

**KLİNİK *ACINETOBACTER BAUMANNII*  
İZOLATLARINDA DİRENÇ GENLERİNİN  
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Arş. Grv. Dr. Gülşah AŞIK**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
AFYONKARAHİSAR 2011**

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**KLİNİK *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARINDA  
DİRENÇ GENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Arş. Grv. Dr. Gülşah AŞIK**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ**

**AFYONKARAHİSAR 2011**

T.C.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Tez başlığı: Klinik *Acinetobacter baumannii* izolatlarında direnç genlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması

Tezi hazırlayan: Arş. Grv. Dr. Gülşah AŞIK

Tez savunma tarihi: 20.10.2010

Tez kabul tarihi: 14.01.2011

Tez danışmanı: Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ

İş bu çalışma jürimiz tarafından TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE

Üye

Üye

Doç. Dr. Mutafa ALTINDIŞ

Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA

ONAY

DEKAN

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve uzmanlık eğitimim süresince, değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her konuda olduğu gibi tez çalışmalarımın da planlanması ve yürütülmesinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana güvenen ve bu güveni daima hissettiren, birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli tez danışmanım Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ hocama yardımları için teşekkür ederim.

Anabilim dalı Başkanımız değerli hocam Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE başta olmak üzere, uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve desteklerini esirgemeyen, yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA ve Doç. Dr. Mustafa ALTINDİŞ'e teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca sevgi ve ilgisiyle hep yanımda olan, anlayışı ve sabrıyla beni sürekli destekleyen sevgili eşim Dr. Ahmet Hakkı AŞIK'a, varlıklarıyla bana güç veren canım çocuklarıma, bana inanıp güvendikleri için anne ve babalarım başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarım Dr. Özlem Yoldaş ve Dr. Halil ER'e ve tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Dr. Gülşah AŞIK

AFYONKARAHİSAR 2010

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
KISALTMALAR .....	V
TABLOLAR DİZİNİ .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
I-GİRİŞ.....	1
II-GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. TAKSONOMİ VE TARİHÇE .....	2
2.2. MORFOLOJİK, METABOLİK VE KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ.....	4
2.3. VİRULANS FAKTÖRLERİ.....	5
2.4. EPİDEMİYOLOJİ .....	9
2.5. ACINETOBACTER İNFEKSİYONLARI .....	11
2.5.1. Solunum sistemi infeksiyonları.....	12
2.5.2. Bakteriyemi .....	12
2.5.3. İntrakraniyal infeksiyonlar .....	13
2.5.4. Yumuşak doku infeksiyonları .....	13
2.5.5. Üriner sistem infeksiyonları.....	13
2.5.6. Diğer infeksiyonlar.....	13
2.7 TEDAVİ.....	14
2.8. ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	18
2.8.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç.....	19
2.8.1.1. Beta-laktamaz üretimi .....	19
2.8.1.2 Dış membran proteinlerinde (OMP) değişiklik .....	25
2.8.1.3 Penisilin bağlayan proteinler (PBP).....	26

2.8.2. Aminoglikozidlere Direnç.....	27
2.8.3. Kinolonlara Direnç.....	28
2.8.4. Diğer Antibiyotiklere Direnç .....	29
2.9. TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ.....	30
2.9.1. Fenotipik Tiplendirme Yöntemleri .....	31
2.9.2. Genotipik Tiplendirme Yöntemleri.....	32
2.9.2.1. Plazmid profil analizi:.....	32
2.9.2.2. Ribotiplendirme: .....	33
2.9.2.3. Multilokus sekans tipleme (MLST):.....	33
2.9.2.4. Southern blotting ve Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP): .....	33
2.9.2.5. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE):.....	34
2.9.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli yöntemler: .....	34
2.9.2.7. DNA dizi analizi: .....	35
III- MATERYAL ve METOT.....	36
3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI .....	36
3.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	36
3.1.2. Kültür ve Tanımlama .....	38
3.1.3. <i>Acinetobacter</i> Suşlarının Depolanması .....	39
3.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ.....	39
3.2.1. MicroScan Autoscan 4 .....	40
3.2.2. VITEK 2 Compact .....	40
3.2.3. Konvansiyonel Yöntem.....	40
3.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR .....	41
3.3.1. Bakteriyal DNA'nın İzolasyonu .....	41

3.3.1.1. Kaynatma yöntemiyle DNA izolasyonu: .....	42
3.3.1.2. Ekstraksiyon kiti ile DNA izolasyonu: .....	42
3.3.1.3. Bakteriyel DNA'nın kalite ve miktarının değerlendirilmesi: .....	44
3.3.1.4. Primer hazırlığı.....	45
3.3.2. PCR Optimizasyon Çalışmaları .....	46
3.3.2.1. <i>A. baumannii</i> 'nin OXA-23 geni için optimizasyon .....	46
3.3.2.2. <i>A. baumannii</i> 'nin OXA-24 geni için optimizasyon: .....	47
3.3.2.3. <i>A. baumannii</i> 'nin OXA-51 geni için optimizasyon: .....	49
3.3.2.4. <i>A. baumannii</i> 'nin OXA-58 geni için optimizasyon: .....	51
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	53
3.3.4. Real Time PCR .....	54
3.5. İSTATİSTİKSEL ÇALIŞMALAR .....	57
IV- BULGULAR .....	58
4.1. KLİNİK İZOLATLARIN ÖZELLİKLERİ.....	58
4.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI .....	60
4.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI.....	62
V- TARTIŞMA .....	69
ÖZET.....	89
SUMMARY .....	91
KAYNAKLAR .....	93

## KISALTMALAR

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

VİP: Ventilator ilişkili pnömoni

QS: Quorum Sensing

IPM: İmipenem

MEM: Meropenem

CAZ: Seftazidim

CTX: Sefotaksim

CRO: Seftriakson

FEP: Sefepim

SAM: Ampisilin Sulbaktam

SCF: Sefaperozon Sulbaktam

TZP: Tazobaktam Piperasilin

CİP: Siprofloksasin

LEV: Levofloksasin

TİG: Tigesiklin

COL: Kolistin

AK: Amikasin

CN: Gentamisin

TOB: Tobramisin

RİF: Rifampisin

AMP: Ampisilin

TE: Tetrasiklin

ÇİD: Çoklu ilaç direnci

IS: İnsersion sequence



MBL: Metallo Beta-laktamazlar

ESBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar

CHDL: Karbapenem hidrolize eden D grubu beta-laktamazlar

OMP: Dış membran proteinleri

PBP: Penisilin bağlayan proteinler

PCR: Polimerize Zincir Reaksiyonu

PFGE: Pulse Field Jel Elektroforez

MIC: Minimal inhibitör konsantrasyon

CLSI: Clinical and Laboratory Standarts Institute

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo I. <i>Acinetobacter</i> cinsinin günümüze dek tanımlanan genomik türleri .....	3
Tablo II. Karbapenem hidrolize eden D grubu beta-laktamazlar sınıfına ait OXA enzim kümeleri.....	24
Tablo III. Çalışma sırasında kullanılan besiyerleri .....	37
Tablo IV. OXA-23 amplifikasyonunda kullanılan MasterMix bileşenleri .....	48
Tablo V. OXA-24 amplifikasyonunda kullanılan MasterMix bileşenleri .....	49
Tablo VI. OXA-51 amplifikasyonunda kullanılan MasterMix bileşenleri .....	51
Tablo VII. OXA-58 amplifikasyonunda kullanılan MasterMix bileşenleri.....	52
Tablo VIII. Real Time PCR için kullanılan bileşenler.....	56
Tablo IX. İzolatların kliniklere göre dağılımı .....	59
Tablo X. İzolatların örneklere göre dağılımı.....	59
Tablo XI. İdentifikasyon-antibiyoqram sistemine göre antibiyotik duyarlılıkları	60
Tablo XII. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarına göre dağılımı (n=121) .....	62
Tablo XIII. İzolatların direnç genlerinin dağılımı.....	66
Tablo XIV. Karbapenem direnci ve direnç genlerinin korelasyonu .....	68
Tablo XV. <i>Acinetobacter</i> türlerinde OXA genlerinin dağılımı ile ilgili yapılan çalışmaların verileri.....	85

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.OXA-23 Agaroz jel görüntüsü .....	64
Şekil 2.OXA-51 Agaroz jel görüntüsü .....	64
Şekil 3. OXA-51 Agaroz jel görüntüsü .....	65
Şekil 4. OXA-51 geninin Real Time PCR görüntüsü .....	66
Şekil 5. OXA-23 geninin Real Time PCR sonuçları .....	67
Şekil 6. OXA-58 geninin Real Time PCR görüntüleri .....	67

## I-GİRİŞ

Nonfermentatif Gram negatif bakterilerden *Acinetobacter* türleri, 1980'li yıllardan bu yana hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde infeksiyonlara neden olmakta ve bu bakterilerde görülen antibiyotik direnci tedavide sorun yaratmaktadır. Ülkemizde de *Acinetobacter* türleri ile meydana gelen yoğun bakım infeksiyonları dikkat çekici boyutlara ulaşmış, eş zamanlı olarak artan antibiyotik direnci de endişe verici bir hal almıştır (1,2).

Bu bakteriler çeşitli mekanizmalar aracılığı ile birçok antibiyotiğe çoklu direnç gösterebilmektedir. Gram negatif bakterilerde olduğu gibi *Acinetobacter* türleri arasında da karbapenemleri de içeren beta laktam antibiyotiklere direnç gelişimi açısından, en sık karşılaşılan ve sorun yaratan durum beta laktamaz yapımıdır. Günümüze kadar tanımlanan 400'ü aşkın beta laktamaz enzimlerine her geçen gün yenileri eklenmektedir (3).

Karbapenem dirençli *Acinetobacter* türlerinin pek çoğunun bu enzimlerden biri olan ve karbapenem hidrolize edebilen OXA türü beta laktamazlara sahip olduğu bildirilmektedir. OXA türü beta laktamaz üreten *Acinetobacter* suşlarının çoğunun sadece karbapenemlere değil, klinikte yaygın kullanımı olan diğer tüm antibiyotiklere dirençli olduğu ifade edilmektedir (4). Ayrıca bu suşlar, yoğun bakım ünitelerinde klonal yayılım gösterebilmesi, yoğun bakım ünitelerindeki cihazlar ve sağlık personelinin elleri aracılığıyla üniteye diğer hastalara bulaşarak epidemi boyutunda infeksiyonlara yol açabilmesi nedeniyle önem arz etmektedirler (3).

Çalışmamız ile hastanemizde saptanan *Acinetobacter baumannii* izolatlarının antibiyotik direnç oranlarının saptanması, hastanemizde klinik kullanımı yaygın olan karbapenemlere direncin belirlenerek karbapenem direncinden sıklıkla sorumlu olan OXA tipi beta-laktamaz varlığının belirlenmesi; ve direnç genlerinin moleküler yöntemlerle araştırılarak OXA gruplarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## II-GENEL BİLGİLER

### 2.1. TAKSONOMİ VE TARİHÇE

Günümüze kadar birçok taksonomik değişikliğe uğrayan *Acinetobacter* türleri ilk kez Martinus Willem Beijerinck tarafından 1911 yılında topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calco-aceticus* olarak isimlendirilmiştir (5). Günümüze kadar *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Alcaligenes*, *Moraxella lwoffii* gibi farklı isimler almış, yapısal ve biyokimyasal özellikleri ile sınıflandırılmaları oldukça karmaşık süreçlerden geçmiştir (5,6). Bergey'in Sistematik Bakterioloji kitabında *Acinetobacter* cinsi, *Acinetobacter calcoaceticus* adında tek tür olarak *Neisseriaceae* ailesi içinde sınıflandırılmıştır (7). Taksonomik çalışmalar sonucunda *Acinetobacter* cinsi *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilişkili diğer cinslerle birlikte *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almıştır (7).

Deoksiribo nükleik asit (DNA) benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda son beş yılda on yeni tür eklenmesiyle birlikte 33 genomik tür tanımlanmıştır (4). Ancak türlerden *A. lwoffii* ve genomic species 9, 13BJ ve 14TU, *A. junii* ve *A. grimontii*'nin birbirinin aynı olduğu saptanmış ve toplam 30 genomik tür tanımlanmıştır (4). Türlerden 18'ine özel isimler verilirken diğer genomik türler isimlendirilmemiştir (Tablo 1) Fenotipik özellikler kullanılarak genomik türler 1, 2, 3 ve 13'ü ayırt etmek zor olduğundan *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* kompleks terimi kullanılmaktadır (8). Tüm bu türler arasında insanlarda en sık infeksiyonlara yol açan etken *A. baumannii*'dir (8).

Tablo I. *Acinetobacter* cinsinin günümüze dek tanımlanan genomik türleri

Tür adı	Genomik tür	Referans suş	Çalışmalardaki ana kaynak	Referans
<i>A. calcoaceticus</i>		ATCC 23055T	Toprak, insan örnekleri	9,10
<i>A. baumannii</i>		ATCC 19606T	İnsan klinik örnekleri	9,10
<i>A. haemolyticus</i>		ATCC 17906T	İnsan klinik örnekleri	9,10
<i>A. junii</i>		ATCC 17908T	İnsan klinik örnekleri	9,10
<i>A. johnsonii</i>		ATCC 17909T	İnsan - hayvan örnekleri	9,10
<i>A. lwoffii</i>		ATCC15309T	İnsan örnekleri	9,10
<i>A. radioresistens</i>		IAM 13186T	İnsan klinik örnekleri, toprak, pamuk	9,10,11
<i>A. ursingii</i>		LMG 19575T	İnsan klinik örnekleri	12
<i>A. schindleri</i>		LMG 19576T	İnsan klinik örnekleri	12
<i>A. parvus</i>		LMG 21765T	İnsan klinik örnekleri	13
<i>A. bouvetii</i>		DSM 14964T	Çamur	14
<i>A. baylyi</i>		DSM 14961T	Çamur	14
<i>A. townneri</i>		DSM 14962T	Çamur	14
<i>A. tandoi</i>		DSM 14970T	Çamur	14
<i>A. grimontii</i>		DSM 14968T	Çamur	14
<i>A. tjernbergiae</i>		DSM 14971T	Çamur	14
<i>A. gernerii</i>		DSM 14967T	Çamur	14
<i>A. venetianus</i>		ATCC 31012	Deniz suyu	15
	3	ATCC 19004	İnsan klinik örnekleri	9,10
	6	ATCC 17979	İnsan örnekleri	9,10
	10	ATCC 17924	İnsan örnekleri	9,10
	11	ATCC 11171	İnsan klinik örnekleri	9,10
	13BJ, 14TU	ATCC 17905	İnsan klinik örnekleri	10,16
	14BJ	CCUG 14816	İnsan klinik örnekleri	16
	15BJ	SEIP 23.78	İnsan örnekleri	16
	16	ATCC 17988	İnsan örnekleri	16
	17	SEIP Ac 87.314	İnsan klinik örnekleri	16
	13TU	ATCC 17903	İnsan klinik örnekleri	10
	15TU	151a	İnsan örnekleri	10
	1ve3 arasında	10095	İnsan klinik örnekleri	17
	13TU'ya yakın	10090	İnsan klinik örnekleri	17

## 2.2. MORFOLOJİK, METABOLİK VE KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ

*Acinetobacter* türleri zorunlu aerob, Gram negatif kokobasil görünümünde, oksidaz negatif, hareketsiz, indol negatif, genellikle nitrat negatif ve nonfermentatif basillerden oluşmaktadır. Her biri 1-1,5x1,5-2,5 µm boyutlarında, bazen zor dekolorize olup, sıklıkla çiftler halinde bulunmaktadır (7). Pozitif kan kültür şişelerinden hazırlanan direkt yaymalarda Gram pozitif kok görünümünde olabileceği bildirilmiştir (18). Seçici olmayan agarda sabit üreme fazında kokobasil formu baskınken, sıvı besiyerinde erken üreme döneminde veya antimikrobiyal içeren plaklarda sıklıkla basil formunda izlenmektedir (7).

Kanlı agarda 24 saatlik üreme sonrasında 0,5-2 mm çapında, opak, pigmentsiz, konveks ve düzgün koloniler şeklinde gözlenirken, bir çok suş MacConkey agarda renksiz veya hafif pembe renkte koloniler oluşturmaktadır (19). Glukozu okside eden bazı *Acinetobacter* türleri tirozin içeren kalp infüzyon agarda ya da glukoz eklenmiş kanlı agarda kahverengi renk değişimine neden olmaktadır (20). Üç şekerli besiyerinde (TSİ) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar (7).

