha iyi olduğunu, AP-PZR'nin ise düşük maliyet ve az iş gücü gerektirmesi gibi avantajlarının bulunduğunu vurgulamışlardır (90). Bu çalışma sonucunda, yurtiçi ve yurtdışında yapılan çalışmalar gibi AP-PZR'nin hızlı ve etkili bir yöntem olduğu ancak diğer PZR tabanlı yöntemlerle ve altın standart olarak kabul edilen PFGE ile desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Klonal olarak ilişkili suşlar, zamanla antibiyotik duyarlılık profilleri açısından değişim göstermektedir (40, 71). ÇDR *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde hem başarıyı arttırmak hem de direnç gelişimini önlemek amacıyla kombine antibiyotik kullanımı önerilmektedir (96) İmipenem-amikasin, seftazidim-

aminoglikozit, seftazidim-florokinolon ve imipenem-siprofloksasin kombinasyonları *in vitro* sinerjik aktivite göstermeleri nedeniyle tedavide ikinci seçenek olarak kullanılmaktadır (4, 12, 99). ÇDR *A. baumannii*'nin neden olduğu VIP'de ampisilin/sulbaktam, ampisilin/sulbaktam-aminoglikozit kombinasyonu ya da tek başına kolistin tedavisi *in vitro* duyarlılık sonuçlarına göre önerilen tedavi seçeneklerindedir (1). Çalışmamızda AP-PZR ile elde edilen 15 farklı klonun herbirinden rastgele olarak seçilen bir izolata karşı çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının etkinliği dama tahtası yöntemi ve zamana bağlı öldürme kinetiği yöntemi ile araştırılmıştır. Dama tahtası yöntemi ile antibiyotik kombinasyonlarının denendiği 15 izolat için yüksek sinerji değerleri; kolistin-rifampisin (%100), kolistin-meropenem (%100), kolistin-siprofloksasin (%60), kolistin-moksifloksasin (%60), kolistin-tigesiklin (%46) ve tigesiklin-rifampisin (%53) kombinasyonları arasında bulunmuştur. Siprofloksasinin tigesiklin ve kolistin ile olan kombinasyonlarında %50'ye yakın etkileşim gözlenmemiştir. Tigesiklin-kolistin kombinasyonunda ise 15 izolatın üçünde antagonizma saptanmıştır.

Dama tahtası yöntemine göre, kolistin-rifampisin ile sinerji ve tigesiklin-rifampisin ile aditif etkileşim gösterdiği belirlenen bir izolat, zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemi ile test edilmiştir. Bu yöntem ile tigesiklin-rifampisin arasında aditif etkileşim ve kolistin-rifampisin arasında sinerjik etkileşim 3., 6. ve 24. saatte gözlenmiştir. Her iki sinerji testi de ÇDR *Acinetobacter* spp. izolatlarına karşı kolistin ile rifampisin kombinasyonunun tedavide iyi bir seçim olacağını işaret etmektedir. Dama tahtası yöntemi ile %100 sinerjik etkileşim gösteren kolistin-meropenem kombinasyonunun da *Acinetobacter* spp. izolatları üzerinde etkili olacağını düşünmekteyiz. 2005 yılında beş *Acinetobacter* spp. de dama tahtası yöntemi kullanılarak yapılan sinerji testinde levofloksasin ve siprofloksasin tek

