

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otomatize ve yarı otomatize sistemler bakteri tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemler, çabuk sonuç vermesi, daha az iş yükü gerektirmesi, nispeten ekonomik olması ve çoğunun laboratuvar ve hastane bilgi sistem ağıyla uyumlu olması nedeniyle özellikle çok sayıda klinik örnekle çalışan laboratuvarlar için tercih edilmektedir (1).

Ancak özellikle nonfermentatif bakterilerde elde edilen antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının her zaman referans yöntemlerle elde edilen sonuçlarla örtüşmediği, karbapenem grubu dahil olmak üzere beta- laktam antibiyotiklerin duyarlılık test sonuçlarının güvenilir olmadığını bildirilmektedir (2). Nonfermentatif bakterilerden *Acinetobacter* türleri başta yoğun bakım üniteleri olmak üzere hastanede yatan hastalardan kolonizan/enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla izole edilmektedirler. *Acinetobacter* türlerinde birçok direnç mekanizması tanımlanmış olup, bu bakteriler yeni direnç determinantları kazanmakta da şaşılacak bir kapasiteye sahiptir. Son zamanlarda çoğul dirençli *A. baumannii* suşlarında ciddi artış gözlenmekle birlikte, karbapenemler halen en etkili ajanlar arasında yer almaktadır. *Acinetobacter* enfeksiyonlarının, yüksek mortalite ve morbidite, tedavi güçlükleri ve nozokomiyal yayılım göstermesi nedeniyle bakterinin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık durumlarının hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (3).

Bu çalışmada klinik örneklerden soyutlanan *A.baumannii* izolatlarında imipenem ve meropenem duyarlılığını belirlemede MicroScan/WalkAway (Dade Behring, ABD) otomatize sisteminin, referans kabul edilen yöntemlerle karşılaştırılarak güvenilirliğinin araştırılması ve son yıllarda tüm dünyada ve ülkemizde sorun yaratan ve hızla yayılan metallo beta laktamaz üreten dirençli suşların hastanemizdeki sıklığının tesbiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Çoklu dirençli basillerin etken olduğu hastaneden kazanılmış enfeksiyonların kontrolü son otuz yılda ciddi bir problem haline gelmiştir. 1970'lerde *Enterobacteriaceae* üyelerinin oluşturduğu hastane ilişkili enfeksiyonların insidansındaki artış, hastaneleri daha yeni geniş spektrumlu antibiyotiklerle tanıştırmış ve *P.aeruginosa*, *S.maltophilia* ve *Acinetobacter* türlerini içeren zorunlu aerop gram negatif basillerin önemini arttırmıştır. Bu patojenler arasında *Acinetobacter* türleri hastanede yatan hastalarda hem kolonizasyon hem de enfeksiyon etkeni olarak önemli rol oynamaktadır. Bakteremi, üriner sistem enfeksiyonları ve sekonder menenjit gibi çeşitli hastane ilişkili enfeksiyonlarla bağlantılı olmasına rağmen esas olarak hastane ilişkili pnömonilerde, özellikle de yoğun bakım hastalarında ventilatör ilişkili pnömonilerde etkindirler. Bu tür enfeksiyonların tedavisi bu bakterinin antibiyotiklerin çoğuna dirençli olması nedeniyle klinisyen için oldukça zordur. *Acinetobacter* türlerinin etken olduğu hastane ilişkili enfeksiyonlarında genellikle kombine antibiyotik tedavisi gerekmektedir. Bakterinin hastane gereçlerinde uzun süre canlı kalabilme kapasitesi, rezervuar insanlar ve cansız materyaller aracılığıyla hastalar arasında yayılması ve çoğalması tedavinin zorluğunda etkilidir(4). Günümüzde *A.baumannii* tüm dünyada önemli bir nozokomiyal patojen olarak kabul edilmektedir. *Acinetobacter* türleri Avrupa ve Amerika'da yoğun bakım ünitelerinde tüm gram negatif enfeksiyonların %2-10'undan sorumludur. Ancak mikroorganizmanın halk sağlığı açısından önemine rağmen virulansı, antimikrobiyal direnci, rezervuarı ve epidemiyolojisi hakkında açıklanamayan noktalar vardır(5).

2.1.Taksonomi Ve Klinik Olarak Önemli Türler

Yapısal ve biyokimyasal özellikleri ile tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları oldukça karmaşık süreçlerden geçmiştir. *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Micrococcus calcoaceticus* gibi isimler aldıktan sonra sonunda 1954 yılında *Acinetobacter* cinsi olarak tanımlanmıştır(4).

Acinetobacter genusu bugün *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır. DNA-DNA hibridizasyon temeline dayanan çalışmalarla *Acinetobacter* genusu içinde 32 genotip tanımlanmıştır. Ancak bunların 17 tanesi isimlendirilmiştir. Fenotipik yöntemler kullanılarak *Acinetobacter*'lerin tür düzeyinde doğru identifikasyonu problemlidir. Özellikle *A.baumannii* ve genetik olarak çok benzer olan isimlendirilmemiş genotip 3 ve 13TU ayrımı zordur(6). Otomasyon sistemleri *A.baumannii* dışındaki türleri tanımlamakta yeterince etkin bulunmamışlardır. DNA-DNA hibridizasyonu, ribotipleme çalışmaları ve 16S ribozomal RNA restriksiyon analizi gibi moleküler metodlar günümüzde en duyarlı metodlardır ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak uygulanamamaktadır ayrıca maliyetleri de yüksektir(4). Fenotipik testlerle türlerin ayırt edilmesindeki problem nedeniyle *Acinetobacter* türlerinin sakkarolitik ve asakkarolitik olmak üzere iki gruba ayrılması benimsenmiştir. Glukozu okside eden nonhemolitik suşlar *A.baumannii*, glukoz negatif nonhemolitik olanlar *A.lwoffii* ve hemolitik olanlar *A.haemolyticus* olarak değerlendirilmelidir (7).

Güvenilir identifikasyon yöntemleriyle yapılan çalışmalar klinik izolatlardan en sık *A.baumannii*'nin saptandığını net olarak göstermiştir. Bu tür ve daha az oranda da genotipik olarak çok benzer olan genotip 3 ve 13TU en sık enfeksiyon etkeni ve hastane salgınlarından sorumlu tutulan *Acinetobacter* türleridir (6). Bunu *A.lwoffii*, *A.haemolyticus*, *A.jhonsoni* ve genotip 6 izlemektedir. *A.jhonsoni*, *A.lwoffii* ve *A.radiorsistens* (nonsakkarolitik *Acinetobacter* türleri) insanda ciltte normal flora üyesi olup orofarinks ve vajinada da kommensal olarak bulunabilmektedir. *A.lwoffii* menenjitte diğer türlerden daha sık neden olur. *A.ursingii* hastanede yatan hastalarda bakteremi etkenidir. *A.junnii* nadiren göz enfeksiyonları ve bakteremiye neden olmakta ve özellikle de pediatri hastalarında nozokomiyal salgınlar oluşturmaktadır. HIV pozitif bir hastada toplumdan kazanılmış bir *A.radiorsistens* bakteremisi de bildirilmiştir. *A.schindleri* vajinal, servikal, boğaz, burun, göz, konjunktiva ve idrar gibi çeşitli insan örneklerinden izole edilmekte ancak klinikte önemsiz olarak kabul edilmektedir (8).

2.2.İdentifikasyon

Acinetobacter cinsi bakteriler , gram negatif nonfermentatif, zorunlu aerop, oksidaz negatif ve hareketsiz bakterilerdir. Üreme fazında çomak, stabil dönemde diplokok morfolojisinde , 1-1.5 ile 1.5-2 µm boyutlarında ve sıklıkla çiftli dizilime sahiptirler. Bazen dekolorize olmaları zor olduğu için pozitif kan kültür şişelerinden hazırlanan direkt yaymalarda gram pozitif kok sanılabileceğinden dikkatli olunmalıdır (7).

Koloniler kanlı agarda konveks,gri-beyaz,2-3 mm çapında ve değişken hemolizlidirler. Özellikle *A.haemolyticus* olmak üzere bazı klinik izolatlar koyun kanlı agarda hemoliz yapabilir. Oksidaz negatif,katalaz pozitifdir. Benzer koloni özellikleri Mac Conkey agardaki laktozu fermente etmeyen *Enterobacteriaceae* üyelerinde de görülebilir. Ancak *Acinetobacter* TSI veya KIA'nın dibinde üremez ve nitratı redükte etmez. Pek çok gram negatif basille benzer şekilde ancak *Moraxella* benzeri diğer mikroorganizmaların aksine genellikle penisiline in-vitro dirençlidir (9).

Çoğu suş, MacConkey agarda üreyebilir, renksiz veya hafif pembe renkte koloniler oluşturur. Glukozu okside eden bazı *Acinetobacter* türleri tirozin eklenmiş beyin- kalp infüzyon agar veya glukoz eklenmiş kanlı agarda kahverengi renk değişimine neden olabilir. Bu fenomen aynı zamanda MacConkey agar ve Mueller-Hinton agardaki *A.baumannii* izolatlarında da gözlenmektedir. Kontamine örneklerden *Acinetobacter* türlerinin izolasyonu için ayırt edici ve seçici besiyerleri kullanılabilir (7) .

Acinetobacter'ler, nutrient agar ve triptik soy agar gibi sık kullanılan besiyerlerinde üreyebilmekle birlikte amonyum veya nitrat tuzları ve bir veya daha fazla karbon kaynağı içeren mineral bazlı ayırtedici besiyerleri spesifik tanımlama için kullanılmaktadır (4). Klinik örneklerden direkt izolasyon için diğer mikroorganizmaların üremesini inhibe eden seçici besiyerlerinin kullanılması yararlıdır. Safra tuzları,şeker ve bromkrezol moru içeren ticari ismi Herella agar (Difco) olan seçici ve ayırt edici besiyeri kullanılabilir. Bu besiyeri çeşitli antibiyotikler kullanılarak modifiye edilmiştir. Seçici ve ayırt edici özellikleri kombine eden antibiyotik de içeren yakın zamanda tanımlanmış yeni bir seçici besiyeri olan Leeds *Acinetobacter* Medium adlı

besiyeri hem klinik hem de çevresel örneklerden *Acinetobacter* suşlarının izole edilmesinde son derece kullanışlıdır. Çevresel tarama için özellikle *Acinetobacter*'lerin az sayıda bulunabileceği alanlarda sıvıda zenginleştirme yöntemi de kullanılabilir. Pek çok mikroorganizmayla kontamine örnekler bir karbon ve enerji kaynağı, amonyum veya nitrat tuzu gibi bir nitrojen kaynağı içeren sıvı içinde inoküle edilir. İnkübasyon sırasında sürekli kuvvetli çalkalamanın *Acinetobacter* suşlarının *Pseudomonas* suşlarından daha çabuk üremesi için gereklidir. 24- 48 Saatlik inkübasyonun ardından bir öze dolusu selektif besiyerine pasaj yapılır ve olası *Acinetobacter* kolonilerinin ileri identifikasyonu yapılır. Bu metod fekal örnekler ile çeşitli klinik ve çevresel örneklerden *Acinetobacter* izole edilmesinde kullanılmaktadır. En sık genotip 2 (*A.baumannii*), 3 ve 13TU klinik izolatları 37⁰ C ve daha yüksek ısılarda ürer, diğer bazı genotipler ise sadece daha düşük ısılarda üreyebilirler. Genel olarak önerilen üreme ısısı 30⁰C olmakla beraber örneğin özelliğine göre daha düşük ısı kombinasyonlarının kullanılması daha akılcıdır. Biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyon sağlayan ticari kitler ve otomatize/yarı otomatize sistemler de tür düzeyinde tanımlama için yaygın olarak kullanılmaktadır (4).

2.3.Epidemiyoloji

Acinetobacter türleri doğada yaygın olarak bulunurlar. Sıklıkla hayvan ve insanlar konak konumundadır(10). Hastalardaki cilt kolonizasyonu sonrasında hastane çalışanlarının elleriyle mikroorganizma yayılabilmektedir. Cilt, boğaz, solunum sistemi veya gastrointestinal sistemde yüksek oranda kolonizasyonun çeşitli salgınlara değişen derecelerde katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (11). Sağlıklı bireylerde %25- 40, hastanede yatanlarda %75 oranında cilt taşıyıcılığı bildirilmiştir (12).

Acinetobacter türleri hem nemli hem kuru yüzeylerde uzun süre canlılığını koruyabilir. Hastane ortamında formika, cam, pamuk, kuru filtre kağıdı ve yatak kenarlarında günlerce canlı kalabildiği gösterilmiştir(13). Pedyatrik yoğun bakım ünitesinde yaşanan bir salgın sırasında muhtemelen çalışanların elleriyle kontamine olmuş çeşitli ekipman ve yüzeylerde (telefon kulpları, kapı kolları, hasta kartları vb) buldukları saptanmıştır. Salgın

kökenlerinin araştırılmasıyla çeşitli yüzeylerde yerleşebilme ve canlılığını sürdürebilme eğilimleri olduğu belirlenmiştir. Özellikle *A.baumannii* salgınlar oluşturma eğilimindedir. Enfeksiyon görülmeye başlandığında kolonize hastaların sayısı son derece yüksektir ve önleyici tedbirler için geç kalınmıştır. Salgın geliştiğinde çevredeki tüm cansız yüzeyler *A.baumannii* için taşıyıcı olabilmektedir (14). Salgını tanımlamak ve kaynağı ortaya çıkarmak için çok çeşitli tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Serotipleme, faj, bakteriyosin, protein profilleri, multilokus enzim elektroforez tipleme, PCR, plazmid profili, PFGE, ribotipleme bu yöntemler arasındadır. Ancak en ideal metodun ne olduğu konusu netlik kazanmamıştır (4).

Acinetobacter türleri hastane personelinin %19'unun deri kalıcı florasında yer almaktadırlar. Bu durum sağlık çalışanlarının ellerinin sürekli potansiyel bir kaynak olabileceğini düşündürmektedir. Hava yoluyla hastadan hastaya bulaş yoğun çevre kontaminasyonu olduğunda önemli olabilir. *Acinetobacter* türleriyle gelişen enfeksiyonların diğer bir epidemiyolojik özelliği de sıklıkla yazın gelişmeleri ve tropikal ülkelerde daha sık rastlanmalarıdır (16).

2.4.Virulans

Acinetobacter türleri göreceli olarak düşük derecede bir patojenite göstermektedirler. Bilinen en önemli virulans faktörleri arasında fagositozdan koruyucu polisakkarit kapsül, insan epitelyum hücrelerine adherensi sağlayan fimbria, dokulardaki yağları eritici enzimler ve hücre duvarında bulunan ve Lipid A varlığı sayılabilir. İn vivo endotoksin üretimi *Acinetobacter* sepsisinin semptomlarından sorumludur. Bakterinin insan vücudunda üreyebilmesi için gerekli olan demiri sağlayabilme özelliği de önemli virulans etmenlerindedir. Bazı *Acinetobacter* cinsi bakterilerin dış membran reseptör proteinleri gibi siderofor ürettikleri gösterilmiştir. Bakterinin glikokaliks aracılığıyla yabancı cisimlere yapışabilmesi virulansda önemli olabilir. Polimikrobiyal enfeksiyonlarda bakteri daha virulan davranmaktadır.

Quorum sensing gram negatif bakteriler arasında yaygın bir regülasyon mekanizmasıdır. *Acinetobacter* klinik izolatlarında, durağan

üreme fazında maksimal aktivite gösteren 4 farklı quorum sensing sinyal molekülü bulunmuştur (15) .

Antibiyotik direnci sağlayan PER-1 geninin virulansı arttırdığı ve klinik olarak daha ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (13).

2.5.Antibiyotik Direnci

2.5.1.Antibiyotik Direncinin Genetik Temelleri

Gram negatif nonfermentatif çomakçıklar ampisilin, çoğu sefalosporinler ve makrolidler gibi yaygın kullanılan antibiyotiklere diğer gram negatif bakterilerle kıyaslandığında dış membranının bu antibiyotiklere göreceli olarak geçirgen olmayışı nedeniyle intrensek olarak dirençlidir. Örneğin gram negatif nonfermentatif bakterilerin *E.coli* ile karşılaştırıldığında dış membran geçirgenliğinin 10-100 kat daha düşük olduğu gösterilmiştir. Effluks sistemleri de bu grubun intrensek direnç sergilemesine katkıda bulunmaktadır (17,18).

Acinetobacter genusu muhtemelen antibiyotiğe maruz kalmış toprakta uzun dönem evrimleşmesine bağlı olarak antibiyotik direnci geliştirmede çok yüksek bir hıza sahiptir (4). Genetik değişikliklere çok iyi uyum sağlayabilme özelliğindedir ve "doğal dönüştürülen" olarak adlandırılan bir bakteriler arasındadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışma hem duyarlı hem dirençli *A.baumannii* izolatlarında bol miktarda direnç geni bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Fournier ve ark çoğul dirençli suşlarda 45 direnç geni içeren 86 kb'lık AbaR1 olarak adlandırılan bir direnç adası tanımlamışlardır. Tanımlanan anahtar direnç genleri VEB-1, Amp C ve OXA 10 beta laktamazları, çeşitli aminoglikozid modifiye edici enzimleri ve tetrasiklin effluks pompa proteinlerini kodlamaktadır. AbaR1'in detaylı genetik analizi aynı zamanda hareketli genetik elemanlar ve daha önce *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp ve *E.coli*'de tanımlanmış olan diğer direnç genlerinden oluştuğunu göstermiştir. Duyarlı *A.baumannii* suşlarında benzer lokalizasyonda tekrarlayan 20 kb'lık direnç genlerinden yoksun genomik ada bulunur (3). Dirençli *Acinetobacter* türlerinin ortaya çıkmasında ana faktör plazmidler, transpozonlar ve integronlar aracılığıyla antibiyotik direncinin

kazanılması ve taşınmasıdır. Çeşitli çalışmalar *Acinetobacter* türlerinin %80'inden fazlasının değişik molekül ağırlıklarına sahip çok sayıda plazmid taşıdığını göstermektedir (6).

25 yılı aşkın süre önce *Acinetobacter* türlerinin antimikrobiyal direnç faktörlerini plazmidlerin konjugasyonu sayesinde kazanabildiği gösterilmiştir (20). Günümüzde transpozonların (kromozoma integre olan veya plazmid üzerinde taşınan hareketli genetik elemanlar) *Acinetobacter* türleri içinde direncin genetik determinantlarının yayılımında önemli olduğu bilinmektedir (21). Bu transpozonların pek çoğu sınıf 1 ağırlıklı olmak üzere integronlar içermektedir. İntegronlar kendi başlarına hareket edemediği halde, (bir plazmid veya transpozon üzerinde taşınmaya ihtiyaç duyarlar) int geni ve gen kasetleri içeren diğer integronlara veya bakteri genomu içinde sekonder bölgelere mobilize olabilen genetik elemanlardır. Gen ekspresyonunu arttıran IS elementlerinin tanımlanması da direncin regülasyonunun açıklanmasında önemli rol oynamıştır. *Enterobacteriaceae* veya *Pseudomonas aeruginosa*'da olmayan fakat *A.baumannii*'de tanımlanmış IS_{ABA1} elementinin varlığı Amp C ve OXA-51, OXA-69 gibi beta laktamazların aşırı salınımı ve sırasıyla seftazidim ve karbapenemlere duyarlılık seviyesinin düşmesiyle sonuçlanır (22).

2.5.2.Beta laktam direnci

A.baumannii'nin beta-laktamlara direncinin belli başlı mekanizmaları; beta laktamaz üretimi, penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik, porin proteinlerinin yapı ve sayısında değişiklik ve effluks pompalarıdır

A) Beta Laktamazlar

Beta-laktamazların sınıflandırılması ve isimlendirilmesi her zaman karmaşık ve problemli olmuştur. Olduça fazla çeşitlilik gösteren bu enzimlerin sınıflandırılması için birkaç şema önerilmiştir. Başlangıçta penisilinazlar ve sefalosporinazlar olarak ayrılmış, daha sonra genetik determinantın bulunduğu yere göre plazmid aracılı veya kromozomal olarak sınıflandırılmışlardır. 1989 yılında Bush tarafından önerilen grupta beta-laktamazlar, substrat ve inhibitör özellikleri moleküler yapı ile

ilişkilendirilerek sınıflandırılmıştır. Bu fonksiyonel sınıflandırmaya karşın beta-laktamazlar aminoasit dizilim benzerliklerine göre moleküler olarak A, B, C ve D olmak üzere dört gruba ayrılmıştır (Ambler sınıflaması) (16).

