



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ACINETOBACTER BAUMANNII* BAKTERİYEMİSİ:
EPİDEMİYOLOJİ VE KÖKENLERİN ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatma Mutlu SARIGÜZEL

KAYSERİ – 2008



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ACINETOBACTER BAUMANNII* BAKTERİYEMİSİ :**
EPİDEMİYOLOJİ VE KÖKENLERİN ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatma MUTLU SARIGÜZEL

Danışman
Prof. Dr. A. Bülent SÜMERKAN

KAYSERİ – 2008

TEŞEKKÜR

Eđitim d6nemim süresince değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, aynı zamanda bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen başta değerli hocam Prof.Dr. A. Bülent SÜMERKAN olmak üzere Prof.Dr.Yusuf ÖZBAL'a, Prof.Dr. Hüseyin KILIÇ'a, Prof.Dr. A. Nedret KOÇ'a, Doç.Dr. Selma GÖKAHMETOđLU'na, Doç.Dr. Duygu PERÇİN'e, Uzm.Dr. Mustafa ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın klinik aşamasında ve istatistiksel analizi için katkılarından dolayı Yrd.Doç. Dr. Gökhan METAN' a teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Merkez laboratuvarı bakteriyoloji çalışanlarına ve araştırma görevlisi arkadaşlarımlın asistanlık eğitimim boyunca yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana verdikleri destek için annem, babam ve kardeşlerime; sevgisi ve ilgisiyle hep yanımda olan eşim Uz.Vet. Hekim Yzb. Devrim SARIGÜZEL' e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Taksonomi ve Tarihçe	3
2.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler	4
2.3. Patogenez ve Virulans	5
2.4. Epidemiyoloji	6
2.5. Acinetobacter Enfeksiyonları	7
2.6. Acinetobacter Enfeksiyonlarının Tedavisi	7
2.7. Metallo- Beta- Laktamazlar (MBL)	8
2.7.1. Metallo-beta-laktamazların sınıflandırılması:	8
2.7.1.1. Kromozomal Kodlanan MBL' ler:	9
2.7.1.2. Transfer Edilebilen MBL' ler	10
2.7.1.2.1. İMP Tipi MBL' ler	10
2.7.1.2.2. VIM Tipi MBL' ler	12
2.7.1.2.3 SPM- 1 Tipi MBL' ler	13
2.7.1.2.4. GIM- 1 Tipi MBL' ler:	13
2.8. MBL enzim üretiminin gösterilmesi	13
2.8.1. Fenotipik MBL Tespit Yöntemleri:	14

2.8.1.1. Kombine Disk Diffüzyon Testi:	14
2.8.1.2. Modifiye Hodge testi	14
2.8.1.3. Çift Disk Sinerji Testi	14
2.8.1.4. E- test	15
2.8.1.5. Mikrodilüsyon Yöntemi	15
2.8.2. Genotipik MBL enzim üretiminin gösterilmesi	15
2.8.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Hastalar ve Kan Kültürü Örnekleri	18
3.2. Bakterilerin Tanımlanması	19
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	19
3.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi	19
3.3.2. E-test Yöntemi	19
3.4. Sinerji Yöntemi	20
3.5. MBL enzim üretiminin gösterilmesi	20
3.5.1. İmipenem/ imipenem-EDTA, meropenem/ meropenem-EDTA içeren kombine disk yöntemi	20
3.5.2. MBL E-test yöntemi	21
3.5.3. Modifiye Hodge Testi	21
3.5.4. Acinetobacter baumannii' nin bla-VIM-1 ve bla-IMP-1 Genlerinin PZR İle Araştırılması	21
3.5.5. Nükleik asit izolasyonu	22
3.5.6. Bakteri kültürlerinden nükleik asit izolasyon prosedürü	22
3.5.7. DNA Amplifikasyonu	23
3.5.8. Testin uygulanması	24
3.6. İstatistiksel analiz	26

4. BULGULAR	27
4.1. Hasta Bilgilerinin Analizi	27
4.2. Suşların Duyarlılık Sonuçları	30
4.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi	30
4.2.2 E-test Yöntemi	30
4.2.3 Sinerji Yöntemi	31
4.2.4 Çoğul Direnç	32
4.3. MBL enzim üretiminin gösterilmesi	32
4.3.1 Fenotipik Testlerle MBL enzim üretiminin gösterilmesi.....	32
4.3.2 Genotipik Yöntemle MBL enzim üretiminin gösterilmesi	33
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR	46
7. KAYNAKLAR	48
KABUL ONAY SAYFASI	59

KISALTMALAR

MBL	: Metallo- beta- laktamaz
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
2- MPA	: 2- merkaptopropionik asit
SMA	: Sodyum merkaptoasetik asit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
FİK	: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
SIRS	: Sistemik enflamatuvar yanıt sendrom
BSAC	: British Society for Antimicrobial Chemotherapy
SPSS	: Statistical Package For Social Sciences
KİT	: Kemik iliği transplantasyonu
DM	: Diabetes mellitus
HM	: Hematolojik malignensi
IP-CPS	: İmipenem - sefoperazon/ sulbaktam
MP-CPS	: Meropenem - sefoperazon/ sulbaktam

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. <i>Acinetobacter</i> spp. için çeşitli araştırmacılara göre genomik tür ve suş tipleri	4
Tablo 2. Sık saptanan <i>Acinetobacter</i> türlerinin ayırımında kullanılan temel parametreler...	5
Tablo 3. <i>A. baumannii</i> izolatlarının kliniklere göre dağılımı	27
Tablo 4. <i>Acinetobacter baumannii</i> bakteriyemisi olan hastaların verilerinin dağılımı	29
Tablo 5. Suşların disk difüzyon ve E- test yöntemleriyle antibiyotik duyarlılık durumu ...	30
Tablo 6. Suşlarının imipenem, meropenem, ampisilin /sulbaktam, sefoperazon/ sulbaktam, tigesiklin için MIK_{50} ve MIK_{90} değerleri ile MIK aralıkları ve duyarlılık oranları.....	31
Tablo 7. E-test yöntemi ile imipenem - sefoperazon/ sulbaktam ve meropenem- sefoperazon/ sulbaktam kombinasyonlarının sinerjistik aktivitesi.	31

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kombine disk testi ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretimi	32
Şekil 2. MBL E-test ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretimi.....	33
Şekil 3. Modifiye Hodge test ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretimi	33
Şekil 4. Jel elektroforez sisteminde <i>bla_{VIM-1}</i> geninin incelenmesi	34
Şekil 5. Jel elektroforez sisteminde <i>bla_{IMP-1}</i> geninin incelenmesi.	34

ACINETOBACTER BAUMANNII BAKTERİYEMİSİ: EPİDEMİYOLOJİ VE KÖKENLERİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, hastaların kan kültürlerinden izole edilen *A. baumannii* izolatlarının epidemiyolojisi, çeşitli antibiyotiklere *in vitro* etkinliğinin belirlenmesi, karbapenem-sefoperazon/sulbaktam kombinasyonunun suşlar üzerine sinerjistik etkisine bakılması ve fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz (MBL) ürettiği gösterilen suşların PZR ile IMP-1 ve VIM-1 tipi enzim genlerini taşıyıp taşımadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Şubat 2007-Mart 2008 ayları arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinden *A. baumannii* bakteriyemili 100 hasta prospektif olarak çalışmaya alındı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon ve E-test yöntemi, karbapenem-sefoperazon/sulbaktam kombinasyonuna karşı sinerjistik etkisine E-test yöntemi ile bakıldı. Suşların MBL enzimi üretilip üretilmediği kombine disk difüzyon testi, Modifiye Hodge testi (MHT), E-test yöntemleriyle ve PZR ile de araştırıldı.

Bulgular: Suşlarının %73'ü YBÜ'den izole edildi. İleri yaş, hematolojik malignite ve diabetes mellitus, bakteriyemi öncesi hastanede kalış süresi, uygun olmayan ampirik ve kesin tedavi mortalite için risk faktörü olduğu gösterildi. Bakteriyemi odağı bulunamayanlarda mortalite oranı yüksek bulundu. Ölümün %63'ü hastaneye yatışın ilk 14 günü içinde gerçekleşti. İzolatların %62'si karbapenemlere, %37'si çoğul dirence sahipti. Disk difüzyon yöntemi ile %100 ve %41 duyarlılık oranları ile kolistin ve tobramisin, E-test yöntemi ile %100 ve %35 duyarlılık oranları ile tigesiklin ve imipenem en duyarlı antibiyotikler olduğu belirlendi. İzolatların imipenem-sefoperazon/sulbaktam ve meropenem-sefoperazon/sulbaktam kombinasyonları için sırası ile %43 ile %49 oranlarında sinerjistik aktiviteye sahipti. Bu kombinasyonlarda antagonistik aktivite bulunmadı. Suşların %54'nün imipenem/imipenem-EDTA, %59'u meropenem/meropenem-EDTA kombinasyonu, %54'nün MHT, %51'nin E-test yöntemiyle fenotipik olarak MBL ürettiği, PZR ile 15 izolat da *bla_{IMP-1}* geni, üç izolat da

*bla*_{VIM-1} geni gösterildi.

Sonuç: *A. baumannii* suşlarının tigesiklin ve kolistin hariç birçok antibiyotiğe yüksek direnç oranları gösterdiği saptanmıştır. *In vitro* çalışma sonuçlarımıza göre, karbapenem-sulbaktam kombinasyonunun çoğul ilaç dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde bir alternatif olabileceği görülmüştür. Ayrıca MBL üretiminin araştırılması ve sıkı enfeksiyon kontrol programlarıyla direncin yayılımı önlenebilecektir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, çoğul direnç, metallo-beta-laktamaz, sinerji

**ACINETOBACTER BAUMANNII BACTEREMIA: EPIDEMIOLOGY,
ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF STRAINS**

ABSTRACT

PURPOSE: The study aimed at evaluating epidemiology, *in vitro* susceptibilities to various antibiotics, *in vitro* synergistic activity between carbapenems and sulbactam on *Acinetobacter baumannii* strains isolated from blood cultures of patients. This study also aimed at screening IMP-1 and VIM-1 enzyme genes by PCR amongst phenotypically MBL-producing strains.

MATERIAL and METHODS: A prospective study from February 2007 to March 2008 was conducted in Erciyes University Gevher Nesibe Hospitals. The patients who had positive blood culture for *A. baumannii* were included in this study. The antibiotic susceptibility tests were performed with disk diffusion and E-test methods. The *in vitro* synergistic activities of carbapenem-cefoperazone/sulbactam combination on 100 *A.baumannii* strains were carried out by E-test method. The MBL production was investigated with combined disk test (CDT), Modified Hodge Test (MHT), E-test method and PCR.

RESULT: The 73% of *A.baumannii* strains were isolated from intensive care units. Advanced age, hematological malignancy and diabetes mellitus, hospitalization length before the onset of *A.baumannii* bacteremia, inappropriate empirical and exact therapy were associated with mortality amongst patients with *A.baumannii* bacteremia. The mortality rate was higher for the patients with unknown source of bacteraemia. The overall mortality was 63% in 14 days. The 62% of the isoates were resistant to carbapenems, whereas the 37% of them were multidrug-resistance. Of the strains 100% was susceptible to colistin, 41% to tobramycin by using disk diffusion method and 100% was susceptible to tigecycline, 34% to imipenem by using E-test method. The combinations of imipenem-cefoperazone / sulbactam and meropenem-cefoperazone / sulbactam had synergistic activity against 43% and 49% of the strains, respectively. No antagonism was detected with any combination. The MBL production was found to be 54% by imipenem/imipenem-EDTA combination, 59% by meropenem/meropenem-

EDTA combination, 54% by MHT and 51% by E test. The *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-1} genes were demonstrated 15 and 3 of these strains by PCR, respectively.

CONCLUSION: The *A.baumannii* strains were found to be resistant for many antibiotics, except colistin and tigecycline. According to the results of our *in vitro* study, carbapenem-cefoperazone/sulbactam combination can be an alternative for the treatment of infections caused by multidrug-resistant *A.baumannii*. Screening of MBLs production and applying strict infection control programs for these strains are of utmost importance in order to prevent further spread of resistance.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, carbapenem, E-test method, sulbactam, synergy

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Acinetobacter baumannii nozokomiyal enfeksiyonlara ve çoğul ilaç direncinden dolayı yüksek mortaliteye neden olan önemli bir patojendir. Karbapenemler, bakteri tarafından üretilen beta laktamaz enzimlerinin hidrolizine karşı stabil olmaları sebebiyle dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir seçenek olmuştur (1). Ancak son yıllarda karbapenemlere karşı da artan bir direnç sorunu ortaya çıkmaya başlamıştır (2). Direnç nedenleri arasında en sık görülen, bu bakterilerin ürettikleri karbapenemaz enzimleridir. Bu enzimler arasında metallo- beta- laktamaz (MBL) enzimleri en önemli grubu oluşturmaktadır. MBL enzimleri karbapenemler dahil olmak üzere tüm beta-laktam ilaçları hidrolize edebilirler (3). Bu nedenle *A. baumannii* enfeksiyonlarında alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. *A. baumannii*' ye karşı etkili antibiyotiklerden biri de sulbaktam' dır (4). Ampisilin/ sulbaktam ve sefoperazon/ sulbaktam klinik kullanımda olan sulbaktam içeren kombinasyonlardır (4). Kolistin ve tigesiklin çoğul dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında etkili antibiyotiklerdir (5, 6). Ayrıca *A. baumannii* kökenlerinde görülen antibiyotiklere artan direnç oranları bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kombine antibiyotik tedavisini gerektirmektedir (7).

Antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimlerinin anlaşılabilmesi için uygulanan tüm *in vitro* duyarlılık işlemlerine sinerji testleri denilmektedir. Bu amaçla iki boyutlu sulandırım (Dama Tahtası "Chequerboard") yöntemi, öldürme- zaman kinetik yöntemi, difüzyon yöntemi uygulanabilmektedir. Difüzyon yöntemlerinden biri de E-test yöntemidir (8, 9).

MBL' ler, Bush sınıflamasında fonksiyonel grup 3 veya Ambler sınıflamasında sınıf B' de yer alırlar. Bugün için bilinen IMP, VIM, SPM ve GIM tipi MBL' lar tanımlanmıştır. MBL enzimlerinin üretiminden sorumlu genler, integron üzerindeki hareketli gen kasetlerinde yer almakta ve farklı gram negatif bakteri türleri arasında hızla yayılabilmektedir (10). *A. baumannii* suşlarında MBL varlığının belirlenmesi, direnç genlerinin hastane ortamında diğer bakteri türlerine aktarılma olasılığının önlenmesi ve hastalara optimum tedavinin uygulanabilmesi açısından önemlidir. Bu enzimler aktif bölgelerinde Zn⁺² iyonu taşıdıklarından tanımlanmalarında bu iyona bağlanarak enzimi inaktive eden etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), 2- merkaptopropionik asit (MPA) ve sodyum merkptoasetik asit (SMA) gibi bileşikler kullanılır (11- 13). MBL üretimi fenotipik olarak imipenem- EDTA/ meropenem- EDTA disk yöntemi, Modifiye Hodge testi, MBL E- test, çift disk sinerji testi ile tespit edilebilir. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)' nin önerdiği MBL testi için standart fenotipik bir yöntem yoktur (14). Fenotipik yöntemler ile yalancı pozitif sonuçlar alınabileceğinden sonuçların doğrulanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve sekanslama gibi genotipik yöntemlerle MBL varlığının ortaya konması gerekmektedir.

Bu çalışmada laboratuvarımızda bakteriyemili hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* izolatlarının

1- Epidemiyolojisi

2- İmipenem, meropenem, tigesiklin, sefoperazon/ sulbaktam, ampisilin/ sulbaktam antibiyotiklerine E- test yöntemiyle duyarlılıkları, sefoperazon/ sulbaktam ve imipenemin, sefoperazon/ sulbaktam ve meropenemin E-test yöntemiyle suşlar üzerine sinerjistik etkisine bakılması

3- Disk difüzyon yöntemiyle izolatların kolistin ve diğer bazı antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması

4- Fenotipik olarak karbapenemaz ürettiği gösterilen suşların PZR ile IMP-1 ve VIM-1 tipi MBL enzim genlerini taşıyıp taşımadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taksonomi ve Tarihçe

Acinetobacter türleri ilk kez Beijerinck tarafından 1911 yılında topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiştir. Günümüze kadar *Micrococcus calcoaceticus*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Alcaligenes*, *B5W*, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii* gibi 15' in üzerinde farklı isimle anılmıştır. ‘‘Bergey’ s Manual of Systematic Bacteriology’’ de 1973 yılında *Acinetobacter calcoaceticus* adlı tek tür olarak *Neisseriaceae* ailesi içinde yer almıştır. Taksonomik çalışmalar sonucu *Acinetobacter* cinsi günümüzde *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilgili diğer cinslerle birlikte *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır (1).