başına ve her ikisinin de seftazidim, sefepim, imipenem, piperasilin/tazobaktam ve amikasin ile kombinasyonlarının etkileşimleri incelenmiştir. En yüksek sinerjinin florokinolon ile beta-laktam ve florokinolon ile amikasin kombinasyonlarında olduğu belirtilmiştir (25). 2007 yılında Türkiye’de yapılan bir çalışmada, test edilen karbapenem-aminoglikozit, karbapenem-kinolon, beta-laktam-aminoglikozit ve beta-laktam-kinolon kombinasyonları denenmiştir. İmipenem-netilmisin kombinasyonunun %25 gibi yüksek bir oranda sinerji gösterdiği bildirilmiştir (45). Chang ve ark. (15) bakteriyemi etkeni olarak izole edilen 22 *A. baumannii* kökeninin %36’sında karbapenem-aminoglikozit kombinasyonunda sinerjik etki saptadıklarını belirtmişlerdir. Tan ve ark. (103) 2011’de yaptıkları çalışmada, dama tahtası yöntemi ile kolistin-rifampisin ve tigesiklin-rifampisin arasında %19 oranında ve kolistin-tigesiklin arasında %12 oranında sinerji, zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemi ile kolistin-rifampisin arasında %56, tigesiklin-rifampisin arasında %19 ve kolistin-tigesiklin arasında %44 oranında sinerji gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Çalışılan tüm izolatlar değerlendirildiğinde, zamana bağlı öldürme yöntemi ile %40, dama tahtası yöntemi ile %16 oranında sinerji gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, araştırmacılar zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemi ile gözlenen en iyi *in vitro* sinerjinin kolistin-rifampisin kombinasyonu arasında olduğunu belirtmişlerdir. Lim ve ark. (65) ÇDR ve kolistine duyarlı 31 *A. baumannii* izolatı ile yaptıkları çalışmada zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemi ile 24. saatte kolistin-rifampisin kombinasyonunda bakterisidal aktivitenin en iyi düzeyde (%42), tigesiklin-rifampisin kombinasyonunda ise oldukça düşük düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Zamana bağlı öldürme yöntemi kullanılarak yapılan klinik bir çalışmada tigesiklin-kolistin kombinasyonunda antagonizma görülürken, çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklerle tigesiklin kombine edildiğinde herhangi bir etkileşim

gözelemlenmemiştir (100). Çalışmamızda, dama tahtası ve zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemlerinde çalışılan 30 no'lu izolat için her iki yöntem ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu iki yöntemin sonuçlarının farklı olabildiğini belirten çalışmalar olmakla birlikte çalışmamızda böyle bir sonuç elde edilmemiştir. Her iki yöntemin de, işgücünün fazla olması, yoğun zaman alması, düşük antibiyotik konsantrasyonları ile çalışılması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Buna rağmen, her iki yöntem de sinerji çalışmalarında kullanılmaktadır.

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, çoklu dirençli *Acinetobacter* spp.'lerin sıklıkla YBÜ'den izole edildiği saptanmıştır. Bu enfeksiyonların önlenmesi için, risk faktörleri saptanarak etkin enfeksiyon kontrol programlarının uygulanması gerekmektedir.

Test edilen tüm izolatlar içinde en yüksek direncin siprofloksasine karşı olduğu tespit edilmiştir. İkinci sırada meropenem ve amikasin yer almıştır. Tigesiklin ve kolistin en etkili antibiyotikler olarak bulunmuştur. Etkin tedavi protokollerini belirlemek amacıyla her hastanenin kendi ortamında bulunan mikroorganizmaları ve bunların direnç profilindeki değişiklikleri düzenli olarak saptaması gerekmektedir. Çok ciddi olmayan *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarında monoterapide aminoglikozitlerin ve karbapenemlerin etkili olabileceğini, tedavinin yanıtız kaldığı durumlarda ise tigesiklin ve kolistin tercih edilebileceğini düşünmekteyiz.

AP-PZR yöntemi ile 15 farklı grup elde edilmiştir. İzolatların %42.85'i (36) aynı grupta (P_A) yer almıştır. Aynı klondaki izolatların farklı zamanlarda yapılan AP-PZR denemeleri sonucu elde edilen bant paternlerinde görülebilen değişiklikler, PZR tabanlı bu yöntemde önemli bir tartışma konusudur. Ortam şartları ve PZR karışımındaki küçük değişiklikler tiplendirme sonuçlarını etkileyebilmektedir. Kullanılan kalıp DNA'nın ekstraksiyon protokolü, DNA konsantrasyonu, primerlerin baz dizilimi ve konsantrasyonu, MgCl₂ konsantrasyonu, tampon, Taq DNA polimeraz enzimi çalışma süresince sabit tutulmalı, karışıma eklenme sırası dahi değiştirilmemeli ve tüm salgın izolatları aynı anda çalışılmalıdır.