Ambler sınıf A enzimleri (Bush grup 2) beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı penisilinazlardır. Ambler sınıf B enzimleri (Bush grup 3) aktif bölgesinde çinko bulunan metallo beta laktamazlar (MBL)'dir. MBL'lar bakterinin penisilin, sefalosporin ve karbapenem direncinden sorumludur. MBL'a sahip bakteriler klinisyenlerin karşılaştıkları en dirençli fenotiplerdir.

Ambler sınıf C enzimleri (Bush grup 1) *C.freundii*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *M.morganii*, *P.aeruginosa* ve *S.marcescens*'de bulunan kromozomal Amp C tipi beta-laktamazları içermektedir. Amp C tipi beta laktamazlara sahip bir bakteri penisilinler, beta-laktamaz inhibitörlü beta laktamlar, sefoksitin, sefotetan, seftazidim, seftriakson ve sefotaksime dirençlidir. Sınıf C beta-laktamazlara karşı en etkili ajanlar aztreonam ve sefepimdir. Klinik olarak önemli sınıf C enzimi üreten gram negatif basiller arasında beta-laktamaz üretimi normalde düşük düzeydedir. Sefoksitin ve klavulonik asit kombinasyonları gibi beta-laktamlar *Enterobacter* spp ve *Morganella* spp'ye karşı kullanıldığında beta-laktamaz üretimini artırır. İmipenem de indükleyici olmakla beraber artmış Amp C varlığında stabilitesini sürdürmektedir (hidrolize dirençlidir). Ambler sınıf D enzimleri (Bush grup 2f) oksasilini hidrolize edebilen serin beta-laktamazlardır. Bu yüzden oksasilinaz veya OXA beta-laktamaz adını almışlardır. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa*'daki OXA enzimleri yapısal olarak en fazla çeşitliliği gösteren ve hızla artan beta-laktamaz grubudur. Bu beta-laktamazlar penisilinlere, sefalosporinlere, geniş spektrumlu sefalosporinlere (OXA-tip ESBL'ler) veya karbapenemlere (OXA-tip karbapenemazlar) direnç oluşturabilir (23).

Tablo 2.5.2.a. Beta-laktamazların sınıflandırma şeması (23)**Ambler sınıflaması**

| | | |
|---------|--------------------------|---|
| Sınıf A | Penisilinazlar GSBL | TEM'ler,SHV'ler,PC1, CTX-M'ler,SME-1,KPC-1 |
| Sınıf B | Metallo-beta-laktamazlar | IMP-1,VIM-1,CcrA |
| Sınıf C | Sefalosporinazlar | Amp-C'ler,CMY-2,ACT-1 |
| Sınıf D | Oksasilinazlar | OXA-1 |

Bush Sınıflaması

| | | |
|--------|---|-------------------------------|
| Grup 1 | Sefalosporinazlar Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eder,klavulonik asit dirençli | Amp C'ler,CMY-2,ACT-1,,MIR-1 |
| Grup-2 | Tamamı klavulonik aside duyarlı | |
| 2a | Penisilinaz | S.aureus'daki PCI |
| 2b | Geniş spektrumlu penisilinaz | TEM-1,SHV-1,TEM-2 |
| 2be | GSBL'ler | SHV-2,TEM-10,CTX-M'ler |
| 2br | İnhibitörlere dirençli | TEM'ler,IRT'ler,TEM-30,TEM-31 |
| 2c | Karbenisilini hidrolize eden | PSE-1 |
| 2d | Oksasilini hidrolize eden | OXA-10,OXA-1 |
| 2e | Klavulonatla inhibe olan sefalosporinazlar | FEC-1 |
| 2f | Karbapenemazlar | KPC-1,SME-1 |
| Grup 3 | Metallo-beta-laktamazlar İmipenemi hidrolize eder,EDTA ile inhibe olur,klavulonata dirençli | IMP-1,VIM-1,CcrA |
| Grup 4 | Diğer (Klavulonik asitle inhibe olmayan penisilinazlar) | |

1.Sınıf A beta-laktamazlar:

TEM-1 beta laktamazının *Acinetobacter*'lerde görüldüğü bilinmesine rağmen sınıf A genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar çok yeni bulunmuştur (24). *A.baumannii* suşlarında penisilin ve geniş spektrumlu sefalosporinlere yüksek düzeyde direnç gösteren PER-1 tipi GSBL bulunmaktadır. Ancak PER-1 beta-laktamazlar karbapenem direncine neden olmamaktadır. PER-1 Türkiye ve Kore'deki *A.baumannii* suşlarında çok yaygındır(25,26). Fransa, Belçika ve Bolivya'dan da bildirim vardır. Yakın zamanda yapılan bir moleküler ve epidemiyolojik analizle ABD'de ilk kez PER-1 tanımlanmıştır (27). Vahaboğlu ve ark. yaptıkları çok merkezli bir çalışmada *A.baumannii*

kökenlerinde %46 oranında PER-1 enzimi varlığını ve poliklonal bir yayılım bulunduğunu göstermişlerdir. PER-1 enzimi bulunan *A.baumannii* enfeksiyonlarının prognozunun daha kötü olduğu da belirlenen önemli bir noktadır (13).

A.baumannii yine bir GSBL olan ve integronla taşınan ve Fransa ve Belçika hastanelerinde salgına neden olan VEB-1'e sahiptir. Çin'de SHV-12 GSBL üreten, Hollanda'da SHV-12 ve TEM-116 üreten *A.baumannii* suşları bildirilmiştir. Endimiani ve ark. da İtalya'da *A.baumannii* izolatlarında TEM-92 GSBL bulmuştur. CTX-M -2 sefotaksim ve seftriaksonun artmış hidroliziyle karakterize bir GSBL'dir ve Bolivya'da izole edilen *A.baumannii* suşlarında olduğu gibi Japonya'da da beyin cerrahi kliniğinde epidemik suşlar bulunmuştur. *A.baumannii*'de GSBL'lerin klinik olarak saptanması halen standardize değildir ve kromozomal sefalosporinazların neden olduğu karışıklık yüzünden sınıf A GSBL'lerin *A.baumannii*'deki yaygınlığı kesin olarak bilinmemektedir (22).

2.Sınıf B Beta-Laktamazlar

Metallo-beta-laktamazlar (MBL), monobaktamlar (aztreonam) hariç tüm beta-laktamlara karşı hidrolitik aktivite gösteren çinko bağımlı beta-laktamazlardır. Serin beta-laktamazlardan farklı bir yolla, beta laktam halkasındaki amid bağını kırarak etki göstermektedirler (28). MBL'lar genel yapı ve aktif bölgelerinin özellikleri bakımından birbirlerine çok benzemekle beraber beta laktamlara bağlanma ve hidroliz edebilme yetenekleri değişkenlik göstermektedir. Örneğin VIM-1 ve VIM-2 yapısal olarak neredeyse aynıdır. Ancak VIM-2 imipeneme VIM1'e göre altı kat daha yüksek afinite gösterirken, VIM-1 piperasilin, azlosilin, tikarsilin, sefaloridin, sefalotin, sefuroksim, sefotaksim, seftazidim, sefpirom ve meropenemi daha güçlü hidrolize etmektedir. Enzimler arasındaki bu farkın aktif bölgelerindeki aminoasit farklılığından kaynaklandığı belirtilmektedir (29). Bu enzimlerin hidrolizi klavulonat, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmamakta ancak EDTA gibi metal şelatörleriyle inhibe olmaktadır. *S.maltophilia*, *Chryseobacterium* spp ve *Flavobacterium* türleri gibi bazı nonfermentatifler karbapenemlere doğal olarak dirençlidirler. Bu

intrensek direncin bir kısmı endojen MBL salınımına bağlıdır. Ek olarak IMP ve VIM enzimleri gibi kazanılmış MBL'lar ilk olarak *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerini içeren nonfermentatif patojenlerde ortaya çıkmıştır ve dünya çapında giderek yayılmaktadır (30).

MBL'lar Ambler'in 1980'de yaptığı sınıflandırmada serin beta-laktamazlar sınıfında yer almıştır. 1989'da fonksiyonel özellikleri göz önüne alınarak Bush tarafından sınıf 3'de sınıflandırılmıştır. Tablo 1995 ve 1997'de güncellenmiştir. Tüm MBL'lar imipenemi hidrolize edebilir ancak hidroliz güçleri farklıdır. Bakterinin direnç düzeyi hidroliz oranını etkileyebilir (31). Bush sınıflamasında sınıf 3'de yer alan MBL'lar imipenem ve beta-laktam hidrolizleri temel alınarak alt gruplara ayrılmıştır. Grup 3a'da geniş spektrumlu enzimler, grup 3b'de özellikle karbapenemleri substrat olarak tercih edenler, grup 3c'de ise diğer beta-laktamlara göre karbapenemleri daha zayıf hidrolize eden enzimler bulunmaktadır. Bütün bu enzimlerin ortak özelliği EDTA ile inhibe olmalarıdır (32). Substrat profillerinin yanı sıra sekans benzerlikleri ve diğer yapısal özelliklerine göre de alt gruplara ayrılmışlardır. Sınıf B1'de yeralan enzimler aktif bölgelerinde üç histidin ve bir sistin içermektedir. IMP, VIM, GIM ve SPM gibi transfer edilebilen enzimler bu grupta yer almaktadır. Sınıf B2'de bulunan enzimler aktif bölgelerinde birinci pozisyonda histidin yerine asparajin içerir. *Aeromonas* türlerinde ve *Serratia fonticola*'da bulunan SFH1 enzimi bu grupta yer alır. Sınıf B3'de bulunan Li enzimi ise bu grubun tek üyesidir ve monomer olan diğerlerinden farklı olarak tetramer yapıdadır (33).

Kromozomal Olarak Kodlanan MBL'lar

Bu enzimlerin en önemli özelliği indüklenebilir olmalarıdır. Bu enzimleri sentezleyen bakteriler fırsatçı patojenlerdir ve *S.maltophilia* ve *B.anthraxis* dışında ciddi enfeksiyonlara yol açmazlar. Kromozomal kökenli MBL'ların bir diğer özelliği de genellikle serin beta laktamazlarla beraber bulunmalarıdır. Örneğin *S.maltophilia* hem L1 metallo beta laktamazı hem de kromozomal sınıf A enzimi olan L2'yi birlikte sentezler (33).

Tablo 2.5.2.b.Kromozomal kökenli MBL sentezleyen bakteriler ve enzimleri

| | |
|---|-----------------|
| <i>B.cereus</i> | BCII |
| <i>B.anthraxis</i> | <i>Bla-2</i> |
| <i>S.maltophilia</i> | L1 |
| <i>Aeromonas hydrophilia</i> | CphA |
| <i>Chryseobacterium indologenes</i> | IND-1 |
| <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> | BlaB veyaGOB -1 |
| <i>Legionella gormanni</i> | FEZ-1 |
| <i>Myroides spp</i> | TUS-1,MUS-1 |
| <i>Flavobacterium johnsoniae</i> | JOHN-1 |
| <i>Serratia fonticola</i> | SFH-1 |

Transfer Edilebilen MBL'lar

Bu enzimler IMP, VIM, SPM-1 ve GIM-1 ve SIM olmak üzere beş grupta toplanmaktadır.

IMP

IMP benzeri MBL'lar ilk olarak 1988 yılında Japonya'da bir *P.aeruginosa* izolatında tesbit edilmiştir. Dirençten sorumlu genin konjugatif bir plazmidde taşındığı belirlenmiştir (34). 1991 yılından itibaren Japonya'nın farklı bölgelerinden MBL saptandığına dair bildirimler olmuştur. Tüm enzimlerin aynı aminoasit dizisine sahip olduğu belirlenmiş ve diğer beta laktamlar yanında özellikle imipenemi hidrolize edebilme yeteneklerinden dolayı IMP-1 adı verilmiştir (35). Sonraki çalışmalarda 13 ayrı ülkede 18 farklı IMP tipi MBL saptanmıştır (31). Güneydoğu Asya ile Avrupa ülkelerinden izole edilen IMP tipi enzimlerin farklılık göstermesi, lokal yayılım gösterdiği fikrini desteklemekte iken 2002'de İngiltere'de *Acinetobacter junonii* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarında IMP-1 enziminin saptanması MBL sorununun küresel olduğunu göstermiştir (36,37).

A.baumannii suşlarında metallobetalaktamaz üretiminin artışı, beta laktamlara dünya çapında ürkütücü boyutta direnç ortaya çıkarmıştır (38). *A.baumannii* IMP tipi MBL'ları genellikle Uzak Doğu'da ilk saptananlar gibi sınıf 1 integronun bir parçası olarak bulunurlar. MBL'lar baskın karbapenemazlar olmamakla beraber *A.baumannii*'de IMP-1, IMP-2, IMP-4,

IMP-5, IMP-6 ve IMP-11 gibi çeşitleri tanımlanmıştır. Çeşitli tiplerde IMP beta-laktamazları Japonya'dan bildirilmektedir (39). IMP tipi MBL'lara bağlı karbapenem direnci Kore ve Pasifik kıyı bölgesinde de ciddi bir problemdir.

VIM

VIM-1 enzimi ilk kez 1997'de İtalya'nın Verona kentinde bir *P.aeruginosa* suşunda tanımlanmıştır. IMP tipi enzimlerden oldukça farklı bir yapısı vardır, aminoasit dizilimi en fazla *B.cereus* 'un BCII enzimine benzer. *bla_{IMP}* genleri gibi *bla_{VIM}* genleri de integronlar içindeki gen kasetlerinde taşınır ve genellikle aminoglikozid direnç genlerini taşıyan gen kasetleriyle aynı integron içinde bulunurlar (40).

İtalya'da hastane ilişkili enfeksiyon etkeni olan, birbiriyle klonal ilişkili üç *P.putida* izolatının saptanması, MBL'ların çevresel kaynaklı olabileceğini ya da *P.putida*'nın MBL'lar için vektör olabileceğini düşündürmüştür (41). Bugüne değin aralarında Türkiye'nin de bulunduğu yirmi ülkeden onbir farklı VIM tipi MBL bildirilmiştir. Türkiye'den bildirilen olgularda, bir *K.pneumoniae* ve bir *P.aeruginosa* suşunda VIM-5 tipi MBL saptanmıştır (31). VIM-2 ilk kez 1996 yılında Fransa'da bir *P.aeruginosa* suşunda saptanan VIM tipi bir MBL'dır. Aminoasitlerin dizilimi açısından VIM-1 ile %90 benzerlik göstermektedir (42). *Acinetobacter baumannii*'ye ait VIM-2 enzimi sadece Kore'den bildirilmiştir (43).

SPM -1

İlk olarak 1997 yılında Brezilya'nın Sao Paulo kentinde bir *P.aeruginosa* suşunda tanımlanmıştır. Sekans analizinde en yüksek homolojiyi %35,5 oranıyla IMP-1 ile göstermiştir. SPM-1'in IMP ve VIM tipi MBL'lardan farkı transpozonlar veya integronlar içinde yer almayışıdır. Bu enzimin sefalosporinlere afinitesi penisilinlerden daha fazladır (44).

GIM-1

İlk olarak 2002 yılında Almanya'da farklı hastalara ait beş *P.aeruginosa* izolatında saptanan GIM-1 (German imipenemase) MBL'ların B1 alt sınıfında yer almaktadır. Hidrolitik profili IMP-1'e benzer ancak daha

zayıf etkilidir. Sınıf 1 integron üzerinde iki aminoglikozid direnç geni ve OXA-2 enzimini sentezleyen gen kasetiyle birlikte bulunmaktadır (45).

SIM-1

Kore'deki *A.baumannii* izolatlarının MBL çeşitliliği ilgi çekicidir, yakın tarihte yeni bir MBL olan Seul imipenemaz (SIM-1) tanımlanmıştır. SIM-1, B1 alt sınıfında yer alan, IMP-12 ile %69, IMP-9 ile %64 benzerliğe sahip geniş spektrumlu bir metallo beta laktamazdır (46).

MBL'ların Saptanması

MBL'ların klinik mikrobiyoloji laboratuvarında tanımlanması için fenotipik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak henüz standardize edilmiş ve CLSI tarafından önerilen bir fenotipik test yoktur. Kullanılan fenotipik yöntemlerin esasını MBL'ların EDTA ile inhibe olma özellikleri oluşturur. Genellikle substrat olarak seftazidim ve imipenem kullanılır.

Öncelikle MBL varlığı araştırılacak suşların imipenem MİK değerleri belirlenmelidir. *P.aeruginosa* için $\geq 16\mu\text{g/ml}$, *Acinetobacter* spp için $\geq 8\mu\text{g/ml}$ ve *Enterobacteriaceae* için $\geq 2\mu\text{g/ml}$ MİK değerleri saptanan suşlarda MBL üretiminin araştırılması önerilmektedir. Ancak bazı *Enterobacteriaceae* üyeleri ve *Acinetobacter* türlerinin imipeneme duyarlı olduğu halde MBL geni taşıyabildiği akılda tutulmalıdır.

Fenotipik yöntemlerden, kolay uygulanabilir olmalarından dolayı E-test MBL şeritleri kullanılabilir. Ancak kullanılmakta olan E-test şeritleri düşük düzeydeki dirence bağlı olarak yanlış negatif sonuç verebilmektedir.

Çift disk sinerji veya kombine disk metodu kullanılabilir. Bu yöntemin duyarlılığını arttırmak için imipenem, meropenem, seftazidim gibi farklı substratlar ve EDTA, 2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA), sodyummerkaptopropiyonik asit (SMA), 2-merkaptolanol gibi birden fazla inhibitör kullanılabilir.

Bir diğer fenotipik test imipeneme duyarlı *E.coli* suşunun MBL üreten bir bakteriyle birlikte bulunduğu inhibisyon zonunun daralmasıyla karakterize Modifiye Hodge testidir (31). Hodge testi aslında penisilinaz üreten *N.gonorrhoeae* 'yi tesbit etmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu test

penisiline duyarlı *S.aureus* ATCC 25923 yerine *E .coli* ATCC 25922 standart suşu ve 10U penisilin diski yerine 10 µg imipenem diski kullanılarak MBL varlığının tesbit edilmesi için modifiye edilmiş ve bu adı almıştır (47). MBL üretimini araştırmak için basit bir test olmakla beraber bazı bakteriler için yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir.

Fenotipik testler içinde altın standart sayılabilecek test ise saflaştırılan enzimin imipenem veya meropenemi hidrolize edebildiğinin ve bu aktivitenin EDTA varlığında inhibe olduğunun spektrofotometrik olarak gösterilmesidir. Fenotipik testlerle pozitif bulunan sonuçların referans laboratuvarlarda moleküler tekniklerle doğrulaması yapılabilir. Genotipik yöntemler fenotipik testlere göre daha duyarlıdır. Her enzime özgül primerler kullanılarak bir izolatta bulunan MBL tipi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) belirlenebilir. Genotipik testlerden DNA hibridizasyon yöntemleri daha duyarlıdır. Altın standart kabul edilen genotipik yöntem ise klonlama ve sekans analizidir (31).

Deneyisel MBL İnhibitörleri

MBL'ların aktif bölgeleri küçük varyasyonlarla birbirinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle tek bir inhibitör ajanın tüm enzimlere etkili olması zordur. Bir başka problem de MBL'ların aktif bölge yapılarının memelilerde hücre fonksiyonlarında gerekli olan bazı enzimlere benzemesidir. Bugüne değin MBL inhibitörü olarak bazı bileşikler geliştirilmiş ve çeşitli MBL'lar üzerinde denenmiştir. Bu bileşikler arasında tiyoester türevleri, sülfonil hidrazon, süksinik asit türevleri, penisilinat, sülfon, bifenil tetrazol, sefotetan, merkaptokarboksilat ve 1-β-metil karbapenem sayılabilir. Her bir bileşik farklı bir enzim üzerinde denenmiş olduğundan aktivitelerini karşılaştırmak zordur. *P.aeruginosa*'da bulunan IMP-1 enzimine karşı 1-β-metil karbapenem, penisilinat sülfon ve bazı tiyoester türevleri etkili bulunmuş, diğer bileşiklerin ise çalışılan hiçbir MBL'a etkili olmadığı saptanmıştır (48).