Diğer nonfermentatif mikroorganizmaların izolasyonunda olduğu gibi *Acinetobacter* türlerinin izolasyonunda da genellikle kanlı agar ve Eosin Metilen Blue (EMB) agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır. Bromkrezol moru, safra tuzları, laktoz, maltoz şekerleri içeren Herellea agar klinik örneklerden ve vankomisin, sefsulodin, sefradin gibi bazı antibiyotikleri içeren Leeds *Acinetobacter* Medium ise hem klinik örneklerden hem de çevreden *Acinetobacter*'lerin izole edilmesinde kullanılabilen seçici ve ayırt edici besiyerleridir (6,21).

Geleneksel biyokimyasal yöntemler türler arası ayırım yapmak için yeterli olmamakla birlikte glukoz oksidatif etki, 44°C'de üreyebilme ve hemoliz özelliklerinden yararlanılarak; glukozu okside eden ve hemolitik olmayan suşların çoğu *A. baumannii*, glukoz negatif hemolitik olmayanlar *A. lwoffii*, hemolitik

olanlar *A. haemolyticus* olarak tanımlanmıştır. *A. jhonsonii* diğer türlerden 37°C’de üreyememesi ile ayrılmaktadır (7,19).

### 2.3. VİRULANS FAKTÖRLERİ

Virülans potansiyelleri düşük olan *Acinetobacter* türleri konak savunma mekanizmalarının bozulduğu durumlarda şiddetli hastalık tablolarına neden olabilen mikroorganizmalar olarak kabul edilmekle birlikte; ağır seyirli toplum kökenli infeksiyonlarına neden olmaları bu mikroorganizmaların bazen yüksek patojenite gösterebileceği fikrinin oluşmasına yol açmıştır (22).

*A. baumannii* genus içerisinde infeksiyonlarla başta sık ilişkili insan patojenidir. Bu fırsatçı patojen özellikle düşkün hastalar olmak üzere oldukça ciddi infeksiyonlara neden olur. Bakteri infeksiyon patogenezinde rol oynayan çok sayıda virülans faktörünü eksprese etmektedir. Solid yüzeylere yapışmak, demir gibi esansiyel besinleri kazanmak, epitelial hücrelere adheze olmak ve takiben apoptozis aracılığıyla onların ölümlerine neden olmak, konakçı dokuya zarar veren enzimleri ve toksik ürünleri üretmek ve sekrete etmek bu faktörler arasında yer almaktadır.

Potansiyel virülans ile ilişkili bazı faktörler şunlardır:

1) Hücre Yüzey Özellikleri: Genel olarak bakterilerin yüzey özellikleri ve ürünleri konakçı dokularında hasara neden olup, infeksiyonların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Bu kapsamda *Acinetobacter* için yapılan ilk çalışmalarda RAG-1 suşunun insan ağız içi epitel hücrelerine hidrofobik yüzey bileşenleri aracılığıyla tutunduğu gösterilmiştir. Bu tutunmada ince fimbria ve L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşan polisakkarit kapsül benzeri yapıların rol oynadığı bildirilmiştir (23,24). Daha sonra hücre yüzey hidrofobitesisi ve kollajen, fibronektin, fibrinojen ve vitronektin gibi hücrel matriks proteinlerine bağlanma ile ilişkili sonuçlar elde edilmiştir (25,26). Ancak bu faktörlerin infeksiyon patogenezini ile ilişkisi henüz doğrulanmamıştır.



2) Litik-Toksik Bileşik Üretimi: Pek çok *A. baumannii* izolatu yapısı ve özellikleri bilinen lipopolisakkarit üretir (27). Bu hücresel komponentler serum direnci, endotoksin üretimi kaynaklı konakçı yanıtı ve semptomlar gibi virülans özelliklerinden sorumlu gibi görünmektedir (28,29).

*Acinetobacter*'in diğere bir virülans özelliğı de geniş oranda ekstrasellüler enzim üretebilme yetenekleridir (30). Bu enzimler lipidlerin yıkımına neden olmakta, farelerde letal aktivite oluşturmakta ve in-vitro/in-vivo çalışmalarda nötrofillere zarar vermektedir (31).

Ayrıca solunum sistemi infeksiyonu olan hastalardan izole edilen *A. baumannii* klinik izolatının kültür filtratının farelerin akciğere hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiği saptanmıştır (32).

3) Dokulara yapışma ve hasar oluşturma: Konakçı hücrelerine tutunma kolonizasyona ve infeksiyona neden olan en erken basamaktaki konakçı patojen etkileşimidir. İlk olarak *Acinetobacter* RAG-1 ve *A. calcoeceticus*'un epitel ve lenfositlere yapışması bu genusun insan hücreleri ile etkileşiminin kanıtı olarak gösterilmiştir (24,33). Daha sonra *A. baumannii* klinik izolatlarının insan bronşial epitel hücrelerine yapıştığı gösterilmiştir (34).

Çalışmalar *A. baumannii* klinik izolatlarının insan eritrositlerine yapıştığını göstermektedir. Bu durumun bakterinin intrasellüler alanında lokalize olmuş, uzun-ince ve mannoza dirençli polisakkarit fimbrialar aracılığıyla gerçekleştiğı bildirilmiştir (35,36).

*A. baumannii*'nin virülansının epitelyal yüzeylere hasar verme ve daha derin dokulara ulaşma yeteneğine bağılı olduğu düşünölmektedir. Bu olasılık bakterinin konak hücrelerinin apoptozisini tetikleyen moleküller içerdiğinin gösterilmesi ile desteklenmiştir (37).

4) Biofilm Oluşumu: Bakteriyel biofilmler yüzeye yapışmış ve ürettiğı matrisle kaplanmış bakteriyel hücre agregatlarıdır. Bakteriyel infeksiyonlarının

%65'inin bakteriyel patojenin biofilm oluşturma yeteneğine bağlı olduğu düşünülmektedir (38). Biofilm üretim yeteneği çoğu bakteri türünde yaygın olup, oldukça değişik çevre koşullarından bakteriyel hücrenin korunmasını sağlar. Özellikle antibakteriyel bileşiklere direnç ve konakçı cevabından kaçmaya yardımcıdır (39). *A. baumannii* için solid yüzeyler üzerinde biofilm oluşturma ve yapışma yeteneği 2003'te ortaya konmuştur. *A. baumannii* izolatları tarafından eksprese edilen farklı biofilm fenotiplerinin *E. coli* izolatları ile benzerlik gösterdiği de ifade edilmiştir (40).

5) Yüzeylerde Yaşaması: Bakteriyel patojenin sınırlı besin koşulları altında, kuru yüzeylerde yaşayabilme yeteneği doğal/tıbbi çevrelerde canlı kalmasına ve yayılımına yardımcı olmaktadır. Hastane cihaz ve ekipmanlarındaki kolonizasyonun uzun süreli olması, salgınlara neden olabilmektedir. Bu durum büyük ihtimalle patojenin hem kuru yüzeylerden izole edilen türlerinde hem de hastaneden kazanılmış türlerinde bulunan kuru yüzeylere yapışma ve yaşama yeteneğine bağlıdır (41). Söz konusu gözlemler özellikle düşükün hastaları etkileyen nozokomiyal salgınlarda *A. baumannii*'nin medikal alanlardaki inatçı varlığının önemini ortaya koymaktadır.

6) Demir Kazanımı: Hemen hemen yaşayan tüm sistemler için kritik metal olan demir için bakterinin konakçı ile yarışma kapasitesi konakçıda yerleşebilmesini sağlayan çeşitli bakteriyel faktörlerden biridir. Demir, deoksinükleotid sentezi ve serbest radikallerden korunma gibi süreçler için temel hücre bileşenidir. Ortamda bol bulunmasına rağmen, demir bakterinin büyümesi esnasında dışarıdan aldığı, anaerobik şartlarda ve nötr pH'da çözünmemiş halde bir mineraldir. Konakçıda varlığını sürdürmek için mikroorganizmalar öncü demir moleküllerini kullanma yeteneklerini ortaya koyarlar, bunu yüksek affiniteli demir kazanım sistemleri eksprese ederek sağlarlar (42).

Demir kazanım sistemleri pek çok bakteriyel patojenin virülansında rol oynar (42). Önemli çevresel bir sinyal olan demirin konsantrasyonu, çeşitli temel hücresel fonksiyonları kodlayan genlerin ekspresyonunu ve regülasyonu ile

ilişkilidir (43). Sideroforlar da bakterinin temel besini olan demir kazanımı yanı sıra infekte konakçıda hücre hasarına neden olarak ek virülans özellik sağlar.

*A. baumannii* 19606 suşu tarafından acinetobaktin adı verilen sideroforların üretildiği gösterilmiştir (44). Üretildikten sonra sideroforlar çeşitli bakteriler için tanımlanan antibiyotik direncindeki efflux pompaları ile benzer mekanizma ile hücre dışı ve çevreye salınır (45).

Demirin sınırlı olduğu şartlar altında *A. baumannii*'nin yaşam ve infeksiyon yapma kapasitesi etkilenmekte, patojen yüksek afiniteli demir kazanım fonksiyonları eksprese etmektedir (46).

7) Quorum sensing: Bir bakterinin patogenezi için gerekli olan şartlardan biri, yeni çevreye uyum sağlamak ve çevreden gelen uyarınları algılayarak cevap geliştirmektir. Bakteri bir çok farklı mekanizma ile pH, ozmolarite, besin kaynağı ve popülasyon yoğunluğu gibi çevresel şartlardaki değişiklikleri algıladığında, metabolizmasında birtakım değişiklikler yaparak yeni şartlara kendini adapte etmeye çalışır (47).

“Minimum popülasyon birimini algılama” olarak ifade edilen “Quorum sensing” (QS) sistemi bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan bir sistemdir ve bakteri bu bilgiyi bir çok genin regülasyonunu kontrol etmekte kullanır (48). Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir, aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir, infeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün cevaptan kaçabilir (49).

QS sistemi bir sinyal molekülü ile direkt veya indirekt olarak aktive olur ve aralarında insan patojenlerinde bulunduğu pek çok bakteri tarafından kullanılır. Gram negatif bakterilerde bulunan sinyal moleküllerinin N-Açıl Homoserin Lakton (AHL) tipinde olduğu belirtilmiştir (50). *Acinetobacter* izolatlarında da AHL tipi iletişimi aktive edebilen sinyal molekülleri olduğu gösterilmiştir. QS sisteminin, *Acinetobacter* gibi fırsatçı olduğu düşünülen

patojenlerde çeşitli virülans faktörlerinin otoindüksiyonunda temel mekanizma olabileceği düşünülmektedir (22).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda antibiyotik direnci sağlayan bazı direnç genlerinin virülansı arttırdığı ve klinik olarak daha ölümcül infeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (22).

## 2.4. EPİDEMİYOLOJİ

*Acinetobacter* türleri yaşamlarını sürdürebilmek için gereksinimlerinin oldukça az olması, çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilme avantajı nedeniyle doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbestçe yaşayabilmektedir (6,51). *Acinetobacter* cinsi bakteriler diğer mikroorganizmalara kıyasla kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı pH ve ısı ortamlarında canlı kalabilme özellikleri nedeniyle cansız yüzeylerde günlerce canlılığını sürdürebilmektedir (51,52). Pastörize sütlerden, donmuş yiyeceklerden, dökümhane ve hastane havasından, kapı kolları, hasta tabelaları, yatak kenarları, musluklardan, camdan, peritoneal diyaliz maddelerinden, anjiyografi kateterinden, ventilatörlerden, laringoskoplardan, kontamine eldivenlerden, pamuktan, formikadan, kullanılmış enjektörlerden, hasta yastıklarından, kuru filtrelerden izole edilmiş ve buralarda günlerce canlı kaldığı gösterilmiştir (6,51,52).

*Acinetobacter* türlerinin insan derisinin doğal konakçısı olabileceği, özellikle salgınlar sırasında hastanede yatan hastalarda % 25'e varan oranlarda taşıyıcılık görülebilmesi, hastane personelinin derisindeki kalıcı taşıyıcılıkla ilişkilendirilmektedir (8,51). Hastane personeli, hastanede yatan ve uzun süre hastanede kalan hastalarda bu oran belirgin olarak artmaktadır (22). Deri dışında sağlıklı insanların ağız florası, üst solunum yolları, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde de bulunduğu gösterilmiştir (6,52). Hastaneye yatırılmış bireylerde salgın dönemlerinde %7-18 oranında nazofarengeal taşıyıcılık görülürken trakeostomili hastalarda bu oranın %45 olduğu gözlenmiştir (6,8). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların dışkılarında çoğul ilaca dirençli *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir (7) .

Genel olarak düşük virulansa sahip olan *Acinetobacter* cinsi bakterilerin konak savunma mekanizmaları normal olan bireylerde infeksiyon oluşturmaları oldukça güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı infeksiyonlara neden olmaktadır (8). *Acinetobacter* infeksiyonları özellikle yoğun bakımlarda olmak üzere ciddi salgınlara yol açabilmekte, hatta hastaneler arasında yayılım söz konusu olabilmektedir. Ülkemizde yoğun bakım ünitelerini içeren çok merkezli bir çalışmada *Pseudomonas* türlerinin ardından en sık görülen ikinci mikroorganizma olarak %21,9 oranında bildirilmiştir (53).

Malignite, yanık, konağın savunma sistemini baskılayan durumlar ve konağın yaşı infeksiyon gelişimini kolaylaştıran bazı faktörlerdir. Hastane kaynaklı infeksiyonlarda; yatış süresi, ağır cerrahi girişim, yara varlığı, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma, infeksiyon ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, damar içi kateterizasyon, enteral beslenme, idrar sondası, endotrakeal tüp ve trakeostomi varlığı gibi bazı risk faktörleri bulunmaktadır (8).

*Acinetobacter* türlerinin cerrahi girişim veya invaziv aletlerin kullanımı ile ilişkili olduğu, cerrahi sonrası uygulanan invaziv girişimler sonucu kolonizasyonun arttığı ve bu hastalarda kolonizasyonu takiben *Acinetobacter* infeksiyonunun geliştiği bildirilmiştir (54).

*Acinetobacter* türleri ile toplum kökenli infeksiyonlar sık değildir. Ancak özellikle tropikal bölge ülkelerinde tanımlanmış pnömoni olguları mevcuttur. Alkol bağımlılığı, sigara kullanımı, kronik akciğer hastalığı varlığı, diyabet ve gelişmekte olan tropikal bir ülkede yaşamak toplum kökenli infeksiyonlar için tanımlanmış risk faktörleridir (8).

*Acinetobacter* infeksiyonları mevsimsel değişiklikler göstermektedir. Özellikle nem ve sıcaklık oranının yüksek olduğu temmuz ile ekim ayları arasındaki infeksiyon oranları, yılın diğer zamanlarından yaklaşık %50 daha yüksek tespit edilmiştir (55). Bu durumun olası açıklamaları arasında

*Acinetobacter*'in canlılığının ve çoğalmasının ısı ve nem faktörü nedeniyle doğal olarak kolaylaşması ve çevresel kontaminasyon yer almaktadır (22).

Ayrıca *Acinetobacter* türleri infeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasının zorlaştığı afet veya savaş gibi olağanüstü durumlarda sorun yaratan önemli patojenler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde 1999 yılındaki Marmara depreminde bir yoğun bakım ünitesinde tedavi edilen kazazedelerde, *A. baumannii* rapor edilen en yaygın nozokomiyal patojen olmuş ve panrezistan suş oranlarında artış olduğu gözlenmiştir (56). Benzer şekilde çeşitli savaş bölgelerinde bulunan ve yaralanan askeri personel arasında da özellikle çoklu ilaç direncine (ÇİD) sahip suşlarla gelişen *Acinetobacter* infeksiyonları bildirilmiştir (57).

Son 30 yıldır hastane ortamında yeni, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanımı, hem *Acinetobacter* türleri ile gelişen hastane infeksiyonları oranını arttırmış hem de bu bakterilerde birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmesine neden olmuştur. Antibiyotik kullanma alışkanlıkları ve çevresel faktörlerin katkısı ile antibiyotik direnci hastaneler, şehirler ve ülkeler arasında farklılık göstermektedir (58).