İzolatların antibiyotik direnç profillerine göre, 25 antibiyotip grubu belirlenmiş ve %30.95'nin (26) A_E grubu içinde yer aldığı gözlemlenmiştir. Antibiyotiplendirme sonuçları, AP-PZR sonuçları ile karşılaştırılarak, en yoğun grup olan A_E'nin 22

izolatının P_A grubunun içinde bulunduğu tespit edilmiştir. Çoklu antibiyotik direncinin izolatlar arasında yayılım gösterip göstermediğinin kesin olarak kanıtlanabilmesi için, moleküler bir taramanın yapılması gerekmektedir. *Acinetobacter* spp. izolatlarında hem antibiyotik direnç profillerinin hem de izolatlar arasındaki klonal yakınlığın belirlenmesi ile yapılan tiplendirme, antibiyotik direncinin yayılımının önlenmesi çalışmaları, klinik açıdan tedavide yararlı olacak doğru antibiyotiklerin seçilmesini sağlayabilecektir.

Çalışmamızda, dama tahtası yöntemiyle, kolistin, MİK değerinin altındaki konsantrasyonlarda, rifampisin, meropenem, amikasin ve siprofloksasin ile kombine edildiğinde %50 sinerji göstermiştir. Zamana bağılı öldürme eğrisi yöntemiyle kolistin ile rifampisin arasında MİK ve MİK×2 değerlerinde sinerji görülmüştür. Kolistin, Türkiye’de rutin olarak kullanılmaması direnç gelişimini bir ölçüde engellemektedir. Kolistin yan etkilerinden dolayı klinik kullanımının sınırlı olması ve nadiren de olsa dirençli olduğu tespit edilen az sayıdaki izolatın yüksek MİK değerleri göstermeleri kolistin başka antibiyotiklerle kombinasyonlarının araştırılmasını gerektirmektedir. Kolistin etkinlik gösterdiği diğer bir antibiyotik ile kombine edilerek kullanılması, direnç gelişimini de sınırlayacaktır.

Çalışmamızda, dama tahtası yöntemiyle tigesiklinin diğer antibiyotiklerle kombinasyonu sonucunda, kolistine oranla daha az sinerji (%23) elde edilmiştir. Tigesiklin, diğer antibiyotiklerle %47, kolistin ile %25 etkileşim göstermemiştir. Zamana bağılı öldürme eğrisi yöntemiyle tigesiklin ile rifampisin arasında MİK ve MİK×2 değerlerinde aditif etkileşim görülmüştür. Ciddi *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni seçenek ilaçların başında gelen tigesiklinin, *in vitro* çalışmalarda etkinliğinin yorumlanabilmesi için kullanılacak sınır değerlere netlik kazandırılması gerekmektedir.

Her iki sinerji testi de ÇDR *Acinetobacter* spp. izolatlarına karşı kolistin ile rifampisin kombinasyonunun tedavide iyi bir seçim olabileceğine işaret etmektedir. Dama tahtası yöntemi ile %100 sinerjik etkileşim gösterdiği belirlenen kolistin-meropenem kombinasyonu da *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde seçenek olarak düşünülebilir. Ancak bunun için yapılan *in vitro* çalışmanın *in vivo* çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir.

BÖLÜM VI

ÖZET

Hastane Kaynaklı *Acinetobacter* spp. Kökenlerinde Antibiyotik

Direnç Profili ve Moleküler Tiplendirilmesi

Bu çalışmada *Acinetobacter* izolatlarının antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi, moleküler düzeyde tiplendirmelerinin yapılması ve dirençli izolatlarda antibiyotik kombinasyonlarının aktivitesinin araştırılması amaçlandı.

2009-2010 yılları arasında, İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde izole edilmiş 84 çoklu dirençli (ÇDR) *Acinetobacter* spp. izolatu kullanıldı. MİK değerleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Epidemiyolojik ilişki, Arbitrarily-primed polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PZR) ve antibiyotiplendirme ile saptandı. Antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ise dama tahtası yöntemi ve zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemi kullanılarak araştırıldı.