3.Sınıf C Beta-Laktamazlar

Acinetobacter türleri diğer gram negatif bakteriler gibi kromozomal olarak kodlanan sınıf C beta-laktamazlara sahiptirler. Güncel filogenetik

analizler *Acinetobacter* spp'deki kromozomal Amp C genlerinin büyük ihtimalle yaygın beta-laktamazlarla aynı gen soyundan geldiğini ve diğer bakteri türlerinde bulunan *ampC* genleriyle çok yakın akraba olduğunu göstermektedir. *bla* genlerinin kodladığı sınıf C sefalosporinazlar penisilinleri, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eder ancak sefepim veya karbapenemleri hidrolize edemez. Bu yüzden çoğu *A.baumannii* klinik izolatu seftazidime dirençlidir. Yakın tarihte *A.baumannii*'nin kromozomal beta-laktamaz üretimini arttıran IS elementi bulunmuştur (49).

4.Sınıf D Beta-Laktamazlar

A.baumannii'de ilk tanımlanan OXA karbapenemaz OXA 23'dür ve karbapenemlerin tanıtımından önce 1985'de İskoçya'da bir klinik izolatta bulunmuştur. Ardından başlangıçta ARI-1 (*Acinetobacter* resistant to imipenem) adı verilen bu enzim İngiltere, Brezilya, Polinezya, Singapur, Kore ve Çin'de saptanmıştır (50,51). OXA-58 plazmidle taşınan bir karbapenemazdır ve Fransa, İngiltere, Arjantin, İspanya, Türkiye, Romanya, Avusturya, Yunanistan, İskoçya ve Kuveyt'ten bildirilmiştir (52,53,54). Bu enzimlerin özellikle doğal olarak varolan ve IS_{ABA-1} ve IS_{ABA-2} içeren plazmidleri birlikte bulunduran türleri başta olmak üzere *A.baumannii*'deki karbapenem direncine önemli katkıda bulunduğu vurgulanmaktadır(53).

Tablo 2.5.2.c. *Acinetobacter baumannii*'deki OXA karbapenemazlar (3).

| Karbapenemaz tipi | OXA karbapenemaz |
|-------------------|--|
| Kazanılmış | |
| Kromozomal | OXA-24,OXA-25,OXA-26,OXA-40,OXA-58* |
| Plazmid | OXA-23,OXA-58* |
| Yapısal | |
| OXA-51/69 benzeri | Oxa-64,OXA-65,OXA-66,OXA-68,OXA-70 OXA-71,OXA-78,OXA-79,OXA-80,OXA-82 |

*OXA 58 *A.baumannii*'de hem kromozomal hem plazmid aracılı olarak tanımlanmış bir karbapenemazdır.

A.baumannii'nin sahip olduğu OXA-40 ve OXA-58 ile ABD'de salgınlar görülmüştür. *A.baumannii*'deki OXA 51/69 benzeri beta-laktamazlar dört kıtadan bildirilen ve değişen düzeylerde IS_{ABA-1} içeren özel "doğal olarak varolan" kromozomal enzimlerdir (55).

B) Dış Membran Proteinleri(DMP) Ve Penisilin Bağlayıcı Proteinlerin (PBP) Değişimi

Porinler veya dış membran proteinlerinin kaybı veya modifikasyonu yoluyla periplazmik alana transportun azaltılması penisilin bağlayan proteinlere bağlanmayı azaltmaktadır. Beta-laktamların periplazmik alana geçişinin azalmasıyla birlikte beta-laktamazların zayıf enzimatik aktivitesi artar. *A.baumannii* izolatlarıyla oluşan salgınların çoğunda imipenem direncinin porin kaybı nedeniyle olduğu saptanmıştır (49).

Porin veya dış membran proteinlerinin *A.baumannii*'deki antibiyotik direncine olan katkısı anlaşıldığından beri bu konuya odaklanan çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak dış membran proteinlerinin kaybının nasıl olduğunu göstermek zordur. Laboratuvar çalışmaları DMP'lerinde çok çeşitli değişiklikler olduğunu göstermiştir, benzer tablo PBP'lerde de görülmektedir. New York'daki epidemik çoğul dirençli *A.baumannii* suşlarının araştırılması karbapenem dirençli izolatların 37, 44 ve 47 kDa ağırlığındaki DMP'lerinin azalan ekspresyonu ve sınıf C sefalosporinazların üretiminin artışıyla ortaya çıktığını göstermiştir. Benzer şekilde Madrid'deki izolatlarda 22 ve 33 kDa ağırlığındaki DMP'lerinin kaybının OXA-24 üretimiyle beraber karbapenem direncine yol açtığı gösterilmiştir.

Yakın zamanda *A.baumannii*'de, *P.aeruginosa*'daki imipenem direncinden yüksek oranda sorumlu olan Opr D'nin homoloğu olan 43 kDa ağırlığında bir protein tanımlanmıştır. 29 kDa DMP *A.baumannii*'de imipenem ve meropenem direncine neden olmaktadır.

İspanyada izole edilen *A.baumannii* suşlarında karbapenem direnci PBP-2 ekspresyonundaki azalmayla açıklanmıştır. Bu suşlarda DMP'lerinin kaybı ve beta-laktamaz üretiminin de mevcut olması farklı direnç mekanizmalarının birlikte bulunabileceğini göstermektedir (3).

C)Effluks Pompaları

Bakterilerde esansiyel besinler ve iyonların içeri alımını metabolik son ürünlerin ve zararlı maddelerin atılımını, hücre ile dış ortam arasında iletişimi sağlayan pompa sistemleri aynı zamanda antibiyotiklerin hücre dışına pompalanmasında da kullanılmaktadır (16). Bakterilerde pompa sistemleri

beş önemli aileden oluşmaktadır: Major Facilitator (MF), Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE), Resistance-Nodulation-Cell Division (RND), Small Multidrug Resistance (SMR) ve ATP Binding Casette (ABC). Tüm bu sistemler enerji kaynağı olarak protonları [Proton Motive Force (PMF)] kullanırken ABC ailesi ATP kullanmaktadır. Antibiyotikleri ve diğer maddeleri taşıyan pompa sistemleri antibiyotik çağının streslerine yanıt olarak ortaya çıkmamıştır. Farklı pompa sistemlerini inceleyen bazı genom çalışmaları bu yapıların kalıtsal olduğunu ortaya koymaktadır. Bakteriyel genlerin %5-10'unun taşıyıcı sistem genleri, bunların büyük bir kısmının da pompa proteinlerini kodlayıcı genler olduğu belirtilmektedir (56,57).

Effluks pompaları bakterilerin bazı antibiyotiklere doğal direncinden sorumlu olmakla birlikte pompa proteinerinde oluşan nokta mutasyonlar sonucunda birçok farklı sınıftan antibiyotiğe karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. *A.baumannii*'de RND ailesinin üyesi olan AdeABC effluks pompası bulunur ve aminoglikozidler, sefotaksim, tetrasiklinler, eritromisin, kloramfenikol, trimetoprim ve florokinolonları dışarı pompalar(58). AdeABC effluks pompasının aşırı ifadesi karbapenem hidrolize edici oksasilinazlarla birlikte karbapenemlere yüksek düzeyde dirençten sorumludur. Bu pompanın ifadesini kontrol eden mekanizma iki basamaklı regülör (adeR) ve sensor (ade S) sistemiyle açıklanmaktadır. *adeR* veya *adeS* genlerindeki tek nokta mutasyonu pompa ifadesini dolayısıyla arttırmaktadır.

Yakın tarihte *A.baumannii*'de MATE ailesinin üyesi olan bir başka çoklu ilaç atım pompası AbeM tanımlanmıştır. Bu pompa sisteminin antibiyotik substrat profili florokinolonlar ve diğer toksik bileşiklerle sınırlı gibi görünmektedir. (3)

2.5.3.Aminoglikozid Direnci

A.baumannii'de aminoglikozidlere dirençte en önemli mekanizma bu antibiyotiklerin amino ya da hidroksil gruplarının enzimatik olarak değiştirilmesidir. Değişikliğe uğrayan aminoglikozid molekülü ribozomlara iyi bağlanamaz ve bakteri aminoglikozid varlığında üremeye devam eder. Aminoglikozid molekülünü değiştiren enzimler (AME) aminoglikozid fosfotransferazlar (APH), aminoglikozid asetiltransferazlar (AAC) ve

aminoglikozid nükleotidiltransferazlardır (ANT) (59). *A.baumannii*'de her üçü de tanımlanmıştır. AME'lerin yapısını incelemek için yapılan genetik analizler bu enzimlerin pek çoğunun integronlar tarafından kodlandığını göstermiştir. (49). Nemec ve ark'nın yaptığı bir çalışmada 13 ülkeden aminoglikozid dirençli izolatlar AME'leri kodlayan genler açısından analiz edilmiştir. PCR haritasında bu izolatlar *aphA1*, *aphA6*, *aacC1*, *aacC2*, *aacA4*, *aadA1* ve *aadB* genlerini sergilemiştir (60).

Amerika bazlı bir çalışmadaki izolatlarda *aphA1*, *aadA1*, *aadB*, *aacC1* ve *aacC2* tesbit edilmiştir (27). Seward ve ark benzer AME'leri birbiriyle ilgisiz *Acinetobacter* spp izolatlarında bulmuş ve bu sık rastlanan genlerin dünyanın belirli bölgeleriyle sınırlı olmadığını göstermişlerdir. Yine dünyanın farklı yerlerinde genotipik olarak farklı izolatlarda benzer integronlar bulunmuştur (61,62). Bu bulgu İspanya, İngiltere ve diğer Avrupa ülkelerinde de doğrulanmıştır. Antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında önemli olan klas 1 integronun aynı değişken bölgesi genotipik olarak ilişkisiz izolatlarda saptanmıştır (3).

Yakın tarihte *aac(6')*-lad tarafından kodlanan ve esas olarak *A.baumannii*'deki amikasin direncinde rol oynayan yeni bir AME Japonya'da keşfedilmiştir (63). Bugün *S.marcescens*, *E.faecalis*, *S.aureus* ve *P.aeruginosa*'da olduğu gibi *A.baumannii*'de de birden fazla aminoglikozid sınıfını modifiye edebilen multifonksiyonel AME'ler tanımlanmıştır (3).

Acinetobacter spp'de aminoglikozid direncinin diğer mekanizmaları hedef ribozomal proteinin değiştirilmesi ve antibiyotiğin bakteri içine girişinin azaltılmasıdır. Magnet ve ark. üriner sistem enfeksiyonlu bir hastadan elde edilen çoklu dirençli *Acinetobacter* izolatında aminoglikozid direnciyle ilişkili RND tipi bir effluks pompası tanımlamışlardır (58).

2.5.4.Kinolon Direnci

Florokinolonlar bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan tipII topoizomerazlar; DNA giraz ve topoizomeraz IV'ün aktivitesini inhibe ederek DNA sentezini durdurmaktadır. DNA giraz iki *gyrA* ve iki *gyrB* alt biriminden oluşmaktadır. Topoizomeraz IV de DNA giraz'dakine homolog olan iki alt birimden (*parC* ve *parE*) oluşmaktadır (64). Bugüne değin florokinolonlara

direncin iki mekanizmayla oluştuğu gösterilmiştir. Bunlar hedef enzim değişiklikleri ve ilacın hücreye girişinin azaltılmasıdır.

A.baumannii'deki hedef enzim değişiklikleriyle olan kinolon direnci *gyrA* ve *parC* genlerinin kinolon direncini belirleyen bölgelerindeki mutasyonlarla olmaktadır. Bu değişiklikler kinolonun enzim-DNA kompleksine bağlanma afinitesinde azalmayla sonuçlanır (3). Plazmid aracılı kinolon direnç geni olan *qnrA* *Enterobacter* ve *Klebsiella* türleri gibi diğer gram negatif bakterilerde bulunduğu halde henüz *A.baumannii*'de saptanmamıştır (65). Bu genin ürünü olan qnr proteini DNA'yı kinolon bağlanmasından korur. Bu korumanın mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (66).

İlacın bakteri hücresine girişinin azalması ise; bakterinin geçirgenliğinde azalma veya atım pompalarının aşırı ifadesine bağlı olabilir. Genellikle hücreye girişin azalması yoluyla oluşan direnç mutasyonlarla DMP'lerinin azalması sonucu olmaktadır (16). Diğer direnç mekanizması da effluks sistemleri aracılığıyla ilacın bakteri hücresi içinde yığılmasının engellenmesidir. Bazı kinolonların (klinafloksasin, gatifloksasin, levofloksasin, gemifloksasin ve moksifloksasin) *A.baumannii*'de siprofloksasine göre hafifçe artmış bir aktivite göstermesinin nedeni anlaşılamamıştır (67).

2.5.5.Tetrasiklin Direnci

Tetrasiklin ribozomun 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eder. *A.baumannii* 'de tetrasiklin direncinde iki mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan ilki transpozon aracılı Tet A ve Tet B effluks pompalarıdır. TetA sadece tetrasiklini, Tet B hem tetrasiklini hem de minosiklini dışarı pompalamaktadır (68). İkinci mekanizma ribozomu tetrasiklinin etkisinden koruyan ribozomal koruyucu proteindir. *Tet M* geninin kodladığı bu protein ribozomu tetrasiklin, doksisisiklin ve minosiklinin etkisinden korur. *A.baumannii*'de bulunan bu ribozom koruyucu protein *S.aureus*'daki Tet M proteiniyle %100 homologdur (69). Ne effluks ne de ribozom koruyucu protein tetrasiklinlere bağlı glisilsiklinlerin yeni bir üyesi olan tigesiklinin etkisine engel olamamaktadır. Tigesiklin plazmid aracılı

flavine bağımlı bir monooksijenaz olan TetX'in substratıdır. Fakat bu enzim henüz *A.baumannii* klinik izolatlarında bulunmamıştır (70). Yakın zamanda Ruzin ve ark. tigesiklin için AdeABC effluks pompasının bir direnç mekanizması olduğunu göstermişlerdir. *AdeABC* gen lokusunun aşırı ifadesi *A.calcoaceticus-A.baumannii* kompleks suşlarına karşı tigesiklin MİK değerlerinde üç kat artışla uyumlu bulunmuştur (71).

2.5.6.Polimiksin Direnci

Polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) 1947'de ilk izolasyonunu takiben çoğul dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde son seçenek olarak kullanımı gittikçe artmış peptid antibiyotiklerdir. Ne yazık ki *A.baumannii*'de kolistin direnciyle ilgili bildirimler ve bu konuda ciddi bir tedirginlik vardır. Urban ve ark. 2001'de polimiksin B dirençli bir *A.baumannii* suşu bildirmişlerdir (72). Son zamanlarda *A.baumannii* için tanımlanan heterorezistans (genetik olarak özdeş olan alt klonların orijinal ana klondan daha dirençli olan alt popülasyonları) ürkütücü boyutlara ulaşmıştır (73). Heterorezistansın etkisinin belirlenmesi için kolistin tedavisi altındaki hastalarla yapılacak prospektif çalışmalara gereksinim vardır. Pournaras ve ark. kolistine ek olarak karbapenemler için de benzer bulgulara ulaşmışlardır (74). Kolistin direncinin mekanizmasının *A.baumannii*'nin lipopolisakkaridinde asidifikasyon, asetilasyon veya antibiyotikle bağlanarak hücre membranına giren antijenlerin varlığı gibi değişiklikler olduğu düşünülmektedir. Polimiksinlerin kullanımının artışına bağlı olarak kolistin direncinin daha da yaygınlaşacağından korkulmaktadır (3).

2.5.7.Diğer Antibiyotiklere Direnç

A.baumannii hem kloramfenikol hem TMP/SXT'ye yüksek derecede direnç göstermekte, fakat bu direncin genetik temelleriyle ilgili çok az şey bilinmektedir. Klinik *Acinetobacter* izolatlarındaki CAT 1 geninin hem kromozomal hem plazmid DNA'sıyla bağlantılı olması bu genin transpozon üzerinde olabileceğini düşündürmektedir. Devaud ve arkadaşları kloramfenikol direncinin kloramfenikol asetil transferaz 1 (CAT1)'e bağlı olduğunu bulmuşlardır. Bir başka çalışmada ise CAT1 aktivitesi

saptanmamış, direncin antibiyotik geçirgenliğinde değişiklik veya hedef proteinde mutasyon sonucu olduğu düşünülmüştür. Diğer bakterilerde sulfonamidlere direnç normalde hedef protein olan dihidropteroat sentetaz'ın plazmidle kodlanan dirençli versiyonlarının yayılımıyla olmaktadır. Benzer şekilde yüksek düzeyde trimetoprim direnci genel olarak plazmid DNA'sıyla taşınan *dhfr* geniyle kodlanan dihidrofolat redüktazın trimetoprime düşük afinitesinden kaynaklanır. *Acinetobacter* türlerinde bu antibiyotiklere direnç mekanizmaları ile ilgili yayınlanmış spesifik çalışmalar yoktur (6).

2.6. *Acinetobacter* Türlerinin Hastane İlişkili Enfeksiyonları

Amerikan Ulusal Nozokomiyal Enfeksiyon Surveyans Sistemi (National Nosocomial Infections Surveillance ,NNIS) *Acinetobacter* türlerini en yaygın görülen hastane enfeksiyonu etkenleri arasında yedinci sırada bildirmiştir(75). Ülkemizde yapılan çok merkezli iki çalışmada YBÜ'lerinde yatan hastalarda ikinci ve dördüncü sıralarda saptanmıştır (76,77). *Acinetobacter* enfeksiyonları cerrahi veya invaziv alet kullanımıyla yakından ilişkilidir. Cerrahiye takiben endotrakeal tüp takılması, intravasküler, ventriküler veya üriner kateter uygulanması gibi girişimler *Acinetobacter* kolonizasyonu ve ardından da enfeksiyonla sonuçlanabilmektedir. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı da kolonizasyon için risk faktörüdür (78,79).

Acinetobacter türleri septisemi, pnömoni, endokardit, menenjit, cilt ve yara enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları gibi çeşitli oportunistik enfeksiyonlardan izole edilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde alt solunum yolları ve üriner sistem için özellikle önemli bir patojendir. Bunun bir nedeni de yoğun bakım ünitelerinde invaziv tanı ve tedavi yöntemlerinin çok yoğun uygulanmasıdır. *Acinetobacter* türlerine bağlı nozokomiyal enfeksiyonların gerçek sıklığını belirlemek zordur. Çünkü klinik örneklerde bakterinin varlığı her zaman enfeksiyon göstergesi değildir (4). *Acinetobacter* kaynaklı hastane enfeksiyonlarının sıklığı %30- 75 olarak bildirilmektedir. Prognoz enfeksiyonun tipiyle ilişkilidir ve genellikle diğer gram negatif ve gram pozitif bakterilerin neden olduğu tablolardan daha kötü seyretmektedir(75). Pnömoni, klinikte *Acinetobacter* cinsi bakterilerin en sık oluşturdukları klinik

tablodur. NNIS yoğun bakımda *Acinetobacter*'e bağlı pnömoni epizodlarının 1986'da %4 iken önemli bir artış göstererek 2003'de %7'ye ulaştığını göstermiştir. Klinik bulgularla diğer etkenlerden ayırt edilmesi mümkün değildir. Mekanik ventilasyon, gastrik tüp, ileri yaş, kronik akciğer hastalığı, immüno-supresyon, cerrahi girişim ve antibiyotik kullanımı en önemli risk faktörleridir. Bulaşta kontamine respiratör ekipmanı, diğer ekipmanlar ve hastane personeli önemli rol oynamaktadır. Tıpkı *P.aeruginosa* ile gelişen ventilatör ilişkili pnömoni olgularındaki gibi mortalite belirgin olarak yüksektir. Çoğu kez çoklu antibiyotik direnci nedeniyle tedavi daha uzun ve pahalıdır (13). Önemli bir sorun da *Acinetobacter* cinsi bakterilerin etken olarak tanımlanmasında yaşanmaktadır, çünkü bu bakteriler YBÜ'de yatan hastalarda hızla kolonize olabilir. Bir çalışmada YBÜ'de mekanik ventilasyonlu hastaların %45'i *Acinetobacter* ile kolonize olarak belirlenmiştir. Ventilatör ilişkili pnömoni tanısında bronkoskopik teknikler kullanıldığında tüm atakların %24'ünde etken olarak *Acinetobacter* cinsi bakteriler saptanmıştır (16).