## **2.5. ACINETOBACTER İNFEKSİYONLARI**

Düşük virülansa sahip olduğu kabul edilen patojenlerden olan *Acinetobacter*'ler fırsatçı patojen olarak infeksiyonlara yol açarlar. Kolonizasyon sonucu neden olduğu infeksiyonların gerçek sıklığını tayin etmek oldukça zordur. Ancak çeşitli ülkelerde yapılan araştırmaların ortak sonucu, son 20 yılda bu bakterinin sıklığının giderek arttığı şeklindedir (59). Ülkemizde yapılan, yoğun bakım ünitelerini kapsayan bazı çalışmalarda *Acinetobacter* türlerinin hastane kaynaklı infeksiyonlardan en sık izole edilen mikroorganizma olduğu ve sıklıkla pnömonilere yol açtığı görülmüştür (58,60)

*Acinetobacter* türlerinin neden olduğu infeksiyonların başında VIP ve kan dolaşımı infeksiyonlarının yer aldığı ifade edilmektedir (55). Damar içi ve

solunum yolu kateterleri, *Acinetobacter*'lere bağlı gelişen bakteryemilerinin en yaygın kaynaklarını oluşturmaktadır (61,62). Üriner sistem infeksiyonları, nozokomiyal menenjit ve yumuşak doku infeksiyonları neden olduğu diğer klinik tablolardandır (63).

### **2.5.1. Solunum sistemi infeksiyonları**

Mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda yapılan araştırmalarda %15, bronkoskopik tekniklere alınan örneklerde %24 oranında *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir. Genel olarak tüm hastane kökenli pnömonilerde saptanma oranı % 3-5 olarak bildirilmektedir. Bu çalışmalarda çeşitli risk faktörleri önemli bulunmuştur (6).

*Acinetobacter* pnömonileri genellikle multiloberdir. Kavitasyon, plevral effüzyon ve bronkopulmoner fistül gelişimi gözlenebilir. Pnömonilerde kaba mortalite oranı %30-75 olarak bildirilmektedir (22). Üç gün içinde uygun antibiyotik tedavisi verilmiş olanlarda mortalite azalmakta, sekonder bakteriyemi ve septik çok gelişenlerde mortalite artmaktadır. Yoğun bakım hastalarında *Acinetobacter* kolonizasyonu ya da infeksiyonu aynı zamanda hastanın altta yatan hastalığının da kötüye gidişinin bir göstergesidir (59).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada *A. baumannii*, hastane kökenli pnömoni etkenleri arasında %24 oranı ile ilk sırada yer almıştır. Bu olguların önemli bir kısmının VIP olduğu dikkati çekmektedir (64).

### **2.5.2. Bakteriyemi**

En sık pnömonilere sekonder olarak ve hastaneye yatışın ikinci haftasında gelişir. İntravenöz kateterler, üriner sistem, yara/deri infeksiyonları, abdominal infeksiyonlar diğer bakteriyemi kaynaklarıdır. Malignite, travma ve yanık en önemli risk faktörleridir. *Acinetobacter* türlerinin yenidoğan sepsislerinde sıklığı giderek artan oranlarda bildirilmektedir (59).

*Acinetobacter* ilişkili bakteriyemi olgularında mortalite %17-46 arasında bildirilmektedir. Polimikrobiyal bakteriyemilerde mortalite oranı daha yüksek iken *A. baumannii* dışındaki türler ile gelişen bakteriyemiler daha hafif seyirlidir (22).

### **2.5.3. İntrakraniyal infeksiyonlar**

Genellikle kafa travmasına bağlı olarak ya da lomber ponksiyon, miyelografi ve ventrikülografi gibi nöroşirürjik girişimleri takiben gelişen sekonder menenjitler şeklindedir. Ventrikülostomi, serebrosipinal sıvı kaçağı, uzun süreli ventriküler katater varlığı ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı risk faktörleri olarak sayılabilir. Mortalite oranı %20-27 arasında bildirilmiştir. Hastaların %30'unda peteşiyal döküntüler bulunabilir ve mikroskopik olarak *Neisserria meningitidis* ile benzerliği karışıklığa yol açabilir (8).

### **2.5.4. Yumuşak doku infeksiyonları**

Venöz kateterlerle ilgili selülit tablosuna yol açabilir. Genellikle kateter çıkarılmasıyla iyileşir (59). Travmatik ve cerrahi yaralar, yanıklar *Acinetobacter* ile kolonize olabilir. İmmun sistemi bozuk hastalarda, yabancı cisim varlığında ve cerrahi sonrası yaralarda infeksiyon gelişimi ile sonuçlanabilir (63).

### **2.5.5. Üriner sistem infeksiyonları**

*Acinetobacter* türleri ile nozokomiyal üriner sistem infeksiyonları gelişebilir. Bu infeksiyonlar sıklıkla yaşlı, yoğun bakımda takip edilen üriner kateterli hastalar da görülmektedir. Ancak kateterize hastalardan elde edilen izolatların kolonizasyon olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (8).

### **2.5.6. Diğer infeksiyonlar**

Endoftalmit, prostetik ve doğal kapak endokarditi, peritonit, girişimsel işlemler sonrası gelişen kolanjit, pankreas ve karaciğer apsesi, osteomyelit, septik



artrit gibi hemen her organ ile ilişkili hastane kökenli infeksiyonlar tanımlanmıştır (22).

## 2.7 TEDAVİ

*Acinetobacter* cinsi bakterilerle gelişen infeksiyonların tedavisinde ideal bir tedavi seçeneğinden söz etmek mümkün değildir. Karbapenemler, florokinolonlar, aminoglikozidler, sulbaktam, kolitsin (COL) gibi antimikrobiyaller tedavi seçenekleri arasında değerlendirilmektedir. Ancak giderek artan direnç sorunu ve etkin tedavi seçeneklerini yansıtacak yeterli karşılaştırmalı ve kontrollü klinik çalışmaların mevcut olmaması başarılı tedaviyi güçleştirmektedir. Özellikle ÇİD'ne sahip veya panrezistan suşların tedavisinde seçenekler sınırlıdır. ÇİD üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına direnç olarak tanımlanmakta, bazen bu tanımlama karbapenem direnci ile eş değer olarak da kullanılmaktadır. Mevcut tüm antibiyotiklere dirençli suşlar ise panrezistan olarak adlandırılmaktadır (22).

Çoklu direnç konusunda literatürde birçok tanımlama mevcuttur. Çoklu direnç bu bakterilerin neden olduğu ciddi infeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden en az üçü veya daha fazlasına direnç olarak tanımlanmışsa da bu tanımlamalar oldukça tartışmalıdır. Gram negatif basiller için yapılmış olan bir öneride “panrezistan” kavramı seftazidim (CAZ), sefepim (FEP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), piperasilin+tazobaktam (TZP), siprofloksasin (CİP), ve levofloksasine (LEV) azalmış duyarlılık olarak tanımlanmış, ayrıca “extreme drug resistance (XRD)” kavramı ortaya atılmıştır. Bu kavramla, panrezistan tanımı içinde yer alan antibiyotiklere ek olarak tikarsilin+klavulonat (TCL), ampisilin+sulbaktam (SAM), aminoglikozidler, tigesiklin (TİG) ve polimiksinlere de direnç kastedilmektedir (65).

Son olarak Falagas ve Karageorgopoulos tarafından karışıklıklara neden olabileceği görüşüyle bu tanımlar eleştirilmiş ve yenileri önerilmiştir. Buna göre, “pandrug resistance” tüm antimikrobiyallere dirençli, “extensive drug resistance”

bir veya ikisi dışında tüm antimikrobiyallere dirençli ve “multidrug resistance” üç veya daha fazla antimikrobiyal sınıfına dirençli tanımlamaları yapılmıştır (66).

Duyarlı türlerin tedavisinde ilk seçenek karbapenemlerdir (67). Karbapenem veya SAM gibi bir beta-laktam antibiyotik tek başına veya aminoglikozid ile kombine kullanılabilir. Karbapenemlerden IPM veya MEM tedavide yaygın olarak kullanılan ajanlardır. Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) sörveyans çalışma grubunun verilerine göre çoklu dirençli *A. baumannii* infeksiyonlarında IPM’in MEM’den daha etkili olduğu bildirilmiştir (68). Diğer karbapenemlerden *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*’ya etkili olmaması ile ayrılan ertapenem (ERP), sınırlı etkinliği nedeniyle bu mikroorganizma ile gelişen infeksiyonların tedavisinde önerilmez. Yeni grup bir karbapenem olan doripenemin (DRP) ise *Acinetobacter* türlerine etkili olduğu ifade edilmektedir (22). DRP, dayanıklılığı nedeniyle 4 saatlik infüzyona izin vermekte ve daha dirençli bakterilerin tedavisinde diğer karbapenemlere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca ülkemizdeki *A. baumannii* izolatlarında yaygın olarak görülen OXA-58 enzimine dayanıklı olmasında bir avantaj gibi görünmektedir (69).

Beta-laktamaz inhibitörleri arasında sulbaktamın pek çok *Acinetobacter* türüne karşı intrensek aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Penisilin bağlayıcı proteinlere bağlanarak bakteriyosidal etki gösteren sulbaktamın genellikle SAM şeklinde kullanımı söz konusudur. Ancak bu kombinasyonun *Acinetobacter* için sinerjik bir etkisinin olmadığı düşünülmektedir (22). Bir çalışmada IPM’e dirençli suşlar ile gelişen infeksiyonlarda SAM tedavisi ile %67,5 oranında kür sağlandığı bildirilmiştir (70). *A. baumannii* bakteriyemisinde SAM monoterapisinin etkili olduğu ve IPM monoterapisi ile karşılaştırıldığında tedavi başarısı açısından belirgin fark göstermediği saptanmıştır (71). ÇİD’ne sahip *A. baumannii*’nin neden olduğu VIP tedavisinde monoterapide yüksek doz SAM kullanımının güvenli ve etkili tedavi rejimi olduğu bildirilmiştir (72). Sefoperazon-sulbaktam (SCF) ise pek çok türde in vitro duyarlı saptanmakla birlikte etkinliği konusunda klinik veriler sınırlıdır (22). Ancak SCF ile IPM’in etkinliğinin karşılaştırıldığı

çalışmalarda tedavi etkinliği ve mortalite açısından benzer sonuçlar bildirilmiştir (73).

Polimiksinler oklu dirençli suşların artması ile birlikte yeniden gündeme gelen polipeptid yapıda antibiyotiklerdir. Bakteriyel hücre membranını etkileyerek geçirgenlik artışına ve hücre ölümüne neden olmaktadır. COL (polimiksin E) *Acinetobacter* türlerine karşı doz bağımlı bakterisidal aktiviteye sahiptir. *Acinetobacter* infeksiyonlarında etkin doz henüz standardize edilememiştir. Ancak kısa zaman aralıklarında yüksek doz uygulamalar ile daha başarılı sonuçlar alındığı belirtilmektedir. Nefrotoksisite ve nörotoksisite en önemli yan etkileridir (74). Pnömoni tedavisinde etkinliği daha düşük bulunmakla birlikte çeşitli infeksiyonları içeren çalışmalarda %57-77 arasında başarı oranları bildirilmektedir (22). İntervenz (IV) kullanımda akciğer penetrasyonunun zayıf olmasına rağmen, VİP tedavisinde IPM ile karşılaştırıldığında IV COL, karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının neden olduğu VİP tedavisinde güvenli ve etkili bulunmuş ve IPM'e alternatif olabileceği bildirilmiştir (75). Nozokomiyal menenjit olgularının tedavisinde intratekal ve intravenöz uygulamanın birlikte kullanımı ile etkili sonuçlar alındığına dair vaka bildirimleri mevcuttur (76). Son zamanlarda in vitro çalışmalar, fenotipik olarak duyarlı bazı *Acinetobacter* suşlarında COL heterodirenci olduğunu ortaya koymuştur, ancak bu fenomenin klinik önemi aydınlatılamamıştır (77,78).

TİG yakın zamanda kullanıma giren glisilsiklin bir ajandır. Bir tetrasiklin derivativesidir ve benzer şekilde bakteriyostatik etkilidir. Çoklu dirençli *A. baumannii* infeksiyonlarında önemli bir alternatif olduğu bildirilmiştir (69). *Acinetobacter* infeksiyonlarının tedavisinde umut verici olmakla birlikte farklı endikasyonlarda kullanım sırasında TİG'e dirençli *Acinetobacter* bakteriyemisi gelişen 2 hasta tanımlanmıştır (79). Komplike deri ve yumuşak doku infeksiyonları ve intraabdominal infeksiyonlarda kullanım onayı alan TİG, oklu dirençli *A. baumannii* infeksiyonlarına karşı oldukça iyi in vitro aktivite göstermektedir. Alternatifin olmadığı durumlarda, bu endikasyonların dışında kan dolaşımı ve

solunum sistemi gibi diğer bölgelerde oluşan *A. baumannii* infeksiyonlarında da kullanılmış ve %68-84 arasında değişen klinik yanıt bildirilmiştir (80).

Florokinolonlar Gram negatif infeksiyonların tedavisinde önemli ajanlardır. *Acinetobacter* türlerinde LEV minimum inhibitör konsantrasyonu değeri, ofloksasin (OFX) ve CİP ile karşılaştırıldığında daha düşük olarak saptanmıştır (81). Klinik izolatlar arasında yaklaşık %75-80 oranında CİP ve LEV direnci söz konusudur. Nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonlarında klinik etkinliklerine ait yeterli bilgi bulunmaması ve direnç nedeniyle beta-laktam veya aminoglikozid grubu antibiyotiklerle kombine kullanılmaları önerilmektedir (22).

ÇİD'ne sahip *Acinetobacter* türlerinde tobramisin (TOB) ve amikasin (AK) duyarlı suşlarda tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. Ancak diğer antimikrobiyal ajanlarla kombine şekilde kullanılmaları uygundur (67).

*Acinetobacter* infeksiyonlarının tedavisinde kombinasyon tedavilerinin üstünlüğü *P. aeruginosa* infeksiyonlarında olduğu kadar net kanıtlanamamıştır. Ancak elde edilmesi beklenen sinerjik etki, daha düşük dozların kullanımı ile yan etkilerin azaltılması ve direnç gelişiminin önlenmesi gibi nedenlerle tedavide tercih edilmektedir. Kombinasyon ile ilgili çalışmaların çoğu in vitro çalışmalar, hayvan deneyleri veya vaka gözlemlerine dayanmaktadır (22). Kombine terapi çeşitli deneysel fare pnömoni modellerinde araştırılmış ve en iyi sonuçlar IPM+TOB, IPM+rifampisin (RİF), RİF+TOB kombinasyonları ile gözlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde; en iyi sonuçların RİF taşıyan kombinasyonlar ile elde edildiği ifade edilmiştir (82). Doksisisiklin (DOX) ve AK kombinasyonu sinerjik etkili bulunurken, bu etki IPM ve AK birlikteliğinde gözlenmemiştir (83). Yine LEV ile yapılan deneylerde IPM ve AK ile kombinasyonu başarısız bulunmuştur (84). Karbapeneme duyarlı türler ile yapılan bir başka çalışma, IPM ile AK kombinasyonunun, tek başına IPM tedavisinden daha az etkin olduğu sonucunu saptamıştır.

İn vitro çalışmalar ve hayvan deneylerinde elde edilen sonuçlar önemli olmakla birlikte klinik uygulamalarda her zaman aynı sonuçlara ulaşmak mümkün

değildir. VİP tedavisinde COL ve RİF kombinasyonunun değerlendirildiği 14 hastalık bir çalışmada %64 mikrobiyolojik kür sağlanmıştır (85). COL'in diğer antimikrobiyal ajanlar ile kombinasyonu buna benzer çeşitli çalışmalarda başarılı olarak bildirilmiştir (67).