Seksen dört ÇDR *Acinetobacter* spp. izolatının siprofloksasin, rifampisin, moksifloksasin, meropenem, amikasin, kolistin ve tigesiklin için antibiyotik direnç oranları sırasıyla; %90.47; %47.62; %22.62; %58.33; %50; %5.9, %3.57'dir. Seksen dört ÇDR *Acinetobacter* spp. izolatu için antibiyotik direnç profillerine göre 25 antibiyotip grubu belirlenirken, M13 primerleri ile yapılan AP-PZR ile 15 farklı patern ayırt edildi. Dama tahtası yöntemine göre, tigesiklinin tüm antibiyotiklerle kombinasyonlarının; %31 sinerjik, %18 aditif, %3 antagonist etkili olduğu, kolistin tüm antibiyotiklerle kombinasyonlarının; %59 sinerjik, %27 aditif, %0,6 antagonist etkili olduğu gözlemlendi. Dama tahtası yöntemi sonucuna göre kolistin-rifampisin kombinasyonu ile sinerjik etki, tigesiklin-rifampisin kombinasyonu ile aditif etki gösteren bir izolat seçildi ve bu köken üzerinde zamana bağlı öldürme eğrisi yöntemi

ile 3., 6. ve 24. saatlerde, kolistin-rifampisin arasında sinerjizm ve tigesiklin-rifampisin kombinasyonunda ise aditif etkileşim olduğu gözlemlendi.

Çalışmaya alınan *Acinetobacter* spp. izolatları büyük oranda yoğun bakım ünitelerinden (YBÜ) izole edildi. İzolatların benzer antibiyotip paterni ve bant profilleri göstermeleri klonal olarak birbirleriyle ilişkili olduklarını düşündürdü.

Anahtar kelimeler: Kolistin, Dama tahtası, Zamana bağlı öldürme eğrisi, AP-PZR, Moleküler Tiplendirme

ABSTRACT

Antibiotic Resistance Profile and Molecular Typing of Hospital Acquired

***Acinetobacter* spp. Isolates**

The aim of this study was to determine antimicrobial resistance profile and clonal relations of *Acinetobacter* isolates and to test efficacy of antimicrobial combinations on resistant isolates.

Eighty four multiple drug resistant (MDR) *Acinetobacter* spp. were isolated at Clinical Microbiology Laboratory of İzmir Atatürk Training and Research Hospital, between 2009-2010. MIC values were determined by using broth microdilution method. Epidemiological relation was indicated by Arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) and antibiotyping. Antibiotic interactions were researched by chequerboard and time-kill methods.

The rates of resistance in 84 MDR *Acinetobacter* spp. isolates were found as 90.47%, 47.62%, 22.62%, 58.33%, 50%, 5.9%, 3.57% for ciprofloxacin, rifampicin, moxifloxacin, meropenem, amikacin, colistin, tigecycline respectively. While 25 different antibiotypes were observed according to antibiotic resistance profiles of 84 MDR *Acinetobacter* spp. isolates, 15 different patterns were distinguished by AP-PCR with M13 primer. According to chequerboard method, tigecycline combination with all the antimicrobials showed 31% synergy, 18% additive, 3% antagonism and colistin combination with all the antimicrobials showed 59% synergy, 27% additive, 0.6% antagonism. One isolate which showed synergistic interaction by chequerboard method between colistin-rifampicin and additive interaction between tigecycline-rifampicin combinations and the synergistic interaction between colistin and rifampicin and the additive interaction between tigecycline and rifampicin at 3h, 6h and 24h were determined on that isolate by time kill method.

Acinetobacter spp. isolates used in our study were mostly isolated from intensive care units (ICU). It showed that the isolates related to each other as a clonal because of they have similar antibiotype pattern and band profile.