Bakteremide *Acinetobacter* türleri tek başına veya polimikrobiyal baktereminin bir parçası olarak bulunabilir. En sık izole edilen tür *A.baumannii*'dir. Yetişkin hastaların büyük çoğunluğunu immüdüşkün hastalar oluşturur. Bu hastalarda bakteremi kaynağı sıklıkla solunum sistemidir ve genellikle hastaneye yatışın ikinci haftasında ortaya çıkmaktadır. En sık predispozan faktörler malign hastalıklar, travma ve yanıktır. İkinci önemli hasta grubu yenidoğanlardır. Septisemiye zemin hazırlayan nedenler düşük doğum ağırlığı, antibiyotik kullanım öyküsü, mekanik ventilasyon ve neonatal konvülziyonların varlığıdır. Risk faktörlerine sahip hastalarda yara yeri enfeksiyonları özellikle yanık hastalarında bakteremiye yol açabilmektedir. Çeşitli çalışmalar vasküler kateterizasyonla *Acinetobacter* enfeksiyonlarının korele olduğunu göstermiştir (4). Her 48 saatte kateter giriş yerinin değiştirilmesi ve temizlenmesi riski azaltabilir. Bakteremide mortalite oranı %17- 46 arasında bildirilmekte, polimikrobiyal olgularda mortalitenin arttığı vurgulanmakta ve *A.baumannii* dışındaki türlerde ise enfeksiyon daha hafif seyretmektedir. Genelde altta yatan

hastalık, prognozu belirlemektedir. Kanser ve yanık hastalarında prognoz daha kötü, travma hastalarında ise daha iyidir. Öncesinde antibiyotik kullanılmış olması dirençli suşların seçilmesine neden olmaktadır.

Acinetobacter türleriyle gelişen nozokomiyal menenjitler nöroşirürji kliniklerinde travma ya da operasyon sonrası gelişen olgular ve çoğu kez küçük salgınlar şeklinde saptanmaktadır. BOS bulguları pürülan menenjit özelliğindedir ve diğer bakteriyel etkenlerden ayırt ettirici değildir. Klinik bulgu olarak sıklıkla konvülsiyon ve mental durumda bozulma gözlenirken, ense sertliği nispeten daha geri planda saptanan bir bulgudur. Hastaların yaklaşık yarısında enfeksiyon polimikrobiyal olup mortalite oranları %20-25 olarak bildirilmektedir (13).

Acinetobacter cinsi bakteriler yanık dışı yaralardan izole edildiklerinde öncelikle kolonizasyon yönünden değerlendirilmelidir. Özellikle immün sistemi bozuk hastalarda ve cerrahi sonrası enfeksiyonlarda etken olarak belirlenmeleri olasıdır. *Acinetobacter* türleri ile nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonu nadirdir. En sık yaşlı debil hastalar, yoğun bakım ünitesinde yatanlar ve üriner kateteri olan olgularda görülmektedir. Birkaç nadir vakada *Acinetobacter* spp'ye bağlı normal kapak enfektif endokarditi bildirilmiştir. Dental girişimler ve açık kalp cerrahisi predispozan faktörlerdir (4).

2.7. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Acinetobacter izole edilen hastaların önemli bir kısmında mikroorganizma enfeksiyon etkeni olmayıp kolonizasyonu yansıtmakta, kolonizasyon olgularının da %40'ında antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Artan antibiyotik kullanımının *Acinetobacter* suşlarının ortaya çıkması ve yayılmasında etkili bir faktör olduğunu gösteren kanıtlar giderek artmaktadır(16). *Acinetobacter* suşlarında pek çok direnç mekanizması bir arada bulunmakta ve empirik antimikrobiyal tedavilerin yaklaşık %30'unun başarısız olmasına neden olmaktadır (80). Bugün hastanelerde izole edilen suşların büyük bir kısmı sefalosporinlere, aminoglikozidlere, bazen kinolonlara hatta karbapenemlere dirençlidir. Bu nedenle mevcut tedavi seçenekleri için mutlaka antibiyotik duyarlılık test sonuçları göz önüne alınmalıdır. *Acinetobacter* cinsi bakterilerin enfeksiyonlarının tedavisinde ilk

tercih olarak önerilen antibiyotikler karbapenemler (imipenem/meropenem) , bir kinolonla birlikte amikasin veya seftazidim kombinasyonlarıdır.

2.7.1.Karbapenemler

Karbapenemler en geniş spektruma sahip beta laktam grubu antibiyotikler olup tıbbi kullanıma girmesi 1970'li yılların ortalarında tienamisin bulunması ile başlar. Tienamisin bir toprak mikroorganizması olan *Streptomyces cattleya*'dan elde edilmiş üründür. Diğer beta-laktamları parçalayabilen birçok beta laktamaza dirençli oluşu ve geniş spektrumu ile o yıllarda ümit vaat eden bir antibiyotik olarak kabul edilmişken, konsantrasyonlarında aktivitesini çabuk yitirmesi hayal kırıklığı yaratmıştır. Tienamisin yarı sentetik bir derivativesi olan N-formimidoil tienamisin (imipenem)'in bu önemli dezavantajı ortadan kaldırdığı saptanmış ancak bu kez de bu bileşiğin insan böbrek dehidropeptidaz-1 (DHP-1) enzimi tarafından metabolize edildiği anlaşılmıştır. Bu enzim insan böbrek proksimal tüplerinin fırçamsı kenarlarında bulunmaktadır ve orijinal imipenem molekülünün idrarla atılımını engellemektedir. Böylece imipenem molekülleri proksimal tübüllerde toksik düzeyde birikerek nekroza yol açmaktadır. Bu problem de kısa sürede silastatin moleküllerinin tanımlanmasıyla aşılmıştır. Silastatin DHP-1 enzimini inhibe etmekte ve böylece imipenem molekülünün nefrotoksik özelliğini ortadan kaldırmaktadır. 1986 yılından itibaren bu ilaç ruhsatlandırılarak kullanıma girmiştir. İmipenem gram pozitif, gram negatif, aerob ve anaerobları içeren etkinliğiyle bilinen en geniş spektrumlu antibiyotiktir. İn vitro olarak klinik önemi olan bakterilerin çoğuna etkilidir (81).

Karbapenemler ortak bir karbapenem molekülü içeren yarı sentetik beta-laktam antibiyotiklerdir. Bir karbapenem molekülünün penisilin molekülünden iki önemli farklılığı vardır.

a.C₁ pozisyonunda bir karbon atomunun yerini bir kükürt atomu almış ve bu da bir tiazolidin halkasıyla birleşmiştir.

b.C₂ ve C₃ pozisyonları arasında doymamış hidroksil bağı bulunmaktadır.

Karbapenemlerin kimyasal yapılarıyla etkinlikleri arasında da sıkı bir ilişki vardır. Geniş bir beta laktamaz grubuna dirençli olan bu antibiyotiklere bu

özelliği veren 6-trans-hidroksimetil gruplarıdır. Yine meropeneme imipenemden farklı olarak DHP-1 enzimine direnç veren bölgesi de C1 atomuna bağlanmış olan metil grubudur. Yine C2 atomuna bağlanmış uzun zincir meropenemin konvülzan etkisini azaltan kısmıdır. Tüm karbapenemlerde bu bölgenin kimyasal yapısı gram negatif mikroorganizmalara etkinlikten sorumludur. Molekül ağırlığının düşük olması bakterinin hücre zarından girişini kolaylaştırır. Penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise *P.aeruginosa*'ya etkinliği sağlamaktadır (82).

Diğer beta laktam antibiyotikler gibi bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösterir. İmipenem gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yüksek molekül ağırlıklı penisilin bağlayan proteinlerine (PBP) yüksek afiniteyle bağlanır. Bağlanma ilk önce PBP 2'ye ardından PBP 1a'ya olur. PBP2'ye bağlanması gram negatif basillerin sferoblastlara dönüşmesine neden olur. Ek olarak PBP1'e bağlanması bakteri hücrelerinin daha hızlı lizisine yol açar (83). Gram negatif bakterilerde dış membrana penetrasyonu da daha fazladır. Düşük molekül ağırlığı ve nötral yük nedeniyle bakterinin hücre duvarına, penisilin ve sefalosporinlerden daha hızlı penetre olmaktadır (84)

İmipenemin plazma yarılanma ömrü yaklaşık bir saattir. Serum proteinlerine bağlanma oranı %10-20 arasındadır. Total dozun %48,6'sı idrarla değişmeden atılmaktadır (85).

Yan etki olarak en sık enjeksiyon yerinde ağrı, flebit ve tromboflebit'e (%1.7) neden olmaktadır. Gastrointestinal sistemle ilişkili olarak da bulantı (%1.4), kusma (%0.9), ağız mukozasında değişiklikler (0.3), ishal(%0.9) ve pseudomembranöz enterokolit (%0.1) görülmektedir. Ciddi yan etkiler nadirdir. Diğer beta laktamlara allerjisi olan hastalar imipeneme de allerjik olabilir. Ateş, kaşıntı, deri döküntüsü, solunum sıkıntısı gibi çeşitli reaksiyonlar görülebilir. Konfüzyon, huzursuzluk, konvülziyon, tremor gibi santral sinir sistemi toksisitesine bağlı belirtiler görülebilir. İnfüzyon hızına bağlı olarak bulantı, kusma, terleme ve halsizlik olabilir (84).

Meropenem, imipenemin aksine insan böbrek DHP-1 enzimine karşı çok yüksek stabilite gösteren bir karbapenemdir. PBP 2 hem imipenemin

hem de meropenemin başlıca hedefidir. Ancak meropenem *P.aeruginosa* ve *E.coli*'nin PBP 2 ve 3'üne daha büyük bir afinite göstermektedir. İmipenem gram pozitif mikroorganizmalara karşı daha etkili görünürken meropenem gram negatiflere özellikle de *P.aeruginosa*'ya daha etkilidir (86).

Meropenem genel olarak üçüncü kuşak sefalosporinlerden daha güçlü bir indükleyici olmasına karşın, *Enterobacter* ve *P.aeruginosa* izolatlarında grup 1 beta laktamazlar üzerindeki indükleyici etkisi imipeneme göre daha zayıftır (87). Meropenem *P.aeruginosa* 'daki PBP2 ve 3'e karşı yüksek afinitesi olmasına rağmen, imipenemin afinitesi sadece PBP2'ye karşıdır. Bu durumun özellikle meropenemin *P.aeruginosa* üzerinde daha güçlü bir gösterebilmesinde katkısının olabileceği belirtilmektedir (88).

A.baumannii 'de karbapenem direnci, dış membran proteinlerinin kaybı ve PBP'lerde değişiklik gibi çeşitli mekanizmalarla olur. Ek olarak *A.baumannii* izolatları sınıf B metallo beta laktamaz, sınıf A ve sınıf D beta laktamazları içeren karbapenemazları taşıyabilir. Diğer gram negatiflerde olduğu gibi aynı izolatta farklı mekanizmalar birlikte bulunabilmektedir.

2.7.2.Diğer Tedavi Seçenekleri

Ampisilin-sulbaktam, sulbaktam alternatif seçenekler arasında bildirilmekte ayrıca doksisisiklin ile birlikte amikasin kombinasyonunun hayvan deneylerinde başarılı bulunduğu belirtilmektedir (13).

Sulbaktam yapısal, kimyasal ve farmakokinetik özellikleriyle aminopenisilinlere benzeyen, *Acinetobacter* cinsi bakterilerde penisilin bağlayıcı protein 2'ye bağlanarak bu bakteriler üzerinde tıpkı beta-laktam antibiyotikler gibi etki eden sentetik bir beta-laktamaz inhibitörüdür. Diğer beta laktamaz inhibitörlerinden farkı pek çok sefalosporinin düşük etkinlik gösterdiği veya etkinlik gösteremediği *B.fragilis* ve *Acinetobacter* spp üzerine direkt antimikrobiyal aktivite göstermesidir. Çoğu çalışmada pek çok ülkede sulbaktamın ticari preparatlarının olmayışı nedeniyle ampisilin-sulbaktam kombinasyonu kullanılmıştır (6).

Etkinliğini 8 mg/l gibi düşük yoğunlukta gösterirken tazobaktam ancak çok yüksek yoğunluklarda benzer etkinlik gösterir. Klavulonik asidin ise böyle bir etkisi belirlenmemiştir. Jimenez-Mejias ve ark. birçok ilaca ve

karbapeneme dirençli *A.baumannii* ile gelişen sekiz menenjit olgusunun tedavisinde sulbaktam-ampisilin kullanmışlar, altı olguda başarılı olmuşlar ve mortalite hızını %25 ile imipenem tedavisine eşit bulmuşlardır. Wood ve ark, imipeneme dirençli *A.baumannii* ile gelişen ventilatör ilişkili pnömoni olgularında tedavide sulbaktam-ampisilin uygulamışlar ve bu tedaviyi etkili bulmuşlardır. Sulbaktam-ampisilin hastane ilişkili *Acinetobacter* bakteremilerinde imipenem kadar etkili olduğunu gösteren veriler bulunmaktadır. Çok sayıda çalışma özellikle yoğun bakım ünitesinde gelişen farklı klinik tablolarda imipenem dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarında sulbaktam-ampisilin tedavisinin başarısını göstermektedir. Sulbaktamla azitromisin, rifampin kombinasyonları denenmektedir. Sefoperazon-sulbaktam ile ilgili yeterince klinik veri bulunmamaktadır (13).

Ne yazık ki imipenem dirençli *A.baumannii* suşlarında sulbaktam direncinin ortaya çıkmasıyla beraber polimiksinler (kolistin, polimiksin B) tek tedavi seçeneği olarak kalmıştır. Kolistin hızlı bakterisidal etkiye sahiptir. Katyonik deterjanlar gibi bakteriyel hücre membranının bütünlüğünün bozulmasına, intrasellüler içeriğin dışarı sızmasına ve böylelikle hücre ölümüne yol açmaktadır. Kolistine direnç lipopolisakkaridlerin kolistine afinitesinin azalması yoluyla olmaktadır (6).

Nefrotoksisite, nörotoksisite, nöromusküler blokaj gibi toksik etkileri nedeniyle imipenem dirençli olgular dışında çok sık kullanılmamaktadır (13).

Tigesiklin yakın tarihte klinik kullanımı onaylanan, çoklu ilaç direncine sahip *A.baumannii* izolatlarının çoğuna in vitro olarak etkili, tetrasiklin türevi bir antimikrobiyaldir.

2.7.3. İn-Vitro Sinerjistik Etkili Kombinasyonlar

Karbenisilin- kanamisin / tobramisin / gentamisin, imipenem-amikasin, imipenem-kolistin, siprofloksasin-azlosilin, imipenem-siprofloksasin, imipenem-ampisilin sulbaktam ve kolistin-rifampindir (16). Ancak çoğul dirençli suşlarla oluşturulan fare pnömoni modelinde, yalnız imipenem-sulbaktam ve imipenem-rifampin kombinasyonu bakterisidal etki sağlamıştır (89).

Görüldüğü gibi direnç nedeniyle günümüzde *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisi giderek azalan alternatiflerle sağlanmaya çalışılmakta, klasik bilgilerin de dışına çıkılabilen kombinasyonların etkinliği araştırılmaktadır. Bu nedenle direncin önlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (16).

2.8.Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan en önemli işlerden biri, klinik olarak önemli bakteriyel izolatlara antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasıdır. Duyarlılık testlerinin amacı çok sayıda antimikrobiyal ajan arasından hastanın enfeksiyonunu iyileşmeyle sonlandırma olasılığı en yüksek antibiyotiği seçmektir (90). Günümüzde karbapenemler de dahil olmak üzere pek çok antibakteriyel ajana dirençli *Acinetobacter* suşlarının bulunması antibiyotik duyarlılık testi yapılmaksızın ilaç seçimini imkansız hale getirmiştir.

2.8.1.Sıvı Makrodilüsyon ve Mikrodilüsyon Testleri

Makrobroth veya tüp dilüsyon yönteminde bir sıvı besiyerinde antibiyotiklerin 1-2 ml'lik volümler halinde sekiz veya daha fazla konsantrasyonu hazırlanır (91). Daha sonra antibiyotik içeren her tüpe bakteri suspansiyonu inoküle edilir ve bir gece inkübasyonun ardından gözle görülür bulanıklık değerlendirilir. Gözle görünür üremeyi engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeridir. Testin avantajı kantitatif sonuç (MİK değeri) vermesidir. Dezavantajı ise antibiyotik solusyonlarının her test için ayrı hazırlanması nedeniyle göreceli olarak çok miktarda malzeme ve zaman gerektirmesidir. Ayrıca antibiyotik konsantrasyonları hazırlanırken hata olasılığı da söz konusu olabilmektedir.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi tüp dilüsyon yönteminin küçük tek kullanımlık plastik mikrobrot plaklarında daha minyatürize ve mekanize edilerek çalışıldığı için aynı anda pek çok suşun test edilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu plaklar genellikle 96 kuyucukludur, her biri 200µl volüm alır Tek bir plakta 12 farklı antibiyotiğin ikişer katlık sekiz dilüsyonu çalışılabilmekte veya 12 farklı suşun aynı antibiyotikle duyarlılığı araştırılabilmektedir. Çalışmayı kolaylaştırmak ve zamandan kazanmak için

mikrodilüsyon plakları topluca hazırlandıktan sonra bakteri inokülasyonu yapılabilir. Bazı antibiyotikler için hazırlanan plaklar kullanılıncaya kadar dondurulabilir (91). Dondurulmuş plaklarda antimikrobik ilaçlar aylarca dayanabilirse de bazı ilaçlar diğerlerine göre daha dayanıksızdır. Plaklar kendi kendine defrost olan dondurucularda saklanmamalı ve bir kez çözülmüş antimikrobik ilaç yeniden dondurulmamalıdır. Yeniden dondurup çözmeler özellikle beta laktamlar başta olmak üzere bazı antibiyotiklerin bozulmalarını hızlandırmaktadır. Mikrodilüsyon testlerini okumada kolaylık sağlamak ve sonuçları kaydetmek için kuyucuklardaki üremenin gözlenmesini bozmadığı sürece görüntüleyici aletler kullanılabilir

Aynı yoğunluktaki bakteri mikrodilüsyon plaklarına inoküle edilir. İnokülasyon genellikle mekanik cihazlar veya çoklu atım pipetleri kullanılarak, standart bakteri suspansiyonundan eş zamanlı olarak mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa 1-5µl dağıtılması şeklindedir (92).

2.8.2. Agar Dilüsyon Yöntemi

Antimikrobik duyarlılığın belirlenmesinde agar dilüsyon yöntemi yerleşmiş bir tekniktir. Antibiyotiğin iki kat seri dilüsyonları agar besiyerine karıştırılır. Her plak antibiyotiğin tek bir konsantrasyonunu içerir. 1×10^4 bakteri hücresi içeren standart bakteri suspansiyonundan 1-3 µl agar yüzeyine damlatılır. İnokulum için eşzamanlı ve hızlı dağıtım sağlayan replikatörler de kullanılabilir. Çoklu dağıtım yapabilen replikatörler kullanılarak her plakta 32-36 farklı izolat test edilebilir. Plaklar 18-20 saat inkübe edildikten sonra makroskopik olarak incelenir; bakteri üremesini gözle görünür şekilde engelleyen antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak yorumlanır. Agar dilüsyon yönteminin avantajı çok sayıda izolatın eş zamanlı olarak çalışılabilmesi, göreceli olarak ekonomik oluşu, kantitatif sonuç vermesive sıvı besiyerinde iyi üremeyen *N.gonorrhoeae* ve anaeropik bakteriler gibi müşkülpesent bakteriler için de uygun olmasıdır. Dezavantajı çalışılacak izolat az sayıda ise zaman alıcı olması, antibiyotikli plakların taze hazırlanmasınının gerekmesi veya sınırlı süreyle saklanabilir oluşu ve plakların ticari olarak bulunmayışıdır (93).