## 2.8. ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI

*Acinetobacter* ailesinin üyeleri ilk olarak 1970'lerin başlarında önemli nozokomiyal patojen olarak tanınmaya başlanmıştır. İlk in-vitro çalışmalarda, pek çok klinik izolat ampisillin (AMP) (izolatların %60-70'i duyarlı), CN (%92,5), kloramfenikol (CL) (%57) ve nalidiksik asit (NA) (% 97,8) gibi sık kullanılan antimikrobiyal ajanlara duyarlıydı ve böylece bu organizmaların neden olduğu infeksiyonlar nispeten kolayca tedavi edilebilmekteydi (6). Ancak, sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla özellikle *A. baumannii* kompleksine ait klinik izolatların antimikrobiyallere karşı direncinde artış olduğu vurgulanmaktadır. Günümüzde izolatların büyük bir kısmı sık kullanılan antimikrobiyal ajanlara dirençli hale gelmiştir (6,86). ÇİD'ne sahip *Acinetobacter* türlerinin ortaya çıkış nedeni hastanelerde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı olarak gösterilmektedir. Bu durum ÇİD *Acinetobacter* infeksiyonlarının tedavisinde karbapenemlerin yoğun kullanımına neden olmuştur (87). Ancak *Acinetobacter* klinik izolatları kısa sürede karbapenem direnci kazanmış, bazı izolatların klinik kullanımda olan tüm antibiyotik ajanlarına dirençli olduğu bildirilmiştir (86,88).

*Acinetobacter* türlerinin ÇİD izolatları sıklıkla *A. baumannii* kompleksine aittir. Moleküler çalışmalar ÇİD'nden sorumlu genin büyük kısmını karakterize etmiş ve sınıf içindeki antibiyotik direnç mekanizmalarını saptamıştır. ÇİD tipik olarak çoklu mutasyonların birikimi ve/veya diğer bakteri soylarından direnç genlerinin kazanılması sonucu oluşmaktadır. Bu kazanım, aynı anda birbirleriyle ilişkisi olmayan çeşitli antibiyotik gruplarına direnç gelişimini kodlayan gen kümelerini taşıyan plazmidlerin, transpozonların ve integronların transferi gibi çeşitli mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Dirençli suşların tam-genom dizi analizleri *A. baumannii* kromozomu üzerine mobil genetik bölümlerin eklenmesi ile oluşan direnç adalarının varlığını ortaya koymaktadır (89).

### 2.8.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç

Beta-laktam grubunda penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve bir monobaktam olan aztreonam (AZM) yer almaktadır. Beta-laktamlara direnç gelişimine neden olan genel mekanizmalar; penisilin bağlayan proteinlerde oluşan değişiklikler ile antibiyotiğin hedef bölgeye bağlanmasının engellenmesi, dış membran proteinlerinin ifadesinde azalma veya atım pompaları ile antibiyotiğin hücre duvarından geçişinin ve hücre içine girişinin önlenmesi, beta-laktamaz enzimleriyle beta-laktam antibiyotiğinin inaktive edilmesi sonucu da direnç oluşabilmektedir (90).

#### 2.8.1.1. Beta-laktamaz üretimi

*Acinetobacter* türlerinde karbapenemleri de içeren beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin ana mekanizması kromozom veya plazmid tarafından kodlanan beta-laktamaz üretimidir. Bazı suşlarda direnç normal olarak nispeten belirsiz düzeylerde eksprese edilen beta-laktamazların üretimindeki değişim nedeniyle oluşur (89).

##### 2.8.1.1.1. Doğal kromozomal beta-laktamazlar

*A. baumannii* kompleksine ait izolatların çoğunda iki doğal tip beta-laktamaz tanımlanmıştır (89).

##### AmpC Tipi Sefalosporinazlar;

*A. baumannii* kompleksine ait tüm türler oldukça yüksek pI değerlerine sahip AmpC tipi sefalosporinaz içermektedir (89).

Tüm bu enzimler birinci kuşak sefalosporinleri, üreidopenisillinleri ve aminopenisillinleri oldukça etkin bir şekilde hidrolize eder. Ancak bazal düzeyde eksprese edildiklerinde *Acinetobacter* türlerine karşı geniş spektrumlu sefalosporinlerin etkilerini azaltmazlar. Bununla birlikte *bla<sub>AmpC</sub>* geninin üst kısmına *ISAbal* olarak gösterilen Insertion Sequence (IS) elementinin eklenmesi

yüksek düzeylerde beta-laktamaz ekspresyonunu artırır. Bu da sefotaksim (CTX) ve CAZ gibi geniş spektrumlu sefalosporinlerde belirgin düzeyde dirence neden olurken karbapenemlere karşı direnci etkilemez (91-93). Eklenme olayı aynı zamanda *ampC* geninin ribozom bağlanma bölgeleri sekanslarında nükleotid değişimi ile sonuçlanır. Ancak bu değişim *ampC* geninin ekspresyonunu değiştirmez ve yüksek düzeyde ekspresyon yalnızca *ISAbal* sekansının varlığı ile ilişkilidir (93). *ISAbal* *Acinetobacter* türlerinde birkaç kopya olarak bulunur ancak bu element *Enterobacteriaceae* veya *P. aeruginosa* gibi diğer organizmalarda şu ana kadar bulunmamıştır (94).

### **OXA-51/69 varyantı beta-laktamazlar;**

AmpC tipi sefalosporinazlara ek olarak, *A. baumannii* türlerinin büyük bir çoğunluğu OXA-51/OXA-69 enzim kümesi olarak gösterilen ve sınıf D oksasilinaz olan ikinci bir doğal beta-laktamaz üretir. Bu enzimler %63 amino-asit benzerliği ile diğer bilinen oksasilinazlardan farklı bir enzim kümesi oluştururlar (95,96).

Çeşitli coğrafik bölgelerde şu ana kadar en az 18 OXA-51 varyantı saptanmıştır (95-99). Bu varyantlar 1 ila 15 amino-asit modifikasyonu ile ayrılır, tümü zayıf karbapenemaz aktivitesine sahiptir ve sefaloridin (CF) hariç sefalosporinleri hidrolize etmezler (95). Bu genlerin ekspresyon seviyesinin pek çok vakada oldukça düşük olduğu görülmüştür (96). Ancak *A. baumannii* klonlarında OXA-51 benzeri enzimlerin varlığı analiz edildiğinde, çalışılan tüm izolatlarda *bla<sub>OXA-51</sub>* geni bulunmasına rağmen sadece *ISAbal* ile komşu olan *bla<sub>OXA-51</sub>* genlerin karbapenem direnci ile ilişkili olduğu saptanmıştır (100).

Bu zayıf karbapenemazların tam orjini halen bilinmemektedir. Orjinleri ne olursa olsun OXA-51/OXA-69 enzim kümesi üyeleri, *A. baumannii*'nin hemen hemen tüm izolatalarında doğal yapı olmasına rağmen *Acinetobacter* ailesinin diğer üyelerinde bulunmazlar (96,101). Bu enzimler sıklıkla diğer kümelerle ait kazanılmış OXA-tipi enzimlerle kombine olarak bulunurlar ve karbapenem

direncinde OXA-51/OXA-69 enzim kümesinin en azından sinerjik rolü olabileceği öne sürülmüştür (99,102).

#### **2.8.1.1.2. Kazanılmış beta-laktamazlar**

Yapısal beta-laktamazların yanı sıra *A. baumannii*'de karbapenem direncinin kaynağı olarak, çeşitli kazanılmış beta-laktamazlar da saptanmıştır. Bunlar; metallo beta-laktamazlar olarak tanımlanan Ambler sınıf B enzimler, oksasilinazlar olarak bilinen sınıf D enzimler ve sınıf A geniş spektrumlu beta-laktamazlardır (88).

#### **Sınıf B Metallo-beta-laktamazlar (MBL);**

IMP benzeri, VIM benzeri, SIM-1, SPM-1 ve GIM-1 olmak üzere şu ana kadar tanımlanan beş grup kazanılmış MBL vardır. Bunlardan ilk üç grubun üyeleri *Acinetobacter* türlerinin klinik izolatlarında bildirilmiştir (89).

IMP grubunda yedi subgrup içinde kümelenen en az 19 varyant bulunmaktadır (103). *A. baumannii*'de bunlardan üç farklı subgruba ait IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8 ve IMP-11 olmak üzere en az 6 IMP varyantı saptanmıştır (88). Bu enzimleri kodlayan genleri taşıyan *Acinetobacter* izolatları, Avrupa'da özellikle Akdeniz ülkelerinde sporadik olarak bildirilirken, birkaç Asya ülkesinde endemik olduğu rapor edilmiştir (89).

*A. baumannii*'de VIM enzimleri oldukça nadir olarak saptanmıştır. Güney Kore'de VIM-2 (104) izolatları, Almanya'da ve Yunanistan'daki hastanelerde VIM-1 taşıyan *Acinetobacter* türleri saptanmıştır (89). Bu güne dek, SIM-1 sadece Kore'deki *A. baumannii* klinik izolatlarında bildirilmiştir (105).

*Acinetobacter* izolatlarında IMP ve VIM varyantları karbapenem ve AZM hariç diğer beta-laktam antibiyotiklere karşı güçlü hidrolitik etkinliğe sahiptir ve yüksek düzeyde dirence neden olurlar. SIM-1 üreten izolatlar daha düşük karbapenemaz aktivitesine sahiptir. Beta-laktamlar arasında sadece FEP, sefpirom



(CFP) ve daha az miktarda TZP, MBL üreten suşlara karşı rezidüel aktiviteye sahiptir (89).

DNA sekans analizleri *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> ve *bla*<sub>SIM</sub> genlerinin, sınıf 1 integron yapılarının korunmuş segmentleri arasına eklenmiş gen kasetleri olarak bulunduğunu ortaya koymuştur. MBL kodlayan gen kasetleri genellikle diğer antibiyotik direnç kasetleriyle, özellikle de aminoglikozidleri modifiye eden enzimleri kodlayanlarla ilişkili bulunmuştur (89).

### **Sınıf A Geniş Spektrumlu Beta-laktamazlar (ESBL) ;**

*Acinetobacter* türlerindeki kazanılmış beta-laktamazlar 1980'lerin başında ilk önce sınıf A enzimlerden TEM-1 ve TEM-2 beta-laktamazlar, daha sonra CARB-5 ve SHV benzeri enzimleri bildiren çalışmalarla ortaya konmuştur. AMP, karboksipenisilinler ve üreidopenisilinlere direnç bu enzimlerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bu enzimlerin geniş spektrumlu sefalosporinler veya karbapenemlere karşı aktif olmadığı görülmüştür. Tüm dünyaya yayılmış olan ESBL'lerin pek çoğu yapısal olarak dar spektrumlu olup, TEM ve SHV tipi beta-laktamazlardan köken almaktadır. Ancak şu ana dek *Acinetobacter*'lerde Çin'de bildirilen SHV-12 tipi ESBL hariç, *Enterobacteriaceae*'larda sık bulunan TEM ve SHV tipi ESBL varyantı bildirilmemiştir (89). Bununla birlikte *A. baumannii* izolatlarında ESBL'lerden PER-1 enzimi Türkiye (106), Fransa (107), Kore (108) ve Belçika'da (109); VEB-1 enzimi Fransa (110) ve Belçika'da (109); CTX-M tipi enzimler Japonya (111) ve Bolivya'da (112) bildirilmiştir.

*Acinetobacter* türlerinin bu enzimleri tam olarak hangi mekanizmayla kazandığı henüz ortaya konamamıştır. *Enterobacteriaceae* üyelerindeki plazmidlerin *Acinetobacter*'e geçme yeteneği olduğu vurgulanmıştır. Geçiş sonrasında plazmidler yeni konakçının genomuna transpoze olmakta, ancak bundan sonra plazmidler gerçek niteliklerini kaybetmekte, konakçı kazandığı geni kendi jenerasyonları boyunca aktarılabilen iken diğer *Acinetobacter* üyelerine gen ya da plazmid aktarımı olmadığı bildirilmektedir (89).

Bazı çalışmalar *bla*<sub>VEB-1</sub> geninin sınıf 1 integron yapısı ile ilişkili olduğunu, *bla*<sub>PER-1</sub> geninin kromozomal olarak lokalize bir transpozonun parçası olduğunu ortaya koymuştur (110,113).

### **Sınıf D Oksasilinazlar;**

Sınıf D oksasilinazlar, oksasilini benzilpenisiline göre daha etkin hidrolize eden beta-laktamazlardır. *A. baumannii* türleri zayıf karbapenemaz aktivitesi gösteren OXA-51/OXA-69 enzim kümesine ait doğal sınıf D oksasilinaz üretmektedir. Buna ek olarak, *Acinetobacter* türlerinde karbapenemlere karşı aktivite gösteren kazanılmış üç oksasilinaz kümesi tanımlanmıştır. Sınıf D oksasilinazlara ait tanımlanmış OXA enzim kümeleri Tablo-II'de gösterilmiştir. MBL sınıfı ile karşılaştırıldığında bu enzimlerin karbapenemlere karşı hidrolitik etkinliği 100 ila 1000 kat daha düşüktür, bu durum bazen rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında saptanmalarını güçleştirmektedir. Bu enzimler karbapenem hidrolize eden D grubu beta-laktamazlar = oksasilinazlar (CHDL) olarak adlandırılmaktadır. CHDL sınıfına ait farklı kümelerin saptanması ve ayrımı multiplex PCR kullanılarak yapılmıştır (102).

*Acinetobacter*'de kazanılmış CHDL ilk olarak 1985'te İskoçya'da izole edilen türlerde bildirilmiştir (97). Bu enzim, genetik ve biyokimyasal karakterizasyonunu takiben OXA-23 olarak adlandırılmıştır. OXA-23, doğal OXA-51/OXA69 kümesi ile %56 amino-asit benzerliğine sahiptir ve CHDL kümesinin ilk temsilcisidir. Daha sonra Singapur'da OXA-27 ve Çin'de OXA-49 (GenBank erişim no: AY288523) enzimi tanımlanmıştır (114) OXA-27, OXA-23'ten ve OXA-49'dan birkaç aminoasitin yer değiştirmesi ile ayrılır (88). Son birkaç yıl içinde *A. baumannii* türlerinde OXA-23; Brezilya'daki (115), Çin'deki (116), Fransız Polonezya'sında (117), Kore'deki (118) ve Singapur'daki (GenBank erişim no: AY795964) izolatlar da dahil olmak üzere tüm dünyada saptanmıştır. İngiltere'deki hastane izolatlarında endemik olduğu bildirilmiştir (100).

Tablo II. Karbapenem hidrolize eden D grubu beta-laktamazlar sınıfına ait OXA enzim kümeleri

Enzim kümesi	Subgrup üyeleri	Yapı	Referans
I	OXA-23	Kazanılmış	Brown&Amyes 2006
	OXA-27		Afzal-Shah et al.2001
	OXA49		Poriel&Nordmann 2006
II	OXA-24	Kazanılmış	Bou et al. 2000
	OXA-25,26		Afzal-Shah et al.2001
	OXA-40		Lopez-Otsoa et al. 2002
III	OXA-58	Kazanılmış	Poriel et al. 2005
	OXA-51		Brown et al. 2005
	OXA-64,65,66		Brown&Amyes 2006
IV	OXA-68,69,70,71	Kromozomal	Brown&Amyes 2006
	OXA-75,76,77		Heritier et al. 2005
	OXA-78,79,80,82		Brown&Amyes 2006
	OXA-83,84		Turton et al.2006
	OXA-86		Vahaboğlu et al.2006

*A. baumannii* izolatlarında IS4 ailesine ait *ISAbal* her zaman *bla*<sub>OXA-23</sub> geninin üst kısmında yer almaktadır (98). Bu da *ISAbal*'in etkiyi sağladığı, OXA-23'ün ekspresyonunda ve kazanılmasında muhtemel kilit rol oynadığını düşündürmektedir. Fransa ve Cezayir'deki *A. baumannii* izolatlarında benzer şekilde, ekspresyonda rol oynadığı düşünülen *ISAbal4*, OXA-23 geninin üst kısmında saptanmıştır (88).

Kazanılmış ikinci küme CHLD'ler OXA-24, OXA-25, OXA-26 ve OXA-40 içerir. Bu enzimler OXA-23 ile %60 ve OXA-51/OXA-69 doğal kromozomal enzimleri ile %62 amino-asit benzerliği göstermektedir (88). Bu kümedeki enzimlerin pek çoğunun birbirinin yakın varyantı olduğu düşünülmektedir. OXA-26 Belçika'daki bir izolatta saptanmıştır (114). Diğer varyantlar, özellikle OXA-

40 kısmen dirençli klonların epidemik yayılımının sonucu olarak İspanya ve Portekiz'deki *A. baumannii* türleri arasında görülmüştür (119,120).