DNA hibridizasyon çalışmalarına göre en az 19 genomik tür tanımlanmıştır. Bunlardan 7 genomik türe isimleri verilirken diğer genomik türler isimlendirilmemiştir. *Acinetobacter* genomik türleri, isimlendirmeleri ve numaraları Tablo 1’ de gösterilmiştir (1). Nemec ve arkadaşları 2001 yılında *A. ursingii* ve *A. schindleri* türlerini tanımlamış ve cins içerisinde tür sayısı 21’ i bulmuştur (15). Grup 1, 2, 3 ve 13TU benzerlik göstermekte ve *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* kompleksi adı altında incelenmektedir. Tüm bu türler arasında en sık enfeksiyonlara yol açan etken *A. baumannii*’ dir (16).

Tablo 1. *Acinetobacter spp.* için çeşitli araştırmacılara göre genomik tür ve suş tipleri (1)

Tür	Bauvet ve ark.	Tjernberg ve ark.	Nishimura ve ark.	Suş tipi
<i>A. calcoaceticus</i>	1	1	1N	ATCC23055
<i>A. baumannii</i>	2	2	1N	CIP70.34
İ	3	3	TE	ATCC19004
İ	G	13TU	TE	ATCC17903
<i>A. haemolyticus</i>	4	4	4N	ATCC17906
<i>A. junii</i>	5	5	TE	ATCC17908
İ	6	6	4N	ATCC17979
<i>A. johnsoni</i>	7	7	3N	ATCC17909
<i>A. lwoffii</i>	8	8TU	2N	ATCC15309
İ	9	8TU	TE	ATCC9957
İ	10	10	G	ATCC17924
İ	11	11	G	ATCC11171
<i>A. radioresistens</i>	(12)***	12	5N	IAM13186
İ	13	14TU	TE	ATCC17905
İ	14	TE	TE	Bauvet 382
İ	15	TE	TE	Bauvet 240
İ	16	G	TE	ATCC17988
İ	17	TE	TE	Bauvet 942
İ	TE	15TU	TE	Tjernberg 151a

İ: İsimlendirilmemiş genomik tür, TE: Test edilmemiş, G: Gruplandırılmamış, ***Yayınlanmamış sonuçlar

2. 2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler

Acinetobacter türleri zorunlu aerop, sporsuz, non-fermentatif, gram negatif, hareketsiz bakterilerdir. Pozitif kan kültürü şişelerinden hazırlanan preparatlarda gram pozitif kok olarak görülebilirler. Antibiyotik içeren katı besiyerlerinde ve sıvı besiyerlerinde erken üreme fazında çoğunlukla basil formunda bulunurlarken seçici olmayan besiyerinde stasyonere fazda kokobasil formunda görülürler. Bakteriler 1.0- 1.5 µm X 1.5- 2.5 µm boyutlarındadır. Oksidaz, DNase ve indol negatif, katalaz pozitifdir. Birçok türü nitratları nitritlere indirgeyemez (16).

Genel üretim besiyerlerinde 35- 37°C’ de kolayca üretilebilirler. Kanlı agardaki kolonileri 24 saat sonunda 2-3 mm çapına ulaşırlar ve bazı türler hemolitik özellik gösterebilirler. MacConkey agarda ve Eozin Metilen Blue agar’ da laktoz negatif koloniler oluştururlar. Enterobakterilerden daha küçük, opak, pigmentsiz, S tipi koloniler meydana getirirler. Bazı türler pigment oluşturabilir (16). Klinik örneklerden izole etmek için seçici-ayırıcı besiyerleri geliştirilmiştir. Safra tuzları, şeker ve bromkrezol moru içeren Herelea agar, Holton’s agar, Leeds *Acinetobacter* Medium bu amaçla kullanılabilir. Bakterileri, dışkı gibi kontamine örneklerden izole etmek için tek bir karbon ve enerji kaynağı, nitrojen kaynağı olarak amonyum veya nitrat tuzları içeren pH 5.5- 6.0 olan sıvı mineral besiyerine inoküle ederek izole etmek mümkündür (1, 17).

Biyokimyasal ve üreme özelliklerine göre *Acinetobacter* cinsi içerisinde tür ayrımı

yapılabilmektedir. Bu ayırımıda glukoza oksidatif etki, 44°C' de üreyebilme ve hemoliz özelliklerinden yararlanır. Klinik izolatlar arasında en sık izole edilen 4 *Acinetobacter* türünün özellikleri Tablo 2' de gösterilmiştir (18).

Tablo 2. Sık saptanan *Acinetobacter* türlerinin ayırımında kullanılan temel parametreler

	Glukoz	Laktoz	44°C' de üreme	Hemoliz
<i>A. calcoaceticus</i>	+	+	-	-
<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-
<i>A. lwoffii</i>	-	-	-	-
<i>A. haemolyticus</i>	Değişken	-	-	+

Klasik mikrobiyolojik yöntemler dışında otomotize sistemlerde *Acinetobacter*' lerde tür ayırımı yapılabilmektedir. Fakat moleküler yöntemler en duyarlı metotlardır. Bakteriyosin ve faj tiplendirme, protein profili, serotiplendirme, multilokus enzim elektroforez ile tipleme, PZR, ribotipleme, Pulsed Field Gel Electrophoresis yöntemleri' de kullanılabilir (1).

2.3. Patogenez ve Virülans

Acinetobacter cinsi bakteriler virülansı düşük kabul edilen patojenlerdir. Normal konak savunma mekanizmasına sahip bireylerde enfeksiyon oluşturmaları oldukça güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar. Uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, antibiyotik kullanımı ve mekanik ventilatöre bağlı kalma, damar içi kateterizasyon, idrar sondası, endotrakeal tüp, trakeostomi ve enteral beslenme enfeksiyon için başlıca risk faktörleridir (16, 19).

Acinetobacter cinsi bakterilerin virülans faktörleri;

1. Endotoksin: Hücre duvarının lipopolisakkarit bileşeni Lipid A
2. Fimbria: Epitel hücrelerine yapışma özelliği
3. Polisakkarit kapsül: L- ramnoz, D- glukoz, D- glukronik asit ve D- mannoz kompleksi yapısındadır. Bakteri yüzeyinin hidrofilik özelliğini sağlar ve bakteriyi fagositozdan korur.

4. Lipidleri hidrolize eden enzim yapımı

5. Aerobaktin gibi sideroforlar ve demir tutucu dış membran reseptör proteinleri: Bakterinin çoğalması için gerekli demir ihtiyacını sağlamaktadır (1, 20).

2. 4. Epidemiyoloji

Diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında *Acinetobacter* türleri kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH derecelerinde yaşayabilme özellikleri ile cansız yüzeylerde günlerce canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler (1, 19).

Sağlıklı insanların %25' inin derilerinde *Acinetobacter* türlerini taşıdığı düşünülmektedir. Faringeal kolonizasyon ise %7 oranında görülmektedir. Ayrıca sağlıklı insanların ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde bulunduğu gösterilmiştir (1, 19, 21). Hastaneye yatırılmış bireylerde salgın dönemlerinde %7-18 oranında boğaz taşıyıcılığı görülmekte iken trakeostomi sürüntülerinde bu oran %45' dir (1). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların dışkılarında çoğul ilaç dirençli *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir (16).

Acinetobacter türleri hastane havası, buhar makinesi, periton diyalizat banyoları, musluklar, yatak kenarları, tansiyon aletleri, anjiyografi kateterleri, mekanik ventilasyon cihazlarından izole edilmiştir (1, 22).

Acinetobacter türleri hastane personelin derisinde sürekli taşınan en yaygın gram negatif bakterilerdir. Sağlık personeli, rezervuar insanlar ve cansız materyaller, hastalar arasında geçiş için uygun bir ortam sağlamaktadır (1). *A. baumannii*' nin özellikle yoğun bakım ünitesine (YBÜ) yatan hastaların %71' ini yatışı takiben birinci haftanın sonunda kolonize ettiği ve bu hastalarda *A. baumannii* ile ilişkili enfeksiyonların arttığı gösterilmiştir (23). Özellikle YBÜ' de değişik risk faktörleri bu duruma etkili olmaktadır. Uzun süre hastanede yatmak, cerrahiye takiben endotrakeal tüp takılması, intravasküler, ventriküler veya üriner kateter uygulaması, invaziv alet varlığı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, parenteral beslenme ve mekanik ventilasyon gibi işlemler *Acinetobacter* enfeksiyonları için risk faktörü oluşturmaktadır (19).

2.5. *Acinetobacter* Enfeksiyonları

Acinetobacter türleri genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olurlar. Toplumdan kazanılmış enfeksiyonları nadirdir. Tüm organlarda süperatif enfeksiyonlara neden olabilirler. *Acinetobacter* türleri arasında en sık ve en ciddi klinik tablolara neden olan etken *A. baumannii*' dir. Pnömoni, sepsis, menenjit, bakteriyemi, üriner sistem ve yumşak doku enfeksiyonlarına neden olurlar (19).

Bakteriyemi en sık pnömonilere sekonder gelişir. Batın içi, üriner sistem, yara ve deri enfeksiyonları, intravenöz kateter bakteriyeminin diğer kaynaklarını oluşturmaktadır. *Acinetobacter* bakteriyemi insidansı %8.4' ün üzerinde olduğu bildirilmiştir. *Acinetobacter* bakteriyemisi tek patojenli veya polimikrobiyal bakteriyemi şeklinde görülebilir. Polimikrobiyal bakteriyemilerde mortalite oranı artmaktadır (%17- 46). *A. baumannii*' ye bağlı bakteriyemilerde klinik tablo daha ağır seyreder (19).

2.6. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Acinetobacter türlerine etkili ilaçlar; ampisilin- sulbaktam, amoksisilin- klavulanat, tikarsilin- klavulanat, piperasilin- tazobaktam, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler, meropenem, imipenem, kinolonlar, kloramfenikol, rifampisin, aminoglikozidler, trimetoprim- sülfametoksazol, doksisiklin ve kolistin dir (1,16). Ancak *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi, bu mikroorganizmanın birçok antibiyotiğe direnç kazanmış olmalarından dolayı son derece güçtür. Karbapenemler, sulbaktam, kolistin ve tigesiklin en etkili antibiyotiklerdir (1, 4- 6). Ancak bakterinin tedavi esnasında hızla direnç geliştirebilme olasılığı ve tedavide yeterince başarı sağlanamaması nedeniyle tedavinin tek bir antimikrobiyal ajan kullanılarak yapılması önerilmemektedir. En sık tercih edilen kombinasyon, düşük direnç oranları ve *in vitro* sinerji göstermesinden dolayı imipenem+aminoglikozid, seftazidim+aminoglikozid veya florokinolon, imipenem+siprofloksasin, sefoperozon+sulbaktam kombinasyonlarıdır (1,16, 19, 24, 25).

Çoğul ilaç dirençli *A. baumannii* için yapılan *in vitro* çalışmalarda polmiksin B veya kolistin+ imipenem veya rifampin veya azitromisin; polmiksin veya kolistin +imipenem + rifampin; rifampin+ azitromisin; sulbaktam+ rifampin veya azitromisin veya kinolon kombinasyonlarının etkinliği gösterilmiştir (26- 31). Kombinasyon tedavilerinde *in vitro* sinerji testleri yol gösterici olabilir (9).

2.7. Metallo- Beta- Laktamazlar (MBL)

MBL' ler, Bush sınıflamasında fonksiyonel grup 3 veya Ambler sınıflamasında sınıf B' de yer alan ve diğer beta- laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde Zn⁺² iyonu bulunan enzimlerdir. Bu enzimler klavulanat, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik beta- laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken EDTA, MPA, SMA gibi metal şelatörleri ile inaktive olurlar. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar hariç tüm beta- laktamları hidroliz edebilmeleridir. Hastane salgınları açısından önemli bakteri türlerinde buldukları için tanımlanmaları enfeksiyon kontrolü açısından önemlidir (10- 13, 32).

2.7.1. Metallo-beta-laktamazların sınıflandırılması

MBL' ler 1980' de ilk olarak serin beta laktamazlardan Ambler' in sınıflandırmasına göre sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflama yapıldığında L1 (*Stenotrophomonas maltophilia*) ve BCII (*Bacillus cereus*) dışında çok az MBL tanımlanmıştı. Bin dokuz yüz seksen dokuz' da, Bush fonksiyonel özelliklerine göre MBL' leri ayrı bir grup (grup 3) olarak sınıflandırdı ve bu sınıflama genel olarak beta laktamazlar için önerilen referans sistem olarak alındı (3, 10, 33). Bu sınıflama substrat profilleri (özellikle imipenem hidrolizi), EDTA' ya olan duyarlılıkları ve serin beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmamalarına dayanılarak yapılmıştır. Bu tablo 1995 yılında güncellenmiş ve 1997 yılında artan grup 3 enzimlerini kapsayacak şekilde düzenlenmiştir. Tablonun ilk hazırlandığı dönemde MBL' lerin sadece transfer edilebilen iki tipi (*Bacteroides fragilis* CcrA ve *P. aeruginosa*' dan elde edilen IMP-1) belirlenmiştir (3, 33).

Tüm MBL' ler imipenemi hidrolize edebilirler ancak etki güçleri oldukça değişkendir. Hidroliz oranı, bakterinin direnç düzeyine göre değişiklik gösterebilir veya göstermeyebilir. MBL' ler buna uygun olarak substrat ve inhibitör profil benzerliğine göre Bush-Jacoby-Medieros fonksiyonel sınıflandırma tablosunda grup 3 de yer alır. Grup 3 imipenem ve beta laktam hidrolizi baz alınarak üç alt gruba ayrılmıştır (33).

Grup 3a: Bu enzimler, genellikle penisilinleri imipenemden daha hızlı (en az %60) olarak hidrolize edebilirler. Sefalosporinler genellikle imipenemden daha yavaş hidrolize olurlar. Bu grup içerisinde *B. cereus* II, *B. fragilis*' in CcrA, *B. Cepacia*' nın PCM-1, *S. maltophilia*' nın L1, *Chryseobacterium indologenes*' in IND-1-4, *Chryseobacterium meningosepticum*' un BlaB enzimleri ve *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* gibi değişik

türlerde saptanan IMP- 1- IMP- 18 ve VIM- 1-VIM- 13 enzimleri yer almaktadır (33).

Grup 3b: *Aeromonas* türlerinin metallo enzimlerini kapsar. Bunlara "gerçek karbapenemazlar" da denir. Bu enzimlerin karbapenemlere yüksek özgülüğü bulunmaktadır. Karbapenemler dışındaki beta- laktamlara etkileri çok az olduğundan varlıkları nitrosefin hidrolizine dayanan testlerle gösterilemez (10,33).

Grup 3c: Bu grupta sadece *Legionella gormanni*' nin MBL' si yer almaktadır. Yüksek sefalosporinaz aktivitesi ile diğer alt gruplardan ayrılmaktadır (33).

Ambler moleküler sınıflandırma tablosunun temeli aminoasit benzerliğine göredir. B sınıfı enzimleri MBL' ler oluşturur.

B1 sınıf enzimler: Üç histidin ve bir sistein rezidüleriyle koordine edilen anahtar çinkoya sahiptir. Transfer olabilen IMP, VIM, GIM ve SPM-I' e sahiptirler.

B2 sınıf enzimler: Çinko ile bağlanma bölgesinde histidin yerine asparagine sahip olan bir gruptur.

B3 sınıf enzimler: MBL Ll, sınıf B3' ün tek üyesidir ve tüm beta laktamazlar arasında tetramer olarak bilinen tek enzimdir (10, 33, 34).

2.7.1.1. Kromozomal Kodlanan MBL' ler

Doğada da bazı bakteriler MBL taşımaktadır. Taşımalarının sebebi ile ilgili olarak birçok görüş vardır. Bir görüş doğada bu bakterilerin belirli bir süre beta laktam ve beta laktam tipi bileşiklere maruz kalmaları doğrultusunda iken, diğer bir görüş ise bu enzimlerin hücrenel bir fonksiyonu yerine getirmek için oldukları yönündedir (10).

Kromozomlarca kodlanan MBL' ler *B. cereus* (BCII), *B. anthracis*, *S. maltophilia* (LI), *Aeromonas hydrophilia* (CphA), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB veya GOB- 1), *Chryseobacterium indologenes* (IND- 1), *Legionella gormanni* (FEZ- 1), *Caulobacter crescentus* (Mb11B), *Myroides spp.* (TUS- 1, MUS-1) ve *Janthinobacterium lividum* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) ve *Serratia fonticola* (SFH- 1) içermektedir (10, 34). Genel olarak kromozomal MBL' ler birbirlerinden ufak değişikliklerle ayrılmaktadırlar. En belirgin fark *Chryseobacterium meningosepticum*' un enzimlerinde görülmektedir. Bu nedenle ayrı bir alt sınıfa ayrılmıştır.

Kromozomlarca kodlanan enzimler, MBL' ler dışında serin beta laktamazlar tarafından

da düzenlenmektedir. Örneğin *Aeromonas hydrophilia* ve *A. veronii* biovar *sobria* penisilinaz, sefalosporinaz ve MBL olmak üzere üç çeşit beta laktamaz üretmektedir ve bunların hepsi yüksek derecede beta laktam direnci olan mutantların (dereprese mutantlar) seçildiği sırada fazlaca eksprese olmaktadır (10).

Bacteroides türlerinde görülen bir grup MBL kromozomal olarak tanımlansa da transfer edilebilir özelliktedir. Diğer anaerop bakterilerle karşılaştırılacak olursa, CfiA ve CcrA' ya bağlı olarak nisbeten beta laktamlara dirençlidir (33).