2.8.3.Antimikrobiyal Gradyent Yöntemi

E-test duyarlılığın tesbiti için azalan miktarda antibiyotik emdirilmiş şeritlerin kullanıldığı bir yöntemdir. Standart bakteri suspansiyonu agar besiyerine yayıldıktan sonra şeritler agar yüzeyine yerleştirilir. Bir gece inkübasyonun ardından eliptik şekilli inhibisyon alanı gözle değerlendirilerek, eliptik inhibisyon çizgisinin şeritle kesiştiği noktadaki antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenir. Disk difüzyon yöntemi gibi yapılması kolay ve pratik bir testtir ancak pahalıdır. Çeşitli yayınlarda E-test yöntemiyle belirlenen MİK değerlerinin agar dilüsyon veya sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında uyumlu olduğunu göstermiştir (91). E-testin kantitatif sonuç veren diğer antibiyotik duyarlılık test yöntemlerine göre en önemli avantajı antibiyotik konsantrasyonlarında ikişer kat dilüsyon olmadığı için gerçek MİK değerine en yakın konsantrasyonu belirleme imkanı sağlamasıdır.

2.8.4.Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon veya Bauer- Kirby prosedürü en basit ve güvenilir duyarlılık yöntemlerinden biridir. Bu yöntem uzun yıllardan beri yapılan geniş çaplı çalışmalarla standardize edilmiştir. $1-2 \times 10^8$ cfu/ml saf bakteri suspansiyonunu pamuklu çubukla Müeller-Hinton agar yüzeyine yayıldıktan sonra belli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş diskler agar yüzeyine yerleştirilir (93). Yerleştirilen disklerin merkezleri arasında en az 24 mm aralık bulunmalıdır. Normalde 150 mm'lik plaklara en fazla 12,100 mm'lik plaklara en fazla beş disk yerleştirilmelidir. 16-18 saatlik inkübasyonun ardından inhibisyon zon çapları ölçülerek sınır değerlerle karşılaştırılır ve duyarlı, orta derecede dirençli şeklinde bildirilir. Duyarlılık kategorisini veren kalitatif bir yöntemdir. Standardize, tekrarlanabilir, özel bir ekipman gerektirmeyen basit bir testtir, kategoriyel sonuç klinisyen için yorum kolaylığı sağlar ve tüm duyarlılık yöntemleri içinde en ekonomik olanıdır. Olumsuz yönleri ise mekanize ve otomatize edilemeyişi, yavaş üreyen bakteriler için bu yöntemin uygulanamayışıdır. Disk yöntemi *H.influenzae*, *S.pneumoniae*, *N.gonorrhoeae* gibi güç üreyen bakteriler için özel besiyeri, inkübasyon

şartları ve farklı zon çapı yorumlama kriterleri kullanılarak modifiye edilmiştir (94).

2.8.5.Otomatize Antibiyotik Duyarlılık Sistemleri

Günümüzde otomatize ve yarı otomatize sistemler bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemler, kısa sürede antibiyotik duyarlılık test sonucu vermesi, daha az iş yükü gerektirmesi, nispeten ekonomik olması ve çoğunun laboratuvar ve hastane bilgi sistem ağıyla uyumlu olması nedeniyle özellikle çok sayıda klinik örnekle çalışan laboratuvarlar için tercih edilmektedir. Ancak panellerin sınırlı konsantrasyonlarda ve belirli antibiyotikleri içermesi önemli bir dezavantajdır (1). Ayrıca bu sistemlerde zor üreyen, anaerop ve bazı nonfermentatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri yapılamamaktadır. Kısa inkübasyonlu otomatize sistemlerde tam MİK hesaplanamamakta, ayrıca bu süre, indüklenebilir beta-laktamaz üretimi ve benzeri bakteri direnç mekanizmalarının açığa çıkarılmasına yetmemektedir.

Klinik kullanımda olan sistemlerde standardı sağlamak ve hasta kayıtlarını tutabilmek için kompüterize yazılım programı bulunmakta bu da veri yönetim sistemi olarak adlandırılmaktadır. Bu sistemler özet raporları gibi özel verilerin enfeksiyon kontrol raporlarının ve antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının alınması gibi epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan bilgilerin toplanmasına da yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu gelişmiş sistemlerde "Expert software" olarak adlandırılan antimikrobiyal duyarlılık profiliyle izole edilen suşun fenotipik özelliğini değerlendiren programlar bulunmaktadır. Bu programlar spesifik kural veya algoritmelerle sık rastlanan direnç paternlerini belirlemekte, antibiyotik duyarlılığında değişiklik önermekte, antibiyotiklere karşı çapraz direnci belirtmekte ve aynı zamanda rapor olarak dip not şeklinde vermektedir. Ayrıca bazı sistemlerde bulunan "pharmacy softare" programı ile suşun duyarlılık paterni göz önüne alınarak tedavi için öneride bulunmaktadır (95).

Otomatize sıvı bazlı antimikrobiyal duyarlılık testlerinden bugün için ülkemizde ticari olarak VITEK 1 ve 2 (bioMerieux ,Fransa),

MicroScan/WalkAway (Dade Behring,ABD) ve Phoenix sistemi (BD Diagnostic Ststems,ABD) bulunmaktadır (95).

VITEK 1 Ve 2 Sistemleri

VITEK sistemi ilk olarak 1960'larda ABD'nin uzay araştırmaları sırasında, uzay gemisinde bulunan astronotlarda üriner sistem patojenlerini araştırmak ve tanımlamak için üretilmiştir. Klinik laboratuvarların kullanımı için modifiye edilmesi 1970'li yıllarda gerçekleştirilmiştir.

VITEK sistemi kartlara inokülasyon için doldurucu-çekici bir modül, kartların yerleştirildiği atlıkarınca benzeri bir cihazla bir arada olan inkübatör-okuyucu bir modül, kartları manüple eden bir robotik sistem, kartlardaki biyokimyasal reaksiyonların renk değişikliğini ve optik dansiteyi ölçen bir fotometre ve monitör ve yazıcıdan oluşmaktadır. Ayrıca test verilerini depolamak / geriye dönük değerlendirmek ve farklı değerşkenlerle istatistiksel rapor almak için veri yönetim sistemine sahiptir. Antibiyotik içeren kuyucuklardaki üremeyi turbidometrik olarak ölçerek MİK değerini verir (97).

Yakın tarihlerde VITEK sisteminin daha otomatize bir versiyonu olan VITEK 2 kullanıma girmiştir, kartları 64 kuyucuk içerir ve 30-45 kuyucuk içeren orijinal VITEK kartlarından biraz incedir (91).

VITEK sistemi mikroorganizma ve duyarlılık parametrelerine göre 4-18 saat içinde sonuç vermektedir (95).

MicroScan/WalkAway Sistemi

Bu sistem 1980'lerin sonlarında geliştirilmiştir. Klasik panelleri bir gecelik inkübasyonun ardından bakteri üremesini turbidometrik olarak ölçer. Yakın tarihte güncellenmiş ve MicroScan rapID/S plus olarak yeniden adlandırılmıştır. Kısa inkübasyonlu hızlı panelleri ise 3,5-7 saatte florometrik değerlendirme yaparak sonuç vermektedir (91).

Büyük nemlendiricili bir inkübatör-okuyucu ünite, panel içeren kuleleri döndüren bir karusel, barkod okuyucu, spektrofotometre, panelleri hareket ettiren, pozisyon veren, reagentleri ekleyen ve panelleri okuma pozisyonuna getiren robotik bir mekanizma, bilgisayar ve yazıcıdan oluşur. Cihazın 40 testlik ve 96 testlik iki farklı modeli bulunmaktadır. Standart boydaki

mikrodilüsyon panelleri, çoklu dağıtıcı aletle (RENOK) manuel olarak inoküle edilir ve cihazın inkübatörüne yerleştirilir. Sonrasında cihaz periyodik aralıklarla ve otomatik olarak panelleri sırayla fotometrenin/florometrenin altına getirir ve üreme indeksi bir önceki seviyenin üzerindeyse üreme son noktalarını belirler. Özel "combo" panelleri mikroorganizma tanımlaması ve antibiyotik duyarlılık testinin bir arada yapılmasına olanak verir. Teorik olarak üremenin saptanmasında florojenik substratlardan floresans tesbiti, türbidometrik okumalardan daha duyarlı ve daha hızlıdır. Üremenin florometrik olarak tesbiti indirekt olup üremekte olan bakterilerin üremekte olmayanlardan farklı olarak enzimatik aktiviteyle florojenik substratları metabolize edebildiği varsayımına dayanmaktadır. Pratik olarak ise florojenik teknolojinin turbidometrik yaklaşıma karşı ispatlanmış bir üstünlüğü yoktur. Bu nedenle yakın tarihte hızlı, türbidometrik değerlendirme yapan gecelik inkübasyona uygun tasarlanmış hazır paneller rapID/S plus versiyonuna adapte edilmiş ve duyarlılık testleri için florojenik sistemin geliştirilmesine ara vermiştir. Bu sistemin bir başka avantajı da cihazın arızalanma durumunda panellerin bir gece inkübasyonun ardından gözle de değerlendirilebilmesidir (91).

Becton Dickinson Phoenix Sistemi

Kullanıma giren en yeni otomatize duyarlılık sistemidir. Panelleri 51'i bakteri tanımlama, 85'i antimikrobiyal duyarlılık olmak üzere 136 kuyucuktan oluşmaktadır (95). Test panelleri manuel olarak inoküle edilir. Phoenix sistemi bakteriyel üremeyi hem türbidometrik hem de redoks indikatör sistemi (resazurin) ile değerlendirmektedir. Bu sistem *Enterobacteriaceae* ailesi için 6,5 saatte, *Pseudomonas*'lar için 12 saatte, *Enterococcus* türleri için 5,5 saatte ve stafilokoklar için 7 saatte sonuç vermektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.İzolatların Tanımlanması

Çalışmamız Etik kurul tarafından 08.02.2007 tarihinde 27 sayılı karar ile onaylandı. ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Ekim 2005-Aralık 2007 tarihleri arasında tamamı yatan hastalardan izole edilen, tekrarı olmayan 200 adet *A. baumannii* izolatu çalışma kapsamına alındı. Bakterilerin tanımlanması geleneksel yöntemler ve MicroScan/WalkAway otomatize sistemiyle yapıldı. Suşlar çalışılincaya kadar %15 gliserollü triptik soy broth içeren boncuklu tüplerde -70°C'de saklandı.

3.2.Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Otomatize Sistemde Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Üreticinin önerileri doğrultusunda, 96 test kapasiteli Microscan/WA sisteminin Negatif Combo 34 panelleriyle çalışıldı. Panelde imipenem ve meropenem için 4 ve 8 µg/ml antibiyotik içeren iki kuyucuk bulunmakta ve duyarlılık sonucu ≤4 µg/ml duyarlı, 8 µg/ml orta derecede duyarlı ve >8 µg/ml dirençli olarak verilmektedir. Suşların imipenem ve meropenem duyarlılıkları MİK değerleriyle beraber kaydedildi. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı.

Disk Difüzyon Yöntemi

İzolatların imipenem ve meropenem duyarlılıkları CLSI standartlarına uygun olarak Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı. *A.baumannii* izolatlarının bir gecelik taze pasajında tek düşmüş kolonilerden doğrudan koloni suspansiyonu yöntemiyle 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bakteri suspansiyonu hazırlandı. Steril eküvyon daldırıldıktan sonra tüpün kenarına hafifçe bastırılarak eküvyon üzerindeki fazla sıvı atıldı. Önceden kurutulmuş, 4 mm kalınlığındaki Mueller-Hinton agar (Oxoid,İngiltere) plağının yüzeyine sürülerek bakteri tüm agar yüzeyine inoküle edildi. Bakteri suspansiyonunun absorbe olması için kapak aralık olarak birkaç dakika beklendikten sonra 10µg imipenem (Oxoid,İngiltere) ve 10µg meropenem(Oxoid,İngiltere) içeren

antibiyotik diskleri,merkezleri arasında en az 24 mm olacak şekilde agar yüzeyine bastırılarak yerleştirildi. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı. Kapakları alta gelecek şekilde 37⁰C'lik etüve kaldırdı. 16-18 saat inkübasyonun ardından değerlendirildi. CLSI standartlarına göre inhibisyon zon çapları ölçülerek duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi.

Tablo 3.1. İmipenem ve meropenem için duyarlılık zon çapları

| | Disk İçeriği | Duyarlı (mm) | Orta Derecede Duyarlı (mm) | Dirençli (mm) |
|-----------|--------------|--------------|----------------------------|---------------|
| İmipenem | 10µg | ≥16 | 14-15 | ≤13 |
| Meropenem | 10µg | ≥16 | 14-15 | ≤13 |

Agar Dilüsyon Yöntemi

Öncelikle imipenem için hem çözücü hem sulandırıcı olarak kullanılmak üzere pH'ı 7,2 olan 0.01 M fosfat tamponu hazırlandı.

CLSI önerileri doğrultusunda toz haldeki imipenem (Merck&Co Inc,ABD) ve meropenem (Astra-Zeneca,ABD) etken maddelerinden stok solusyonlar hazırlandı. 129,03 mg imipenem 12 ml fosfat tamponda, 133,33mg meropenem 12 ml steril distile suda eritilerek 10.000 µg/ml antibiyotik içeren stok solusyonlar hazırlandı. Bu solusyon da imipenem için fosfat tamponla, meropenem için steril distile suyla tekrar dilüe edilerek 1000 µg/ml ve 100 µg/ml antibiyotik içeren stok solusyonlar hazırlandı. Daha sonra dehydrate besiyerinden üreticinin önerileri doğrultusunda Mueller-Hinton agar hazırlandı ve antibiyotikler eklenmeden önce sıcaklığının su banyosu içinde 50⁰C'ye inmesi sağlandı. Antibiyotiklerin 0,125-64µg/ml aralığında çift kat seri sulandırılmalarını içeren, agar dilüsyon besiyerlerini hazırlamak için 11 adet 50 ml'lik vidalı kapaklı plastik tüpün üzerine sıfırdan başlayarak antibiyotik içerikleri yazıldı ve aşağıdaki algoritm izlenerek, agardaki son konsantrasyon olacak şekilde, çalışılmak istenen aralık için gerekli miktarlar stok

solusyonlardan tüplere aktarıldı. Tüplerden birine üreme kontrolü için antibiyotik eklenmedi.

10.000 µg/ml'lik antibiyotik stok solüsyonundan;

64 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 192µl

32 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 96µl

16 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 48µl

1000 µg/ml'lik antibiyotik stok solüsyonundan;

8 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 240µl

4 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 119µl

2 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 60µl

100 µg/ml'lik antibiyotik stok solüsyonundan;

1 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 300µl

0,5 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 150µl

0,25 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 75µl

0,125 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu için 37,5µl

Ardından, kare petrilere 3 mm kalınlığında besiyeri elde edebilmek için her bir tüpe 50⁰C'ye soğutulmuş Mueller-Hinton besiyerinden 30'ar ml eklendi. Kapağı kapatılıp tersyüz edilerek agarla antibiyotik çözeltisinin iyice karışması sağlandı. Daha sonra önceden hazırlanmış kare petrilere köpük oluşturmayacak şekilde, düz bir zemin üzerinde döküldü ve oda ısısında donmaya bırakıldı. Besiyerleri her defasında yeniden hazırlanarak en fazla 24 saat içinde kullanıldı (119). *A.baumannii* izolatlarının bir gecelik taze pasajında tek düşmüş kolonilerden doğrudan koloni suspansiyonu yöntemiyle 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bakteri suspansiyonu hazırlandı. Steril distile su ile 1/10 oranında sulandırılarak 10⁷cfu/ml içeren bakteri suspansiyonu elde edildi. Bu suspansiyondan agar yüzeyine 1µl damlatılarak son inokulumun her damlatma başına 5x10⁴ cfu olması sağlandı. Önce standart pipet yardımıyla antibiyotik içermeyen üreme kontrol plağına inokülasyonla başlandı ve sonra en düşük konsantrasyondan

başlamak üzere diğer konsantrasyonları içeren plaklara inokülasyon yapıldı. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı. Bu şekilde tek bir plakta 36 suş test edildi. İnoküle edilen plaklar oda sıcaklığında inokulum noktaları agara absorbe olana dek bekletildi. Plaklar ters çevrilerek 37⁰C'lik etüde 16-20 saat inkübe edildikten sonra siyah bir zemin üzerinde değerlendirildi. Üremeyi inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kaydedildi ayrıca CLSI önerileri doğrultusunda duyarlı, orta derecede duyarlı veya dirençli olarak kategorize edildi.

Tablo 3.2. İmipenem ve meropenem için duyarlılık MİK değerleri

| | Duyarlı (µg/ml) | Orta Derecede Duyarlı (µg/ml) | Dirençli (µg/ml) |
|-----------|--------------------|-------------------------------------|---------------------|
| İmipenem | ≤4 | 8 | ≥16 |
| Meropenem | ≤4 | 8 | ≥16 |

Sıvı Mikrodilüsyon Testi

Agar dilüsyon testinde olduğu gibi imipenem ve meropenem için 10.000 µg/ml, 1000 µg/ml ve 100 µg/ml antibiyotik içeren stok solüsyonlar hazırlandı. Agar dilüsyon testinin yapılışında ayrıntılı olarak verilen algoritma uygulanarak antibiyotik solüsyonları, besiyerindeki son konsantrasyonları olacak şekilde vidalı kapaklı tüplere dağıtıldı. Bu kez tüplere 30 ml katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri eklenerek antibiyotik çözeltisiyle iyice karışması sağlandı. Önceden hazırlanmış mikrodilüsyon plaklarında karşılık gelen kuyucuklara negatif ve pozitif kontrol için sadece sıvı besiyeri ve 0,125-64 µg/ml aralığındaki antibiyotik içeren sıvı besiyeri, çoklu dağıtıcı pipet yardımıyla 100'er µl dağıtıldı. Bu şekilde hazırlanan mikroplaklar, kullanılıncaya dek plastik poşetler içinde -70⁰C'de saklandı (119).

A.baumannii izolatlarının bir gecelik taze pasajında tek düşmüş kolonilerden doğrudan koloni suspansiyonu yöntemiyle 0,5 McFarland

bulanıklığa eşdeğer bakteri suspansiyonu hazırlandı. Steril distile su ile 1/10 oranında sulandırılarak 10^7 cfu/ml içeren bakteri suspansiyonu elde edildi. Bu süspansiyondan, önceden çözdürülmüş mikrodilüsyon plaklarının negatif kontrol kuyucuğu hariç diğer kuyucuklarına 5'er µl dağıtılarak her kuyucuktaki bakteri inokulumunun 5×10^4 cfu olması sağlandı. Bu şekilde her bir mikrodilüsyon plağında sekiz suş test edildi. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı. Mikrodilüsyon plakları üzerleri kapatılarak 37^0 de 16-20 saat inkübe edildikten sonra siyah zemin üzerinde gözle değerlendirildi. Mikrodilüsyon kuyucuklarındaki bakteri üremesini tamamen inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kaydedildi ve yine agar dilüsyon testinin yapılışında gösterilen tablo kullanılarak CLSI standartlarına göre duyarlılık kategorisi belirlendi.

3.3.Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanıma giren ticari testlerin performansının değerlendirilmesinde Amerika'da Food and Drug Administration (FDA) tarafından bir kılavuz çıkarılmıştır. Bu kılavuzda performansın değerlendirilmesinde, manuel veya otomatize sistemlerde klinik örneklerle ait en az yüz suşun antibiyotik duyarlılık test sonuçları referans yöntemle karşılaştırıldığında çok büyük hatanın (yalancı duyarlılık) %1.5'un altında, büyük hatanın (yalancı direnç) %3'ün altında, küçük hatanın %10'un altında ve referans yöntemle uyumun %90'ın üzerinde olması gerektiği belirtilmektedir (91,96). MicroScan/WalkAway otomatize duyarlılık sistemi her biri referans alınarak ayrı ayrı disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle karşılaştırıldı. Otomatize sistem ve referans yöntem ile aynı kategoride (duyarlı, orta derece duyarlı, dirençli) sonuç alındığında testler "uyumlu" kabul edildi.