Kazanılmış CHDL üçüncü kümesi ilk olarak Fransa'da saptanan OXA-58'dir (121) OXA-58, OXA-51/OXA69 doğal kromozomal enzim kümesi ile %59 ve diğer iki kazanılmış CHDL kümeleri ile %50'nin altında amino-asit benzerliğine sahiptir (88). OXA-58 tipi enzimler tüm dünyada farklı coğrafik bölgelerde saptanmıştır (87,88,122). Bu enzimlerin detaylı incelenmesi ile OXA-58 enziminden bariz sekans farklılıklarının olduğu ortaya konulmuş, bu nedenle üçüncü küme enzimleri olarak ifade bulmuştur. OXA-58 *A. baumannii*'de plazmidle eksprese olduğunda karbapenemlere hassasiyeti azaltırken, efflux sistemiyle birlikte eksprese olduğunda yüksek karbapenem direncine yol açmaktadır (123). Poirel ve Nordmann (124) *bla*<sub>OXA-58</sub> ekspresyonunun *ISAb3*-benzeri element, *ISAb1*, *ISAb2* ve *IS18* gibi farklı bağlanma sekansları aracılığıyla artabildiğini gözlemişlerdir (124).

Bu CHDL'ların kökeni veya kazanılma mekanizmaları ile ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bazı türlerde OXA-23 ve OXA-58'i kodlayan genlerin plazmid kökenli olduğu gösterilmiştir (122,124). Ancak *Acinetobacter*'deki bugüne kadar tanımlanmış diğer kazanılmış CHDL'ler kromozomal olarak kodlanmaktadır. OXA-58 gen bölgesi eksprese edilmesinde rol oynayan IS elementlerince çevrelenmiştir (124). Ancak ekspresyonda rol oynayan IS elementlerinin muhtemelen OXA-58 geni kazanılmasında etkisi yoktur (89).

CHDL'ların dördüncü kümesini kromozomal olarak kodlanan OXA-51/OXA-69 türü enzimler oluşturur.

### **2.8.1.2 Dış membran proteinlerinde (OMP) değişiklik**

*Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci ile ilişkili ilk çalışmalar permeabilite bozukluğunun porin proteinlerindeki değişikliklerle ilişkili olduğunu bildirmiştir (125). Ancak günümüzde konuyla ilgili daha detaylı moleküler bilgiler sağlanmıştır.

Limanski ve ark (126) 2002 yılında saptanabilir karbapenemaz aktivitesi göstermeyen *Acinetobacter* klinik izolatlarında 20-kDa'luk OMP kaybının IPM direnci ile ilişkili olduğunu raporlamıştır. Siroy ve ark (127) 2005 yılında IPM ve MEM direncini CarO adı verilen ve ısıyla değişebilen 25-29 kDa'luk OMP kaybı ile ilişkilendirmiştir.

Del Mar Tomas ve ark (128) 2005 yılında *A. baumannii*'de karbapenem direnci ile ilişkili 33-36 kDa'luk OMP klonlamış ve sekans analizini gerçekleştirmiştir. Sonuçta bu OMP'nin diğer Gram negatif bakterilerdeki gibi yüksek glisin içerikli, sistein rezidüleri içermeyen, negatif yüklü, hidrofobik rezidüleri olmayan, bakteriyal membran ve hücre yüzey proteinleri içeren tipik porinler olduğunu göstermişlerdir (128).

Mussi ve ark (129) 2005 yılında CarO'nun *Moraxellaceae* ailesi *γ-proteobacteria* sınıfı ile sınırlı belirli bir OMP ailesini temsil ettiğini düşünseler de şu ana kadar toplanan verilerin incelenmesi ile CarO homologlarının sadece *Acinetobacter*, *Moraxella* ve *Psychrobacter* genusu üyelerinde bulunduğu saptanmıştır.

Son olarak *A. baumannii*'nin aynı zamanda *P. aeruginosa* izolatlarındaki karbapenem direnci ile ilişkili olduğu bilinen 43-kDa'luk D2 porin homologuna (OprD olarak adlandırılan) sahip olduğu gösterilmiştir. *P. aeruginosa*'da olduğu gibi, OprD-benzeri protein üreten *A. baumannii* suşlarındaki karbapenem duyarlılığının değişebileceği ortaya konulmuştur (130).

### **2.8.1.3 Penisilin bağlayan proteinler (PBP)**

Penisilin bağlayan proteinlerdeki değişikliğin *A. baumannii*'de beta-laktam direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İlk çalışmalarda Gehrlein ve ark (131), in-vitro mutant türevlerde karbapenem direncini araştırmışlar ve dirençli mutantın 24-kDa'luk PBP aşırı ürettiğini ancak, duyarlı türler ile karşılaştırıldığında diğer altı PBP'i daha düşük düzeylerde eksprese ettiğini raporlamışlardır. Urban ve ark (132) IPM dirençli ve duyarlı *A. baumannii* izolatlarında PBP'ler ile sulbaktam,

klavulonik asit ve tazobaktam ilişkisini araştırmış ve yarışmalı-bağlanma deneylerinde tüm bu üç beta-laktamaz inhibitörünün IPM dirençli izolatlarda PBP'e bağlandığını göstermiştir. Ancak, şu anki klinik formülasyonu ile sadece sulbaktam *in vivo* olarak *A. baumannii*'ye karşı aktif gibi görünmektedir.

Yeni yapılan bir çalışmada Fernandez-Cuenca ve ark (133) çeşitli beta-laktamaz direnç profillerine sahip *A. baumannii* izolatlarını incelemişler ve 12 farklı PBP paterni tanımlamışlardır. Aynı çalışmada karbapenem direnci (MIC>4mg/L) karbapenemaz üretimi ile birlikte 73.2 kDa'luk PBP bulunmaması ile ilişkili bulunmuştur.

### 2.8.2. Aminoglikozidlere Direnç

*Acinetobacter* türlerinde diğer pek çok patojen grubuna göre klinik olarak kullanımda olan aminoglikozid grubu antibiyotiklere direnç oranları daha fazladır (86). *Acinetobacter* türlerinde çoğu aminoglikozid direnci aminoglikozid-modifiye edici enzimlerin üretimini içermektedir ve *Acinetobacter* türlerinde tüm üç sınıfta aminoglikozid-modifiye edici enzimler bulunmuştur: asetil-transferazlar, adenil-transferazlar, fosfo-transferazlar. *A. haemolyticus* ve ilişkili genomik gruplar, genomik grup-spesifik N-asetil-transferazların sentezi nedeniyle doğal olarak aminoglikozidlere dirençlidir (134). Hibridizasyon verileri bazı *Acinetobacter* türlerinin birkaç farklı aminoglikozid direnç geni içerdiğini doğrulamıştır (135). *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozidlere diğer direnç mekanizmaları hedef ribozomal protein değişikliklerini, bakteri membranından aminoglikozid transportunun bozulmasını ve aminoglikozidlerin hücre içine akış pompasının ortadan kalkmasını içermektedir (136). Son zamanlarda Kore'de diğer Gram negatif bakterilerde ve *A. baumannii*'de yeni 16S rRNA metilaz'ın düzenlediği AK ve arbekasin'e (AR) yüksek düzeyde direnç mekanizması saptanmıştır (137).

Vakaların pek çoğunda *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozid direncinden sorumlu genler aynı zamanda diğer Gram negatif bakteri cinslerinde de bulunmuştur. *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozid direnç genlerinin

yayımlarının plazmidlerin ve transpozonların transferini de içeren çeşitli genetik mekanizmalarla gerçekleştiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, *Acinetobacter* türlerinde bulunan ve sınıf 1 integron yapısının bir parçası olan aminoglikozid direnç genleri en sık rastlanan gen kasetleridir (135,138,139).

### 2.8.3. Kinolonlara Direnç

Kinolonlara direnci kodlayan enzimler kromozomal olarak lokalize genlerin mutasyonu sonucu gelişen direnç olup; sıklıkla DNA giraz (topoizomeraz II) veya topoizomeraz IV'ün yapısal değişikliğini içermektedir. DNA giraz sırasıyla *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan iki A ve iki B subünitinden oluşmaktadır. Benzer şekilde topoizomeraz IV'de *parC* ve *parE* genleri tarafından kodlanan iki subünitten oluşmaktadır. 1990'a kadar kinolonlar *Acinetobacter* türlerine karşı oldukça iyi aktivite göstermiş ancak daha sonra *A. baumannii* klinik izolatları bu antibiyotiklere hızla direnç geliştirmiştir.

*A. baumannii*'de en sık karşılaşılan kinolon direnci mutasyon tipi *gyrA*'nın 83. kodonunda Serin yerine Lösin aminoasidinin değişimidir, bu değişim CİP'in MIC değerinin >4mg/L olmasına neden olmaktadır (140). *gyrA*'da farklı aminoasit değişiklikleri de bildirilmiştir (105,140). CİP'e yüksek direnç (MIC>64 mg/L) genellikle *gyrA* ve *parC* genlerinin her ikisinde de mutasyon varlığında ortaya çıkmaktadır. Bunlardan *parC* genindeki en sık mutasyon *parC*'nin 80. kodonunda Serin yerine Lösin aminoasidinin gelmesi şeklindedir (140,141). Kinolon direnci için benzer mutasyonların tüm dünyadaki farklı coğrafik bölgelerde, farklı *Acinetobacter* izolatlarında, genotipik olarak bağımsız gerçekleştiği gösterilmiştir (140). İzolatlar arasında dirençteki küçük değişimler ilaç permeabilitesindeki değişiklikleri ve/veya akım pompasının etkilerini yansıtabilir (136).

MOX gibi yeni kinolonlar CİP gibi diğer eski ajanlarla karşılaştırıldığında *A. baumannii*'ye karşı in vitro artmış aktiviteye sahiptirler. Spence ve Towner izolatlarında *gyrA* geninin Ser-83. kodonundaki tek bir mutasyon ile CİP için MIC değerinin 2→32 mg/L artırdığını ancak MOX için MIC değerinde 0,25-1mg/L

artış olduğunu göstermiştir (142). Tümü MOX dirençli (MIC>2 mg/L) klinik izolatların *parC* geninde 80. kodonda ikinci bir mutasyon gösterilmiştir. CIP dirençli, MOX duyarlı izolatlarda yapılan tek basamaklı mutasyon çalışmaları bu tarz stabil MOX dirençli mutantların oluşumunun zor olduğunu göstermiştir (89).

#### 2.8.4. Diğer Antibiyotiklere Direnç

Pek çok vakada *Acinetobacter* türlerinde diğer sık kullanılan antibiyotiklere gelişen direncin mekanizması temel olarak Gram negatif bakterilerde saptanan direnç mekanizmaları ile benzerlik göstermektedir (89).

Tetrasiklin (TE) bakterinin 30S ribozomal subünitine bağlanarak protein sentezi inhibisyonuna neden olmaktadır. TE dirençli bakteriler genellikle akım pompası veya ribozomal koruma sistemi olarak adlandırılan iki farklı direnç mekanizmasından birini eksprese etmektedir. Gram negatif bakterilerde farklı sayıda tetrasiklin direnç geni tanımlanmıştır, bunlardan en sık görüleni *tetA-tetE*'dir (tetrasiklin-spesifik akım pompasını kodlar). Bu genlerin pek çoğunun plazmidler veya transpozonlarla ilişkili olduğu bulunmuştur. Diğer Gram negatif bakterilerde olduğu gibi, *A. baumannii* klinik izolatlarında en sık rastlanan TE direnç genleri *tetA* ve *tetB*'dir (143,144). Bunlar genellikle non-spesifik akım pompası geni *adeB* ile kombine olarak bulunmaktadır. *A. baumannii*'de *tetM* varlığı da tanımlanmıştır (144). Çevresel izolatlarda, klinik örneklerle ilişkisiz *Acinetobacter* türlerinde (*A. baumannii* dışındaki genomik türler) transfer edilebilen ve *tet-39* olarak gösterilen, plazmidler üzerinde lokalize yeni bir TE direnç belirteci tanımlanmıştır (145). *Acinetobacter* türlerinde TE direncinin genetik temeli ile ilgili detaylı moleküler çalışma bulunmamaktadır.

RİF bazen *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu çoklu ilaç dirençli infeksiyonlarda tedavinin bir kombinasyonu olarak kullanılmaktadır. *Acinetobacter* türlerinde yüksek düzeyde RİF direnci; diğer Gram negatif bakterilerde görülenlerle benzer şekilde kromozomal olarak ribozomal polimeraz subünitinde lokalize *rpoB* geninde spontan mutasyon nedeniyle oluşmaktadır. Huang ve ark (146). Hong Kong'daki *Acinetobacter* izolatlarında, integron



yerleşimli gen kasetinde RİF ADP-riboziltransferaz enzimini kodlayan *arr-2* geni varlığını tanımlamıştır (146). Bu çalışmada *arr-2* gen kaseti RİF direncinin major etkileyicisi gibi görünmektedir; *arr-2* pozitif izolatlarda RİF MIC değeri >32mg/L iken *arr-2* negatif izolatlarda RİF MIC değeri ≤8mg/L olarak saptanmıştır.

*Acinetobacter* türleri kalıtsal olarak düşük düzeylerdeki trimethoprim dirençlidir (MIC 16-32 mg/L) Ancak yüksek düzeylerde direnç (1000mg/L'ye kadar) genellikle dihidrofolat redüktaz kodlayan genin kazanılması ile ilişkilidir. Benzer şekilde *Acinetobacter* türlerinde kloramfenikol (C) direnç genleri, özellikle CAT-1, konakçı kromozomuna entegre olmuş Tn21 ailesine ait transpozonlar içermektedir (89).

### **Multidrug efflux sistemi (Çoklu İlaç Akım Pompası)**

Gram negatif bakterilerde olduğu gibi spesifik akım pompalarına ek olarak *tet* genleri tarafından kodlananlar gibi kromozomal olarak kodlanan çoklu ilaç akış sistemi tanımlanmıştır (147).

Çoklu antimikrobiyal ajanların başarısız olmasına neden olan beş ana sınıf akış sistemi tanımlanmıştır. Bunlar; major kolaylaştırıcı süperailisi (MFS); direnç nodülasyon bölünme (RND) ailesi; ATP bağlayıcı kaset (ABC) ailesi; küçük çoklu ilaç direnç ailesi (SMS) ailesi ve çoklu ilaç ve toksik madde ekstrüzyon (MATE) ailesi olarak sıralanabilir (147).

Klinik olarak direnç sözkonusu olduğunda RND ailesi bunlardan en önemlisidir. *A. baumannii*'de RND ailesine ait *AdeABC* akış sistemi tanımlanmış ve aminoglikozidlere dirençteki rolü ve C, florokinolonlar, trimethoprim ve CTX'e azalmış duyarlılık açıkça ortaya konmuştur (136).

## **2.9. TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ**

Tiplendirme yöntemleri; epidemiyolojik ilişkinin ortaya konulması, re-aktivasyonun re-infeksiyondan ayırt edilmesi ve salgın araştırmalarında epidemik

suşların kaynağının ve yayılım yollarının belirlenmesi, hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonların belirlenmesi, dirençli suşların tanımlanması ve yaygınlığının belirlenmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemi bulunmaktadır. Buna rağmen *Acinetobacter* spp. için henüz tek bir tiplendirme sistemi altın standart yada referans yöntem olarak kabul görmemiştir (6).

### **2.9.1. Fenotipik Tiplendirme Yöntemleri**

Fenotipik yöntemler bakterilerin genetik özelliklerini yansıtır ve genellikle oldukça spesifiktir. Bugüne kadar bilinen patojen bakterilerin çoğu tanımlanmış ve identifikasyonlarında anahtar olabilecek bazı fenotipik özellikler belirlenmiştir. Bir kökende ender olarak bulunan belirli bir fenotip tek başına bu kökenin yayılımı hakkında bilgi verebilir ancak her zaman görülebilen fenotipik özelliklere sahip kökenlerde ise alt tiplendirme yapılmalıdır. Alt tiplendirme için kullanılan yöntemler; antimikrobiyal duyarlılık modellerinin belirlenmesi, biyotiplendirme, faj ve bakteriyosin tiplendirme, serotiplendirme, protein elektroforezi olarak sayılabilir (148).