2.7.1.2. Transfer Edilebilen MBL' ler

2.7.1.2.1. İMP Tipi MBL' ler

Hareketli MBL' ler ilk olarak 1988' de Japonya' da *P. aeruginosa* suşunda bulunmuştur (35). Üç yıl sonra yine Japonya' daki (Okazaki) bir hastanede aynı gen *S. marcescens* Tn9106 kökenin de gösterilmiştir (36). İki yıl sonra aynı gene Okazaki' ye çok yakın bir hastanede bir başka *S. marcescens* kökeninde rastlanmıştır (37). Bu IMP- 1 alleli (bla_{IMP-1}) geniş bir plazmidin üzerinde aac(6')Ib' ye benzer gene çok yakın olan sınıf 3 integron içinde bulunmuştur. Japonya' da 1993 yılında yedi hastanede yapılan bir çalışmada bla_{IMP-1} taşıyan 4 adet *S. marcescens* bulunmuştur (38). Japonya' da 1992-1994 yılları arasında 15 hastanede 3700 *P. aeruginosa* suşları ile yapılan hibridizasyon çalışmasında, 5 hastaneden toplam 15 köken bla_{IMP-1} yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan bu kökenlerde imipenem minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerine bakıldığında ilginç bir şekilde değerlerin 2 µg/ mL- 128 µg/ mL arasında değiştiği görülmüştür (39). Japonya' da seftazidime dirençli dokuz *S. marcescens*, iki *Achromobacter xylosoxidans*, bir *P. putida* ve bir *K.pneumoniae* klinik izolata bla_{IMP-1} geni PZR ile gösterilmiştir (10).

Yine Japonya' da *S. flexneri*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes spp.* kökenleri ile yapılan çalışmada IMP-1' in minör varyantları olan IMP-3, IMP-6 ve IMP-10 bulunmuştur. IMP-3 *S. flexneri*' de gösterilmiştir ve IMP-1' den sadece 2 aminoasit farklılığı vardır. Genetik ve kinetik çalışmalar, IMP- 3' ün 196. pozisyonunda glisin yerine serin eklenmesinin, penisiline karşı aktivitede azalma ile sonuçlandığını göstermiştir. Aynı aminoasit değişikliği IMP- 6' da gözlenmesine karşın burada sadece penisilin G' ye karşı aktivite azalması ile kalmamış aynı zamanda IMP ve piperasiline göre meropenem hidrolizinde artışa sebep olmuştur (10).

P. aeruginosa ve *Alcaligenes spp.* izolatları ile 1995- 2001 tarihleri arasında yapılan bir çalışma sırasında IMP- 10 bulunmuştur. *bla*_{IMP-10} geni bir *P. aeruginosa* izolatında plazmid aracılı, bir tanesinde ise kromozomal aracılı olarak bulunmuştur. *bla*_{IMP-10} ve *bla*_{IMP-1} genleri 49. pozisyonda valin yerine fenilalanin gelmesine sebep olan tek baz değişikliği ile birbirinden ayrılmaktadır (40). İlk başlarda MBL genlerinin sadece Japonya' da problem oluşturduğu düşünülürken 1997' de *bla*_{IMP-2}, 1998' de *bla*_{IMP-5} sırasıyla İtalya ve Portekiz' de görülmüştür. IMP-2, IMP-1' e göre 36 aminoasit farklılığı gösterirken, IMP-5 17 aminoasit değişikliği göstermektedir. İkisi arasında da genetik farklılıklar mevcuttur (10).

İtalya' da 2000 yılında *P. putida* ve *P. aeruginosa* klinik izolatlarında sırası ile IMP-12 ve IMP-13 gösterilmiştir. IMP-12 36 aminoasitle, IMP- 13 19 aminoasitle IMP-1' den ayrılır (41).

Yakın zamanda İngiltere' de *A. baumannii* ve *A. junii* izolatlarında IMP-1 geni gösterilmiştir. Pozitif bulunan *A. baumannii* kökeni İspanya' da tatilde olan ve İngiltere' ye dönmeden önce 4 hafta gibi süre oradaki hastanede kalan kadın hastadan izole edilmiştir (42).

Hong Kong' da 1994 yılında *Acinetobacter spp.* izolatında IMP-4 ve 1995 yılında Kanada' da *P. aeruginosa* izolatında IMP-7 tanımlanmıştır. *bla*_{IMP-4} 1994- 1998 yılları arasında, imipeneme dirençli kökenlerin %66' sında gösterilmiştir. IMP- 4 enzimini taşıyan *Acinetobacter* suşları 1997 ve 1998' de %14 seviyesinde iken, sebebi bilinmeyen bir nedenle 1999' da gösterilememiştir. Daha sonra 2000' li yıllarda Çin' de, *Citrobacter youngae* ve *P. aeruginosa*' da ortaya çıkmıştır (10).

Daha sonraki çalışmalarda MBL üreten izolatların Japonya' dan dünyaya yayılmış olduğu düşünülse de bu konuda yeterli bilgi elde edilememiştir. Genetik veriler bu konu için yetersiz kalmıştır.

Kore' de yapılan iki çalışmada MBL' ye bağlı karbapenem direnci ile ilgili ciddi sorunların ortaya çıktığı görülmüş, 130 karbapeneme veya seftazidime dirençli izolatın %35' inde IMP benzeri MBL genlerinin taşındığı tespit edilmiştir. İmipenem direnci 1996' da %6 iken, 2001' de %19' a yükselmiştir (10).

Dünya çapındaki SENTRY çalışmasında Brezilya' dan 5 tane IMP-1 ve yeni bir IMP olan IMP-6, New Mexico' da *P. aeruginosa*' da IMP-18 gösterilmiştir (10).

2.7.1.2.2. VIM Tipi MBL' ler

Kazanılmış MBL' lerin ikinci temel grubu VIM tipi enzimlerdir. VIM-1 İtalya' da, Verona' da bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. 1997' de elde edilen bu klinik izolat piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonamı kapsayan çeşitli beta laktamlara dirençli bulunmuştur. Özellikle imipenem MİK değerinin $> 128 \mu\text{g/ mL}$ olduğu görülmüştür. Biyokimyasal analizler, EDTA ile inhibe olan ve Zn^{+2} eklenmesiyle yeniden kazanılan karbapenem hidrolizi yaptığını göstermiş bu gözlemler bir metallo enzim üretimini düşündürmüştür (43).

bla_{IMP} gibi *bla_{VIM}* geni de sınıf 1 integron içindeki bir gen kasetinde bulunmaktadır. Bu integron, sınıf 1 içinde *bla_{VIM}* gen kasedine ek olarak, aminoglikozid direnci kodlayan bir *aacA4* gen kasedini taşımaktadır (10).

VIM-1 Yunanistan' da çeşitli *K. pneumoniae* izolatlarında ve *E. coli'* de saptanmıştır. Benzer bir VIM-1 pozitif *K. pneumoniae* kökeni yakın zamanda Fransa' da genişlemiş spektrumlu beta laktamaz olan SHV-5 ile ilişkili olarak bulunmuştur (10).

bla_{VIM-2} ilk olarak 1996' da Fransa' nın güneyinde nütropenik bir hastanın kan kültüründeki *P. aeruginosa* izolatında saptanmıştır. Beta laktamların çoğuna dirençli iken aztreonama duyarlı kalmıştır. VIM-1 ve VIM-2 arasında %90 aminoasit ortaklığı söz konusudur (44).

Benzer şekilde VIM-2 üreten *P. aeruginosa* izolatları İtalya ve Yunanistan' da salgın kaynağı olarak bulunmuştur. VIM-2 üreten *P. aeruginosa* izolatları Güney Kore, Portekiz, İspanya, Polonya, Hırvatistan, Şili, Venezuela, Arjantin, Belçika ve yakın zamanda ABD' den de bildirilmiştir (10).

Son zamanlarda VIM-3 Taiwan' da *P. aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır. VIM-2' den 2 aminoasit değişimi ile ayrılmaktadır.

VIM-4 Yunanistan' da bir *P. aeruginosa* izolatında bildirilmiştir. Bu köken daha önce imipenem kullanmış bir hastadan elde edilmiştir ve beta laktamlara dirençli iken, aztreonama duyarlı bulunmuştur. VIM-1' den 1 aminoasit değişikliği ile ayrılan VIM-4 üreten, *P. aeruginosa* izolatı İsveç' te de tanımlanmıştır ancak izolatın Yunanistan' dan gelen bir hastaya ait olduğu görülmüştür. Mayıs 2002' de İtalya' da karbapenem tedavisi alan hastadan izole edilen *Enterobacter cloacae* ve *K. pneumoniae* izolatlarında aynı MBL geni saptanmıştır. Bu izolatların imipenem, meropenem MİK değerleri sırasıyla

0,25 µg/ mL ve 0,12 µg/ mL ile 2 µg/ mL ve 0,5 µg/ mL' dir. *bla*_{VIM-4} ' ün bu iki izolatta da aynı plazmid tarafından kodlandığı halde karbapenem MİK düzeylerinin çeşitliliği oldukça ilginç bulunmuştur (10).

VIM-5, VIM-1' den 5 aminoasit değişikliği ile ayrılmaktadır. Türkiye' de *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* ' da tanımlanmıştır. *P. aeruginosa* suşu azteronam dahil tüm beta laktamlara dirençli bulunmuştur (45).

VIM-6 Singapur'da *P. putida* izolatında tanımlandı. Beta laktamlara yüksek düzeyde dirençliydi. VIM-7 Texas' da karbapeneme dirençli bir *P.aeruginosa* ' da gösterildi. VIM-1 ile %77, VIM- 2 ile %74 benzerlik göstermekteydi. VIM-8, VIM-9, VIM-10 ve VIM-11 enzimleri de çeşitli izollarda yakın zaman içinde gösterilmiştir (10).

2.7.1.2.3 SPM-1 Tipi MBL' ler

Bu karbapenemaz Sao Paulo, Brezilya' da 1997 yılında SENTRY surveyans programı dahilinde bir *P. aeuginosa* klinik izolatında tanımlanmıştır. Dört yaşındaki bir lösemi hastasının kanından izole edilmiştir. Kolistin dışındaki bütün Gram negatiflerin tedavisinde kullanılan antibiyotiklere dirençli bulunmuştur (46).

*bla*_{SPM} ' nin genetik içeriği tektir, transpozonlarla ya da integronlarla ilişkili değildir. IMP-1 ve VIM-1' deki gibi SPM-1 de kısmen klavulanik asit ya da aztreonamı hidroliz etmez, yarışmacı inhibitör olarak çalışır. Sefalosporinlere penislinlerden daha sıkı bağlanır (10).

2.7.1.2.4. GIM-1 Tipi MBL' ler

Almanya' da 2002 yılında 5 farklı hastadan elde edilen *P. aeuginosa* izolatlarında GIM-1 (German imipenemaz) olarak tanımlanandı. İzolatların hepsi polimiksine duyarlı bulunmuştur (47).

2.8. MBL enzim üretiminin gösterilmesi

Hastalara uygun tedavinin yapılabilmesi, direnç genlerinin hastane ortamında diğer bakteri türlerine aktarılmasının önlenmesi açısından *Acinetobacter* cinsi bakterilerde, çoğul ilaç direncinin ve MBL üretiminin belirlenmesi çok önemlidir. Fakat MBL ezimlerinin varlığının fenotipik olarak araştırılması için CLSI tarafından önerilen standart bir yöntem henüz bildirilmemiştir. Duyarlılık testleri ise MBL üretimini göstermek için yetersiz kalmaktadır.

2.8.1. Fenotipik MBL Tespit Yöntemleri

2.8.1.1. Kombine Disk Diffüzyon Testi

Test suşları CLSI' in önerdiği disk difüzyon yönteminde olduğu gibi Mueller- Hinton agar plağının yüzeyine ekildikten sonra hazırlanan imipenem/ imipenem- EDTA, meropenem/ meropenem- EDTA içeren kombine diskler plağa yerleştirilir. 35⁰C'de 16- 18 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçülür. EDTA' lı ve EDTA' sız 2 disk arasında ≥ 7 mm inhibisyon zonunda genişleme pozitif sonuç olarak kabul edilir. Bu testin avantajı uygulaması ve yorumlaması kolay, dezavantajı ise MBL üreten bakteri imipenem ve meropeneme duyarlı olabilir yani yanlış pozitif sonuç verebilir (48).

2.8.1.2. Modifiye Hodge Testi

E. coli ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonu Mueller- Hinton agar plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi sürülür. Plağın merkezine imipenem diski (10 / μ g) yerleştirildikten sonra test suşları, bu diskin dört bir kenarından periferine doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekilir. 35⁰C' de 16- 18 saatlik inkübasyondan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunda bozukluk veya yonca görünümü pozitif olarak kabul edilir (11).

2.8.1.3. Çift Disk Sinerji Testi

Arakawa ve ark. (12) 2000 yılında seftazidim dirençli suşlarda seftazidim- MPA, seftazidim- SMA, imipenem- EDTA+SMA diskleriyle bu testi uygulamışlardır. Standart bulanıklıkdaki süspansiyon Mueller- Hinton agar plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi sürülür. 35⁰C'de 16- 18 saatlik inkübasyondan sonra bu iki disk arasındaki inhibisyon zonunun artmasını pozitif olarak yorumlamışlardır.

Lee ve ark. (13) 2001 yılında imipeneme dirençli suşlarla imipenem ve EDTA diski kullanarak bu testi yapmışlar ve iki disk arasındaki inhibisyon zonunun artmasını pozitif olarak yorumlamışlardır.

Jing Jou Yan ve ark. (49) tarafından 2004 yılında seftazidim ve seftazidim + klavulanik asit, sefepim ve sefepim+ klavulanik asit diskleri Mueller- Hinton agar plağının kenarlarına yerleştirildikten sonra plağın ortasında 2-MPA, EDTA ve SMA diskleri yerleştirilir. 35⁰ C'de 16- 18 saatlik inkübasyondan sonra şelatör madde içeren diskler ile herhangi bir disk arasındaki inhibisyon zonunun artması pozitif sonuç olarak yorumlanır. Bu yöntemle imipeneme duyarlı suşlarda da MBL taranabilmiştir.

2.8.1.4. E- test

Test suşlarının 0.5 McFarland bulanıklığına getirilmiş süspansiyonu Mueller- Hinton agar plağının yüzeyine ekildikten sonra imipenem (4- 256 µg/mL) / imipenem- EDTA (1- 64 µg/mL) E- test şeridi plağa yerleştirilir. İmipenemin EDTA ile birlikte test edildiğindeki MİK değerinin, tek başına test edildiğindeki MİK değerine göre ≥ 3 dilüsyon azalması veya fantom zonunun görülmesi pozitif olarak yorumlanır. Bu yöntemin dezavantajı ise MBL üreten bakteri imipeneme duyarlı olabilir, borderline olanlar da gözden kaçabilir (2).

2.8.1.5. Mikrodilüsyon Yöntemi

Migliavocco ve ark. (50) tarafından 2002 yılında geliştirilmiştir. Test edilen suşun imipenem MİK değeri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendikten sonra metal şelatörlerden EDTA ile tekrar MİK değerlerine bakılır. MİK değerleri arasında sekiz kat azalma pozitif olarak yorumlanır

2.8.2. Genotipik MBL enzim üretiminin gösterilmesi

MBL enzim genlerinin tanısında genotipik yöntemler de kullanılabilir. Genotipik yöntemler fenotipik yöntemlere göre daha duyarlıdır.

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

Belirli primerler kullanılarak bir izolatta MBL geni olup olmadığı PZR uygulanarak belirlenebildiği gibi, her enzime özgül primerler kullanılarak enzim tipini saptamak da mümkündür (10).

2. DNA prob yöntemi

3. Klonlama ve sekanslama (moleküler altın standart)

2.8.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

1. Kalitatif Testler

Disk Diffuzyon Testi (Kirby - Bauer Testi)

En yaygın olarak kullanılan testtir. Potensleri belirlenmiş diskler, standart miktarda bakteri inoküle edilmiş standart besiyerine, belli aralıklarla yerleştirilir ve uygun süre ve sıcaklıkta bekletilir. Disklerin etraflarında oluşan inhibisyon sınırlarının çapları milimetre cinsinden okunur ve her antimikrobiyal için standardize edilmiş zon çapları ile karşılaştırılarak; dirençli, orta duyarlı, duyarlı olarak değerlendirilir (14).

2. Kantitatif Testler

Agar Dilüsyon Yöntemi

Farklı konsantrasyonda antimikrobiyal içeren agarlı besiyerleri, plaklara dökülür. Agara ilave edilen antibiyotikler, çift kat seri sulandırma yöntemiyle hazırlanır. Her dilüsyon için, ayrı agar plakları elde edilir. Bu yöntem, bir agar plağında aynı anda çok sayıda bakterinin test edilebilmesine imkan verir. Standart yoğunlukta bakteri, plaklara inoküle edilir, bir gece inkübe edilir, üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak değerlendirilir (14).