MicroScan/WalkAway sistemi ile duyarlı, referans yöntemle dirençli saptanan sonuçlar "çok büyük hata", MicroScan/WalkAway sistemi ile dirençli referans yöntemle duyarlı bulunan sonuçlar "büyük hata", MicroScan/WalkAway ile duyarlı veya dirençliyken referans yöntemle orta derecede duyarlı bulunan veya MicroScan/WalkAway ile orta derecede

duyarlı iken referans yöntemle duyarlı veya dirençli bulunan sonuçlar ise “küçük hata” olarak kabul edildi.

3.4.Metallo Beta - Laktamaz Üretimini Saptanması

İmipenem ve meropenem azalmış duyarlılık veya direnç saptanan izolatlar (MİK ≥ 8) metallo beta laktamaz üretimi açısından iki farklı fenotipik yöntemle test edildi. Uygulanan iki test arasında sonuçların uyum oranı her iki testle pozitif ve her iki testle negatif bulunan izolat sayısının toplam çalışılan izolat sayısına bölünmesiyle belirlendi.

Kombine Disk Difüzyon Testi

Öncelikle kombine disklerin oluşturulması için EDTA solüsyonu hazırlandı. 18,61 gram disodyum EDTA \cdot 2H $_2$ O 100 ml steril distile su içinde çözülerek 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlandı, NaOH ile pH'ı 8'e ayarlandı. Otoklavlanarak sterilize edildi.

İzolatların taze pasajlardan 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri suspansiyonu hazırlandı ve MHA plağı yüzeyine yayıldı. Plak yüzeyinin kuruması için birkaç dakika beklendikten sonra iki adet 10 μ g imipenem diski birbirinden 22 mm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirildi. Disklerden birinin üzerine pipet yardımıyla 5 μ l (930 μ g) EDTA solüsyonu damlatılarak kombine disk oluşturuldu. 16-18 saatlik inkübasyonun ardından her iki diskin etrafındaki inhibisyon zonu ölçüldü ve kaydedildi. EDTA ile kombine edilen diskin zon çapı, imipenem diski zon çapından 7 mm ve daha genişse izolat MBL üretimi açısından pozitif kabul edildi (99).

Modifiye Hodge Testi

İmipenem duyarlı *E.coli* ATCC 25922 standart suşunun 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan suspansiyonu steril pamuklu çubukla MHA plağı yüzeyine yayıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra merkezine 10 μ g imipenem diski yerleştirildi. Test edilecek suşların, taze pasajlarından iğne öze ile alınıp, diskin kenarından başlanarak merkezden perifer doğru çizgi ekimi yapıldı. Bu şekilde her plakta dört suş çalışıldı. 37 $^{\circ}$ C'de 16-18 saatlik inkübasyonun ardından değerlendirildi. Disk

etrafındaki inhibisyon zonunda meydana gelen yonca yaprağı Őeklindeki bozulma MBL üretimi açısından pozitif sonuç olarak değerlendirildi (100).

4.BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan 2005-Aralık 2007 tarihleri arasında tamamı yatan hastalardan izole edilmiş, 200 adet *A. baumannii* izolatınının 18'i(%9) dahiliye, 20'si(%10) pediatri, 25'i(%12,5) cerrahi, 21'i(%10,5) göğüs hastalıkları 12'si (%6) ortopedi, 17'si (%8,5) beyin cerrahisi, 23'ü (%11,5) anestezi yoğun bakım, 13'ü (%6,5) dahiliye yoğun bakım, 20'si (%10) cerrahi yoğun bakım, 14'ü (%7) pediatri yoğun bakım, 17'si(%8,5) diğer servislerden gelen klinik örneklerden soyutlanmıştır. (Tablo 4.1)

Klinik örneklerin 35'i(%17,5) endotrakeal aspirat, 29'u(%14,5) kan, 12'si(%6) kateter, 66'sı(%33) yara yeri, 5'i(%2,5) balgam, 15'i(%7,5) idrar, 10'u(%5) entübasyon tüpü, 17'si(8,5) bronkoalveoler lavaj, 1'i(%0,5) beyin omurilik sıvısı,10'u(%5) diğer örneklerden oluşmaktadır. Örneklerin 133'ünün (%66,5); 67 alt solunum yolu örneği (%33,5) ve 66 yara yeri örneği (%33)'nden oluşması dikkat çekmektedir. Ortopedi servisinden soyutlanan izolatların tamamı yara yeri örneğine aittir. Suşların %35'i yoğun bakım hastalarına ait klinik örneklerden izole edilmiştir. (Tablo 4.1.)

Tablo 4.1. *A.baumannii* izolatlarının servis ve örnek türüne göre dağılımları.

| | ETA | Kan | Kat | YY | Balgam | İdrar | Ent | | | | Toplam |
|-----------------|-----|-----|-----|----|--------|-------|------|-----|-----|-------|--------|
| | | | | | | | Tüpü | BAL | BOS | Diğer | |
| Dah | 4 | 5 | - | 6 | 2 | - | 1 | - | - | - | 18 |
| Ped | 4 | 4 | 1 | 4 | - | 2 | 3 | - | - | 2 | 20 |
| Cerr | 1 | 1 | - | 18 | - | 2 | - | 1 | - | 2 | 25 |
| Göğüs | | | | | | | | | | | |
| Hst | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | - | - | 13 | - | 1 | 21 |
| Ortopedi | - | - | - | 12 | - | - | - | - | - | - | 12 |
| NRŞ | 5 | 2 | - | 7 | - | 2 | - | - | 1 | - | 17 |
| Anestezi | 9 | 5 | 6 | 1 | - | 2 | - | - | - | - | 23 |
| YB | | | | | | | | | | | |
| Dah YB | 5 | 2 | - | 1 | - | 1 | 1 | 1 | - | 2 | 13 |
| Cerr YB | 3 | 4 | 3 | 5 | - | 1 | 1 | 1 | - | 2 | 20 |
| Ped YB | 2 | 3 | 1 | 2 | - | 2 | 4 | - | - | - | 14 |
| Diğer | - | 2 | - | 9 | 1 | 3 | - | 1 | - | 1 | 17 |
| Toplam | 35 | 29 | 12 | 66 | 5 | 15 | 10 | 17 | 1 | 10 | 200 |

ETA:Endotrakeal aspirat,Kat:Kateter,YY.Yara yeri,Ent:Entübasyon,BAL:Bronkoalveoler lavaj.

Dah:Dahiliye,Ped:Pediatri,Cerr:Cerrahi,NRŞ:Beyin cerrahisi,YB:Yoğun bakım.

Çalışılan izolatların;MicroScan WalkAway sistemiyle imipeneme 99'u (%49,5) duyarlı, 89'u (%44,5) orta derecede duyarlı, 12'si (%6)'sı dirençli bulunmuştur. Meropeneme suşların 49'u(%24,5) duyarlı, 23'ü (%11,5) orta derecede duyarlı ve 128'i(%64) dirençli bulunmuştur.

İmipenem için disk difüzyon testiyle izolatların 60'ı (%30) duyarlı, 33'ü(%16,5) orta derecede duyarlı, 107'si(%53,5) dirençli bulunmuştur. Meropenem için disk difüzyon test sonuçları 58 (%29) duyarlı, 6 (%3) orta derecede duyarlı , 136 (%68) dirençli şeklindedir.

İmipenem için agar dilüsyon yöntemiyle suşların 63'ü(%31,5) duyarlı, 44'ü (%22) orta derecede duyarlı, 93'ü (%46,5) dirençli bulunurken, meropenem için sonuçlar 52 (%26) duyarlı, 13 (%6,5) orta derecede duyarlı ve 135(%67,5) dirençli şeklindedir.

İmipenem için sıvı mikrodilüsyon duyarlılık test sonuçları 60 (%30) duyarlı, 39 (19,5) orta derecede duyarlı 101 (%50,5) dirençli şeklindedir. Meropenem içinse aynı yöntemle 54 suş (%27) duyarlı,14 suş (%7) orta derecede duyarlı ve 132 suş (%66) dirençli bulunmuştur. (Tablo 4.2,4.3.)

Tablo 4.2. İzolatların imipenem duyarlılığının yöntemlere göre dağılımı

| İmipenem | MicroScan/WA | DD | AD | SMD |
|-----------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| | n(%) | n(%) | n(%) | n(%) |
| Duyarlı | 99(49,5) | 60(30) | 63(31,5) | 60(30) |
| ODD | 89(44,5) | 33(16,5) | 44(22) | 39(19,5) |
| Dirençli | 12(6) | 107(53,5) | 93(46,5) | 101(50,5) |

DD:Disk difüzyon testi,AD:Agar dilüsyon,SMD:Sıvı mikrodilüsyon,ODD:Orta derecede duyarlı.

Tablo 4.3. İzolatların meropenem duyarlılığının yöntemlere göre dağılımı

| Meropenem | MicroScan/WA | DD | AD | SMD |
|------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| | n(%) | n(%) | n(%) | n(%) |
| Duyarlı | 49(24,5) | 58(29) | 52(26) | 54(27) |
| ODD | 23(11,5) | 6(3) | 13(6,5) | 14(7) |
| Dirençli | 128(64) | 136(68) | 135(67,5) | 132(66) |

DD:Disk difüzyon testi,AD:Agar dilüsyon,SMD:Sıvı mikrodilüsyon,ODD:Orta derecede duyarlı.

MicroScan/WA otomatize duyarlılık sisteminin imipenem için referans yöntemlerle uyumu karşılaştırıldığında en yüksek uyumu %64,5 ile sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle gösterdiği görülmüştür. Disk difüzyon yöntemiyle uyumu %41, agar dilüsyon yöntemiyle uyumu %50 bulunmuştur. Çok büyük hata oranları disk difüzyon ile kıyaslandığında %10, agar dilüsyon ile karşılaştırıldığında %6,5 ve sıvı mikrodilüsyonla karşılaştırıldığında %4 bulunmuştur. Büyük hata oranları kıyaslandığında aynı yöntemler için sırasıyla %0,5, %0,5 ve %1 olarak saptanmıştır. Küçük hata oranları ise yine sırasıyla %48,5, %43 ve %30,5'dir. (Tablo 4.4.)

MicroScan/WA otomatize duyarlılık sisteminin meropenem için referans yöntemlerle uyumu karşılaştırıldığında ise disk difüzyon ile %84, agar dilüsyon ile %86, sıvı mikrodilüsyon ile %86,5 uyumlu bulunmuştur. Çok büyük hata oranları sırasıyla %2, %1,5 ve %1,5,büyük hata oranları sırasıyla %2,5, %1,5 ve %1,5 olarak saptanırken küçük hata oranları sırasıyla %11,5, %11, %10,5'dur. (Tablo 4.4)

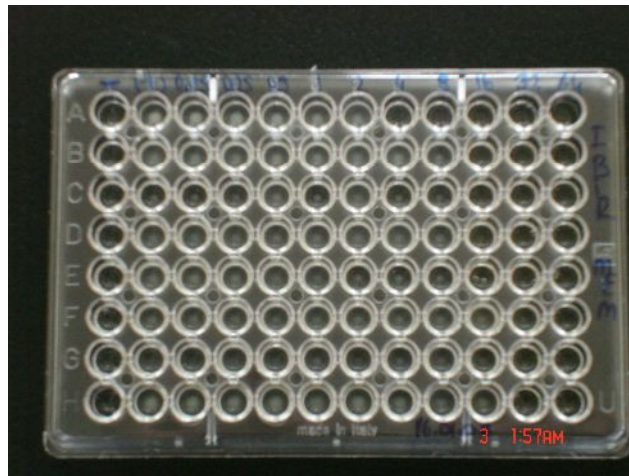
Tablo 4.4. MicroScan/WA otomatize sisteminin referans duyarlılık yöntemleriyle uyumunun karşılaştırılması

| | İmipenem | | | | Meropenem | | | |
|--------------------|----------|---------|--------|--------|-----------|---------|--------|--------|
| | Uyum (%) | ÇBH (%) | BH (%) | KH (%) | Uyum (%) | ÇBH (%) | BH (%) | KH (%) |
| Disk difüzyon | 41 | 10 | 0,5 | 48,5 | 84 | 2 | 2,5 | 11,5 |
| Agar dilüsyon | 50 | 6,5 | 0,5 | 43 | 86 | 1,5 | 1,5 | 11 |
| Sıvı mikrodilüsyon | 64,5 | 4 | 1 | 30,5 | 86,5 | 1,5 | 1,5 | 10,5 |

ÇBH:Çok büyük hata,BH:Büyük hata,KH:Küçük hata



Şekil 4.1: Agar dilüsyon testi



Şekil 4.2: Sıvı mikrodilüsyon testi

İmipeneme her üç referans yöntemle de orta dercede duyarlı ve dirençli tesbit edilen 137 *A.baumannii* suşu metallo beta laktamaz üretimi açısından kombine disk difüzyon ve modifiye Hodge yöntemleriyle test edildi. Kombine disk yöntemiyle izolatların 67'si (%48,55) modifiye Hodge testiyle 70'i(%51,09) metallo beta laktamaz üretimi açısından pozitif bulundu. 13 izolat kombine disk yöntemiyle pozitif, modifiye Hodge testiyle negatif sonuç verirken, 16 izolat modifiye Hodge testiyle pozitif kombine disk yöntemiyle negatif sonuç verdi. Her iki testin de negatif olduğu izolat sayısı ve her iki testin de pozitif olduğu izolat sayısı 54 iken, iki yöntem arasındaki uyum %78,83 olarak belirlendi (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. MBL üretimini araştırmak için kullanılan iki fenotipik yöntemle pozitif ve negatif bulunan izolat sayıları

| | Kombine disk(+) | Kombine disk(-) | Toplam |
|--------------------|-----------------|-----------------|--------|
| Modifiye Hodge (+) | 54 | 16 | 70 |
| Modifiye Hodge(-) | 13 | 54 | 67 |
| Toplam | 67 | 70 | 137 |



Şekil 4.3: Kombine disk testiyle MBL üretimi pozitif bulunan bir izolat



Şekil 4.4: Modifiye Hodge testiyle MBL üretimi pozitif bulunan dört izolat

5.TARTIŞMA

A.baumannii hastane enfeksiyonu etkenleri arasında giderek daha sık görülmektedir. En önemli özelliklerinden biri intrensek olarak pek çok antibiyotiğe dirençli olmasıdır. Çoğu zaman dezenfektanlara dirençli olup , çevreden izole edilebilir, alet ilişkili enfeksiyonların etkeni olabilir ve hastalarda kullanılan aletler ya da sağlık çalışanlarının elleri aracılığıyla hastadan hastaya yayılabilirler. Yakın geçmişte antibiyotik kullanımı kolonizasyon ve enfeksiyon için risk faktörü olup, altta yatan hastalıkları olan hastalarda daha sık karşılaşılan fırsatçı patojenlerdir(101).Çalışmamızda izolatların üçte ikisi alt solunum yolu örnekleri ve yara yeri örneklerinden soyulanmıştır. Tüm izolatların %35'i yoğun bakımda yatan hastalardan elde edilmiştir. *A.baumannii* yoğun bakım ünitelerinde alt solunum yolu enfeksiyonları özellikle de ventilatör ilişkili pnömonide önemli bir patojendir(4). Girişim sıklığı ve yabancı cisim kullanımı bu fırsatçı patojenle gelişen enfeksiyonların sıklığında artışa neden olurken antimikrobiyal kullanımı ve direnç gelişimi giderek artan oranlarıyla bir kısır döngü yaratmaktadır. Kimi zaman mikroorganizmanın direnç özelliğinin laboratuvar tanımındaki güçlükler ,tedavi başarısını etkilemektedir. *A.baumannii* enfeksiyonlarında atfedilebilir mortalitenin %30 olduğu hatta pnömoni olgularında %53 gibi yüksek oranlara vardığı bildirilmektedir(16). Ancak alt solunum yollarında kolonizan olarak bulunması daha sık karşılaşılan bir durumdur. *Acinetobacter* cinsi bakteriler yanık dışı yaralardan izole edildiklerinde ise öncelikle kolonizasyon yönünden değerlendirilmelidir. *Acinetobacter* izole edilen hastaların önemli bir kısmında bakteri enfeksiyon etkeni olmayıp kolonizasyonu yansıtmakta, kolonizasyon olgularının da yaklaşık %40'ında antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Ancak özellikle immün sistemi bozuk hastalarda ve cerrahi sonrası enfeksiyonlarda etken olarak belirlenmesi olasıdır (13). Çalışmamızda yara yerinden izole edilen 66 *A.baumannii* suşunun 37'si (%56) cerrahi kliniklerinden gönderilen örneklerle aittir. Ayrıca ortopedi servisinde yatan hastalardan izole edilen 12 suşun

tamamı yara yeri örneklerine aittir. Bu bilgiler ışığında izole edilen suşların enfeksiyon etkeni olma olasılığının daha fazla olduğu düşünülmüştür.

Antibiyotiklere direnç oranları her merkezde ve farklı enfeksiyon bölgelerinden izole edilen kökenlerde farklılıklar gösterebilse de genelde çoğul dirençli kökenlerin yüksek oranı alarm verdirici boyuttadır; hatta son yıllarda panrezistan kökenlerle ilişkili enfeksiyonlar bildirilmektedir. Karbapenemler diğer antimikrobiyal ajanlara göre daha iyi etkinlik gösterdiği için pek çok merkezde ciddi *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde öncelikli olarak tercih edilen ilaçlardır. Ancak son birkaç yılda dünya çapında karbapenem dirençli izolatların artan oranlarda bildirilmesi dikkat çekmektedir (102). Dünya genelinde *A.baumannii* izolatlarının karbapenem duyarlılığının yıllara ve bölgelere göre dağılımı tablo 5.1'de' da özetlenmiştir (3).