Fenotipik yöntemlerin duyarlılığını azaltan ve dezavantaj olarak ifade edilebilen çeşitli faktörler sözkonusudur (148). Bunlar;

- 1- Çevresel seçici baskılardan etkilenme,
- 2- Antijen yapısının değişken olması,
- 3- Direnç modellerinin antibiyotik tedavisinden güçlü bir şekilde etkilenmesi,
- 4- Fenotipik özelliklerin her zaman eksprese olmayan genlerde kodlanabilmesi,
- 5- Ticari olarak bulunmayan bazı ayıraçların gereksinimi,
- 6- Bir tür içindeki her bir kökeni ayırt etmeye yetecek farklılıkların bulunmaması şeklinde sıralanabilir.

Fenotipik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda genotipik tiplendirme yöntemlerine başvurulmaktadır.

## 2.9.2. Genotipik Tiplendirme Yöntemleri

Bakteri plazmidlerinin veya kromazomal DNA'nın genotiplendirmesi, fenotiplendirme yöntemlerindeki olumsuzlukları ortadan kaldırmış ve epidemiyolojik araştırmalarda daha güvenilir veriler sağlamıştır. Alt tiplerin belirlenmesinde kullanılan tüm moleküler yöntemler DNA dizisindeki farklılıkların saptanmasına dayanır. Genotiplendirme yöntemleri fenotiplendirmeye göre; tiplendirme başarısı, tekrarlanabilirlik ve ayırım gücü yönünden daha üstündür (148).

Günümüzde farklı mikroorganizmalar için kullanılan farklı genotipik tiplendirme yöntemleri bulunmaktadır;

### 2.9.2.1. Plazmid profil analizi:

Epidemiyolojik açıdan incelenecek kökenlerin plazmidlerinin ayrılarak agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmesine dayalı bir yöntemdir. Kolay, ucuz, hızlı ve tekrarlanabilir özelliği olan bu yöntemde sonuç için gen ekspresyonunun gerekli olmaması yöntemin avantajlı yönünü oluşturur. Plazmidler bakteriler arasında konjugasyon başta olmak üzere birçok farklı mekanizma ile nakledildiğinden, bazen hastanelerdeki epidemiler tek kökenin yayılması ile değil, bir plazmidin yayılması ile ortaya çıkar. Plazmidin kolayca kaybedilmesi ya da kazanılabilmesi, ve birer ekstrakromazomal element olduğundan bakterinin genotipini yansıtmaması yöntemin olumsuz yönlerini oluşturur (148).

*Acinetobacter* kökenlerinde farklı boyut ve sayıda plazmidler bulunmuştur. Plazmidler *Acinetobacter*'de oldukça yaygındır fakat plazmidler ile ilişkili genler hakkında bilinenler antibiyotik direncini kodlayan genler ve transfer mekanizmaları ile sınırlıdır. Çevresel *Acinetobacter*'deki plazmidler ve bu plazmidlerin taşıdığı genlerin prevalansı çoğunlukla hala bilinmemektedir (89). Plazmid profil analizi uygulamaları ile *Acinetobacter* suşlarında antibiyotik direnç mekanizmalarının çoğu aydınlığa kavuşturulmuştur (149).

### **2.9.2.2. Ribotiplendirme:**

Ribozomal RNA genleri evrim boyunca en fazla korunan genlerdir ve teorik olarak tüm bakterilerde bulunmaktadır. Ribozomal operonlar ile ilgili DNA sıralarındaki değişkenlikleri belirlemek için cins, tür veya gruba özel ribozomal RNA'lar birer prob olarak kullanılır. Ribotiplendirmede kökenlerin DNA'sı izole edilir, restriksiyon enzimleri ile kesilir ve elektroforez ile DNA parçaları ayrıştırıldıktan sonra seçilmiş prob ile hibridize edilir. Ribozomal gen modellerinin bir tür içinde nispeten stabil halde bulunması, epidemiyolojik kökenleri birbirinden ayırmada yöntemin gücünü bir dereceye kadar azaltır (148).

Diğer yöntemlerle kombine olarak kullanıldığında değerli epidemiyolojik veriler sağlanabilmesine rağmen oldukça zahmetli oluşu nedeniyle yerini Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) gibi diğer yöntemlere bırakmıştır (89).

### **2.9.2.3. Multilokus sekans tipleme (MLST):**

Mikroorganizmaların tiplendirilmesinde oldukça ayırt ettirici özelliğe sahip olan yöntemde direkt olarak protein kodlayan yapısal genlerin internal fragmanlarının DNA sekans karşılaştırması kullanılır (6). Bazı kaynaklarda MLST kromozomal DNA'nın PFGE ile analizinden daha ayırt edici bulunmuş ve MLST dendrogramının PFGE dendrogramı ile yüksek uyum gösterdiği belirtilmiştir (150).

### **2.9.2.4. Southern blotting ve Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP):**

Bakteriye ait tam kromozomal DNA bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve kesilen parçalar agaroz jelde elektroforez ile ayrılır. Parçalar, agaroz jelden nitroselüloz veya naylon membrana Southern blotting ile geçirilir. Daha sonra membrana bağlı nükleik asit, incelenen gen ile homolog olan ve bir veya daha çok işaretli prob ile hibridize edilir. RFLP analizinde sadece problemlerle hibridize olan DNA parçaları görülür hale geldiği için sonuçların analizi de büyük ölçüde kolaylaşmıştır (148).

### **2.9.2.5. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE):**

PFGE mikroorganizma genomunun mutasyonlara uğrayabilmesi esasına dayalı olarak geliştirilmiştir. Nükleotid dizisindeki değişiklikler kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleazlarca oluşturulmuş bant profillerini yansıtmaktadır. Bu yöntemde kökenler eritilmiş agaroz ile karıştırılır, bir deterjan enzim ile lizise uğrattılır ve restriksiyon enzimleri ile kesilir. Daha sonra DNA molekülleri agaroz jelde belirli zaman aralıklarında birbirlerine farklı açıda elektriksel alanların etkisinde bırakılarak PFGE uygulanır. Aynı türün farklı alt tiplerindeki genomik farklılıklar, restriksiyon enzimleri ile kesildikleri bölgelerde farklı olmasına neden olur. İncelenen kökenler, genotipik yönden benzer bulunduğu, epidemik ve endemik kökenlerin kesin olarak ayırt edilebilmesi için en az iki enzim ile restriksiyon analizi yapılması önerilmektedir (148).

*Acinetobacter* suşlarının PFGE analizinde izole edilen DNA'nın *ApaI*, *SmaI* ve *NheI* restriksiyon enzimleri ile parçalanması sonucu oluşan DNA parçalarının uzunluk polimorfizmi gösterilmektedir. Bu yöntem, *A. baumannii* için salgınlarda veya bir hastadan izole edilen farklı kökenlerin tiplendirilmesinde yararlı bir yöntemdir. Dezavantajı, pahalı olması ve uzun süreye ihtiyaç duyulmasıdır. PFGE yüksek oranda tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olduğundan, birçok araştırmacı tarafından moleküler yöntemler içinde altın standart olarak kabul edilmiştir (148,151,152).

### **2.9.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli yöntemler:**

Polimeraz zincir reaksiyonu, 50-2000 baz çiftli DNA veya RNA'nın tek zincirinin bir yarı otomatik sistem içinde birkaç saatte oligonükleotid primerler kullanılarak bir milyondan fazla kat çoğalmasını sağlayan üç basit reaksiyonun bir döngü halinde tekrarlanmasıdır. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek ve hızlı bir yöntem olması, mikroorganizmaların ve ürünlerin direkt olarak tiplendirilmesi yararlı özellikleridir. Buna karşın, kontaminan DNA'nın amplifikasyonuna ya da epidemik ile ilgisi bulunmayan mikroorganizmaların çok benzer nükleik asit sıralarının tanımlanmasına bağlı olarak yanlış pozitif sonuç vermesi, primerlerin

sadece hedeflenen nükleik asit sırasını tanımlaması da, epidemiyolojik araştırmalarda polimeraz zincir reaksiyonunun güvenilirliğini azaltan başlıca olumsuz özelliklerdir (148).

*A. baumannii*'nin tiplendirilmesinde AP-PCR (Arbitrarily Primed Amplification), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive İntergenic Consensus PCR), REP-PCR (Repetitive Palindromic Sequence PCR) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır (6,150).

Rastgele çoğaltılmış polimorfik polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR): Düşük bağlanma sıcaklıklarında kromozomal DNA sıralarına yeterli afinite ile hibridize olan 9-10 baz sıralı rastgele primerlerin kullanılmasıdır. Bu rastgele primer bölgeleri yerleşim ve sayıları yönünden bir bakteri türünün değişik suşlarında farklılık gösterir. Sonuçta agaroz jelde elektroforez ile her bir farklı köken için karakteristik bantlar ortaya çıkar (148).

Tekrarlayan gen dışı enterobacterial ve palindromik polimeraz zincir reaksiyonu (ERIC-PCR, REP-PCR): Bakteri genomundaki değişken sayıda tekrarlayan DNA elementlerinin, bu bölgelere yönelik primerler kullanılarak PCR ile amplifikasyonundan elde edilen suşa özgül modellerinin incelenmesi suretiyle bakteri DNA'sının parmak izinin belirlenmesidir (153).

#### **2.9.2.7. DNA dizi analizi:**

Bunun için DNA hibridizasyonu yapılır. Çift zincirli DNA tek zincirli hale getirilmek üzere denatüre edilir ve sonra işaretlenmiş komplementer tek zincirli DNA probuna bağlanma oranını belirlemek için ölçüm yapılır. Enterobacteriaceae üyesi suşların alt tiplendirilmesinde sıklıkla kullanılır. DNA dizi analizi maliyeti pahalı ve sonuçların yorumlanması yönünden en zor yöntemdir (148).

### III- MATERYAL ve METOT

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 09.TIP.16 numaralı proje ile destek sağlanarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Temmuz 2008 - Haziran 2009 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı kliniklerden gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 121 *A. baumannii* suşu bu çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastadan tekrar izole edilen suşlar çalışmaya alınmamıştır.

##### 3.1.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

Araştırma kapsamında toplanan *Acinetobacter* suşlarının üretimi rutin kullanımda yer alan Kanlı agar (Oxoid, İngiltere) ve Eosin Metilen Blue (EMB) agar (Oxoid, İngiltere) ile gerçekleştirilmiş, identifikasyon amacıyla Triple Sugar Iron (TSİ) agar (Oxoid, İngiltere) kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri Müller Hinton Agar (MHA) ve Müller Hinton Buyyon (MHB) (Oxoid, İngiltere) ile gerçekleştirilirken, bakterilerin yeniden canlandırılması işlemi sırasında Brain Heart İnfüzyon Buyyonu (BHI) (Oxoid, İngiltere) kullanılmıştır.

Çalışma süresince kullanılan tüm besiyerleri üretici firma talimatları doğrultusunda Tablo-III'de özetlendiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri karışımı 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak (Hirayama HV-85, Japonya) sterilize edilmiştir. Steril edilen agar besiyerleri 50°C'ye kadar soğutulup petrilere dökülmüş, sonra oda sıcaklığında bekletilerek katılaşması sağlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Farklı olarak sterilizasyondan sonra 8-9 ml cam deney tüplerine dağıtılan TSI besiyeri ise tüpler 2-3 cm dik kısım ve üste yatık kısım oluşacak şekilde

uygun açıda yatık tutularak katılaştırılması sağlanmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Buyyon besiyerleride üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlanmış ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra steril cam tüplere 3’er ml dağıtılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Tablo III. Çalışma sırasında kullanılan besiyerleri

Besiyeri	Hazırlanışı
Kanlı agar	21 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt’ye tamamlanmıştır %5 olacak şekilde 50 ml kan eklenmiştir
EMB agar	30 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt’ye tamamlanmıştır
MHA	38 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt’ye tamamlanmıştır
TSI agar	64.6 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt’ye tamamlanmıştır
BHI buyyon	37 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt’ye tamamlanmıştır
MHB	21 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt’ye tamamlanmıştır
Deoksiribonükleaz (DNAz) agar	39 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt’ye tamamlanmıştır

Besiyerinin kontaminasyon kontrolü için, hazırlanan petrilerin %5’ini kapsayacak şekilde rastgele örnekleme yöntemi ile 48 saat 37°C’lik etüvde (Nüve EN 500, Türkiye) inkübe edilmiştir. Sterillik denetlenmesinden sonra uygun bulunan besiyerleri izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları için kullanılmıştır.



### 3.1.2. Kùltür ve Tanımlama

Ekimi yapılan kùltürlerin Kanlı agarda hemoliz özelliği ve EMB'de laktoza etkileri değerlendirildikten sonra bakterileri tanımlamak amacıyla bazı fenotipik testler yapılmıştır. Bunlar;

**TSI agar besiyerine ekim ve değerlendirme:** EMB yada Kanlı agar petrisinde tek dűřen bir koloni seşilmiş, iđne öze ile tek dokunuşla alınan bakteriler önce iđne öze besiyerinin dik kısmına batırılarak sonrada yatık kısmın yüzeyine zik zak çizilerek ekimi yapılmıştır. Ekilen besiyeri 36°C'de 18-24 saat inkübasyonu takiben fermentasyon ağısından değerlendirilmiştir (154).

**Oksidaz varlığını araştırma:** Oksidaz test çubuklarının (Oxoid, İngiltere) Kanlı agar petrisindeki koloniye dokundurularak 15 saniye bekletildiğinde mor renk oluşumunun gözlenmesi pozitif sonuç, renk değişiminin olmaması negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

**Katalaz:** Temiz bir lam üzerine 1-2 damla %2'lik hidrojen peroksit damlatılmış ve içerisinde kan bulunmayan bir besiyerinden steril öze yardımıyla alınan bakteri kolonisi ile karıştırılmıştır. Tepkime sonucu gözlenen hava kabarcıklarının oluşumu katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (154).

**Hareket araştırma:** Kanlı agardan alınan bakteri kolonisi lam üzerinde, 1 damla serum fizyolojik damlatılarak süspanse edilmiş ve sıvı hareketinin durması için bir süre beklendikten sonra mikroskopta X40'lık büyütme ile incelenerek hareket bakılmıştır (154).

**44°C'de üreme:** Kanlı agardan alınan bakteri kolonisinden kanlı agara yeni pasaj yapılmış ve 44°C'ye ayarlanan etüvde (Nüve EN 500, Türkiye) 48 saatlik inkübasyonu takiben üremesi değerlendirilmiştir.

**DNAz besiyerine ekim ve değerlendirme:** Kanlı agardan alınan bakteri kolonisinden DNAz besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de bir gece inkübe

edilmiştir. İnkübasyonu takiben 97.2 ml distile su ile 2.8 ml %37'lik HCl karıştırılarak hazırlanan DNAz miyarı plak yüzeyine tüm yüzeyi kaplayacak şekilde dökülmüştür. Koloni çevresinde Hidroklorik asit (HCl) ve DNA birleşmesi sonucu presipitasyon gözlemlendiğinde (besiyeri matlaştığında) DNAz negatif olarak yorumlanmıştır (154).

**İndol deneyi:** Sıvı besiyerine inoküle edilen bakteri 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra tüpün kenarından Kovacs ayırıcı damlatılarak besiyerinin yüzeyinde tabaka oluşması sağlanmıştır. Birkaç saniye içerisinde besiyeri ile ayıraç arasında parlak kırmızı bir halka oluşması olumlu sonuç olarak kabul edilirken halka oluşmaması indol negatif olarak yorumlanmıştır.

Fenotipik testlerle *Acinetobacter* spp. olduğu düşünülen 121 suşdan 51 tanesinin identifikasyonu MicroScan Autoscan 4 (Dade Behring, West Sacramento, CA, ABD) ve 70 tanesinin identifikasyonu VITEK 2 (Biomerieux, North Carolina, ABD) otomatize sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Her iki cihaz için identifikasyon çalışmaları üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.3. *Acinetobacter* Suşlarının Depolanması**

Klinik örneklerden izole edilen suşları uzun süreli saklama amacıyla Roti-Store Cryo-vials sistemi (Roth, Almanya) kullanılmış (3-6 ay), ve DNA izolasyonu gerçekleştirilinceye kadar suşların tümü -80°C'de derin dondurucuda (Nuair -86°C Ultralow freezer, ABD) muhafaza edilmiştir.