Sıvı Dilüsyon Yöntemi

Mikrodilüsyon: Mikroplaklarda antibiyotiğin Mueller- Hinton buyyonda iki kat seri sulandırmaları hazırlanır. Standardize edilmiş süspansiyondan belli miktarda kuyucuklara konur. Kontaminasyonu önlemek için mikroplakların ağızları plastik strip ile kapatılır. Etüvde 35°C' de 16- 18 saatlik inkübasyondan sonra üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK değeridir.

Makrodilüsyon: Mikrodilüsyondaki benzer işlemler 1 mL hacimlerde Mueller- Hinton buyyon eklenmiş tüplerde yapılır (14).

E- Test

Bir gradient yöntemidir. Antibiyotiği belli bir gradient şeklinde salabilen plastik şeritlerle yapılır. Standardize bakteri inokülasyonu Mueller- Hinton agar plağına sürüldükten sonra E-test şeritleri besiyerine bırakılır. Etüvde 35 °C' de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra elipsin şeridi kestiği yerdeki değer MİK değeridir (51).

Otomatize Sistemler

İzole edilen suşların hem tanımlanmasını hem de antibiyotik duyarlılıklarını belirleyen yarı ve tam otomatize sistemler vardır (52).

Sinerji Testleri

Antibiyotik kombinasyonlarının *in vitro* etkinliğinin değerlendirilmesinde çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler arasında iki boyutlu sulandırım (Dama Tahtası “Chequerboard”) yöntemi, zamana bağlı öldürme kinetiklerinin incelenmesi (“ Time- kill”) yöntemi ve difüzyon yöntemleri vardır (8). Difüzyon yöntemlerinden biri de E- test yöntemidir (53).

E-test yönteminde CLSI’ nın önerdiği şekilde hazırlanmış bakteri inokulumu agar yüzeyine sürüldükten sonra test edilen ilk antibiyotiğe ait şerit yerleştirilir. Antibiyotiğin difüzyonu için yaklaşık bir saat beklenir. Yerleştirilen ilk antibiyotiğe ait şerit kaldırılır ve kaldırıldığı yere denk gelecek şekilde ikinci antibiyotiğe ait şerit yerleştirilir. Aynı agara ayrıca her iki antibiyotiğe ait E-test şeritleri ayrı ayrı yerleştirilir. Etüvde 35 ± 2 °C’ de 16- 18 saat inkübasyon sonunda her bir antibiyotik için fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) hesaplanır. Elde edilen Σ FİK değerleri $\leq 0,5$ sinerjistik, > 0.5 ve < 1.0 kısmi sinerji, 1.0 aditif, >1 ve <4 indiferent, ≥ 4 antagonist olarak yorumlanır (8).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarında ve Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalının katkılarıyla yapıldı.

3.1. Hastalar ve Kan Kültürü Örnekleri

Şubat 2007- Mart 2008 ayları arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerindeki hastalardan gönderilen kan kültürlerinde *A. baumannii* izole edilen hastalar enfeksiyon hastalıkları kliniğine bildirildi. Yapılan hasta başı değerlendirmesinde sistemik enflamatuvar yanıt sendrom (SIRS) bulguları (ateş $> 38.3^{\circ}\text{C}$ veya $< 36^{\circ}\text{C}$, kalp atım hızı $>90/\text{dk.}$, solunum hızı $> 20/\text{dk}$ veya $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mmHg}$, lökosit sayısının $> 12000/\text{mm}^3$ veya $< 4000/\text{mm}^3$ olması veya periferik yaymada %10' un üzerinde band formunun bulunması) olan 16 yaş ve üzerindeki hastalar çalışmaya alındı (54). Kültür sonucu postmortem elde edilen hastalar içinde aynı kriterler kullanılarak dosyaları tarandı. Bakteriyemi odağının saptanması için "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" kriterleri uygulandı (55).

Prospektif olarak çalışmaya alınan hastalara ait demografik bilgiler hasta izlem formuna kaydedildi (Ek 1) Bakteriyemi başlangıcından sonraki 14 gün içindeki mortalite oranı başlıca değerlendirme ölçütü olarak kullanıldı.

Bu hastalardan izole edilen suşlar çalışma zamanına kadar -70°C ' de mikrobankalarda saklandı. İzolatların çalışma sırasında kanlı agara iki kez subkültürleri yapıldı.

3.2. Bakterilerin Tanımlanması

Kan kültürü örneklerinden izole edilen suşlar Microscan Walkaway (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) otomatize sistem ile tanımlandıktan sonra katalaz, oksidaz ve indol reaksiyonları, 44°C' de üreyebilme, kanlı agarda hemoliz özellikleri, Eozin Metilen Blue agarda laktoza etkileri değerlendirildi.

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

3.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Bakteri süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlandıktan sonra Mueller-Hinton agar (Acumedia, Baltimore) içeren petri yüzeylerine steril pamuklu çubuk kullanılarak sürüldü. Kolistin (10 µg) (Oxoid, UK), levofloksasin (5 µg) (Oxoid, UK), siprofloksasin (5 µg) (Becton Dickinson, USA), amikasin (30 µg) (Becton Dickinson, USA), sefepim (30 µg) (Becton Dickinson, USA), sefotaksim (30 µg) (Becton Dickinson, USA), seftriakson (30 µg) (Becton Dickinson, USA), gentamisin (10 µg) (Becton Dickinson, USA), tobramisin (10 µg) (Becton Dickinson, USA), trimetoprim/ sülfametoksazol (1.25/ 23.75 µg) (Becton Dickinson, USA), piperasilin/ tazobaktam (100 µg/ 10 µg) (Becton Dickinson, USA), ampisilin/ sulbaktam (10 µg/ 10 µg) (Becton Dickinson, USA), sefoperazon/ sulbaktam (75 µg/ 30µg) (Bioanalyse) diskleri Mueller-Hinton agar yüzeyine yerleştirildi. Plaklar 16- 18 saat 35±2 °C' de aerob ortamda inkübe edildi. Disklerin zon çapları ölçülerek CLSI standartlarına göre suşların duyarlılık durumları yorumlandı. Kolistin için British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) kriterleri kullanıldı (56). Kalite kontrol için *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *E.coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı.

3.3.2. E-test Yöntemi

Bakteri süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlandıktan sonra Mueller-Hinton agar içeren petri yüzeylerine steril pamuklu çubuk kullanılarak sürüldü. İmipenem , meropenem, tigesiklin, sefoperazon/ sulbaktam ve ampisilin/ sulbaktam E-test şeritleri (AB BIODISK, Solna, Sweden) Mueller-Hinton agar yüzeyine yerleştirildi. Plaklar 16- 18 saat 35±2 °C' de aerob ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda inhibisyon zonunun E- test şeridini kestiği noktadaki konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. MİK değerleri kriter alınarak CLSI' ın standartlarına göre suşların duyarlılık durumları yorumlandı. CLSI' de sefoperazon/ sulbaktam MİK değeri

belirtilmediği için sefoperazon MİK değeri, tigesiklin için Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi tarafından önerilen MİK değeri kullanıldı (4, 57). Kalite kontrol için *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı.

3.4. Sinerji Yöntemi

Çalışmaya alınan *A. baumannii* izolatlarında imipenem ile sefoperazon/ sulbaktam ve meropenem ile sefoperazon/ sulbaktam antibiyotiklerinin E- test yöntemiyle sinerjistik etkisine bakıldı. Her izolat için 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller- Hinton agar içeren iki adet petri yüzeyine steril pamuklu çubuk kullanılarak sürüldü. Birinci petriye kombinasyon etkisinin aranacağı antibiyotiklerin MİK değerlerini elde etmek amacı ile E- test şeritleri yerleştirildi. İkinci petriye A ve B antibiyotik E- test şeritleri ayrı ayrı yerleştirildi ve etüvde 35 ± 2 °C’ de bir saat inkübe edildi. Ön inkübasyon sonrasında A antibiyotiğine ait E- test şeriti kaldırıldı ve aynı yere B antibiyotiğine ait E- test şeridi yerleştirildi. B antibiyotiğine ait E- test şeridi kaldırıldı ve aynı yere A antibiyotiğine ait E-test şeriti yerleştirildi ve etüvde 35 ± 2 °C’ de 16- 18 saat inkübe edildi. Her bir antibiyotik için FİK değeri hesaplandı.

$$FİK(A) = \frac{MİK A (B' nin varlığında A (A+B))}{MİK A (A tek başına)}$$

$$MİK A (A tek başına)$$

$$FİK(B) = \frac{MİK B (A' nın varlığında B (B+A))}{MİK B (B tek başına)}$$

$$MİK B (B tek başına)$$

$$\Sigma FİK = FİK A + FİK B$$

Elde edilen $\Sigma FİK$ değerleri ≤ 0.5 sinerjistik, > 0.5 ve < 1.0 kısmi sinerji, 1.0 aditif, >1 ve <4 indiferent, ≥ 4 antagonist olarak yorumlandı (8).

3.5. MBL enzim üretiminin gösterilmesi

3.5.1. İmipenem/ imipenem-EDTA, meropenem/ meropenem-EDTA içeren kombine disk yöntemi

İzolatların MBL enzimi üretilip üretilmediği imipenem/ imipenem-EDTA, meropenem/ meropenem- EDTA içeren disk yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bakteri süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanarak Mueller- Hinton agar içeren plak yüzeyine steril pamuklu çubukla yayıldı ve 2’ şer adet imipenem (10 µg) ve meropenem (10 µg) diskleri agar yüzeyine yerleştirildi. Disklerin birer tanesine 5 µL (930 µg) 0.5 M EDTA

solusyonu eklenerek kombine diskler (10 µg/ 930 µg) oluşturuldu. Plaklar 16- 18 saat 35 °C± 2' de inkübasyondan sonra zon çapları ölçüldü. EDTA' lı ve EDTA' sız 2 disk arasında ≥ 7 mm inhibisyon zonunda genişleme pozitif sonuç kabul edildi.

EDTA stok solusyonun hazırlanışı; 1000 mL distile suda 186.1 g disodyum EDTA.2H₂O çözdürülerek 0.5 M EDTA solusyonu elde edildi ve NaOH ile ph 8.0' a ayarlandı. Solüsyon milipor filtrelerden geçirilerek sterilize edildi (48).

3.5.2. MBL E-test yöntemi

İzolatların MBL enzimi üretip üretmediği imipenem (4- 256 µg/mL)/ imipenem- EDTA (1- 64 µg/ mL) içeren E- test şeritleri kullanılarak araştırıldı. Bakteri süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanarak Mueller- Hinton agar içeren plak yüzeyine steril pamuklu çubukla yayıldı ve E- test şeritleri yerleştirildi. Plaklar 16- 20 saat 35 °C± 2' de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda inhibisyon zonunun E- test şeridini kestiği noktadaki konsantrasyon MİK olarak belirlendi. İmipenemin EDTA ile birlikte test edildiğindeki MİK değerinin, tek başına test edildiğindeki MİK değerine göre ≥ 3 dilüsyon azalması pozitif olarak kabul edildi (2).

3.5.3. Modifiye Hodge Testi

E.coli ATCC 25922 suşunun McFarland 0.5' in 1/10 bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlanarak Mueller- Hinton agar plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekildi. Plağın merkezine imipenem diski (10µg) yerleştirildi. Test suşları, bu diskin dört bir kenarından periferine doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekildi. 35⁰ C'de 16- 18 saatlik inkübasyondan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunda çarpıklık veya yonca görünümü pozitif olarak kabul edildi (11).

3.5.4. *Acinetobacter baumannii'* nin *bla*_{VIM-1} ve *bla*_{IMP-1} Genlerinin PZR İle Araştırılması

Bütün suşların nükleik asit izolasyonu QIamp DNA Mini Kiti (QIAGEN) kullanılarak test kiti prosedürüne uygun çalışıldı. İzolatların *bla*-_{VIM} ve *bla*-_{IMP} genleri belirlenmesi için "in house" PZR uygulandı (2, 12).

3.5.5. Nükleik asit izolasyonu

Suşlar -70 °C' de mikrobank[®], lerden çıkarılarak kanlı agarda iki kez subkültürleri yapıldı.

Kit içeriği

- Proteinaz K
- Buffer ATL
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- QIAamp spin kolonu
- Toplama tüpleri (2 mL'lik)

3.5.6. Bakteri kültürlerinden nükleik asit izolasyon prosedürü

1. Steril ependorf tüpleri ependorf sporlarına dizildi. Her bir ependorf tüpüne 180 µL Buffer ATL eklendi. Tüp içine bir bakteri kolonisi konularak 15 saniye vortekslendi.
2. Üzerine 20 µL proteinaz K konuldu
3. 56⁰C'de etüvde her 20 dakikada bir vortekslenerek 1 saat inkübe edildi.
4. Tüpler kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
5. Tüplere 200 µL Buffer AL ilave edildikten sonra 15 saniye vortekslendi.
6. 70⁰C'de etüvde 10 dakika inkübe edildi. Kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
7. Tüplere 200 µL etil alkol ilave edildikten sonra 15 saniye vortekslendi. Tüpün kenarındaki damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi
8. Tüplerdeki karışımın tamamı toplama tüplerine konulan kolonlara alındı ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.

9. Toplama kolonları santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp üzerine 500 µL buffer AW1 eklendi ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
10. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp üzerine 500 µL buffer AW2 eklendi ve 20.000 x g'de (14.000 rpm/dak.) 3 dakika santrifüj edildi.
11. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı ve 20.000 x g'de (14.000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
12. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz 1,5 mL'lik ependorf tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açıldı ve üzerine 50 µL buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında bir dakika bekletildi ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
13. Kolonlar atılıp ependorf tüplerindeki saf nükleik asit PZR çalışması için saklandı

3.5.7. DNA Amplifikasyonu

A. *baumannii*' nin *bla_{VIM-1}* ve *bla_{IMP-1}* genlerinin belirlenmesi için "in house" PZR uygulandı.

***Acinetobacter baumannii*' nin *bla_{VIM-1}* Geninin Belirlenmesi İçin Amplifikasyon Karışımı**

- 10X PZR Buffer	5 µL
- 25 mM MgCl ₂	5 µL
- 10 mM dNTP karışımı	0,5 µL
- Primer 1 (5' - AGT GGT GAG TAT CCG ACA G- 3')	0,4 µL
- Primer 2 (5' - ATG AAA GTG CGT GGA GAC- 3')	0,4 µL
- <i>Taq</i> DNA Polimeraz	0.3 µL
- Distile su	33.3 µL

3.5.8. Testin uygulanması

1. Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Önceden %10'lık hipokloridli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminar akım içerisinde çalışıldı. Amplifikasyon için kullanılacak buffer, MgCl₂, dNTP, Primer 1, 2 ve *Taq* DNA Polimeraz -20°C'lik derin dondurucudan çıkarıldı. *Taq* DNA Polimeraz çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
2. Örnek sayısı ve pozitif kontrol sayısı kadar PZR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve 0.2 mL PZR tüplerine 45 µL dağıtıldı.
3. Pozitif kontrol ve suşlardan elde edilmiş DNA izolatlarından 5 µL 0.2 mL PZR tüplerine dağıtıldı.
4. 0.2 mL PZR tüpleri 'thermal cycler' (Applied Biosystems 2720) cihazına yerleştirildi.
5. Örneklerdeki nükleik asit 'thermal cycler' cihazında aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı.

94 ⁰ C'de	5 dakika	} 30 döngü
94 ⁰ C'de	25 saniye	
52 ⁰ C'de	40 saniye	
72 ⁰ C'de	50 saniye	
72 ⁰ C'de	6 dakika	

6. Reaksiyon sona erdikten sonra PZR ürünleri cihazın içinden alındı.
7. 100 mL TBE 1X tamponu içerisinde 1 g agaroz ısıtılarak eritildi. El yakmayacak kadar soğuduktan sonra 3 µL 'ethidium bromide' katılarak yatay jel elektroforez tankına döküldü.
8. Çoğaltılan örneklerden 10'ar µL alıp üzerine 5'er µL yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucukların dibine düşmesi sağlandı.
9. Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 120 voltta 20 dakika yürütüldü.

10. Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 261 basepare (bp) uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiği pozitif kabul edildi.

***Acinetobacter baumannii'* nin *bla*_{IMP-1} Geninin Belirlenmesi İçin Amplifikasyon Karışımı**

- 10X PZR Buffer	5 µL
- 25 mM MgCl ₂	5 µL
- 10 mM dNTP karışımı	0,5 µL
- Primer 1 (5' - CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG- 3')	0,4 µL
- Primer 2 (5' - AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT- 3')	0,4 µL
- <i>Taq</i> DNA Polimeraz	0.3 µL
- Distile su	33.3 µL

Testin uygulanması

1. Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Önceden %10'lik hipokloridli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminer akım içerisinde çalışıldı. Amplifikasyon için kullanılacak buffer, MgCl₂, dNTP, Primer 1, 2 ve *Taq* DNA Polimeraz -20⁰C'lik derin dondurucudan çıkarıldı. *Taq* DNA Polimeraz çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
2. Örnek sayısı ve pozitif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve 0. 2 mL PCR tüplerine 45 µL dağıtıldı.
3. Pozitif kontrol ve suşlardan elde edilmiş DNA izolatlarından 5 µL 0. 2 mL PCR tüplerine dağıtıldı.
4. 0. 2 mL PCR tüpleri 'thermal cycler' (Applied Biosystems 2720) cihazına yerleştirildi.
5. Örneklerdeki nükleik asit 'thermal cycler' cihazında aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı.