Tablo5.1.Dünya genelinde izole edilen *A.baumannii* izolatlarının karbapenem duyarlılıkları

| Coğrafi bölge | Yer/Çalışma | Yıl | Duyarlılık(%) | |
|----------------------|-----------------------------|-----------|---------------|-----|
| | | | İMP | MEM |
| Kuzey Amerika | SENTRY | 2001-2004 | 89 | 84 |
| | ABD(YBÜ) | 2001 | 96 | 91 |
| | ABD (YBÜ)/SN | 2000-2002 | 87 | 66 |
| | Kanada(YBÜ) | 2000-2002 | 96 | 94 |
| Avrupa | SENTRY | 2001-2004 | 74 | 70 |
| | İtalya(YBÜ)/SN | 2000-2002 | 78 | 75 |
| | Fransa(YBÜ)/SN | 2000-2002 | 94 | 68 |
| | Almanya(YBÜ)/SN | 2000-2002 | 96 | 96 |
| | İsveç(YBÜ) | 1999-2000 | 96 | - |
| | İspanya(hastane izolatları) | 2001 | 60 | 49 |
| | İngiltere ve İrlanda | | | |
| | İtalya | 2001-2002 | 100 | - |
| | | 1997-1999 | 87 | 84 |
| Asya/Pasifik Bölgesi | SENTRY | 2001-2004 | 74 | 73 |
| | Kore | 2003 | 87 | 75 |
| | Çin(YBÜ) | 2002 | 92 | - |
| | Japonya | 2002 | 95 | - |
| | Tayvan | 2000 | 98 | |
| Latin Amerika | SENTRY | 2001-2004 | 86 | 84 |
| | Brezilya | 2001 | 98 | 97 |
| | Arjantin | 2001-2002 | 85 | - |

SENTRY:SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programı,SN:Sürveyans Network,YBÜ:Yoğun Bakım Ünitesi, IMP:İmipenem,MEM:Meropenem

Türkiye'den bildirilen duyarlılık oranları da tıpkı dünyada olduğu gibi çalışmalar arasında farklılık göstermektedir. Günseren ve ark'nın sekiz farklı hastanenin yoğun bakım ünitelerinden izole ettikleri 80 *A.baumannii* suşunda imipenem duyarlılığını %71,2 bulmuşlardır (103). Ertesi yıl Aksaray ve ark. tarafından tekrarlanan çalışmada ise *Acinetobacter* suşlarına imipenem dışında etkili bir antimikrobiyal bulunmamış, çalışılan 164 izolatın da sadece %49,3'ü imipeneme duyarlı bulunmuştur (104). Yine Türkiye'de yapılan çok merkezli bir başka çalışmada *Acinetobacter* türlerinin en duyarlı olduğu antimikrobiyal ajanlar imipenem (%85) ve sefoperazon-sulbaktam (%73,8) olarak belirlenmiştir. Ancak sefoperazon-sulbaktam duyarlılığının nedeni, sulbaktamın *Acinetobacter* türlerine karşı intrinsek aktivitesi olabilir. Bir diğer çalışmada Kocazeybek ve ark. dört farklı hastanenin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *A.baumannii* izolatlarında imipenem duyarlılığını %100 bulmuşlardır (6). Zarakolu ve ark. tarafından, 2000-2004 arasında yürütülen Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) çalışması sonuçlarına göre *Acinetobacter* türlerinde Türkiye'den bildirilen duyarlılık oranları imipenem için %48,meropenem için ise %53'dür. Bizim çalışmamızda, karbapenem direncinin endemik olduğu İspanya'dakine benzer şekilde karbapenemlere yüksek oranda direnç (imipeneme ortalama %50,meropeneme ortalama %67) saptanmıştır. Bu yükseklikte; kontrolsüz antibiyotik kullanımı, enfeksiyon kontrol programlarına yeterince uyulmayışı gibi etkenlerin rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları veren otomatize sistemlerde, sistem sonuçlarının hastaların kliniğiyle karşılaştırılması ve sistemlerin ekonomik boyutu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Hastaneye yatan hastaların çoğunda başlanan ampirik antibiyotik tedavisinin, antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının hızlı verilmesiyle %10-20 hastada değiştirildiği, bu sonuçların hastanede ekonomik kaybı önlediği, hastanın iyileşme süresinin kısaldığı ve mortalite oranının azaldığı gösterilmiştir.(95)

Ancak bu sistemlerle özellikle nonfermentatif bakterilerde elde edilen antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının her zaman referans yöntemlerle elde edilen sonuçlarla örtüşmediği, karbapenem grubu dahil olmak üzere beta-

laktam antibiyotiklerin duyarlılık test sonuçlarının güvenilir olmadığı bildirilmektedir. Antibiyotik duyarlılığının tesbiti için kullanılan hızlı testler, gerçekte dirençli olan bir mikroorganizma için duyarlı sonuç vermeye daha yatkındır. Bazı üreme sinyallerinin daha kısa sürede okunmasına bağlı olarak bir gece inkübasyona göre daha duyarlı sonuçlar alınabilmektedir. Pek çok ilaç bakterinin aktif üremesi sırasında ürettiği enzimlerin belirli bir seviyeye ulaşmasıyla inaktive olur. Eğer mikroorganizma zor ürüyorsa veya enzim üretmek için birkaç farklı ürün gerektiriyorsa veya direnç geliştirmek için alternatif yollar kullanıyorsa, ilaca gerçekte dirençli olduğu halde duyarlı bulunmaktadır(105). Yakın tarihte ABD’nde yapılan çalışma *P.aeruginosa*’da, otomatize sistem kullanıldığında son derece dirençli mikroorganizmaların %5,9 oranında yanlış duyarlı bulunduğunu göstermiştir(1). Ticari test panellerinde ilacın tahrip olmasına bağlı yalancı direnç de çok sık karşılaşılan bir sorundur. Çalışmalar imipenemin kolayca parçalandığını, meropenemin ise daha stabil olduğunu göstermiştir (16).

Tsakris ve ark yaptıkları çalışmada otomatize sistemle imipeneme dirençli bulunan 35 *A baumannii* izolatını disk difüzyon, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle tekrar test etmiş ve bu izolatların 32’sini duyarlı, 3’ünü yöntemle göre değişmek üzere dirençli veya orta derecede duyarlı bulmuşlar ve bu yalancı direnci, zamanla kartlardaki imipenem konsantrasyonunun olması gerekenin altına düşmüş olabileceğine bağlamışlardır(2). York ve ark.’nın gram negatif basillere karşı 12 antimikrobiyal ajanı WalkAway sistemi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle test etikleri çalışmada genel olarak çok büyük hata oranını yüksek bulmakla birlikte imipenem için çok büyük hata oranını %0,3 büyük hata oranını ise %1,7 bulmuşlardır (105). Tenover ve ark.15 beta laktamaza bağlı karbapenem direncine sahip *bla_{KPC}* pozitif *K.pneumoniae* izolatıyla yaptıkları çalışmada MicroScan/WA sistemi sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılmış ve çok büyük hata (yalancı duyarlılık) oranı hem imipenem hem de meropenem için %6,7 bulmuştur (106).

Zarakolu ve ark’nın çalışmasında ise 61 *Pseudomonas* ve 61 *Acinetobacter* suşunda Phoenix otomatize sistemi, meropenemin de içinde

bulunduğu 6 antimikrobiyal ajana duyarlılıkları açısından sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılmış ve çok büyük hata,büyük hata ve küçük hata oranları sırasıyla %2,8, %19,1 ve %14,5 saptanmıştır (107). Rittenhouse ve ark'nın 500 gram negatif klinik örnek üzerinde yaptıkları çalışmada MicroScan sistemi referans sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılmış, çok büyük hata %3 saptanırken büyük hata saptanmamıştır (95).

Juretschko ve ark *P.aeruginosa* izolatlarında altı geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiğe karşı duyarlılıkları dört farklı otomatize sistem ile belirlemişler ve bu sonuçları referans sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen sonuçlarla kıyaslamışlardır. Özellikle VITEK sisteminde imipenem için yanlış duyarlı sonuçların yüksekliğine dikkat çekilirken Phoenix sistemi hariç küçük hata oranlarının da kabul edilemez olduğu belirtilmiştir. İmipenem için büyük hata oranını MicroScan/WA sisteminde %1,7 saptamış, diğer sistemlerde ise büyük hataya rastlamamışlardır. Çok merkezli bu çalışmanın sonucunda farklı otomatize sistemlerin önerilen referans yöntemlerle karşılaştırıldığında yüksek oranda uyumsuzluk gösterdiği ve ister yanlış direnç ister yanlış duyarlılık olsun hastalar için uygun olmayan ilaçların seçilmesine neden olacağı vurgulanmıştır(108). Steward ve ark'nın yaptığı çalışmada ise MicroScan WA sistemi sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında imipenem için çok büyük hata saptanmazken, meropenemde %4,8 oranında çok büyük hata saptanmıştır. Büyük hata ise meropenemde saptanmamış, imipenemde %1,9 oranında saptanmıştır. Ayrıca sistemin otomatize okumasıyla çok büyük hataların fazla sayıda olduğu ancak antibiyotik duyarlılık test paneli gözle değerlendirildiğinde küçük hatalara rastlandığına dikkat çekilmiştir. Bu durumun mikroorganizmaya göre, sistemin karbapenem içeren kuyucuklardaki üremeyi tanımladığı eşik değerlerinin farklılığından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (109).

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanıma giren ve yaygın olarak kullanılan otomatize sistemlerin performansının değerlendirilmesinde FDA tarafından çıkarılan kılavuza göre çok büyük hatanın %1.5'un, büyük hatanın

%3'ün, küçük hatanın %10'un altında saptanması ve referans yöntemle uyumun %90'ın üzerinde olması kriterleri belirlenmiştir (91,96).

Tüm bu çalışmalar özellikle beta-laktam antibiyotiklerde otomatize duyarlılık sistemleriyle elde edilen sonuçların bu kriterleri karşılamakta yetersiz kaldığını, duyarlı veya dirençli, tüm sonuçların klasik standardize yöntemlerle doğrulanması gerektiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda MicroScan/WA otomatize duyarlılık sisteminin imipenem için referans yöntemlerle uyumu karşılaştırıldığında en yüksek uyumu %64,5 ile sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle gösterdiği görülmüştür. Disk difüzyon yöntemiyle uyumu %41, agar dilüsyon yöntemiyle uyumu %50 bulunmuştur. Çok büyük hata oranları disk difüzyon ile kıyaslandığında %10, agar dilüsyon ile karşılaştırıldığında %6,5 ve sıvı mikrodilüsyonla karşılaştırıldığında %4 bulunmuştur. Büyük hata oranları kıyaslandığında aynı yöntemler için sırasıyla %0,5, %0,5 ve %1 olarak saptanmıştır. Küçük hata oranları ise yine sırasıyla %48,5, %43 ve %30,5'dir.

MicroScan/WA otomatize duyarlılık sisteminin meropenem için referans yöntemlerle uyumu karşılaştırıldığında ise disk difüzyon ile %84, agar dilüsyon ile %86, sıvı mikrodilüsyon ile %86,5 uyumlu bulunmuştur. Çok büyük hata oranları sırasıyla %2, %1,5 ve %1,5, büyük hata oranları sırasıyla %2,5, %1,5 ve %1,5 olarak saptanırken küçük hata oranları sırasıyla %11,5, %11, %10,5'dur. Çalışmamızın sonuçları, oranlar farklılık göstermekle birlikte yapılan çalışmalarla uyumludur. Referans yöntemlerle saptanan duyarlılık oranları aynı iken orta derecede duyarlı ve dirençli saptama oranları farklılık göstermiştir. Bu farklılık referans yöntemlerin kendi aralarındaki uyumu etkilememiş ancak otomatize sistemle karşılaştırıldığında çok büyük hata oranını yükseltmiştir. Örneğin imipenem için genel olarak sıvı mikrodilüsyon ile saptanan MİK değerleri, agar dilüsyon yönteminde saptanan MİK değerlerine göre bir dilüsyon düşük bulunmuş bu durum iki referans yöntem arasında uyumsuzluk yaratmazken otomatize sistem agar dilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında çok büyük hata ve küçük hata oranının daha yüksek bulunmasına neden olmuştur. Yine disk difüzyon yöntemiyle izolatlar diğer iki referans yöntemine göre daha dirençli saptanmış,

bu durum disk difüzyon testiyle diğer referans testler arasında küçük hatalara neden olurken otomatize sistemle karşılaştırıldığında çok büyük hata oranını yükseltmiştir. Otomatize duyarlılık sisteminin imipenem için duyarlılık oranını yüksek, direnci düşük saptamasının da bu durumda etkisi olduğu düşünülmüştür.

Meropenem için referans yöntemlerle elde edilen duyarlılık oranları birbirine ve imipeneme çok yakın iken otomatize sistemle meropeneme duyarlı tesbit edilen izolat sayısı imipeneme duyarlı izolat sayısının neredeyse yarısı kadardır. Bir başka deyişle otomatize sistem imipenem için duyarlı ve orta derecede duyarlı saptadığı izolatları meropenem için dirençli bulmuştur. Meropenem için otomatize sistemin referans yöntemlerle uyumunun imipeneme göre daha yüksek oluşunda bu durumun da etkisi olduğu düşünülmüştür. Mikroorganizma hem karbapenemleri inaktive eden enzim salgılayabilir hem de porin değişiklikleriyle karbapeneme direnç gösterebilir. Bu gibi mikroorganizmalar cihaz tarafından ilaca duyarlı tesbit edilir ancak aslında dirençlidir (109). Fakat bu durum her iki karbapenem için de geçerlidir. Yakın zamanda *A.baumannii*'de, *P.aeruginosa*'daki imipenem direncinden yüksek oranda sorumlu olan Opr D'nin homoloğu olan 43 kDa ağırlığında bir proteinin tanımlanmış olduğu düşünüldüğünde, sistemin imipenem direncini belirleyememesinde meropenemden farklı direnç mekanizmalarının söz konusu olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çok büyük hata ve küçük hata oranları imipenemde daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu da yukarıda bahsi geçen çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Son yıllarda *A.baumannii* suşlarında metallo beta laktamaz üretiminin artışı beta laktamlara dünya çapında ürkütücü boyutta direnç ortaya çıkarmıştır. MBL'lar kritik hastalarda dirençli suşlarla ortaya çıkan enfeksiyonlarda kimi zaman eldeki tek silah olan karbapenemlere de direnç gelişimine neden olmaktadır. Yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesinin zor ve zaman alıcı olduğu düşünüldüğünde çoğul dirençli gram negatif basillerin yanı sıra MBL üreten suşlarla tedaviye yanıtız, mortalite ve morbiditesi yüksek ve kontrol edilemeyen salgınlar olması beklenmektedir. MBL üreten

suşların erken tesbiti gelecekte büyük sorunlara yolaçabilecek bu kontrolsüz yayılımı engelleyebilecektir (99). MBL'ların saptanmasında genotipik yöntemler altın standart kabul edilmekle birlikte bu testler zor, zaman alıcı ve pahalı olduğundan her laboratuvarda rahatlıkla uygulanamaz. Bu nedenle tıpkı GSBL'de olduğu gibi hızlı, kolay ve güvenilir fenotipik tarama yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Bu konuda henüz CLSI tarafından önerilen standardize bir fenotipik yöntem yoktur.

Lee ve ark. imipenem ve/veya seftazidim dirençli *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarında kombine disk difüzyon yöntemini PCR ile karşılaştırmışlar ve VIM tipi MBL üretimini belirlemede yüksek oranda duyarlı (%93,9) saptarken IMP tipi MBL üretimini belirlemede başarısız bulmuşlardır(120). Yan ve ark. *P.aeruginosa* suşları için kombine disk yönteminin duyarlılığını %87, özgüllüğünü %96,7 bulmuşlar ve 4µg/ml üzerinde MİK değerine sahip tüm izolatlarda kombine disk yönteminin MBL üretimini tesbit edebildiğini göstermişlerdir(121). Pitout ve ark. imipenem ve meropenemi tek başlarına ve değişen konsantrasyonlarda EDTA ile kombine edilmiş olarak *P.aeruginosa* izolatlarında MBL üretimini tesbit etmek için kullanmış ve sonuçları PCR ile karşılaştırmışlardır. Meropenem/EDTA disk yöntemi için duyarlılığı %100, özgüllüğü %97, imipenem için duyarlılığı %96, özgüllüğü %91 saptamışlardır (99). Jesudason ve ark. imipenem dirençli 85 nonfermentatif gram negatif basilin %56'sında modifiye Hodge testiyle MBL üretimi saptamışlardır. Ayrıca bu testin basit bir test olmakla birlikte nadiren yalancı pozitiflik verebildiğini ve bu sorunun, besiyerine çinko ilavesiyle giderilebileceğini de belirtmişlerdir (110). Lee ve ark. bir başka çalışmalarında modifiye Hodge testiyle seftazidim dirençli *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarının %66,6'da MBL üretimi tesbit etmişler ve yöntemin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %88 olarak belirlemişlerdir (111). MBL sıklığı ülkeden ülkeye hatta merkezden merkeze değişmektedir. Kore'de yapılan çok merkezli bir çalışmada imipenem dirençli *Acinetobacter* türlerinin %14,2'sinde MBL üretimi saptanmıştır (112). Tognim ve ark.73 karbapenem dirençli *A.baumannii* izolatının %55'inde MBL üretimi saptamışlardır (113).

Japonya'da yapılan bir çalışmada ise seftazidim dirençli *Acinetobacter* suşlarında MBL sıklığı %1,9 olarak saptanmıştır(114). Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında Toraman ve ark. karbapenem dirençli *Acinetobacter* türlerinin %21'inde imipenem/imipenem EDTA E test şeritleriyle fenotipik olarak MBL üretimi saptamışlardır (115). Fidan ve ark. ise *P.aeruginosa* suşlarında MBL üretimini çift disk sinerji ve modifiye Hodge testlerinin her ikisiyle de %5 bulmuşlardır (116). Eser ve ark. çalışmalarında kombine disk difüzyon testiyle *A.baumannii* izolatlarındaki MBL pozitifliğini %51,6 saptamışlardır (117). Sarı ve ark'nın karbapenem dirençli gram negatif nonfermentatif basillerle yaptıkları çalışmada suşların %89'u modifiye Hodge testiyle, %96'sı kombine disk difüzyon yöntemiyle MBL üretimi açısından pozitif bulunmuştur(118).

Bizim çalışmamızda karbapenem dirençli *A.baumannii* kombine disk difüzyon testiyle %48,55, modifiye Hodge testiyle %51,09 MBL pozitifliği saptanmış olup sonuçlar açısından iki fenotipik yöntem uyumlu bulunmuştur. Ülkeye ve merkeze göre değişmekle birlikte genel olarak değerlendirildiğinde dünyada ve ülkemizde MBL pozitifliğinin sıklığındaki artış dikkat çekicidir. Fenotipik yöntemler yaygın olarak kullanılan güvenilir yöntemler olmakla beraber sonuçların altın standart kabul edilen moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir. Ancak genotipik yöntemler zorluğu nedeniyle ancak referans laboratuvarlarında ve araştırma amacıyla kullanılabilir.

Bu çalışmada MBL'ların saptanması için kullanılan yöntemler fazla ekipman gerektirmeyen, basit ve pratik olarak uygulanabilecek etkili ve güvenilir tarama yöntemleridir. Rutin hale getirilerek MBL 'ların erken tesbiti ile enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması ve kontrolsüz antibiyotik kullanımının azaltılması sayesinde direnç yayılımının engellenmesinin yanı sıra hastanın tedavisine da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

6.SONUÇLAR

- 1) Çalışma kapsamına alınan 2005-Aralık 2007 tarihleri arasında tamamı yatan hastalardan izole edilmiş, 200 adet *A. baumannii* izolatının 18'i(%9) dahiliye, 20'si(%10) pediatri, 25'i(%12,5) cerrahi, 21'i(%10,5) göğüs hastalıkları 12'si (%6) ortopedi, 17'si (%8,5) beyin cerrahisi, 23'ü (%11,5) anestezi, 13'ü (%6,5) dahiliye yoğun bakım, 20'si (%10) cerrahi yoğun bakım,14'ü (%7) pediatri yoğun bakım, 17'si(%8,5) diğer servislerden gelen klinik örneklerden soyutlanmıştır.
- 2) Klinik örneklerin 35'i(%17,5) endotrakeal aspirat, 29'u(%14,5) kan, 12'si(%6) kateter, 66'sı(%33) yara yeri, 5'i(%2,5) balgam, 15'i(%7,5) idrar, 10'u(%5) entübasyon tüpü, 17'si(8,5) bronkoalveoler lavaj, 1'i(%0,5) beyin omurilik sıvısı, 10'u(%5) diğer örneklerden oluşmaktadır.
- 3) Farklı yöntemlerle elde edilen sonuçlar hastanemizde izole edilen *A.baumannii* suşlarında karbapenem direncinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu yükseklikte; dirençli suşların hastalar arasında yayılımı ve uygunsuz antibiyotik kullanımı gibi etkenlerin de katkısının olduğu düşünülmektedir. Düzenli sürveyans verilerini esas alan kısıtlı antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmesi, antiseptik ve dezenfektan kullanım politikalarına titizlikle uyulması direnç yayılımını engellemede yardımcı olacaktır.
- 4) Otomatize sistemle *A.baumannii* izolatlarında karbapenemler için elde edilen antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının FDA tarafından önerilen kriterlere uymadığı görülmektedir. Microscan/WA sisteminin meropenemdeki performansı daha iyi bulunmakla beraber her iki antimikrobiyal için de sonuçların standardize bir yöntemle doğrulandıktan sonra klinisyene bildirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.
- 5) Bu çalışmada MBL'ların saptanması için kullanılan yöntemler fazla bir ekipman gerektirmeyen, basit ve pratik olarak uygulanabilecek etkili ve güvenilir tarama yöntemleridir. Rutin hale getirilerek MBL 'ların erken tesbiti ile enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması ve kontrolsüz

antibiyotik kullanımının azaltılması sayesinde direnç yayılımının engellenmesinin yanı sıra hastanın tedavisine de katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

- 6) Karbapenem dirençli izolatlarımızda MBL üretimi sıklığının dikkat çekici şekilde yüksek olduğu görülmüştür. Fenotipik yöntemlerle saptanan bu sonuçların moleküler yöntemlerle doğrulanması sonucu hastanemizdeki *A.baumannii* suşlarındaki MBL sıklığı kesin olarak belirlenebilecektir.
- 7) *Acinetobacter* enfeksiyonlarının sorun olduğu birimlerde diğer hastane ilişkili enfeksiyonlarda olduğu gibi düzenli bir sürveyans yapıp elde edilen veriler ışığında kontrol politikaları geliştirilmelidir. Sürveyans esnasında yatan hasta ve personelden klinik örnekler yanında çevre kültürleri de yapılmalıdır. Düzenli sürveyans verilerini esas alan kısıtlı antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmelidir. Antiseptik ve dezenfektan kullanım politikalarına titizlikle uyulmalıdır. *Acinetobacter* türleri yaralarda kolonize olduğunda polimiksin B topikal olarak, akciğer kolonizasyonu ve enfeksiyonlarında inhalasyonla kullanılabilir. Sindirim sisteminde kolonizasyon varlığında seçici dekontaminasyon için polimiksin B veya emilmeyen aminoglikozidler kullanılabilir. Ağır çevre kontaminasyonu varlığında ilgili birim kapatılıp terminal dezenfeksiyon işlemi uygulanmalıdır (13).