## **3.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ**

Antibiyotik duyarlılık testleri hem otomatize sistemler ile hemde konvansiyonel yöntemlerle CLSI önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Çalışılan izolatlar çeşitli kliniklerden laboratuara gönderilen örneklerden izole edildiğinden otomatize ve konvansiyonel testler rutin laboratuvar çalışmaları kapsamında gerçekleşmiştir.

### **3.2.1. MicroScan Autoscan 4**

İzole edilen şuşların 51 tanesinin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri bu yöntemle çalışılmıştır. Otomatize yöntemde prosedür gereği plak yüzeyinden alınan koloniler 3 ml'lik "inoculum water" içinde süspanse edilip MicroScan Turbiditymeter (Dade Behring, ABD) ile 0,5 McFarland bulanıklığı olacak şekilde ayarlanıp bakteri süspanسیونundan 100 µl "inoculum water with pluronic" (25 ml) içine eklenmiştir. Sonra dağıtım küveti içine dökülerek otomatik dağıtıcı (Renok, Dade Behring, ABD) ile her kuyucukta 100'er µl olacak şekilde panellere (Negatif Breakpoint Combo 34, Dade Behring, ABD) dağıtılmıştır. Bu işlemleri takiben normal atmosfer şartlarında, 37°C'de 18-24 saat inkübasyona tabii tutulduktan sonra okutma gerçekleştirilmiştir. Okutma işleminde MicroScan Autoscan 4 cihazı (Dade Behring, ABD) kullanılmıştır.

### **3.2.2. VITEK 2 Compact**

İzole edilen şuşların 70 tanesinin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri bu yöntemle gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın önerisi doğrultusunda; biri identifikasyon diğeri antibiyogram testinde kullanılmak üzere her şuş için 2'şer adet plastik tüpün içine 4'er ml saline solüsyon dağıtılmış ve birinci tüpte petri yüzeyinden alınan saf koloniler süspanse edilmiştir. Sistemle birlikte gelen cihaz ile (Vitek Densichek, BioMerieux, ABD) 0,5-0,63 McFarland bulanıklığı sağlanan birinci tüpten 145 µl ikinci tüpe aktarılmış ve vortex (Nüve NM 110, Türkiye) yardımıyla iyice homojenize edilmiştir. Vitek 2 GN identifikasyon kiti açılıp birinci tüp, N-90 nonfermenter antibiyogram kiti açılıp ikinci tüp transfer edilip kaset taşıyıcılara yerleştirilmiş ve cihaza yüklenmiştir. Yaklaşık 18-24 saat sonra identifikasyon ve antibiyogram sonuçları elde edilmiştir.

### **2.3.3. Konvansiyonel Yöntem**

İzole edilen bakterilerin tümünün konvansiyonel yöntemle antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi MHA (Oxoid, İngiltere) ve standart antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanılarak CLSI M2-A9'a (155) göre Kirby Bauer

disk difüzyon yöntemiyle yapılmış, inkübasyonu takiben elde edilen sonuçlar CLSI M100-S17'ye (156) göre yorumlanmıştır.

Antibiyotik diski olarak; CAZ (Seftazidim-30µg), CRO (Seftriakson-30µg), CTX (Sefotaksim-30µg), FEP (Sefepim-30µg), IPM (İmipenem-10µg), MEM (Meropenem-10µg), CİP (Ciprofloksasin-5µg), LEV (Levofloksasin-5µg), AK (Amikasin-30µg), CN (Gentamisin-10µg), TOB (Tobramisin-10µg), SXT (Trimetoprim sulfametaksazol-25µg), SCF (Sefaperazon sulbaktam-105µg) diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanılmıştır.

Test için 4 mm kalınlığında dökülmüş MHA kullanılmıştır. İnokülasyon için bakteri suşlarının yoğunluğu turbidometrik yöntemle 0,5 McFarland olacak şekilde (Oxoid turbidometer, İngiltere) süspanse edilmiş ve steril eküvyon yardımı ile agar yüzeyine ekim yapılmıştır. Antibiyotik diskleri dispenser (Oxoid, İngiltere) ile birbirlerine uzaklıkları standart 25'er mm olacak şekilde yerleştirildikten sonra petriler 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her antibiyotik için inhibisyon zon çapı milimetrik olarak ölçülerek; test sonuçları, CLSI'n önerdiği sınırlara göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirilmiştir. Kalite kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır.

### **3.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR**

Elde edilen izolatların DNA izolasyonu iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiş ardından iki aşamalı olarak moleküler çalışmalara geçilmiştir. Birinci aşamada konvansiyonel PCR ile optimizasyon çalışmaları ikinci aşamada Real Time PCR yapılmıştır.

#### **3.3.1. Bakteriyal DNA'nın İzolasyonu**

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere, çalışmaya başlamadan bir gün önce suşların tümü -80°C'den çıkarılmış, BHI buyyonda bir gece inkübe edilerek yeniden canlandırılmış ve kanlı agara subkültürleri yapılmıştır.

### **3.3.1.1. Kaynatma yöntemiyle DNA izolasyonu:**

DNA eldesi için, steril eppendorf tüplere 250 µl distile su dağıtılıp numaralandırılmış ve her suşun 16-18 saatlik kolonilerinden her örnek için tek kullanımlık steril öze ile 3-5 koloni alınıp süspansiyon edilerek iyice çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu 10 dakika kaynatılarak parçalanmış ve eppendorfların oda ısısında soğuması beklenmiştir. Hücresel çöküntü santrifüjde 10.000 rpm'de 5 dakika (Hettich, Almanya) santrifüj işlemine tabii tutularak uzaklaştırılmış ve santrifüj sonrası süpernatantın 100 µl'si PCR analizinde kullanılmak üzere ayrılmıştır. PCR işlemi gerçekleştirilene kadar ayrılmış olan DNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır.

### **3.3.1.2. Ekstraksiyon kiti ile DNA izolasyonu:**

Bütün suşların nükleik asit izolasyonu "QIAGEN QIAamp Mini Kit" (QIAGEN, Almanya) ve "mikrosantrifüj" (Hettich, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda kit prosedürüne uygun gerçekleştirilmiştir.

Kit içeriği; Proteinaz K, Buffer ATL, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE, QIAamp Mini Spin Columns (spin kolon) ve Collection tubes (Toplama tüpleri) 2ml'lik tüplerden ibaret olup bakteri kültürlerinden nükleik asit izolasyon prosedürü şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

-Suş numaraları üzerlerine yazılan 2ml'lik steril eppendorf tüpleri eppendorf sporlarına dizilmiş ve her bir eppendorfa 200µl buffer ATL dağıtılmıştır.

-Daha önceden kanlı agara ekilip yeniden canlandırılan suşların kolonilerinden 1-2 koloni her örnek için tek kullanımlık steril özeler yardımıyla alınarak eppendorf tüplerinde süspansiyon edilmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir.

-Üzerlerine 20µl proteinaz K eklenen eppendorfların kapağı kapatılarak 15 saniye vorteksle karıştırılmıştır.

-Ependorflar benmaride (Nüve BM 402, Türkiye) 56°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir.

-Ependorf tüpünün kapağındaki damlacıkları aşağıya indirmek için kısa süreli spin santrifüj işlemi uygulanmıştır.

-Tüplere 200µl etil alkol (%96-100) ilave edilerek 15 saniye vortekslenmiştir.

-Tüplerin kapağındaki damlacıkları aşağıya indirmek için spin santrifüj yapılmıştır.

-Toplama tüplerine spin kolonlar yerleştirilerek ependoflardaki karışımın tamamı dikkatlice spin kolonlara aktarılmıştır. Kapağı kapatılıp 6000xg (8000 rpm/dk-Hettich, Almanya) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir.

-Spin kolonlar toplama tüpleri ile birlikte santrifüjden alınmış, alttaki 1.5ml'lik toplama tüpleri içinde biriken karışım ile birlikte atılmış ve spin kolonlar temiz bir 2ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirilmiştir. Gözle yapılan değerlendirme sonucu santrifüjlemeden sonra karışımın tamamı kolondan geçmemişse, spin kolon tamamen boşalincaya kadar yüksek devirde santrifüj işlemine devam edilmiştir.

-Spin kolonların kapakları dikkatlice açılmış ve çepere değilmeden 500µl buffer AW1 eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 6000xg (8000 rpm/dk-Hettich, Almanya) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir.

-Toplama tüpleri içinde biriken sıvıyla birlikte atılmış ve kolonlar temiz toplama tüplerine aktarılmıştır.

-Spin kolonların kapakları dikkatlice açılmış ve çepere değilmeden 500 µl buffer AW2 eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 20000xg (14000 rpm/dk-Hettich, Almanya) hızda 3 dakika santrifüjlenmiştir.

-Toplama tüpleri içinde biriken sıvıyla birlikte atılmış ve kolonlar temiz toplama tüplerine aktarılarak 20000xg (14000 rpm/dk-Hettich, Almanya) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir.

-Santrifüjden alınıp toplama tüpleri içinde biriken sıvıyla birlikte atılmış ve kolonlar temiz 2ml'lik temiz ependorf tüplerinin içine yerleştirilmiştir.

-Spin kolonların kapakları dikkatlice açılmış ve üzerine çepere değilmeden 50µl buffer AE eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 6000xg (8000 rpm/dk-Hettich, Almanya) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir.

-Kolonlar atılıp ependorf tüplerindeki saf nükleik asit PCR çalışmalarında kullanılmak üzere için küçük porsiyonlara ayrılarak -20°C'ye alınmıştır.

### **3.3.1.3. Bakteriyel DNA'nın kalite ve miktarının değerlendirilmesi:**

Nükleik asit analizlerinde, izole edilen nükleik asitin kalite ve miktarına bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Nükleik asit miktar ve kalitesini belirlemede genellikle absorpsiyon temeline dayalı spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Spektrofotometrik yöntemde kuartz tüpler kullanılarak örneklerin belli dalga boyunda ışığı absorbe etme dereceleri belirlenmektedir. Nükleik asitler, adenin rezidüleri aracılığıyla 260 nm dalga boyunda ışığı absorbe ederler. Örnekteki nükleik asit konsantrasyonunun miktarı, direkt olarak 260 nm dalga boyundaki ışığı emme derecesi ile ilişkili olarak hesaplanabilmektedir (Absorpsiyon değerleri = A<sub>260</sub>) Bir optik dansite (OD) 260 nm'de; çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA için 33 µg/ml'dir (absorpsiyon sabiti).

Çift iplikçikli DNA için miktar tayini;  $DNA(\mu g/ml) = 260 \text{ nm'deki OD (absorbans değeri = A}_{260}) \times \text{sulandırma oranı} \times 50$  (absorpsiyon sabiti) şeklinde hesaplanır.

Spektrofotometrik ölçümde nükleik asitin miktarı dışında kalite ve saflığını belirlemekte mümkündür. DNA 260 nm, protein 280 nm dalga boylarında pik yapmaktadır. Saflaştırılmış DNA için A260/A280 oranı 1,6-2,0 olmalıdır. İzole edilen örnekte protein kontaminasyonu var ise 280 nm'deki değerde artış olmakta ve A260/A280 oranı azalmaktadır. Dolayısıyla A260 /A280 oranı belirlenen sınırlar arasında değilse izole edilen nükleik asit yeterli saflıkta değildir ve izolasyon prosedüründe protein uzaklaştırma basamağı tekrarlanmalıdır. Bu oran 2'den daha yüksek ise izole edilen DNA'nın RNA ile kontamine olduğunu düşündürür. Bu durumda RNAz ile kontamine RNA uzaklaştırılmalıdır.

PCR çalışmaları için ne kadar saf ve yüksek molekül ağırlıklı DNA izole edilebilirse bantların belirginliği ve üretilebilirliği o derece artmaktadır. Bu doğrultuda çalışmamız kapsamında her iki yöntemle gerçekleştirilen izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen nükleik asitler spektrofotometrik yöntemlerle kalite ve saflık bakımından incelenmiştir.

#### **3.3.1.4. Primer hazırlığı**

Direncin ifadesi olan gen bölgelerinin gösterilmesi için 4 ayrı primer seti kullanılarak çalışılmıştır. Öncelikle Genbankası verilerinden hedeflenen DNA dizilimi bulunmuştur. Seçilecek primerlerin hedef DNA'ya özgün olup olmadığı değerlendirilmek için Primer3 Plus programı kullanılmış ve OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 için yaklaşık 20-30 basepare (bp) uzunluğunda Forward ve Reverse primerler belirlenmiştir. Literatür taranarak, belirlenen primer dizilerinin uygunluğu diğer yayınlarla da desteklenmiş ve dizaynına karar verilmiştir. Liyofilize haldeki primerler (Fermentas, ABD) üretici firmanın talimatları doğrultusunda distile su kullanılarak 100 pikoMol/ml olacak şekilde sulandırılmış ve stok primer solüsyon kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kontaminasyonu önlemek amacıyla küçük porsiyonlara ayrılmış ve kullanıma kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir



### 3.3.2. PCR Optimizasyon Çalışmaları

*A. baumannii*'nin  $bla_{OXA-23}$ ,  $bla_{OXA-24}$ ,  $bla_{OXA-51}$ ,  $bla_{OXA-58}$  genlerinin belirlenmesi için "konvansiyonel PCR" aracılığıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında, her bir primerin DNA zincirine bağlanabileceği en uygun sıcaklığın (annealing temperature) saptanabilmesi için konvansiyonel PCR kullanılarak farklı ısılarda gradiyent uygulaması gerçekleştirilmiştir (Techne TC-512, ABD)

#### 3.3.2.1. *A. baumannii*'nin OXA-23 geni için optimizasyon

Amplifikasyon aşaması kontaminasyonun önlenmesi amacıyla izolasyon odasından farklı bir odada gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmaya başlamadan önce tüm yüzey %10 hipokloridli su ile silinerek temizlenmiştir.

Çalışma şu şekilde yapılmıştır:

Amplifikasyon için kullanılacak buffer,  $MgCl_2$ , dNTP, F ve R primerler ve genomik DNA'lar  $-20^{\circ}C$ 'lik derin dondurucudan çıkarılmış, Taq DNA polimeraz ve tüm PCR bileşenleri çalışma anına kadar soğuk metal blok üzerinde bekletilmiştir.

Çalışılacak örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon MasterMixi tüpteki son volüm  $25\mu l$  olacak şekilde, Tablo-IV'de belirtildiği gibi steril ependorf tüpünde hazırlanmıştır.

Numaralandırılarak metal blok üzerine sıralanan  $0,2\mu l$ 'lik PCR tüplerine hazırlanan MasterMixten  $24'er \mu l$  dağıtılmıştır.

Suşlardan izole edilen DNA'lardan ve pozitif kontrol DNA'sından  $1'er \mu l$  dağıtılırken negatif kontrol için  $1 \mu l$  distile su kullanılmıştır.

Ağızları sıkıca kapatılan tüpler thermal cycler cihazına (Techne TC-512, ABD) yüklenmiş ve program basamakları aşağıdaki gibi ayarlanıp 40 siklus uygulanarak çoğaltılmıştır:

Prehold	92°C'de	6 dakika	
Denaturation	92°C'de	1 dakika	
Annealing	55°C'de	1 dakika	gradyent*
Extension	72°C'de	1 dakika	
Final hold	72°C'de	10 dakika	
	4°C'de ~		

\*En uygun ısı aralığını saptayabilmek için; 5°C, 6°C, 8°C ve 10°C'de gradyent uygulanmıştır.

Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri agaroz jele yüklenmek üzere cihazın içinden alınmıştır.

### **3.3.2.2. *A. baumannii*'nin OXA-24 geni için optimizasyon:**

Amplifikasyon aşaması kontaminasyonun önlenmesi amacıyla izolasyon odasından farklı bir odada gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmaya başlamadan önce tüm yüzey %10 hipokloridli su ile silinerek temizlenmiştir.