94 ⁰ C'de	5 dakika	}	30 döngü
94 ⁰ C'de	25 saniye		
52 ⁰ C'de	40 saniye		
72 ⁰ C'de	50 saniye		
72 ⁰ C'de	6 dakika		

6. Reaksiyon sona erdikten sonra PZR ürünleri cihazın içinden alındı.
7. 100 mL TBE 1X tamponu içerisinde 1 g agaroz ısıtılarak eritildi. El yakmayacak kadar soğuduktan sonra 3 µL 'ethidium bromide' katılarak yatay jel elektroforez tankına döküldü.
8. Çoğaltılan örneklerden 10'ar µL alıp üzerine 5'er µL yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucukların dibine düşmesi sağlandı.
9. Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 120 voltta 20 dakika yürütüldü.
10. Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 578 basepare (bp) uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiği kabul edildi.

MBL enzimini belirlemede kullanılan fenotipik ve PZR' da *bla*_{VIM-1} geninin belirlenmesi için kullanılan kontrol suş Çapa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD' dan, *bla*_{IMP-1} geninin belirlenmesi için kullanılan kontrol suş Hacettepe Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD' dan, sağlandı.

3.6. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler 'Windows "Statistical Package For Social Sciences (SPSS)" (versiyon 15.0; SPSS, Chicago, IL) programı kullanılarak yapıldı. Grup karşılaştırmaları, kategorik değişkenler için kıkare testi ve Fisher'in kesin testleri, sayısal değişkenler için ise Mann-Whitney U- testi uygulandı. İstatistiksel olarak p değeri < 0.05' den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Şubat 2007- Mart 2008 ayları arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinden bakteriyemi ön tanılı hastalardan rutin olarak gönderilen kan kültürü örneklerinden *A. baumannii* izole edilen 100 erişkin hasta çalışmaya alındı.

4.1. Hasta Bilgilerinin Analizi

A. baumannii suşlarının %73' ü yoğun bakım ünitelerinden (YBU) izole edildi. İzolasyon oranları Tablo 3' de gösterilmiştir.

Tablo 3. *A. baumannii* izolatlarının kliniklere göre dağılımı

Servis	n
Anestezi YBU	26
Dahiliye YBU	24
Genel Cerrahi YBU	11
Göğüs hastalıkları YBU	11
Kardiyoloji YBU	1
Hematoloji-Onkoloji	7
Yanık Ünitesi	6
Nöroşirurji YBU	3
Nöroloji	3
Gastroenteroloji	3
Erişkin Enf. Hast. Servisi	3
Nefroloji Servisi	1
Kemik iliği transplant.	1
Toplam	100

Çalışmamızda *A. baumannii* izolatlarının elde edildiği hastaların % 46' sı (yaşayan/ ölü: 20/ 26) kadın, % 54' ü (yaşayan/ ölü:17/37) erkekti. Bu hastaların yaş ortalaması 52. 7±19 (17- 83 yaş arası) olarak bulundu ve ileri yaşın mortalite için bir risk faktörü olduğu gösterildi (55. 4± 19. 0- 48. 0± 18. 8, p=0.03).

Yaşayan hastaların yedisinde kronik obstruktif akciğer hastalığı, altısında akut böbrek yetmezliği, ölen hastaların ise 16' sında diabetes mellitus (DM) ve 12' sinde hematolojik malignensi (HM) en sık gözlenen alt hastalık olarak belirlendi. Diğer alt hastalıklar daha az sıklıkla gözlendi. Alt hastalık görülme sıklığı Tablo 4' de gösterildi. Altta yatan hastalıklardan HM (yaşayan/ ölü: 1/ 12, p= 0.015) ile DM (yaşayan/ ölü: 1/ 16, p= 0.005) mortalite için bir risk faktörü olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Hastaların bakteriyemi öncesi hastanede kalış süresi ortalama 17. 01± 12. 2 gündü ve bu sürenin mortalite için risk faktörü olduğu saptandı (p= 0.027). Bakteriyemi öncesi yoğun bakım ünitesinde kalış süresi ortalama 10. 2± 11. 05 gündü ve bu sürenin mortaliteye etkili olmadığı belirlendi.

Bakteriyemi öncesi mekanik ventilasyon, trakeostomi, hemodiyaliz, total parenteral beslenme gibi invaziv işlemlerin ve nötropeninin mortalite için bir risk faktörü olmadığı görüldü. Yaşayan ve ölen hastalardaki invaziv girişim sayıları Tablo 4' de gösterildi.

Hastaların 29' unda ventilatör ilişkili pnömoni en sık bakteriyemi odağı olarak belirlendi. Bakteriyemi odağı bulunamayan 32 hastada (yaşayan/ ölü: 6/ 26, p=0.028) mortalite oranı yüksek bulundu.

Hastalardan izole edilen *A. baumannii* suşlarının %62' si disk difüzyon yöntemi ile hem imipenem hem de meropeneme dirençli bulunurken %37' si çoğul dirençli bulundu. Hastaların otuz üçü kan kültürleri alındığında ampirik olarak karbapenem tedavisi alıyordu. İmipenem ve meropenem direnci (yaşayan/ ölü:26/ 36, p=0.192) ve çoğul direnç (yaşayan/ ölü: 15/ 22 p= 0.574) mortalite için bir risk faktörü olmadığı saptandı. Uygun olmayan ampirik tedavi (yaşayan/ ölü:23/ 53, p=0.016) ve kesin tedavi (yaşayan/ ölü:10/ 53, p= < 0.001) mortalite için bir risk faktörü olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *Acinetobacter baumannii* bakteriyemisi olan hastaların verileri Tablo 4 de gösterilmiştir.

Tüm ölümlerin % 63' ü hastaneye yatışın ilk 14 günü içinde, % 72' si ise ilk 30 gün içinde gerçekleşti. Fakat ciddi alt hastalığı bulunan kişilerde 30 günlük süre ölümlerin nedenini açıklamak için oldukça uzun olduğu için çalışmamızda 14 günlük süre başlıca değerlendirme ölçütü olarak kullanıldı.

Tablo 4. *Acinetobacter baumannii* bakteriyemisi olan hastaların verilerinin dağılımı

Hastaların Özellikleri	Yaşayan (n=37)	Ölü (n=63)	Toplam (n=100)	P-value ^a
Yaş (ortalama \pm S.D.) (yıl)	48.0 \pm 18.8	55.4 \pm 19.0	52.7 \pm 19	0.03
Cinsiyet (erkek/kadın)	17/20	37/26	54/46	AD
Primer hastalık				
Hematolojik Malignensi	1	12	13	0.015
Solid Tümör:	3	7	10	AD
Akut Böbrek Yetmezliği	6	8	14	AD
Kronik Böbrek Yetmezliği	0	6	6	AD
Kronik Karaciğer Hastalığı	2	5	7	AD
Diabetes mellitus	1	16	17	0.005
Konjestif Kalp yetmezliği	2	3	5	AD
Koroner Arter Hastalığı	3	7	10	AD
Kronik obstruktif Akciğer Hastalığı	7	10	17	AD
Bakteriyemi öncesi hastanede kalış süresi (ortalama \pm S.D.) (gün)	19.8 \pm 12.1	15.3 \pm 12.07	17.01 \pm 12.2	0.027
Bakteriyemi başlangıcında YBU' de kalış	26	59	76	AD
Bakteriyemi başlangıcından önce YBU' de kalış süresi (ortalama \pm S.D.) (gün)	11.2 \pm 21.1	9.7 \pm 10.4	10.2 \pm 11.05	AD
Bakteriyemi öncesi invaziv işlem				
Herhangi bir cerrahi işlem	16	19	35	AD
Mekanik ventilasyon	19	43	62	AD
Trakeostomi	4	24	28	AD
Hemodiyaliz	3	12	15	AD
Total parenteral beslenme	22	38	60	AD
Nötropeni (<500/mm ³)	1	9	10	AD
Bakteriyeminin primer odağı				
Nosokomial pneumoni	2	3	5	AD
Ventilatör ilişkili pnömoni	11	18	29	AD
Üriner sistem enfeksiyonu	1	1	2	AD
Santral venöz kateter enfeksiyonu	8	5	13	AD
Cerrahi sonrası yara enfeksiyonu	11	8	19	AD
Nedeni bulunamayan bakteriyemi	6	26	32	0.028
Uygun olmayan ampirik tedavi	23	53	76	0.016
Uygun olmayan kesin tedavi	10	53	63	<0.001
İmipenem ve meropenem direnci	26	36	62	AD
Çoğul direnç	15	22	37	AD
Charlson's weigted ko-morbidite indeksi (ortalama)	1	2	2	AD

SD: standart sapma, ^a P-Değeri: kıkare, Fisher' in kesin ve Mann-Whitney *U*-test,

AD, anlamlı değil

4.2 . Suşların Duyarlılık Sonuçları

4.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi ile %100 ve %41 duyarlılık oranları ile kolistin ve tobramisin en etkili antibiyotik olduğu belirlendi. İncelenen *A. baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık durumları Tablo 5’ de gösterildi.

Tablo 5. Suşların disk difüzyon ve E- test yöntemleriyle antibiyotik duyarlılık durumu

Antibiyotik	Disk difüzyon		E-test	
	S	R*	S	R*
Imipenem	38	62	34	66
Meropenem	24	76	24	76
Ampisilin/ sulbaktam	17	83	17	83
Sefoperazon/ sulbaktam	31	69	31	69
Tigesiklin	-	-	100	0
Piperasilin/ tazobaktam	1	99		
Sefepim	15	85		
Seftriakson	1	99		
Sefotaksim	1	99		
Siprofloksasin	3	97		
Levofloksasin	8	92		
Kolistin	100	0		
Amikasin	14	86		
Gentamisin	11	89		
Tobramisin	41	59		
Trimetoprim/sülfametaksazol	12	88		

S: duyarlı, R: dirençli, *orta duyarlı olan suşlar dirençli kabul edildi

4.2.2 E-test Yöntemi

İzole edilen *A. baumannii* suşlarının imipenem, meropenem, ampisilin/sulbaktam, sefoperazon/ sulbaktam, tigesiklin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile MİK aralıkları ve duyarlılık oranları Tablo 6’ de gösterilmiştir. E-test yöntemi ile suşların % 34’ nün imipeneme, % 24’ nün meropeneme, % 100’ nün tigesikline, % 31’ nin sefoperazon/ sulbaktama, % 17’ sinin ampisilin/ sulbaktama duyarlı olduğu belirlendi.

Tablo 6. Suşlarının imipenem, meropenem, ampisilin/sulbaktam, sefoperazon/sulbaktam, tigesiklin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile MİK aralıkları ve duyarlılık oranları

Antibiyotik	MİK (µg/ mL)			Duyarlılık oranları(%)	
	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı	Dirençli*
İmipenem	0.006- > 32	32	> 32	34	66
Meropenem	0.125- >32	32	> 32	24	76
Tigesiklin	0.125- 2	1	2	100	0
Ampisilin/ sulbaktam	0.25- >256	32	256	17	83
Sefoperazon/sulbaktam	0.25- 256	32	256	31	69

*orta duyarlı olan suşlar dirençli kabul edildi.

4.2.3 Sinerji Yöntemi

A. baumannii suşlarına karşı E-test yöntemi ile imipenem- sefoperazon/ sulbaktam ve meropenem- sefoperazon/ sulbaktam kombinasyonlarının sinerjistik aktivitesi Tablo 7’ de gösterildi. Bu antibiyotikler arasında antogonistik aktivite bulunmadı. İmipenem - sefoperazon/ sulbaktam ve meropenem- sefoperazon/ sulbaktam kombinasyonları için sırası ile % 43 ile % 49 oranlarında sinerjistik aktivite olduğu görüldü.

Tablo 7. E-test yöntemi ile imipenem - sefoperazon/ sulbaktam ve meropenem- sefoperazon/ sulbaktam kombinasyonlarının sinerjistik aktivitesi.

Kombiasyon	Sinerji (≤ 0.5)	Kısmi sinerji (> 0.5- < 1)	Aditif 1	İndiferent > 1- < 4	Antogonist ≥ 4
IP-CPS	43	22	19	16	-
MP-CPS	49	30	8	13	-

IP-CPS: imipenem- sefoperazon/ sulbaktam

MP-CPS: meropenem- sefoperazon/ sulbaktam

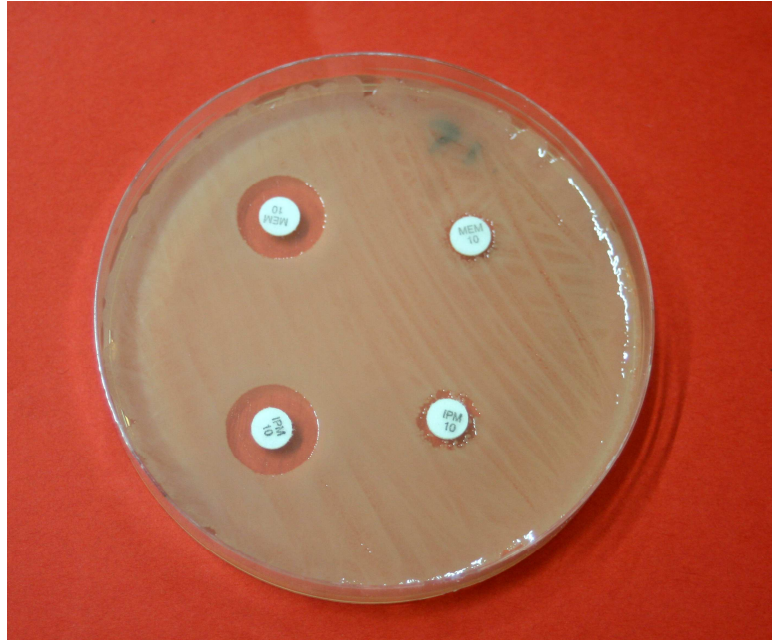
4.2.4 oęul Direnç

Üç yada daha fazla antibiyotik grubuna aynı anda dirençli bulunan izolatlar çoğul ilaç dirençli olarak kabul edildi. Buna göre disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılığı çalışılan 100 *A. baumannii* suşunun 37' si çoğul ilaç direncine sahipti.

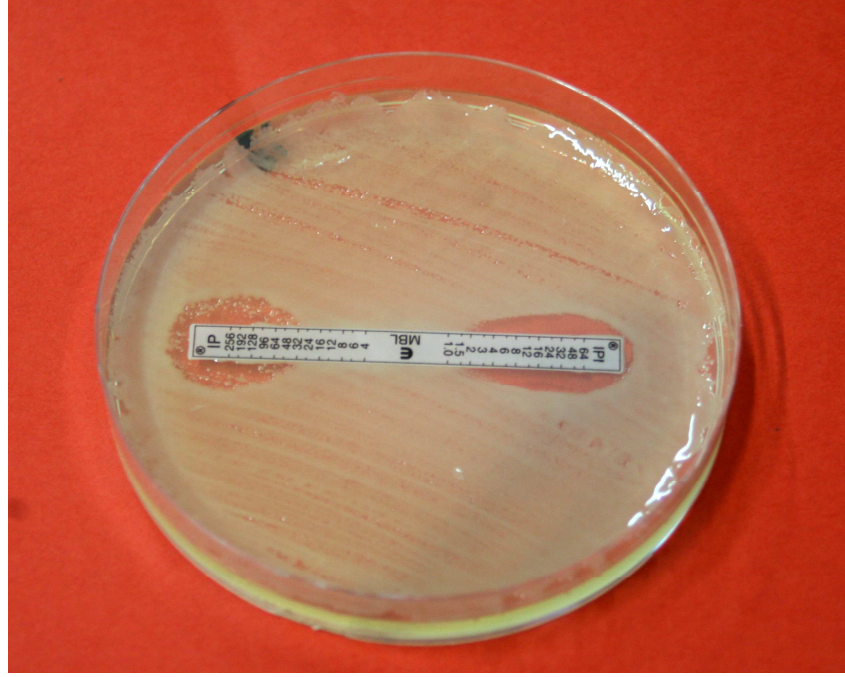
4.3. MBL enzim üretiminin gösterilmesi

4.3.1 Fenotipik Testlerle MBL enzim üretiminin gösterilmesi

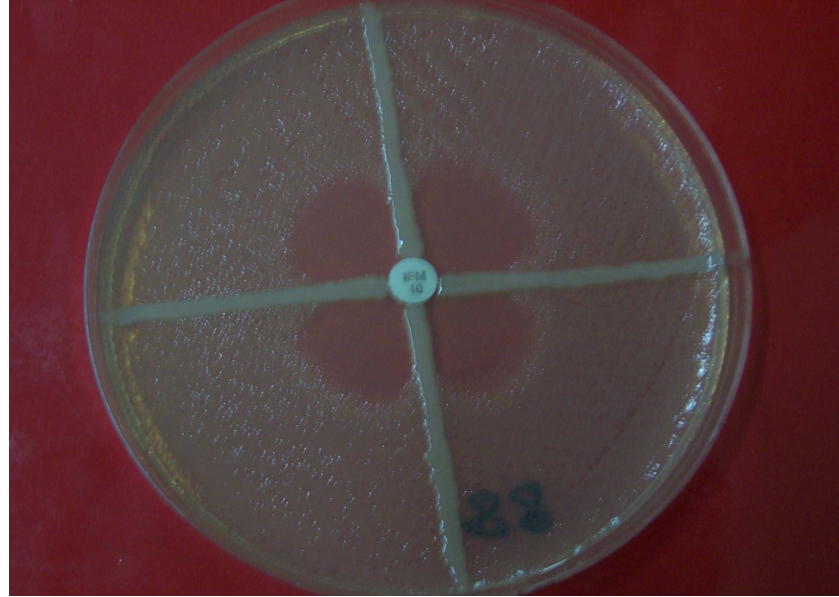
Çalışmaya alınan izolatların fenotipik olarak MBL üretiminin gösterilmesi amacı ile uygulanan kombine disk testinin uygulanarak yapılan çalışmada suşlarının imipenem/ imipenem- EDTA kombinasyonu ile %54' ünde, meropenem/ meropenem-EDTA kombinasyonu ile %59' unda, MBL E-test yöntemiyle %51' inde, Modifiye Hodge test yöntemi ile %54' ünde fenotipik olarak MBL üretildiği gösterildi. Suşların %45' nin kullanılan her üç yöntem ile de MBL ürettiği bulundu. Kullanılan fenotipik yöntemlerle pozitif bulunan birer suş Şekil 1, 2, 3' de gösterildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan iki MBL enzimi üreten pozitif suş fenotipik yöntemler ile pozitif sonuç verdi. Her üç yöntemle pozitif sonuç veren 45 suş disk difüzyon ve E-test yöntemi ile hem imipenem hem de meropeneme dirençli bulundu.