KAYNAKLAR

1. Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Accuracy of Three Automated Systems (MicroScan WalkAway, VITEK and VITEK 2) for Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* against Five Broad-Spectrum Beta-Lactam Agents. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:1101-1104.
2. Tsakris A, Pantazi A, Pournaras S, Maniatis A, Polyzou A, Sofianou D. Pseudo-Outbreak of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Resulting from False Susceptibility Testing by a Rapid Automated System. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:3505-3507.
3. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:3471-3483.
4. Berezin EB, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9:148-165.
5. Richet H, Fournier PE. Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter baumannii*: A Major Threat Worldwide. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2006; 27: 7.
6. Van Looveren M, Goossens , ARPAC Steering Group. Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter spp* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004;10:684-704.
7. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manuel of Clinical Microbiology*; 8 th edition 2003. p: 750-751.
8. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006, p:353-357.
9. Baron EJ, Pterson LR, Tenover FC. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 9 th Ed., St. Lois, Missouri, Mosby-Year book, Inc. 1994; 400-401.
10. Henriksen SD. *Moraxella, Neisseria, Branhamella and Acinetobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1976; 30: 63-83.
11. Getchell-White SI, Donowitz LG, Groschel DH. The Inanimate Environment of an Intensive Care Unit as a Potential Source of

- Nosocomial Bacteria: Evidence for Long Survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 1989; 10:402-407.
12. Marchaim D, Venezia SN, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ Carmeli Y. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 2007;45: 1551-1555.
 13. Vahaboğlu H. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar. 2004; 20-26.
 14. Javad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J Hawkwy PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surface: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:1938-1941.
 15. Joly-Guillou ML. Clinical Impact and Pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin. Microbiol. Infect. Disease .2005;11:868-873.
 16. Arman D, Leblebicioğlu H. İnfeksiyon Hastalıkları Tedavi Dizisi 9. 2004: 9-86.
 17. Hauser AR, Sriram P. Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. Tackling the Conundrum of Drug Resistance. Postgrad Med 2005;117: 41-48. .
 18. Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist Updat 2000;3: 247-255.
 19. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* . PLoS Genet. 2006;2:e7.
 20. Murray BE, Moellering RC. Evidence of Plasmid Mediated Production of Aminoglycoside Modifying Enzymes not Previously Described in *Acinetobacter* . Antimicrob. Agents. Chemother. 1980;17:30-36.
 21. Devaud M, Kayser FH, Bachi B. Transposon Mediated Multiple Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* Strains. Antimicrob. Agents. Chemother. 1982; 22: 323-329.
 22. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase Over Expression Resulting From Insertion of IS_{ABA} in *Acinetobacter baumannii*. Clin. Microbiol Infect. 2006;12:123-130.

23. Babic M, Hujer MA, Bonomo RA. What's New in Antibiotic Resistance? Focus on Beta-Lactamases. *Drug Resistance Updates*. 2006;9: 142-156.
24. Vila J, Marcos A, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R, Gomez RL, Jimenez de anta T. In-vitro Antimicrobial Production of Beta-Lactamases Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Chloramphenicol Acetyltransferase by and Susceptibility of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 1993; 37: 138-141.
25. Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboğlu H. PER-1 is Still Widespread in Turkish Hospitals Among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* *FEMS Microbiol. Lett.* 2005 ; 249: 241-245.
26. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y and Bauernfeind A. High Prevalance of PER-1 Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Acinetobacter spp.* In Korea. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2004;47: 1749-1751.
27. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PN, Craft DW, Fishbain JT, Ewell MR, Jacobs D, Peterson DL, Bonomo RA. Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter sp* Isolates From Military and CivillanPatients Treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2006; 50: 4114-4123.
28. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular Characterization of SPM-1a Novel Metallo-beta-lactamase Isolated in Latin America: Report From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J. Antimicrob. Chemoter.* 2002;50: 673-679
29. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galenli M, Amicosante G, Frere JM, Bush K, Rossolini GM. On Functional and Structural Heterogeneity of VIM-type Metallo BetaLactamases. *J. Antimicrob. Chemoter.* 2003; 51: 257-266.
30. Zhiyong Z, Xiaoju L, Yanyu G. Metallo- β -Lactamases of Non-fermenting Gram Negative Bacteria. *Rev. Medical Microbiol.* 2003; 14: 79-93.
31. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β Lactamases: The Quiet Before the Storm? *Clin. Microbol. Rev.* 2005; 18(2): 306-321.

32. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem Hydrolyzing BetaLactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997;41:223-232.
33. Walsh TR, MacGowen AP, Bennett PM. Sequence Analysis and Enzyme Kinetics of the L2 Serine β Lactamase From *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 1460-1464.
34. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999;35:147-151.
35. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. Multifocal Outbreaks of Metallo-Beta-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Resistant to Broad Spectrum β Lactams, Including Carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 349-353.
36. Towner KJ, Gee T, Boswell T. An Unwanted Import to the UK: a Carbapenem Resistant Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii* Producing Metallo-Beta-Lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002;50:1092-1093.
37. Tysall L, Stockdale MW, Chadwick PR, Palepou MF, Towner KJ, Livermore DM, Woodford N. MP-1 Carbapenemase Detected in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate From the UK. *J. Antimicrob.* 2002;49: 217-218.
38. Walsh TR. The Emergence and Implications of Metallo-Beta-Lactamases in Gram Negative Bacteria. *Clin Microbiol. Infect.* 2005;11: 2-9.
39. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimkawa K, Sueyoshi N, Ura T, Satoh K, Toyokawa M, Nakamura T, Wada Y, Orita T, Kofuku T, Yamasaki K, Sakamoto M, Kinoshita S, Aihara M, Arakawa Y. Metallo- β -Lactamase Producing Gram Negative Bacilli: Laboratory-Based Surveillance in Cooperation With 13 Clinical Laboratories in the Kinki Region of Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 5256-5263.
40. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and Characterization of *blaVIM* a New Integron-Borne Metallo-Beta-Lactamase Gene From a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 1584-1590.
41. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perili M, Coli A, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Nosocomial Infections Caused by Multidrug-Resistant Isolates of *Pseudomonas putida*

- Producing VIM-1 Metallo-Beta-Lactamase. *J.Clin. Microbiol.* 2002; 40: 4051-4055.
42. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem Hydrolysing Metallo-Beta-Lactamase From a Nosocomial Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg. Infect. Dis.* 2000; 6: 84-85
 43. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, Rossolini GM, Chong Y. Molecular Characterization of Metallo-Beta-Lactamase Producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 From Korea: Identification of Two New Integrons Carrying the bla (VIM-2) Gene Cassettes. *J.Antimicrob. Chemother.* 2002; 49: 837-840
 44. Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical Characterization of the Acquired Metallo-Beta-Lactamase SPM-1 From *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 582-587.
 45. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular Characterization of a Beta-Lactamase Gene, bla_{GIM-1} Encoding a New Subclass of Metallo-Beta -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 4654-4661.
 46. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel Acquired Metallo-Beta-Lactamase Gene bla_{SIM-1} in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 4485-4491.
 47. Livermore DM. Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8: 567-584.
 48. Payne DJ, Hueso-Rodriguez JA, Boyd H, Concha NO, Janson CA, Gilpin M, Bateson JH, Cheever C. Identification of a Series of Tricyclic Natural Products as Potent Broad Spectrum Inhibitors of Metallo-Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 1880-1886.
 49. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of Multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases.* 2006; 43: 49-53.
 50. Brown S, Amies S.J. OXA Beta-Lactamases in *Acinetobacter* :The Story so Far. *Antimicrob. Chemother.* 2006; 57: 1-3.
 51. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH. Investigation of a Nosocomial Outbreak of Imipenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 β -Lactamase in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 2241-2245 .

52. Coelho J, Woodford N, Afzal-Sahah M, Livermore D. Occurance of OXA-58 Like Carbapenemases in *Acinetobacter spp* Collected Over 10 Years in Three Continents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2006; 50: 756-758 .
53. Marque S, Poirel L, Heritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P. Regional Occurance of Plasmid Mediated Carbapenem-Hidrolyzing Oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter spp* in Europe. *J.Clin Microbiol.* 2005; 43: 4885-4888.
54. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis LJ, Tsakris A. Outbreak of Multiple Clones of Imipenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Expressing OXA-58 Carbapenemase in an Intensive Care Unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57: 557-561.
55. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mecanisims and Epidemiology. *Clin. Microbiol.Infect.* 2006; 12: 826-836.
56. Lomowskaya O, Warren MS, Lee A. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* : Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 105-116 .
57. Saier MH, Paulsen IT. Phylogeny of Multidrug Transporters. *Seminars in Cellular and Developmental Biology.* 2001; 12: 205-213.
58. Magnet S, Courvali P, Lambert T. Resistance –Nodulation –Cell Division Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2001;45: 3375-3380.
59. Courvalin P, Carlier C. Resistance Towards Aminoglycoside-Aminocyclitol Antibiotics in Bacteria. *J.Antimicrob. Agents.* 1981;8:57-69.
60. Nemeč A, Dolzani L, Brisse S, Van Den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of Aminoglycoside-Resistance Genes and Their Association With Class 1 Integrons Among Strains of Pan-European *Acinetobacter baumannii* Clones. *J.Med. Microbiol.* 2004; 53: 1233-1240.
61. Seward RJ. Detection of Integrons in Worldwide Nosocomial Isolates of *Acinetobacter spp*. *Clin. Microbiol. Infect.* 1999; 5: 308-318.
62. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular Epidemiology of Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter spp*. *J.Med. Microbiol.* 1998;47: 455-462.

63. Doi Y, Wachino J, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Sibayama K, Kato H, Arakawa Y. Spread of Novel Aminoglycoside Resistance Gene *aac(6')* –*lad* Among *Acinetobacter* Clinical Isolates in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:2075-2080.
64. Hooper DC. Mechanisms of Fluoroquinolones. *Drug Resistance Updates.* 1999;2:38-55.
65. Robicsek A, Sahm DF, Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC. Broader Distribution of Plasmid Mediated Quinolone Resistance in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 3001-3003.
66. Nordmann P, Poirel L. Emergence of Plasmid-Mediated Resistance to Quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56: 463-469.
67. Heineman B, Wisplinghoff H, Edmond M, Seifert H. Comparative Activities of Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin and Trovafloxacin Against Epidemiologically Defined *Acinetobacter baumannii* Strains. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2000; 44: 2211-2213.
68. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and In-vitro Transfer of Tetracycline Resistance Determinants in Clinical and Aquatic *Acinetobacter* Strains. *J. Med. Microbiol.* 2000; 49: 929-936.
69. Ribera A, Ruiz J, Vila J. Presence of the Tet M Determinant in a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2310-2312.
70. Moore IF, Hughes DW, Wright GD. Tygecycline is Modified by the Flavin-Dependent Monooxygenase TetX. *Biochemistry.* 2005; 44: 11829-11835.
71. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC Multidrug Efflux Pump is Associated With Decreased Susceptibility to Tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 59: 1001-1004.
72. Urban C, Mariano J, Rahal J, Tay E, Ponio C, Koprivnjak T, Weiss J. Polymyxin B Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate Susceptible to Recombinant BPI and Cecropin P1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 994-995.

73. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L. Heteroresistance to Colistin in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 2946-2950.
74. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A. Heteroresistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 55: 1055-1056.
75. Chastre J. Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.* 2003; 24: 69-77.
76. Aksaray S, Dokuzoğuz B, Güvener E. Surveillance Study of Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Isolates From Intensive Care Units in Eight Hospitals in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 45: 695-699.
77. Günseren F, Mamıkoğlu L, Öztürk S. Surveillance Study of Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Bacteria Isolated From Intensive Care Units in Eight Hospitals in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 43: 373-378.
78. D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The Importance of Cross-Transmission. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 2000; 21: 588-591.
79. Das I, Lambert P, Hill D, Noy M, Bion J, Eliot T. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* and Role of Curtains in an Outbreak in Intensive Care Units. *Journal of Hospital Infection.* 2002; 50: 110-114.
80. Zaragoza R, Artero A, Camarena JJ, Sancho S, Gonzales R, Nogueira JM. The Influence of Inadequate Empirical Antimicrobial Treatment on Patients With Bloodstream Infections in an Intensive Care Unit. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003; 9: 412-418.
81. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. *Antibiyotikler.* 2003: 275-286.
82. Bimbaum J, Kahan FM, Kroop H. Carbapenems a New Class of Beta-Lactam Antibiotics: Discovery and Development of Imipenem-Cilastatin. *Am. J. Med.* 1985; 78 (suppl 6A): 3-21.
83. Yang B, Bhached N, Bush K. Biochemical Comparison of Imipenem Meropenem and Biapenem: Permeability, Binding to Penicillin – Binding Proteins and Stability to Hydrolysis by Beta-Lacmases. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 35: 75-84.
84. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of Beta Lactam Antibiotics. *Pharmacol Ther.* 1985; 27: 197-231.

85. Dreetz M, Hamacher J, Eller J. Serum Bactericidal Activities and Comperative Pharmakokinetics of Meropenem and Imipenem-Cilastatin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 105-109.
86. Edwards JR. Meropenem: A Microbiological Overview. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 36 (suppl A) :1-17.
87. Gür D. Beta laktamazlar. *Flora.* 1997; 283: 3-16.
88. White Friedrich L, Burgess D, Warkentin D, Bosso J. Comperative in vitro Pharmacodynamics of Imipenem and Meropenem Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1996; 40: 904-908.
89. Wolff M, Joly-Guillou ML, Farinotti R, Carbon C. In-vivo Efficacies of Combinations of Beta-Lactams, Beta-Lactamase Inhibitors and Rifampin Against *Acinetobacter baumannii* in a Mause Pneumonia Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 1406-1411.
90. Cohen ML. Epidemiology of Drug Resistance; Implications for a Antimicrobial Era. *Science* 1992; 257: 1050-1055.
91. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manuel of Clinical Microbiology*; 8 th edition 2003. p: 191-217
92. NCCLS M7- A6: Aerob Üreyen Bakteriler İçin Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobik Duyarlılık Testleri. 2003. Cilt :23, Sayı: 2.
93. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principle and Contemporary. *Clinical Infectious Diseases* 1998;26:973-980
94. CLSI M2-A9: Antimikrobik Disk Duyarlılık Testlei İçin Uygulama Standartları; Onaylanmış Standart Dokuzuncu Baskı. 2006. Cilt: 26, Sayı:1.
95. Hasçelik G. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı , 13-15 Nisan 2006. İstanbul: 43-50.
96. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2001: Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved guideline 2 nd ed. Document M23-A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
97. Stager CE, Davis JR. Automated Systems for Identification of Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992; 5: 302-327.

98. Andrews JM. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 48, Suppl. S1:5-16.
99. Pitout J D D, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Lee P, Church L. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo- β -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 3129-3135.
100. Lee K, Lim S, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 4623-4629.
101. Quinn JP. Clinical Problems Posed by Multiresistant Nonfermenting Gram Negative Pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 27 (Suppl 1) : 117-124.
102. Afzal-Shah M, Livermore DM. Worldwide emergence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter spp*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 41: 576-577.
103. Günseren F, Mamikoğlu L, Öztürk S.A. Surveillance Study of Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Bacteria Isolated From Intensive Care Units in Eight Hospitals in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 43: 373-378.
104. Aksaray S, Dokuzoğuz B, Güvener E. Surveillance of Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Isolates from Intensive Care Units in Eight Hospitals in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 45:695-699.
105. York MK, Brooks GF, Fiss EH. Evaluation of The autoSCAN-WA Rapid System for Identification and Susceptibility Testing of Gram-Negative Fermentative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 2903-2910.
106. FC Tenover, Kalsi KL, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, Rasheed JK, Biddle JW, McGowan JE, Hana B. Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Not Detected by Automated Susceptibility Testing. *Emerg. Infect. Diseases.* 2006; 12: 1209-1212.
107. Zarakolu P, Özçakır O, Haşçelik G, Ünal S. Comparison of BD Phoenix Automated System and E Test to Broth Microdilution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Multiple Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp*. 17'th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany. 31 Mar-4 Apr 2007. 1733-1128.

108. Juretschko S, LaBombardi VJ, Lerner SA, Schreckenberger PC, *Pseudomonas* AST Study Group. Accuracies of β -Lactam Susceptibility Test Results for *Pseudomonas aeruginosa* With Four Automated Systems (BD Phoenix, MicroScan/WalkAway, Vitek and Vitek 2. J. Clin. Microbiol. 2007; 45: 1339-1342.
109. Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, Stocker SA, Williams PP, Gaynes RP, McGowan JE, Tenover FC. Antimicrobial Susceptibility Testing of Carbapenems: Multicenter Validity Testing and Accuracy Levels of Five Antimicrobial Test Methods for Detecting Resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 351-358.
110. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of Two Methods to Detect Carbapenemase and Metallo Beta Lactamase Production in Clinical Isolates. Indian J. Med. Res. 2005; 121: 780-783.
111. Lee K, Chong Y, Shin HB. Modified Hodge Test and EDTA Disc Synergy Tests to Screen Metallo Beta Lactamase Producing Strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* Species. Clin. Microbiol Infect. 2001; 7: 88-91.
112. Lee K, Lee WG, Uh Y. VIM and IMP Type Metallo Beta Lactamase Producing *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9: 868-871.
113. Tognim M C B, Gales AC, Penteado AP, Silberd S, Sader HS. Dissemination of IMP-1 Metallo β Lactamase Producing *Acinetobacter* Species in a Brazilian Teaching Hospital. Infect. Cont. Hospital Epidemiology. 2006; 27: 742-747.
114. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, Satoh K, Toyokawa M, Nakamura T, Wada Y, Orita T, Kofuku T, Yamasaki K, Sakamoto M, Kinoshita S, Aihara M, Arakawa Y. Metallo β Lactamase Producing Gram Negative Bacilli: Laboratory Based Surveillance in Cooperation with 13 Clinical Laboratories in the Kinki Region of Japan. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 5256-5263.
115. Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında Metallo Beta Laktamaz Araştırılması. İnfeksiyon Dergisi. 2005; 19(1) : 101-105.
116. Fidan I, Gürelik FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve Metallo Beta Laktamaz Sıklığı. ANKEM 2005; 19 (2): 68-70.

117. Eser Ö, Ergin A, Hasçelik G. *Acinetobacter* türlerinde Antimikrobiyal direnç ve Metallo Beta Laktamaz Yapımı. 32. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Özet Kitabı, 12-16 Eylül 2006, Antalya, P150.
118. Sarı H, Özer S, Genç S, Batirel A, Balkan İ İ, Karagöz G. Karbapenemlere Dirençli Gram Negatif Basil İzolatlarında İmipenem-EDTA/Meropenem-EDTA Disk Yöntemi ve Modifiye Hodge Testiyle Metallo Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması. *Flora*. 2007; 12: 176-184.
119. Andrews JM. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 48, Suppl. S1:5-16.
120. Oh E, Lee S, Park Y, Park J, Park K, Kim S, Kang M, Kim B. Prevalance of Metallo Beta Lactamase Among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University Hospital and Comparison of Screening Methods for Detecting Metallo Beta Lactamase. *J. Microbiol. Methods*. 2003; 54: 411-418.
121. Yan J, Wu J, Tsai S, Chuang C. Comparison of the Double Disk, Combined Disk and E Test Methods for Detecting Metallo Beta Lactamases in Gram Negative Bacilli. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 49: 5-11.