Key words: Colistin, Checkerboard, Time-kill, AP-PCR, Molecular Typing

BÖLÜM VII

KAYNAKLAR

1. Akalın H. (2004). Nozokomiyal Pnömoni-II: Tedavisi ve Önleme. *Hast. İnfeks. Derg*, 8: 215-224
2. Akalın H. (2007). Kolistin, *ANKEM Derg*, 21: 26-28
3. Aksaray S, Dokuzoğuz B, Güvener E, et al. (2000). Surveillance of antimicrobial resistance among gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother*, 45: 695-699
4. Allen DM, Hartman BJ. (2005). *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6 th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 2632-2636
5. Akıncı E, Mumcuoglu, Onguru P. (2008). *In vitro* activity of tigecycline against *Acinetobacter baumannii* strains isolated from nosocomial infections. *Turk. J. Med. Sci*, 38: 583-586
6. Andrei A, Zervos MJ. (2006). The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch. Pathol. Lab. Med*, 130: 662-668
7. Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. (2002). 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*, 40: 685-686
8. Ayan M, Durmaz R, Aktaş E, Durmaz B. (2003). Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J. Hosp. Infect*, 54: 39-45

9. Ayats J, Corbella X, Ardanuy C, et al. (1997). Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. *J. Hosp. Infect*, 37: 287-295
10. Balcı M, Bitirgen M, Kandemir B, Türk Arıbaş E, Erayman İ. (2010). Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı. *ANKEM Derg*, 24: 28-33
11. Bassetti M, Repetto E, Righi E, et al. (2008). Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J. Antimicrob. Chemother*, 61: 417-420
12. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev*, 9: 148-165
13. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. (2000). PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect*, 6: 635-643
14. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 39: 1211-1233
15. Chang SC, Chen YC, Luh KT, Hsieh WC. (1995). *In vitro* activities of antimicrobial agents, alone and in combination, against *Acinetobacter baumannii* isolates from blood. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 23: 105-110
16. Choi CH, Hyun H, Lee JY, et al. (2008). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell. Microbiol*, 10: 309-319

17. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, et al. (1996). Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin. Infect. Dis*, 22: 1026-32
18. Cisneros JM, Rodriguez-Ban J. (2002). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microbiol. Infect*, 8: 687-693
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 7th ed. CLSI document M7-A7, Wayne, PA, USA, p. 1-17
20. Corbella X, Montero A, Pujol M, et al. (2000). Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin Microbiol*, 11: 4086-4095
21. D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. (2000). An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The important of cross-transmission. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol*, 21: 588-591
22. D'Arezzo S, Principe L, Capone A, et al. (2011). Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J. Antimicrob. Chemother*, 66: 54-61
23. De La Puente-Redondo VA, Del Blanco NG, Gutierrez Martin CB, Garcia Pena FJ, Rodriguez, EF. (2000). Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains, *J. Clin. Microbiol*, 38: 1016-1022
24. Dessel HV, Kamp-Hopmans TEM, Fluit AC, Brisse S. (2002). Outbreak of a susceptible strain of *Acinetobacter* species 13 (sensu Tjernberg and Urising) in an adult neurosurgical intensive care unit. *J. Hosp. Infect*, 51: 89-95

25. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Tocalli L, Gismondo MR. (2005). *In vitro* selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. *J. Antimicrob. Chemother*, 56: 353-359
26. Dizbay M, Altunçekiç A, Sezer BE, Özdemir K, Arman D. (2008). Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia, *Int. J. Antimicrob. Agent*, 32: 29-32
27. Durmaz, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, s. 141-146
28. Durmaz, R. (2001). Restriksiyon fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri, İçinde: Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, s. 149
29. Durmaz, R. (2007). Mikozların epidemiyolojik analizinde moleküler yöntemlerin yeri ve MLST yöntemine özet bir bakış. *İnfeks. Derg*, 21: 173-179
30. Durmaz R. (2007). Dirençli bakteri suşları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi. *ANKEM Derg*, 21: 178-183
31. Durmaz, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, s. 219-228
32. Durmaz, R. (2008). DNA amplifikasyonuna dayalı tiplendirme yöntemleri: AP-PZR, RAPD, ERIC-PZR, BOX-PZR, MLVA(VNTR), XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, İstanbul, s. 52-55
33. Erbay A, Bodur H, Akıncı E, Çolpan A. (2003). Yoğun bakım birimlerinde antibiyotik kullanımının değerlendirilmesi. *KLİMİK Derg*, 16: 63-67
34. Erlich HA. Eds: Meyers RA. (1990). "PCR Technology. Molecular Biology and Biotechnology." Vch Publishers, USA, p. 641-648