Şekil 1. Kombine disk testi ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretimi



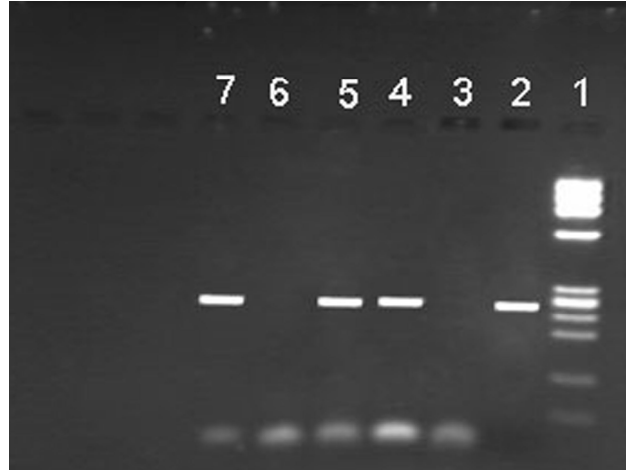
Şekil 2. MBL E-test ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretimi



Şekil 3. Modifiye Hodge test ile fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretimi

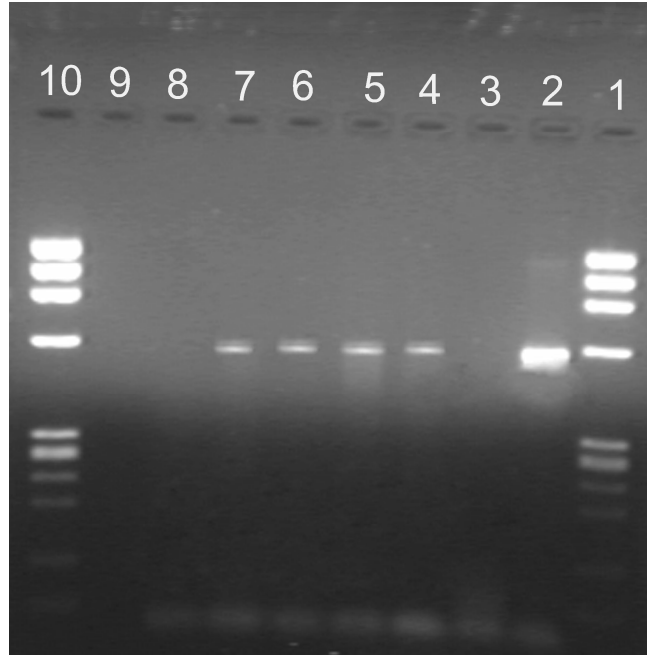
4.3.2 Genotipik Yöntemle MBL enzim üretiminin gösterilmesi

Çalışmaya alınan *A. baumannii* suşlarının, *bla_{VIM-1}* ve *bla_{IMP-1}* genleri özgül iki farklı primer kullanılarak “In house” PZR metodu ile incelendi. Toplam 15 izolat *bla_{IMP-1}* geni, 3 izolat *bla_{VIM-1}* geni açısından pozitif bulundu (Şekil 4, 5).



Şekil 4. Jel elektroforez sisteminde *bla_{VIM-1}* geninin incelenmesi

1. Moleküler weight marker, 2. Pozitif kontrol, 3. Negatif kontrol, 4. 5. 7. Pozitif izolat, 6. Negatif izolat



Şekil 5. Jel elektroforez sisteminde *bla_{IMP-1}* geninin incelenmesi. 1. 10. Moleküler weight marker, 2. Pozitif kontrol, 3. Negatif kontrol, 4. 5. 6. 7. Pozitif izolat, 8. 9. Negatif izolat.

5. TARTIŞMA

Acinetobacter baumannii aerop, hareketsiz, katalaz pozitif, oksidaz negatif, non-fermentatif, gram negatif kokobasildir. Fırsatçı patojen özellik gösteren bu mikroorganizmalar toprakta ve sularda yaşayabildiği gibi hastane ortamına yerleşerek personelden veya hastadan hastaya bulaş ile ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olabilirler. Son 30 yıldır geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması ve invaziv işlemlerin daha sık uygulanması ile bu bakteri hastane ortamında, özellikle YBÜ ve cerrahi kliniklerinde nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak sık izole edilen bakteriler haline gelmiştir(16, 22-24, 58).

A. baumannii bakteriyemisi gelişmesinde risk faktörleri olarak ileri yaş, DM, ventilatör ilişkili pnömoni, yanık enfeksiyonları, uzun süreli ventilatör desteği, yakın dönemde cerrahi işlem uygulanması, malignensiler, YBÜ' de uzun süre yatış ve uygun olmayan antibiyotik kullanımının olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (59- 61).

A. baumannii enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli problem ise çoğul ilaç dirençli kökenlerin izole edilme oranlarında artma ve tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerinde azalmadır (1, 58). Çoğul ilaç dirençli *A. baumannii* bakteriyemileri özellikle ağır sistemik alt hastalığı olan hastalarda görülmektedir. Bu hastalarda pek çok ko morbid faktörün bir arada yer alması bakteriyeminin ve uygun antimikrobiyal tedavinin yaşam üzerine etkisinin analiz edilmesini güçleştirmektedir. *A. baumannii* bakteriyemisinde kaba mortalite oranı % 22- 59 arasında rapor edilmektedir (58, 59, 62, 63). Bu çalışmaların çoğunda 30 gün içinde meydana gelen mortalite başlıca değerlendirme ölçütü olarak kullanılmıştır (58, 62, 63), fakat bu süre ciddi alt hastalığı bulunan kişilerde mortalite nedenlerini analiz etmek için oldukça uzundur. Bu nedenle

çalışmamızda 14 günlük süre başlıca mortalite değerlendirme ölçütü olarak kullanılmıştır. Tüm ölümlerin %63' ü 14 gün içinde, %72' si de 30 gün içinde meydana gelmiştir.

Hastanemizde çalışmaya alınan ardışık *A. baumannii* kökenlerinin %73' ü yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir (Tablo 3). Hastanemizde Alp ve ark.' nın (64) 2006 yılında 41 *A. baumannii* suşunun 34' ni YBÜ' den, ikişer tanesini hemotoloji –onkoloji ve nöroloji servislerinden, birer tanesini de nefroloji ve yanık ünitesinden izole etmişlerdir. Çalışmamızda ise YBÜ dışındaki servislerden özellikle hematoloji-onkoloji servisinden izole edilen suş sayısı yedidir. Bu veriler hastanemizde *A. baumannii* enfeksiyonlarının sadece YBÜ' lerinin problemi olmadığını zamanla diğer servislerin de problemi haline gelebileceğini göstermektedir.

Koprnová ve ark. (61) 157 *A. baumannii* bakteriyemi epizodunda DM' un, Gruppe ve ark (50) ise 219 *Acinetobacter* bakteriyemili hastada ileri yaşın mortalite üzerine etkili olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda ileri yaş (55.4±19.0- 48.0-18.8, p= 0.03), bakteriyemi öncesi hastanede kalış süresi (yaşayan/ ölü=19.8±12.1/15.3±12.07, p=0.027), hastaların altta yatan hastalıklarından hematolojik malignansiler (yaşayan/ ölü=1/12, p= 0.015) ve DM' un (yaşayan/ ölü=1/16, p= 0.005) mortalite için bir risk faktörü olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hastanede kalış süresinin yaşayan hastalara kıyasla ölen hastalarda kısa olması *A. baumannii* bakteriyemisinin ciddi alt hastalığı olanlarda daha ağır geliştiği için hastanede kalış süresinin kısa olduğu düşünülmüştür.

Chen ve ark. (59) invaziv girişim uygulanan hastalarda *A. baumannii* bakteriyemisinde mortalite oranının daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda invaziv girişimler, nötropeni ve enfeksiyon odağı mortalite için bir risk faktörü olarak belirlenmemiştir. Bakteriyemi nedeni bilinmeyen hastalarda ise mortalite oranı oldukça yüksek bulunmuştur (yaşayan/ ölü=6/26, p=0.028). Bunun sebebinin hasta kanındaki yüksek bakteriyel yük ve dirençli *A. baumannii*' nin neden olduğu bakteriyemi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (65). *A. baumannii* bakteriyemisi olan hastaların verilerinin dağılımı Tablo 4' de gösterilmiştir.

Nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonları 1970'li yıllarda gentamisin, minosiklin, nalidiksik asit, ampicilin ve karbenisilin ile tek başına veya kombinasyonlar halinde

kullanılarak kolayca tedavi edilebilmekteyken, bu yıllardan sonra giderek direnç artışı görülmeye başlamıştır (1).

A. baumannii enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenem grubu antibiyotikler diğer bazı bakteriyel enfeksiyonlarda (ESBL pozitif *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* vb.) olduğu gibi son seçenek durumunda olduğu için karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır. Karbapenem direncinden sorumlu mekanizmalar kromozomal veya plazmid kaynaklı beta laktamaz enzimleriyle antibiyotiğin parçalanması, beta laktam antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi ve penisilin bağlayan proteinlerde oluşan değişikliklerdir (1- 3, 19). Bu direnç mekanizmaları arasında en sık görülen, bu bakterilerin ürettikleri karbapenemaz enzimleridir. Bu enzimlerden Ambler sınıflamasında sınıf B' de yer alan MBL enzimleri ve sınıf D' de yer alan oksasilinazlar (Özellikle OXA-51 türevleri, OXA-58 ve OXA-23) en önemli grubu oluşturmaktadır (1-4, 10, 66). Özellikle YBÜ' den izole edilen *A. baumannii* izolatları beta laktam grubu antibiyotiklere karşı farklı ülkelerde, farklı hastanelerde ve hatta aynı hastanenin farklı ünitelerine göre değişik oranlarda direnç göstermektedir.

Ruiz ve ark. (67) İspanya' da altı yıllık süre içinde 1532 *Acinetobacter* izolatında yaptıkları direnç araştırmasında, birçok antibiyotiğe karşı en az iki katı direnç geliştiği, imipenem direncinin ise %1.3' den %80' e ulaştığını bildirmişlerdir. Ülkemizde 4 yıllık bir periyoda yapılan MYSTIC(The Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) program sonuçlarına göre 779 *Acinetobacter* türünün imipeneme %42 ve meropeneme %48 oranında dirençli olduğu saptanmış ve bu suşların üçte biri test edilen bütün antibiyotiklere karşı dirençli bulunmuştur (68). Known ve ark. (58) *A. baumannii* bakteriyemili hastalarda mortalite ile karbapenem direnci arasındaki ilişkiyi rapor etmişlerdir. Karbapenem dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları bütün dünyada olduğu gibi bizim hastanemizin de önemli bir problemidir. Hastanemizde uygun olmayan antimikrobiyal tedavi kullanımının yaygın ve karbapenem direnç oranının da yaklaşık %50 olduğunu bildiren çalışmalar vardır (64, 69). Çalışmamızda izolatların %62' si disk difüzyon yöntemi ile, %66' sı E-test yöntemi ile hem imipeneme hem de meropeneme dirençli bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemi ile izolatların %37' sinin çoğul dirençli olduğu gösterilmiştir. *A. baumannii* bakteriyemili hastaların 33' ünün, kan kültürü alındığında karbapenem tedavisi altında olduğu saptanmıştır. Karbapenem ve çoğul ilaç direncinin hasta sağkalım üzerine etkisini analiz ettiğimizde, karbapenem direncinin

(yaşayan/ ölü=26/ 36, p=0.192) ve çoğul direncin (yaşayan/ ölü=15/ 22, p=0.574) mortalite üzerine anlamlı etkisinin olmadığı görülmüştür. Uygun olmayan ampirik tedavinin (yaşayan/ ölü=23/ 53, p=0.016) ve kesin tedavinin (yaşayan/ ölü=10/ 53, p=<0.001) mortalite üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisinin olduğu görülmüştür. Çalışmamızda karbapenem direncini yüksek bulmamıza rağmen beta laktam grubu antibiyotikler arasında en yüksek duyarlılığa sahip olan karbapenemlerdir (Tablo 5 ve Tablo 6). *A. baumannii* enfeksiyonlarında karbapenemler oldukça duyarlı gözükse de, gelişebilecek direnç düşünülerek empirik antibiyotik kullanımlarında ilk seçenek olarak düşünülmemeli, ancak YBÜ ve riskli hastalarda tercih edilmelidir. Bunun dışındaki durumlarda, antibiyogram sonuçlarına göre tedavi uygulanmalıdır.

Ülkemizde izole edilen *Acinetobacter* türlerinin %80- 95 kadarı geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli bulunmuştur (70, 71). Uzel ve ark. (72) seftriaksona % 92 oranında direncin olduğunu, Erol ve ark. (73) %93.3, Alp ve ark. (74) %87 oranında sefepim direnci olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, sefepime %85, seftriaksona %99, sefotaksime %99 oranlarında saptanan direnç ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Tablo 6). Yüksek oranda saptanan bu direnç, bu grup antibiyotiklerin hastanemizde sıklıkla kullanılmasına bağlanmıştır.

A. baumannii enfeksiyonlarının tedavisinde sulbaktam ve tazobaktamın antibiyotik etkinliğinin olması nedeniyle bunların beta laktam grubundan bir antibiyotikle kombine edilmesinin etkinliği arttıracığı düşünülebilir. Ampisilin/ sulbaktam, sefoperazon/ sulbaktam ve piperasilin/ tazobaktam klinik kullanımda olan sulbaktam ve tazobaktam içeren kombinasyonlardır (4, 75). Higgins ve ark. (75) 115 *A. baumannii* suşuna sulbaktamın tazobaktam' dan daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda *A. baumannii* suşlarına sulbaktam kombinasyonlarının bakterisidal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (76, 77). Hastanemizde 2006 yılında yapılan çalışmada, 41 *A. baumannii* izolatının piperasilin/ tazobaktama %98, ampisilin/ sulbaktama %63 ve sefoperazon/ sulbaktama %56 oranında direnç gösterdiği saptanmıştır (64). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *Acinetobacter* türlerinin piperasilin/ tazobaktama %78-98, ampisilin/ sulbaktama %42-95 ve sefoperazon/ sulbaktama %64.7-88 oranlarında dirence sahip olduğu gösterilmiştir (78- 84). Çalışmamızda piperasilin/ tazobaktama %99, ampisilin/ sulbaktama %83 ve sefoperazon/ sulbaktama %69 oranlarında direnç bulunmuştur. Hastanemizde daha önce

yapılan çalışmaya göre beta laktam+ beta laktamaz inhibitörlerine direncin arttığını görmekteyiz. Sefaperazon/ sulbaktam kombinasyonuna direncin diğer üçüncü kuşak sefalosporinlere göre daha düşük bulunması, sulbaktamın *A. baumannii*' ye bakterisidal aktivite göstermesi ile açıklanmaktadır.

Florokinolonlar ülkemizde kullanıma girdikten sonra fazla miktarda tüketilmeye başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda *A. baumannii* suşlarının bu antibiyotiklere %32. 5-100 oranında dirence sahip olduğu bildirilmektedir (73). İspanya' da 1991- 1996 yılları arasında yapılan bir çalışmada 1532 *Acinetobacter* izolatının siprofloksasin direncinin %54.4' den %90.4' e yükseldiği saptanmıştır (67). Hastanemizde 2004 yılında yapılan çalışmada 114 *A. baumannii* suşunun siprofloksasine %74.7 oranında dirençli olduğu gösterilmiştir (74). Bu çalışmada siprofloksasine %97 ve levofloksasine % 92 oranında direnç bulunmuştur.

A. baumannii enfeksiyonlarının tedavisinde sık kullanılmaları sonucunda aminoglikozidlere direnç gelişimi artmaktadır. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada bu grup antibiyotiklere direncin oldukça yüksek olduğu ve bu grup antibiyotiklerden ise en etkilisinin tobramisin olduğu bildirilmiştir (80, 83, 82). Alp ve ark. (74)' ları hastanemizde daha önce yaptıkları bir çalışmada amikasine %67.3, tobramisine %14.9 oranlarında direncin olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda tobramisine %59, amikasine %86, gentamisine %89 oranında direnç saptanmıştır. Test edilen aminoglikozidler arasında tobramisin *A. baumannii* suşlarına en etkili antibiyotik olduğu görülmüştür.

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda trimetoprim/ sulfametoksazol için direnç oranları %70- 84 olarak bildirilmiştir (73, 81, 82). Çalışmamızda %88 direnç oranı ile trimetoprim/ sulfametoksazol' ün *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde bir seçenek olmaktan uzak olduğu görülmektedir.

Eski bir ilaç olan kolistin, gram negatif bakterilerin dış membranlarındaki anyonik lipopolisakkarid moleküller ile elektrostatik ilişkiye girmek suretiyle hücre membranını bozarak etki gösterir. Ciddi yan etkisinden dolayı kullanımı kısıtlanmış olan bu ilaç, sadece kolistine duyarlı suşların ortaya çıkması ile tekrar gündeme gelmiştir (5, 25). Koomanachai ve ark. (5)' ları çoğul dirençli *A. baumannii*' nin neden olduğu enfeksiyonlarda kolistin kullanan hastalarda mortalite oranının % 46.2, kullanmayan hasta grubunda ise %80 olduğunu göstermişlerdir. Bakteriyemi ile seyreden

enfeksiyonlarda %66- 88 arasında klinik yanıt alınmıştır. Yapılan çalışmalarda kolistin tek başına kullanılamayacağını mutlaka başka bir antibiyotik ile birlikte kullanılması gerektiği belirtilmiştir (5, 26, 28). Bu çalışmada tüm suşlar kolistine duyarlı bulunmuştur. Ülkemizde bu ilacın piyasada bulunmamasından dolayı kolistin sadece bir hastada kullanılmış ve hem klinik hem de mikrobiyolojik başarı sağlanmıştır.

Glisilsiklin derivativesi olan tigesiklin, çoğul dirençli *A. baumannii* kökenlerine *in vitro* etkili bir antibiyotiktir. Yapısal olarak tetrasiklinlere benzerlik göstermesine karşın tigesiklin, tetrasikline karşı bakterilerin geliştirdiği direnç mekanizmalarından etkilenmezler. Tetrasikline özgü pompa mekanizması tigesiklin için zayıf substrat özelliği göstermektedir. Ayrıca bakteri ribozomlarında tetrasiklin bağlanmasını engelleyen proteininin neden olduğu değişikliklerden tigesiklin etkilenmemekte ve ribozomlara bağlanabilmeyi sürdürebilmektedir (85). Bolmström ve ark. (86) *A. baumannii* ve diğer bakterileri de kapsayan çok merkezli bir çalışmada bakterilerin tigesikline olan duyarlılık durumunu CLSI' nın önerdiği sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemi ile E-test yöntemini karşılaştırmışlar ve E-test ile standart yöntemler arasında duyarlılık sonuçları açısından fark olmadığını göstermişlerdir. TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) çalışmasında 2902 *A. baumannii* suşunun tigesiklin için MİK₉₀ değeri 1µg/mL olarak bulunmuştur (87). Zer ve ark. (88) YBÜ' den izole edilen 62 *A. baumannii* suşunun tigesikline %80.64' nün duyarlı, %12.90' nün orta derecede duyarlı, %6.45' nin dirençli olduğunu ve MİK₅₀, MİK₉₀ değerlerini sırası ile 1µg/mL, 4 µg/mL olarak göstermişlerdir. Çalışmamızda tüm suşlar tigesikline duyarlı bulunmuştur (Tablo 5). Ülkemizde tigesiklinin kullanım onayı sadece intraabdominal ve cerrahi sonrası gelişen yumuşak doku enfeksiyonlarında olduğu için ilaç her enfeksiyonda kullanılmamaktadır. Bu sebeple çalışmamızda sadece bir hastada kullanılmış ve klinik yanıt alınmıştır. Dünyada ve ülkemizde az da olsa tigesikline dirençli *A. baumannii* suşları bildirilmektedir. İleride daha yüksek direnç oranlarının gelişmemesi için uygun endikasyonlarda ve hatta kombinasyon halinde kullanılması yararlı olabilir.

Bu çalışmaya alınan *A. baumannii* suşlarının imipenem, meropenem, ampisilin/sulbaktam antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları hem disk difüzyon hem de E-test yöntemiyle çalışılmıştır. Her iki yöntemin duyarlılık sonuçları uyumlu bulunmuştur.

İzole edilen 4 *A. baumannii* suşu E-test yöntemi ile imipeneme dirençli bulunurken disk difüzyon yöntemi ile duyarlı olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki duyarlılık sonuçlarını, hastanemizde daha önceki yıllarda yapılan çalışma verileri ile karşılaştırdığımızda *A. baumannii* suşlarının kolistin ve tigesiklin hariç diğer antibiyotik gruplarına karşı direnç oranlarının artmış olduğu görülmektedir. *A. baumannii* izolatlarında tobramisin ve karbapenem duyarlılığının nispeten yüksek olduğunu, ancak önceki yıllarda daha yüksek olan duyarlılık oranlarının çok düşük değerlere indiği görülmektedir. Karbapenem duyarlılığındaki bu düşüş *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde bu ilacın ileriki yıllarda iyi bir seçenek olmayacağını göstermektedir.

Çoğul dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde hem başarıyı sağlamak hem de direnç gelişimini önlemek amacıyla kombine antibiyotik kullanımı önerilmektedir (24). Bu suşların meydana getirdiği enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif olması amacıyla karbapenem/ sulbaktam antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik aktivitesini araştıran birçok çalışma yapılmıştır (89- 92). Kiffer ve ark. (92) 48 *A. baumannii* suşunda meropenem ve sulbaktam arasındaki antibiyotik etkileşimini dama tahtası yöntemi ile araştırmışlar, izolatların meropenem ve sulbaktam için MİK₅₀ değerlerini sırasıyla 1µg/mL ve 1µg/mL, MİK₉₀ değerlerini ise 8µg/mL ve 32 µg/mL olarak bulmuşlardır. Bu kombinasyon suşların %29. 2' sinde sinerjistik, %47. 9' unda kısmi sinerjistik ve %6. 2' sinde ise antogonistik etki göstermiştir. Ko ve ark. (91) çoğul dirençli bir *A. baumannii* suşunun meropenem/ sulbaktam kombinasyonuna sinerjistik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, farelerdeki intraperitoneal enfeksiyonunun tedavi başarısının meropenemi ve sulbaktamı ayrı ayrı verdiklerinde %35 olduğunu, kombine kullanımında ise bu başarının %87 olduğunu göstermişlerdir. Choi ve ark. (89) ikisi çoğul ilaç dirençli, biri IMP- 1 tipi MBL enzimine sahip 4 *A. baumannii* suşunda imipenem/ sulbaktam kombinasyonun sinerjistik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Song ve ark. (90) imipenem ve sulbaktam için MİK₅₀ değerleri sırasıyla 32 µg/mL ve 16 µg/mL, MİK₉₀ değerleri ise 32 µg/mL ve 32 µg/mL olan 43 *A. baumannii* suşunda imipenem/ sulbaktam kombinasyonun *in vitro* aktivitelerinin etkili olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda 100 *A. baumannii* suşunun imipenem, meropenem ve sefoperazon/ sulbaktam antibiyotikleri için sırası ile MİK₅₀ değerleri 32 µg/mL, 32 µg/mL ve 32 µg/mL, MİK₉₀ değerleri ise > 32 µg/mL, > 32

$\mu\text{g/mL}$ ve $256 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Bu izolatların, imipenem ve sefoperazon/sulbaktam kombinasyonuna karşı %43' ü sinerjistik, %22' si kısmi sinerjistik, %19' u aditif, %16' sı indiferent aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Meropenem ve sefoperazon/ sulbaktam kombinasyonuna ise %49' u sinerjistik, %30' u kısmi sinerjistik, %8' si aditif, %13' ü indiferent aktivite gösterdiği saptanmıştır (Tablo 7). Suşların her iki kombinasyonla da antogonistik etkileşiminin olmaması, hastanemizde çoğul dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenem- sefoperazon/sulbaktam kombinasyonun iyi bir seçim olabileceğini düşündürmüştür.

Ambler sınıflamasına göre moleküler sınıf B' de, Bush, Jacoby ve Medeiros sınıflamasına göre fonksiyonel sınıf 3'de yer alan MBL enzimine sahip *A. baumannii* suşları aztreonam hariç bütün beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek direnç kazanırlar. Bu enzimlerin en önemli özellikleri aktif bölgelerinde çinko iyonu bulundurmaları nedeniyle EDTA, MPA, SMA gibi metal şelatörlerle inhibe olmaları, buna karşılık sulbaktam, tazobaktam ve klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmamalarıdır. Gram negatif bakterilerde IMP, VIM, SPM-1 ve GIM-1 olmak üzere dört farklı grup altında toplanan MBL' lerden en fazla IMP ve VIM tipi enzimler saptanmaktadır. MBL enzimlerinin üretiminden sorumlu olan MBL genleri, integron üzerindeki hareketli gen kasetlerinde yer almakta ve bu nedenle farklı gram negatif bakteri türleri arasında hızla yayılabilme potansiyeli taşımaktadır (10). Ayrıca bu enzime sahip *A. baumannii* suşları, geliştirdikleri farklı direnç mekanizmalarıyla beta laktam olmayan ilaçlara da sıklıkla direnç göstermektedirler (93). Yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara neden olan *A. baumannii* suşlarında giderek artan karbapenem direncinin ve MBL üretiminin belirlenmesi, hem hastalara optimum tedavinin uygulanabilmesi hem de direnç genlerinin hastane ortamında diğer bakteri türlerine aktarılma olasılığının önlenmesi açısından önemlidir. Fakat MBL enzimlerinin varlığının araştırılması için CLSI dokümanlarında önerilen standart bir yöntem henüz bildirilmemektedir. Duyarlılık testleri ise MBL üretimini göstermek için yetersiz kalmaktadır (94). Rutin laboratuarlarda MBL enzimine sahip *A.baumannii* suşlarında bu enzimlerin gösterilebilmesi için hem duyarlılığı hem de özgüllüğü yüksek uygulaması kolay olan fenotipik metodların bulunması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla kombine disk diffüzyon testi, Modifiye Hodge testi ve MBL E test yöntemi tarama testleri olarak kullanılmak üzere özgüllük ve duyarlılık çalışmaları sürekli araştırılmaktadır ve sonuçlar PZR sonuçları ile karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmaların

bazıları olumlu sonuçlar vermiş bazıları da yalancı pozitifliğin yüksek olduğunu göstermiştir. Tabii ki, farklı ülkelerde farklı MBL prevalanslarının bu sonuçlar üzerindeki etkisi büyüktür. MBL enziminin tayininde uygulanan fenotipik testlerin büyük bir çoğunluğu, enzimin metal şelatör tarafından inhibisyonu temeline dayanmaktadır. Metal şelatör, enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonuna bağlanarak aktif bölgeden çinko iyonunun ayrılmasına yol açmaktadır. Bu prensibe dayanan fenotipik testlerden bir tanesi kombine disk diffüzyon testidir. Eun-Jee ve ark. (94) 2003 yılında imipenem ve/veya seftazidime dirençli *P.aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında MBL enzimini göstermek için kombine disk diffüzyon testini uygulamış ve sonuçları PZR analizi ile doğrulamışlardır. Bu araştırmacılar, kombine disk diffüzyon testinin VIM benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısındaki duyarlılığının %93.9 olduğunu belirtirken, IMP benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısında başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Yong ve ark. (48) çoğunluğu VIM-2 üreten MBL-pozitif *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatlarında imipenem-EDTA kombine disk diffüzyon testini araştırmışlar, 750 ve 1000/ µg EDTA içeren farklı iki kombine disk hazırlamışlardır. 750/ µg EDTA içeren diskin kullanıldığı yöntem tüm MBL üreten *Pseudomonas*' ları ayırt edebilmiş ve *Acinetobacter spp.* için duyarlılığı ve özgüllüğü, sırasıyla, %95.7 ve %91 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada imipenem-EDTA kombine disk metodunun basit ve oldukça duyarlı olduğu, özgüllüğünün *Pseudomonas spp.* için mükemmel, *Acinetobacter spp.* için iyi olduğu görülmektedir. Yan ve ark.(49) 2004 yılında yayınladıkları raporda ise, kombine disk diffüzyon testinin *P.aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında MBL' nin fenotipik tanısındaki duyarlılığının %87, özgüllüğünün ise %96.7 olduğunu bildirmişlerdir. MBL üreten izolatlarda imipenem MİK değeri < 4 µg/ mL ise kombine disk difüzyon testinin uygulanamayacağı vurgulanmıştır. Diğer taraftan MBL üreten ve imipenem MİK değeri > 4 µg/ mL olan izolatların hepsi kombine disk diffüzyon yöntemi ile tanımlanabilmiştir. Ülkemizde Altoparlak ve ark. (95), karbapenemlere dirençli 40 *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşunun imipenem- EDTA kombine disk diffüzyon yöntemi ile 22 (%55)' sinde pozitiflik bulmuşlardır. Fakat genotipik yöntemlerle doğrulama çalışması yapmamışlardır. Aktaş ve ark. (96) imipenem, meropenem, seftazidim ve aztreonam' a dirençli 11 *A. baumannii* izolatında 0.5 M EDTA solusyonu eklenerek hazırlanan imipenem kombine disklerle MBL üretimini gösterirken PZR ile gösterememişlerdir.

MBL E-test şeritleri, MBL' lerin fenotipik olarak belirlenmesinde kullanılan diğer bir testtir. Ticari olarak bulunabilen E-test aynı zamanda kolay uygulanma özelliğine de sahiptir. E-test şeridinin üzerinde, bir tarafta imipenem diğer tarafta ise imipenem ile birlikte EDTA bulunmaktadır. En büyük dezavantajı, imipeneme orta dirençli ve duyarlı izolatlarda MBL belirlenmesinde uygun olmamasıdır. Walsh ve ark. (2) 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, daha önce MBL enzimine sahip olduğu belirlenmiş ve imipenem MİK değeri $> 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ olan izolatların büyük bir çoğunluğunun E-test ile pozitif sonuç verdiğini rapor etmişler ve MBL E- test duyarlılığını %94 ve özgüllüğünü %95 olarak bildirmişlerdir. Yan ve ark. (49) 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada, MBL ürettiği bilinen *Pseudomonas spp.* ve *A. baumannii* suşlarında MBL E-testin duyarlılığını %87, özgüllüğünü %100 olarak belirlemişlerdir. Kiffer ve ark. (92) 48 *A. baumannii* izolatının altısında MBL varlığını göstermişlerdir. Lee ve ark.(97) 2005 yılında *bla-VIM* ve *bla-IMP* genlere sahip olan *Acinetobacter spp.* izolatlarında bu testin duyarlılığının %100 olduğunu bildirmişlerdir. Toraman ve ark. (98, 99)' larının yaptığı iki ayrı çalışmada da *A. baumannii* suşlarında MBL E-test yöntemiyle MBL varlığını göstermişler ancak PZR ile MBL enzim genlerini araştırmamışlardır.

MBL enzimlerin fenotipik olarak belirlenmesinde diğer bir test ise Modifiye Hodge Testi' dir. Bu testin prensibi, imipeneme duyarlı olan bir *E. coli* izolatının MBL üreten bir bakterinin varlığında, enzim tarafından imipenemin hidrolize olması nedeniyle üreme kabiliyetini tekrar kazanmasına dayanmaktadır. Lee ve ark. (11) 1995- 1999 yılları arasında imipeneme dirençli *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* izolatlarında bu yöntemi uygulamışlar ve PZR sonuçları ile karşılaştırdıklarında testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %88 olarak bulmuşlardır. Yapılan diğer çalışmalarda Modifiye Hodge testi için nadir yalancı pozitiflikler rapor edilmiş ve bunun imipenem diskinde veya Mueller-Hinton agara çinko sülfat ilavesi ile engellenebileceği bildirilmiştir(13).

Çalışmamızda 0.5 M EDTA solusyonu eklenerek hazırlanan imipenem ve meropenem kombine diskleri kullanılmıştır. Suşların imipenem/ imipenem- EDTA kombinsyonu ile %54' ünde, meropenem/ meropenem-EDTA kombinsyonu ile %59' unda MBL ürettiği gösterilmiştir. İmipenem/ imipenem- EDTA kombinsyonu ile MBL enzimine sahip suşların hepsi hem imipeneme hem de meropeneme dirençli, meropenem/ meropenem-EDTA kombinsyonu ile MBL enzimine sahip suşların hepsi meropeneme dirençli iken 4' ü imipeneme duyarlı bulunmuştur. İzolatların %51' inde MBL E-test, %54' ünde

Modifiye Hodge test yöntemi ile MBL üretimi fenotipik olarak gösterilmiştir ve her iki yöntemle de pozitif olan suşların hepsi karbapenemlere dirençli bulunmuştur. Her üç fenotipik yöntemle MBL üretimi gösterilen 45 izolatın 15' inde *bla_{IMP}* geni, üçünde *bla_{VIM}* geni PZR ile belirlenmiştir.