35. Ersöz G, Akdağ A, Otağ F, Kaya A. (2007). Hastane infeksiyonu etkenlerinin tigesiklin duyarlılıkları. KLİMİK 2007 XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları 14-18 Mart 2007, Antalya kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneği, 2007, s. 274
36. Eser Köseoğlu Ö, Ergina, Haşcelik G. (2009). Erişkin hastalardan izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç ve metallo-beta-laktamaz varlığı. *Mikrobiyol. Bul*, 43: 383-390
37. Falagas ME, Bliziotis IA, Kasiakou SK, Samonis G, Athanassopoulou P, Michalopoulos A. (2005). Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) gram-negative bacteria. *BMC Infect. Dis*, 5: 24
38. Falagas ME, Kasiakou SK. (2005). Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis*, 40: 1333-1341
39. Falagas ME, Kasiakou SK. (2006). Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*, 10: 1186-3995
40. Falagas ME, Kopterides P. (2006). Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J. Hosp. Infect*, 64: 7-15
41. Falagas ME, Bliziotis IA. (2007). Pandrug-resistant gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era?. *Int. J. Antimicrob. Agent*, 29: 630-636
42. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. (1994). Quorum sensing in bacteria the luxR-luxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol*, 176: 269-275
43. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM (1988). CDC definitions for nosocomial infections, *Am. J. Infect. Control*, 16: 128-40

44. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, et al. (2005). *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Int. Care Med*, 31: 649-655
45. Gazi H, Tünger Ö, Vural F, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S. (2007). Çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına in vitro etkileri. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg*, 37: 11-14
46. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. (2008). Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli (on behalf of reaction on antibiotic resistance). *Antimicrob. Agents. Chemother*, 52: 813-821
47. Goel V K, Kapil A. (2001). Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiol*, 1: 16
48. González RH, Dijkshoorn L, Van den Barselaar M, Nudel C. (2009). Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources. *Rev. Argent. Microbiol*, 41: 73-78
49. Gordon NC, Wareham DW. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agent*, 35: 219-226
50. Günseren F, Mamıkoğlu L, Öztürk S, et al. (1999). A surveillance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother*, 43: 373-378
51. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M. (1997). Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol*, 12: 3071-3077

52. Hooper DC. (2001). Emerging Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis*, 7: 337-341
53. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, et al. (2009). Rapid determination of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 47: 1436-1442
54. Innis MA, Gelfald DH. (1990). PCR protocols: A guide to methods and application, Academic Pres San Diego, USA, p. 315-322
55. Işık Y, Dizbay M, Tozlu DK, Yalınay Çırak M. (2010). *Acinetobacter baumannii* salgın analizlerindeki klonal ilişkinin değerlendirilmesinde “Arbitrarily Primed PCR”ın rolü. Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi Bildirileri, P01-08
56. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. (1994). Description of leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp. and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J. Clin. Microbiol*, 32: 2353-2358
57. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol*, 9: 112-119
58. Jose J, Jimmy B, Saravu K. (2007). Tigecycline a novel expanded spectrum antibiotic for the treatment of serous infections. *J. Clin. Diagn. Res*, 1: 181-184
59. Jung R, Husain M, Choi MK, Fish DN. (2004). Synergistic activities of moxifloxacin combined with piperacillin-tazobactam or cefepime against *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 48: 1055-1057

60. Kallel H, Hergafi L, Bahloul M. (2007). Safety and efficacy of colistin compared with imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. *Int. Care Med*, 33: 1162-1167
61. Kurtoğlu MG, Opuş A, Kaya M, Keşli R, Güzelant A, Yüksekaya Ş. (2011). Bir eğitim ve araştırma hastanesinde klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibakteriyel direnç (2008-2010). *ANKEM Derg*, 25: 35-41
62. Kuşcu F, Öztürk DB, Tütüncü EE, Uslu M, Gürbüz Y, Gülen G, Şencan İ. (2009). Çoğul antibiyotik dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında tigesiklin duyarlılık oranlarının E-Test yöntemiyle araştırılması. *KLİMİK Derg*, 22: 48-51
63. Levin RE. (2003). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis to *Listeria monocytogenes*: Review of Methodology and Results. *Food. Biotechnol*, 17: 217-236
64. Li J, Nation RL, Turnidge JD. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Lancet. Infect. Dis*, 6: 589-601
65. Lim TP, Tan TY, Lee W, Sasikala S, Tan TT, Hsu LY, Kwa AL. (2011). *In vitro* activity polymyxin B, rifampisin, tigecycline alone and in combination against carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore. *Plos. One*, 6: 184-185
66. Livermore D M. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 557-584
67. Looveren VM, Goossens H, the ARPAC Steering Group. (2004). Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin. Microbiol. Infect*, 10: 684-704
68. Mahgoub S, Ahmed J, Glatt AE. (2002). Underlying characteristic of patients harboring highly resistant *Acinetobacter baumannii*. *Am. J. Infect. Control*, 30: 386-390

69. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 45: 3375-3380
70. Marti MS. (2008). Molecular bases of antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. clinical isolates. Universitat De Barcelona, Facultad de Medicina, Departamento de Anatomia Patologica, Farmacologia y Microbiologia, Proyecto de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Biologia, Espana, Barcelona
71. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. (1993). Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis*, 17: 153-164
72. Munoz –Price LS, Weinstein RA. (2008). *Acinetobacter* infection. *N. Engl. J. Med*, 358: 1271-1281
73. Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. (2007). High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother*, 59: 772-774
74. Nerad JL, Snyderman DR. (1992). Miscellaneous gram-negative bacilli: *Acinetobacter*, *Cardiobacterium*, *Actinobacillus*, *Chromobacterium*, *Capnocytophaga* and the others. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. *Infectious Diseases*. Philadelphia, WB Saunders Company, p. 1543-1555
75. Nørskov-Lauritsen N, Marchandin H, Dowzicky MJ. (2009). Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolates collected as part of the TEST study in Europe (2004-2007). *Int. J. Antimicrob. Agent*, 34: 121-130
76. Nuchprayoon, S, Junpee, A, Poovorawan Y. (2007). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. *Filaria J*, 6: 1475-2883

77. Olive M, Bean P. (1999). Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol*, 37: 1661-1669
78. Özdemir M, Erayman İ, Gündem NS, Baykan M, Baysal B. (2009). Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. *ANKEM Derg*, 23: 127-132
79. Pacheco ABF, Guth BEC, Almedia DF, Ferreira LSC. (1996). Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Res. Microbiol*, 147: 175-182
80. Pachon Ibanez ME, Jimenez Mejias ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachon J. (2004). Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 48: 4479-4481
81. Pachon-Ibanez ME, Docobo-Perez F, Lopez-Rojas R, et al. (2010). Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 3: 1165-1172
82. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. (2008). *Acinetobacter baumannii* emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev*, 21: 538-582
83. Peters G, Locci R, Pulverer G. (1981). Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl. Bacteriol. Mikrobiol. Hyg*, 173: 293-299
84. Peterson PJ, Jacobus NV, Weiss WJ, Sum PE, Testa RT. (1999). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of novel glycylicline, the 9-tbutylglycylamido derivate of minocycline (GAR-936). *Antimicrob. Agents. Chemother*, 43: 738-744

85. Perez F, Hujer AM, Hujer MK, Decker KB, Rather NP, Bonomo AR. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 51: 3471-3484
86. Philippon A, Arlet G, Jacoby G A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 46: 1-11
87. Pillai SK, Mollering RC, Eliopoulos GM. (2005). Antimicrobial combinations. In: Lorian V (ed), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th ed. Williams and Wilkins, New York, p. 365-440
88. Poirel L, Nordmann P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect*, 12: 826-836
89. Poole K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 44: 2233-2241
90. Prashanth K, Badrinath S. (2005). Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. *Indian J. Med. Res*, 122: 408-418
91. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. (2009). In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*, 8: 18
92. Ralph D, McClelland M. (1998). Arbitrary primed PCR methods for studying bacterial disease. Woodford N, Johnson P, Eds. *Methods in Molecular Medicine*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, p. 60-75
93. Ranjbar R, Sadeghifard N, Ahmadi A, Izadi M, et al. (2007). Antimicrobial susceptibility and AP-PCR typing of *Acinetobacter* spp. strains. *Iranian J. Publ. Health*, 36: 50-56