Bugüne kadar dünyanın çeşitli ülkelerinde ve ülkemizde *A. baumannii* izolatlarında MBL enzimini gösteren çalışmaların çoğunluğu fenotipik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Halen MBL tanısında standart bir test olmaması, araştırmacıları duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek testi bulma çabasına yöneltmiştir. Yapılan çalışmaların bazılarında, fenotipik testlerin MBL tayinindeki duyarlılık ve özgüllükleri belirlenmiştir. Bu çalışmalarda, çalışılan izolatlarda var olabilecek tüm MBL enzimlerinin saptandığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda ise, çalışılan izolatlarda varolabilecek tüm enzim tipleri saptanamadığı için fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin verilmesi uygun görülmemiştir. Bunun yerine fenotipik test sonuçları ve PZR analizi sonucunda pozitif bulunan izolatlar baz alınarak tartışılmıştır. Ayrıca *A. baumannii* suşlarında karbapenem direncine MBL üretiminin sorumlu olabileceği gibi OXA türü beta laktamazların ve diğer direnç mekanizmalarının da neden olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Çoğul ilaç dirençli *A. baumannii* bakteriyemisi genellikle YBÜ' de görülmektedir ve yüksek mortaliteye neden olmaktadır. Bu enfeksiyonların önlenmesi için, risk faktörleri saptanarak etkin enfeksiyon kontrol programlarının uygulanması gerekmektedir.

İzole edilen *A. baumannii* suşlarının kolistin ve tigesiklin hariç birçok antibiyotiğe yüksek direnç oranları gösterdiği, karbapenem grubu antibiyotiklere de önceki yıllarla karşılaştırıldığında duyarlılığın azalmakta olduğu saptanmıştır. Bu nedene antibiyotiklerin kontrollü ve akılcı bir şekilde kullanılması önem taşımaktadır. Aksi halde çoğul dirençli *A. baumannii* suşlarının yerini tam dirençli suşlar alacaktır.

Çalışmamızda izolatların karbapenem- sefoperazon/sulbaktam kombinasyonuna *in vitro* sinerji oranların yüksek olması ve antogonistik etkileşimlerinin olmaması nedeniyle bu kombinasyonun çoğul dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir seçim olabileceğini düşündürmüştür.

MBL üreten *A. baumannii* enfeksiyonlarında tedavi seçeneklerinin sınırlı olması nedeniyle, MBL üreten izolatların hastane ortamında yayılmasını engellemek ve tedaviye yön vermek amacıyla bu izolatların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında hızlı, kolay ve güvenilir testler ile tanımlanabilmesi çok önemlidir.

Ülkemizde *A. baumannii* izolatlarında MBL varlığını araştıran çalışmaların çoğu fenotipik yöntemlerle yapılmıştır ve sonuçlar moleküler yöntemlerle doğrulanmamıştır. Sadece bir çalışmada her iki yöntem uygulanmış ve PZR yöntemiyle MBL varlığı gösterilememiştir. Çalışmamızda *A. baumannii* suşlarında PZR ile MBL enzim genleri gösterilmiştir. Sonuçların moleküler yöntemlerden altın standart olarak kabul edilen sekanslama yöntemi ile de doğrulanması planlanmaktadır.

Ek 1. Hasta İzlem Formu

Hasta No:

Ad-Soyad:

Dosya No:

Örnek No:

Örnek Cinsi:

Yaş-Cinsiyet:

Yatış-Çıkış Tarihleri:

Kültür Gönderme Tarihleri:

Üreme Rapor Tarihi:

Kültür Alındığında Yattığı Servis:

Primer Hastalık:

DM:

KBY:

Karaciğer Yetmezliği:

Kalp Yetmezliği:

Koroner Arter Hastalığı:

Hematolojik Malignensi:

Solid Tümör:

KOAH:

Kültür Alınmadan Önceki 30 Gün İçindeki Kullandığı Antibiyotikler:

1)

2)

Santral Venöz Kataterizasyon:

Üriner Kataterizasyon:

Nazogastrik Tüp Uygulaması:

Bakteriyemi Öncesi Cerrahi Girişim:

Entübasyon:

Trakeostomi:

Parenteral Nutrisyon:

Nötropeni:

Hemodiyaliz:

Başlangıç Tedavisi:

Kültür Sonucu İle Yapılan Tedavi Değişikliği:

Tedavi Süresi:

Primer Enfeksiyon Odağı:

Eş Zamanlı Diğer Enfeksiyon Odağı Varlığı:

İn vitro Duyarlılık Sonucu

KAYNAKLAR

1. Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148- 65.
2. Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A and Gales A. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -lactamases in Routine Clinical Testing. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2755- 2759.
3. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother 1995; 39: 1211- 1233.
4. Levin AS. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 144- 153.
5. Koomanachai P, Tiengrim S, Kiratisin P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of colistin (colistimethate sodium) for therapy of infetions caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. Int J Infect Dis 2007 (in press).
6. Sader HS, Jones RN, Dowzicky MJ, Fritsche TR. Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 52: 203- 208.
7. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill and checkerboard methods. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 38: 43- 50.
8. Moody J. Susceptibility tests to evaluate synergism. In: Isenberg HD, editor. Clinical microbiology procedures handbook. Washington, DC: ASM Press; 2004. pp. 5.12.1– 23.

9. Haddad FA, Van Horn K, Carbonaro C, Agüero- Rosenfeld M, Wormser GP. Evaluation antibiotic combinations against multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii* using E-test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 577- 9.
10. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18(2): 306- 325.
11. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yun JH. Modified Hodge and EDTA synergy tests to screen metallo- β - lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter species*. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 88- 102.
12. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K et al. Convenient test for screening β -lactamase producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 40- 43.
13. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH and Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase- Producing Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol.*2003; 41: 4623- 4629.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S16 [ISBN 1- 56238- 588- 7]. Clinical and Laboratory Standard Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA, 2006.
15. Nemec A, De BT, Tjernberg I, Vaneechoutte M, Van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii sp. nov.* and *Acinetobacter schindleri sp. nov.*, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51: 1891- 99.
16. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH. (Eds.). *Manuel of Clinical Microbiology* 9 th ed. Washington ASM Pres 2007: 770- 802.
17. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selectie and differential medium for isolation of

- clinically important *Acinetobacter spp.*, and comparison with Herellea agar and Holtton's agar. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2353- 58.
18. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th (International) Ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1994: 129.
 19. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, ed(s). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000; 5th ed. 2339- 2344.
 20. Goel KV, Kapil A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane Proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. BMC Microbiol 2001; 1: 16- 23.
 21. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical, and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. J Hosp Infect 2003; 54: 39–45.
 22. D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. Infect Control Hosp Epidemiol 2000; 21: 588- 591.
 23. Dy ME, Nord JA, LaBombardi VJ, Kislak JW. The emergence of resistant strains of *Acinetobacter baumannii*: clinical and infection control implications. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20: 565- 67.
 24. Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PM, Waites KB. Comparative *in vitro* antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 881- 5.
 25. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. *In vitro* activities of non- traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug- resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 224- 8.
 26. Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost

completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Clin Infect Dis 2006; 43: 95- 9.

27. Tascini C, Menichetti F, Bozza S, Favero AD, Bistoni F. Evaluation of the Activities of two-drug combinations of rifampicin, polymyxin B and ampicilli/sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 270- 271.
28. Hogg GM, Barr JG, Webb CH. In vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug- resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 494- 5.
29. Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H. Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Diag Microbiol Infect Dis 2001; 40: 117- 20.
30. Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 753- 7.
31. Appleman MD, Belzberg H, Citron DM et al. *In vitro* activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1035- 40.
32. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 321- 31.
33. Rasmussen BA and Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 223- 32.
34. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. Biochemical Pharmacology 2007; 74: 1686- 1701.
35. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 147- 151.
36. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R et al. Molecular characterization of

- an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 71- 78.
37. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K et al. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1612- 1615.
 38. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 824- 29.
 39. Kazuyoshi S, Arakawa Y, Nakashima K et al. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 349- 53.
 40. Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A et al. Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2014- 16.
 41. Docguier JD, Riccio ML, Mugnaioli C et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1522- 8.
 42. Tysall L, Stockdale MW, Chadwick PR et al. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 217- 8.
 43. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron –borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584- 90.
 44. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 84- 85.
 45. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R et al. Detection of VIM- 5 metallo- β -

- lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 282- 3.
46. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA et al. Molecular characterizaion of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 673- 9.
 47. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4654- 61.
 48. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* J Clin Microbiol 2002; 40: 3798- 3801.
 49. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta- lactamases in gram- negative bacilli. Diag Microbiol Infect Dis 2004; 49: 5- 11.
 50. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C et al. Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2002; 40: 4388- 90.
 51. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol 1991; 29: 533- 8.
 52. McGregor A Schio F, Beaton S, Boulton V, Perman M, Gilbert G. The MicroScan WalkAway diagnostic microbiology system-an evaluation. Pathology 1995; 27(2): 172- 6.
 53. Gülay Z. Antibiyotik kombinasyonlarının *in vitro* etkinliğini ölçen testler. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı Kitabı, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 33, 1997, p: 85- 100.
 54. Doğanay M. Nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonları. Doğanay M, Ünal S

- (eds), Hastane İnfeksiyonları, Ankara 2003, pp. 473- 88.
55. Uzun Ö. Hastane infeksiyonları: Tanımlar. Doğanay M, Ünal S (eds), Hastane İnfeksiyonları, Ankara 2003, pp. 35- 57.
 56. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC Disk Diffusion Method for Antimicrobial susceptibility testing version 4. http://www.bsac.org.uk/_db/_documents/version_4_january_2005_final_NH_april_2.pdf (28 April 2006, date last accessed).
 57. Navon- Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. High tigecycline resistance in multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 772- 4.
 58. Kwon KT, Oh WS, Song JH, et al. Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2007; 59(3): 525- 30.
 59. Chen PH, Chen TL, Lai CH, et al. Predictor of mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. J Microbiol Immunol Infect 2005; 38: 127- 36.
 60. Grupper M, Sprecher H, Mashlach T, Finkelstein R. Attributable mortality of nosocomial *Acinetobacter* bacteraemia. Infect Cont Hosp Epidemiol 2007; 28: 293- 8.
 61. Koprnová J, Svetlanský I, Babel'á R et al. Prospective study of antibacterial susceptibility, risk factors and outcome of 157 episodes of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia in 1999 in Slovakia. Scand J Infect Dis 2001; 33: 891- 5.
 62. Wareham DW, Bean DC, Khanna P et al. Bloodstream infection due to *Acinetobacter spp*: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27: 607- 12.
 63. Falagas ME, Kasiakou SK, Rafailidis PI, Zouglakis G, Morfou P. Comparison of mortality of patients with *Acinetobacter baumannii* bacteraemia receiving appropriate and inappropriate empirical therapy. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 1251- 4.
 64. Alp E, Esel D, Yıldız O, Voss A, Melchers W, Doganay M. Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream infection isolates in a Turkish university hospital.

- Scand J Infect Dis 2006; 38: 335- 40.
65. Kang CI, Kim SH, Park WB et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 760- 6.
 66. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 202- 8.
 67. Ruiz J, Nunez ML, Perez J, Simarro E, Martinez- Campos L, Gomez J. Evolution of resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* over a 6- year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 292- 5.
 68. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B; Turkish MYSTIC Study Group. Antibiotic resistance surveillance over a 4- year period (2000- 2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 453- 7.
 69. Metan G, Alp E, Aygen B, Sümerkan B. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post- neurosurgical patients: Clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 197- 9.
 70. Günseren F, Mamıkoğlu L, Öztürk S et al. 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- 8.
 71. Aksaray S, Dokuzoğuz B, Güvener E et al. Surveillance of antimicrobial resistance among gram- negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 695- 9.
 72. Uzel S, Çağatay AA, Özsüt H, Eraksoy H, Dilmener M. Yoğun bakım biriminde ventilatörle ilişkili pnömoni etkeni olabilecek bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Klimik Dergisi* 1999; 12(2): 60- 4.
 73. Erol S, Yazgı H, Aktaş O, Özkurt Z. Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarında antibiyotik direnci. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2002; 6: 19- 23.
 74. Alp E, Muhammet G, Orhan Y ve ark. Yoğun bakım ünitelerimizde nozokomiyal pnömoni insidansı, etkenleri ve antibiyotik direnci. *Flora* 2004;

9(2): 125- 31.

75. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. *In vitro* activities of the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam and tazobactam alone or in combination with β -lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1586- 92.
76. Rodriguez- Hernandez MJ, Cuberos L, Pichardo C et al. Sulbactam efficacy in experimental model caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob. Chemother* 2001; 47: 479- 82.
77. Wolf 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 mouse pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1406- 11.
78. Çetin ES, Kaya S, Tetik T, Cicioğlu Arıdoğan B. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi* 2006; 20: 202- 5.
79. Köseoğlu-Eser Ö, Kocagöz S, Ergin A, Altun B. Yoğun bakım ünitelerinde infeksiyon etkeni olan gram-negatif basillerin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2005; 19(1): 75- 80.
80. Özer B, Tatman-Oktun M, Memiş D, Oktun M. Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkenleri, antibiyotik duyarlılıkları ve antibiyotik kullanımı. *İnfeksiyon Dergisi* 2006; 20(3): 165- 170.
81. Yavuz MT, Şahin İ, Behçet M, Öztürk E, Kaya D. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi* 2006; 20(2): 107- 110.
82. Karşılıgil T, Balcı İ. Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarında antibiyotik direnci. *İnfeksiyon Dergisi* 2000; 14(4): 511- 4.
83. Çolpan A, Güngör Ş, Baykam N, Dokuzoğuz B. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik direnç durumlarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2002; 16(1): 55- 58.

84. Kaya I, Göker G, Bal Kayacan Ç, Gürler N. Yoğun bakım izolatu Gram negatif bakterilerde tigesiklin duyarlılığı. ANKEM Dergisi 2007; 21(3): 142- 5.
85. Hawkey P, Finch R. Tigecycline: *in vitro* performance as a predictor of clinical of efficacy. Clin Microbiol Infect Dis 2006; 13: 354- 62.
86. Bolmström A, Karlsson A, Engelhardt A et al. Validation and reproducibility assessment of tigecycline MIC determinations by E test. J Clin Microbiol 2007; 45: 2474- 9.
87. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/ Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the *in vitro* activity of tigecycline. J Antimicrob Chemother 2007; 13: 1018- 29.
88. Zer Y, Özgür Akın FE, Namıduru M. *Acinetobacter baumannii* suşlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 2007; 21 (4): 193- 6.
89. Choi JY, Park YS, Cho CH et al. Synergic *in vitro* activity of imipenem and sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 1098- 1101.
90. Song JY, Kee SY, Hwang IS et al. *In vitro* activities of carbapenem/ sulbactam combination, colistin, colistin / rifampicin combination and tigecycline against carbapenem - resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrobiol Chemother 2007; 60: 317- 22.
91. Ko WC, Lee HC, Chiang SR et al. *In vitro* and *in vivo* activity of meropenem and sulbactam against a multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii* strain. J Antimicrobiol Chemother 2004; 53: 393- 5.
92. Kiffer CRV, Sampaio JLM, Sinto S et al. *In vitro* synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Diag Microbiol Infect Dis 2005; 52: 317- 22.
93. Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. Curr Opin Investig Drugs 2002; 3: 218-24.
94. Oh EJ, Lee S, Park YJ et al. Prevalance of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University

- hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β - lactamase. J Microbiol Methods 2003; 54: 411- 8.
95. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. Burns 2005; 31: 707- 10.
96. Aktaş Z, Bal Kayacan Ç. Investigation of metallo-beta- lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E- test, disk synergy and PCR. Scan J Infect Dis 2008; 40: 320- 5.
97. Lee K, Yong D, Yum JH et al. Evaluation of Etest MBL for Detection of *bla*_{VIM-1} and *bla*_{VIM-2} allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2005; 43: 942- 4.
98. Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta laktamaz araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 2005; 19(1): 101- 5.
99. Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. Detection of metallo- β -lactamase production and antibiotic resistance with E-test method in *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Klebsiella* strains, in Turkey. J Infect Chemother 2004; 10: 257- 61.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. **Fatma MUTLU SARIGÜZEL**'in Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait '**ACINETOBACTER BAUMANNII** BAKTERİYEMİSİ: EPİDEMİYOLOJİ VE KÖKENLERİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI' adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 22.12.2008

İmza

Başkan. Prof. Dr. Yusuf Özböl İmza

Üye. Prof. Dr. A. Gülelt SÜMERİCAN İmza

Üye. Prof. Dr. A. Nedret KOCALP İmza

Üye. Doç. Dr. Duygu PERÇİN İmza

Üye. Yrd. Doç. Dr. Gökhan METİN İmza