94. Ramos JR, Teles MPC, Diniz-Filho JAF, Soares TN. (2008). Optimizing reproducibility evaluation for random amplified polymorphic DNA markers. *Gen. Mol. Res*, 7: 1384-1391
95. Roberts SA, Findlay R, Lang SDR. (2001). Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect*, 48: 228-232
96. Sarıgüzel FM, Sümerkan B, Metan G. (2010). Karbapenem sefaperazon/sulbaktam kombinasyonlarının *Acinetobacter baumannii* suşları üzerine *in vitro* aktivitesi. *Erciyes Tıp Derg*, 32: 015-018
97. Saugar JM, Alarcon T, Lopez-Hernandez S, Lopez-Brea M, Andreu D, Rivas L. (2002). Activities of polymyxin B and cecropin A–melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 46: 875-878
98. Saugar JM, Rodriguez-Hernandez MJ, De La Torre BG. (2006). Activity of cecropin A–melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 50: 1251-1256
99. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. (2007). *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH. (Eds.). *Manuel of Clinical Microbiology* 9 th ed. Washington ASM Pres, p. 770
100. Scheetz MH, Qi C, Warren JR, Postelnick MJ, Zembower T, Obias A, Noskin GA. (2007). *In vitro* activities of various antimicrobials alone and in combination

with tigecycline against carbapenem-intermediate or resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 51: 1621-1626

101. Siau H, Yuen KY, Ho PL, Wong SSY, Woo PCY. (1999). *Acinetobacter* bacteremia in Hong Kong: prospective study and review. *Clin. Infect. Dis*, 28: 26-30

102. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol. Rev*, 19: 512-530

103. Tan TY, Lim TP, Ling Lee WH, Sasikala S, Hsu LY, Lay-Hoon Kwa A. (2011). *In vitro* antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and E-test methods. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 1: 436-438

104. Thomson J M, Bonomo R A. (2005). The threat of antibiotic resistance in gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in Peril. *Curr. Opin. Microbiol*, 8: 518-524

105. Tobes R, Pareja E. (2006). Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for insertion sequence elements. *BMC Genomics*, 7: 62

106. Towner K. (2006). The Genus *Acinetobacter*. *Prokaryotes*, 6: 746-758

107. Turner MJ, Greenhalgh JM, MYSTIC study group (Europe). (2003). The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European countries (1997-2000). *Clin. Microbiol. Infect*, 9: 563-567

108. Türk Dağı H, Arslan U, Tuncer İ. (2011). Kan kültürlerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg*, 25: 22-26

109. Weaver R E. (1994). Letter to the Editor Identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol*, 32: 1833

110. Welsh J, McClelland M. (1993). Characterization of pathogenic microorganisms by genomic fingerprinting used arbitrarily primed PCR. In: Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. ASM, Washington, DC, 595-602
111. Wilson LA, Sharp PM. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol. Bio. Evol*, 23: 1156-1168
112. Wise KA, Tosolini FA. (1990). Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. *J. Hosp. Infect*, 16: 319-329
113. Van Den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, et al. (2006). Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999–2001. *Clin. Microbiol. Infect*, 12: 837-843
114. Vila J, Marcos A, Marco F, et al. (1993). *In vitro* antimicrobial production of B-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 37: 138-141
115. Vila J, MA Marcos, MT Jimenez De Anta. (1996). A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J. Med Microbiol*, 44: 482-489
116. Yavuz MT, Şahin İ, Behçet M, Öztürk E, Kaya D. (2006). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 20: 107-110
117. Zer Y, Özgür Akın FE, Namıduru M. (2007). *Acinetobacter baumannii* suşlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması. *İnfeks. Derg*, 21: 193-196

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Ordu'da doğan Ayça BÜYÜK, İlk ve orta öğrenimini 1999 yılında Hamdullah Suphi Tanrıöver İlköğretim Okulu'nda bitirmiştir. Lise eğitimini Ordu, Seçkin Kolej Lisesi'sinde 2002 yılında tamamlamıştır. Aynı yıl girdiği Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında mezun olmuştur. 2009 yılında, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.