Çalışma şu şekilde yapılmıştır:

Amplifikasyon için kullanılacak buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, F ve R primerler ve genomik DNA'lar -20°C'lik derin dondurucudan çıkarılmış, Taq DNA polimeraz ve tüm PCR bileşenleri çalışma anına kadar soğuk metal blok üzerinde bekletilmiştir.

Çalışılacak örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon MasterMixi tüpteki son volüm 25µl olacak şekilde, Tablo-V'de belirtildiği gibi steril ependorf tüpünde hazırlanmıştır.

Tablo IV. OXA-23 amplifikasyonunda kullanılan MasterMix bileşenleri

Bileşenler	Miktar*
10X PCR Buffer	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP mixi	1 µl
OXA-23 F primer (5'-CGGTCTTGATCTCATGCAAA-3')**	0,5 µl (20pM/µl)
OXA-23 R primer (5'-CCCAACCAGTCTTTCCAAAA-3')**	0,5 µl (20pM/µl)
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
Genomik DNA	1 µl
Steril distile su	17,75 µl
Toplam hacim	25 µl

\*Miktarlar tek bir örnek içindir.

\*\*Genbank erişim no: GQ849192.1

Numaralandırılarak metal blok üzerine sıralanan 0,2µl'lik PCR tüplerine hazırlanan MasterMixten 23'er µl dağıtılmıştır.

Suşlardan izole edilen DNA'lardan ve pozitif kontrol DNA'sından 2'şer µl dağıtılırken negatif kontrol için 2µl distile su kullanılmıştır.

Ağızları sıkıca kapatılan tüpler thermal cycler cihazına (Techne TC-512, ABD) yüklenmiş ve program basamakları aşağıdaki gibi ayarlanıp 40 siklus uygulanarak çoğaltılmıştır:

Prehold	92°C'de	5 dakika	
Denaturation	92°C'de	45saniye	
Annealing	55°C'de	30 saniye	gradiyent*
Extension	72°C'de	50 saniye	
Final hold	72°C'de	10 dakika	
4°C'de ~			

\*En uygun ısı aralığını saptayabilmek için; 5°C, 6°C, 8°C ve 10°C'de gradiyent uygulanmıştır.

Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri agaroz jele yüklenmek üzere cihazın içinden alınmıştır.

Tablo V. OXA-24 amplifikasyonunda kullanılan MasterMix bileşenleri

Bileşenler	Miktar*
10X PCR Buffer	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP mixi	1 µl
OXA-24 F primer (5'-GGTTAGTTGGCCCCCTAAA-3')**	0,5 µl (20pM/µl)
OXA-24 R primer (5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3')**	0,5 µl (20pM/µl)
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
Genomik DNA	2 µl
Steril distile su	16,75 µl
Toplam hacim	25 µl

\*Miktarlar tek bir örnek içindir.

\*\*Genbank erişim no: AJ239129

### 3.3.2.3. *A. baumannii*'nin OXA-51 geni için optimizasyon:

Amplifikasyon aşaması kontaminasyonun önlenmesi amacıyla izolasyon odasından farklı bir odada gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmaya başlamadan önce tüm yüzey %10 hipokloridli su ile silinerek temizlenmiştir.

Çalışma şu şekilde yapılmıştır:

Amplifikasyon için kullanılacak buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, F ve R primerler ve genomik DNA'lar -20°C'lik derin dondurucudan çıkarılmış, Taq DNA polimeraz ve tüm PCR bileşenleri çalışma anına kadar soğuk metal blok üzerinde bekletilmiştir.

Çalışılacak örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon MasterMixi tüpteki son volüm 25µl olacak şekilde, Tablo-6'da belirtildiği gibi steril ependorf tüpünde hazırlanmıştır.

Numaralandırılarak metal blok üzerine sıralanan 0,2µl'lik PCR tüplerine hazırlanan MasterMixten 24'er µl dağıtılmıştır.

Suşırlardan izole edilen DNA'lardan ve pozitif kontrol DNA'sından 1'er µl dağıtılırken negatif kontrol için 1µl distile su kullanılmıştır.

Ağızları sıkıca kapatılan tüpler thermal cycler cihazına (Techne TC-512 ABD) yüklenmiş ve program basamakları aşağıdaki gibi ayarlanıp 40 siklus uygulanarak çoğaltılmıştır:

Prehold	92°C'de	5 dakika	
Denaturation	92°C'de	30 saniye	
Annealing	56°C'de	15 saniye	gradiyent*
Extension	72°C'de	45 saniye	
Final hold	72°C'de	2 dakika	
4 °C'de ~			

\* En uygun ısı aralığını saptayabilmek için; 5°C, 6°C, 8°C ve 10°C'de gradiyent uygulanmıştır.

Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri agaroz jele yüklenmek üzere cihazın içinden alınmıştır.

Tablo VI. OXA-51 amplifikasyonunda kullanılan MasterMix bileşenleri

Bileşenler	Miktar*
10X PCR Buffer	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP mixi	1 µl
OXA-51 F primer (5'-TCAGCAAGAGGCACAGTTT-3')**	0,5 µl (20pM/µl)
OXA-51 R primer (5'-GCTGAACAACCCATCCAGTT-3')**	0,5 µl (20pM/µl)
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
Genomik DNA	1 µl
Steril distile su	17,75 µl
Toplam hacim	25 µl

\*Miktarlar tek bir örnek içindir.

\*\*Genbank erişim no: EU255296.1

#### 3.3.2.4. *A. baumannii*'nin OXA-58 geni için optimizasyon:

Amplifikasyon aşaması kontaminasyonun önlenmesi amacıyla izolasyon odasından farklı bir odada gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmaya başlamadan önce tüm yüzey %10 hipokloridli su ile silinerek temizlenmiştir.

Çalışma şu şekilde yapılmıştır:

Amplifikasyon için kullanılacak buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, F ve R primerler ve genomik DNA'lar -20°C'lik derin dondurucudan çıkarılmış, Taq DNA polimeraz ve tüm PCR bileşenleri çalışma anına kadar soğuk metal blok üzerinde bekletilmiştir.

Çalışılacak örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon MasterMixi tüpteki son volüm 25µl olacak şekilde, Tablo-VII'de belirtildiği gibi steril ependorf tüpünde hazırlanmıştır.

Numaralandırılarak metal blok üzerine sıralanan 0,2µl'lik PCR tüplerine hazırlanan MasterMixten 24'er µl dağıtılmıştır.

Suşırlardan izole edilen DNA'lardan ve pozitif kontrol DNA'sından 1'er µl dağıtılırken negatif kontrol için 1µl distile su kullanılmıştır.

Ağızları sıkıca kapatılan tüpler thermal cycler cihazına (Techne TC-512, ABD) yüklenmiş ve program basamakları aşağıdaki gibi ayarlanıp 40 siklus uygulanarak çoğaltılmıştır:

Prehold	92°C'de	6 dakika	
Denaturation	92°C'de	45 saniye	
Annealing	55°C'de	30 saniye	gradyent*
Extension	72°C'de	45 saniye	
Final hold	72°C'de	8 dakika	
	4°C'de ~		

\*En uygun ısı aralığını saptayabilmek için; 5°C, 6°C, 8°C ve 10°C'de gradyent uygulanmıştır.

Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri agaroz jele yüklenmek üzere cihazın içinden alınmıştır.

Tablo VII. OXA-58 amplifikasyonunda kullanılan MasterMix bileşenleri

Bileşenler	Miktar*
10X PCR Buffer	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP mixi	1 µl
OXA-58 F primer (5'-AATTGGCACGTCGTATTGGT-3')**	0,5 µl (20pM/µl)
OXA-58 R primer (5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3')**	0,5 µl (20pM/µl)
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
Genomik DNA	1 µl
Steril distile su	17,75 µl
Toplam hacim	25 µl

\*Miktarlar tek bir örnek içindir.

\*\*Genbank erişim no: EU131095

### 3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Konvansiyonel PCR çalışmaları sonucunda oluşan ürünler agaroz jel elektroforezde incelenmiştir. Bunun için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. % 1'lik jel hazırlamak için;

-Hassas tartıda (AND GF 6100, Japonya) 1 g agaroz (Sigma, ABD) tartılıp 250ml'lik erlen şişe içerisine konulmuştur.

-Dereceli mezürle 100ml 1XTBE (Tris-Borik-Asit-EDTA, Fermentas, ABD) buffer ölçülerek şişenin içerisindeki agarozun üzerine ilave edilerek karıştırılır.

-Mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dakika kaynatılan karışımın biraz soğuması beklenirken yatay jel elektroforez tablasının içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak şekilde taraklar düzgünce yerleştirilmiştir.

-Sıvı haldeki karışım jel tablasının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde dökülmüş ve 25-30 dakika soğumaya bırakılmıştır.

-Katılaştıran jel içerisinden taraklar çıkartılarak, 250ml 1XTBE tampon içeren elektroforez tankının (Thermo minicell EC 320 Electrophoretic Gel System, ABD) içerisine dikkatlice yerleştirilmiştir.

-Çoğaltılan PCR ürünlerinden 10'ar µl alınıp üzerlerine 2'şer µl 6x elektroforez yükleme boyası (Orange G, Zeydanlı, Türkiye) eklenerek karıştırılmıştır.

-Oluşturulan karışımdan 10µl alınarak donmuş olan jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve kuyucukların dibine düşmesi sağlanmıştır.

-Jele marker ve örneklerin yüklemesi yapıldıktan sonra elektroforez tankının (Thermo minicell EC 320 Electrophoretic Gel System, ABD) kapağı



kapatılıp elektrotlar bağlanmış ve güç kaynağına (Thermo EC 25090-90, ABD) bağlanarak 100 V'luk akımda 30-60 dakika yürütülmüştür.

-Sürenin sonunda jel dikkatli bir şekilde, içerisinde Etidyum Bromür (Sigma, ABD) bulunan, ışık geçirmeyen ağzı kapalı bir kabın içerisine 15 dakika boyanmaya bırakılmıştır.

-Boyanan jel transluminatör cihazındaki (Herolab UVT-20M, Almanya) uygun odacığa yerleştirilerek ultraviyole ışık altında incelenmiştir.

-PCR sonucu oluşan ürünler, marker (Fermentas 1kb ladder) ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Yaklaşık 245bp'lik (bp) bant oluşumu OXA-23 gen bölgesi, 249 bp'lik bant oluşumu OXA-24 gen bölgesi, 188 bp'lik bant OXA-51 gen bölgesi ve 231 bp'lik bant OXA-58 gen bölgesinin varlığını göstermiştir.

-Oluşan bantlar Jel görüntüleme sisteminde (Kodak EDAS 290, USA) görüntülenerek kayıt altına alınmıştır.

#### **3.3.4. Real Time PCR**

Optimizasyon sonucunda elde edilen veriler ışığı altında (her primerin annealing sıcaklığı) PCR işlemi Rotor Gene RG 3000 (Corbett Research, Almanya) cihazında aşağıdaki prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir:

Örnek sayısı kadar ince çepirli 0,2 µl'lik ependorf numaralandırılmıştır.

CBYR Green qPCR master mix (Fermentas, ABD) ısı ve ışıktan korunmak üzere çalışma anına kadar -20°C'de tutulmuş ve çözündükten sonra aktivitesini kaybetmemesi için bir sonraki kullanıma kadar folyoya sarılarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2 ml'lik steril ependorf içerisinde Tablo-VIII'de belirtilen şekilde pozitif kontrol, negatif kontrol ve örnek sayısı kadar hesaplanan miktarda PCR reaksiyon

MasterMixi hazırlanmıştır. Metal blok üzerine sıralanan 0,2 µl'lik PCR tüplerine hazırlanan MasterMixten 24'er µl dağıtılmıştır.

Suşıardan izole edilen DNA'lardan ve pozitif kontrol DNA'sından 1'er µl dağıtılırken negatif kontrol için 1 µl distile su kullanılmıştır.

Ağızları sıkıca kapatılan tüpler Rotor Gene RG 3000 cihazına yerleştirilmiş ve uygun amplifikasyon programı düzenlenerek Real Time PCR uygulanmıştır.

Optimizasyon çalışmaları sırasında yapılan gradiyent uygulamaları ile OXA-23 primerinin hedef DNA'ya bağlanabilmesi için en uygun sıcaklık 51°C olarak saptanmıştır. Elde edilen verilere göre OXA-23 için amplifikasyon programı şu şekilde uygulanmıştır:

Prehold	92°C'de	6 dakika
Denaturation	92°C'de	1 dakika
Annealing	51°C'de	1 dakika
Extension	72°C'de	1 dakika
Final hold	72°C'de	10 dakika

Gradiyent uygulamaları ile OXA-24 primerinin hedef DNA'ya bağlanabilmesi için en uygun sıcaklık bulunmaya çalışılmış ancak pozitif kontrol olarak kullanabileceğimiz bir suşa ulaşamadığımız ve izolatlarımız arasında da OXA-24 genine sahip suş saptayamadığımız için sonuç elde edilememiştir. OXA-24 primerinin hedef DNA'ya bağlanabilmesi için en uygun sıcaklık olarak primer prospektüsünde 52°C bildirilen Tm ısı dikkate alınmıştır. Bu verilere göre OXA-24 için amplifikasyon programı şu şekilde uygulanmıştır:

Prehold	92 °C'de	5 dakika
Denaturation	92 °C'de	45 saniye
Annealing	52 °C'de	30 saniye
Extension	72°C'de	50saniye

Final hold                      72°C'de              10 dakika

Optimizasyon çalışmaları sırasında yapılan gradiyent uygulamaları ile OXA-51 primerinin hedef DNA'ya bağlanabilmesi için en uygun sıcaklık 51°C olarak saptanmıştır. Elde edilen verilere göre OXA-51 için amplifikasyon programı şu şekilde uygulanmıştır:

Prehold	92 °C'de	5 dakika
Denaturation	92 °C'de	30 saniye
Annealing	51 °C'de	15 saniye
Extension	72°C'de	45 saniye
Final hold	72°C'de	2 dakika

Optimizasyon çalışmaları sırasında yapılan gradiyent uygulamaları ile OXA-58 primerinin hedef DNA'ya bağlanabilmesi için en uygun sıcaklık 51.5°C olarak saptanmıştır. Elde edilen verilere göre OXA-58 için amplifikasyon programı şu şekilde uygulanmıştır:

Prehold	92 °C'de	6 dakika
Denaturation	92 °C'de	45 saniye
Annealing	51.5 °C'de	30 saniye
Extension	72°C'de	45 saniye
Final hold	72°C'de	8 dakika

Tablo VIII. Real Time PCR için kullanılan bileşenler

Bileşenler	Miktarlar*
CBYR Green qPCR master mix (Fermentas)	12,5 µl
Genomik DNA	1 µl
F primer	0,5 µl (20pM/µl)
R primer	0,5 µl (20pM/µl)
Steril distile su	10,5 µl
Toplam hacim	25 µL

\*Miktarlar tek bir örnek içindir.

### **3.5. İSTATİSTİKSEL ÇALIŞMALAR**

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 17.0 paket programında Fisher'in ki-kare testi ve Pearson korelasyon analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## IV- BULGULAR

### 4.1. KLİNİK İZOLATLARIN ÖZELLİKLERİ

Temmuz 2008 – Haziran 2009 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı kliniklerden gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 121 *A. baumannii* suşu bu çalışmaya dahil edilmiş ve aynı hastadan tekrar izole edilen suşlar çalışmaya alınmamıştır.

Konvansiyonel yöntemlerle gerçekleştirilen ön çalışmaları takiben *Acinetobacter spp.* olarak tanımlanan suşların 51'i (%42,1) MicroScan Neg Combo Panel (Dade Behring, ABD) ve 70'i (57,9) Vitek 2 Gram Negative (BioMerieux, ABD) otomatize sistemi ile *A. baumannii* complex olarak tanımlanmıştır.

Toplam 121 izolatın 82'si (%67,8) erkek hastalardan, 39'u (%32,2) kadın hastalardan ve anestezi reanimasyon başta olmak üzere tüm suşlar yoğun bakım hastalarından izole edilmiştir. *A. baumannii*'nin en yoğun olarak izole edildiği klinikler %24,0 oranı ile anestezi ve %14,9 genel cerrahi iken; nöroloji %13,2, beyin cerrahisi %8,3, göğüs, ortopedi ve dahiliye %7,4, kardiyovasküler cerrahi %6,6 oranıyla sıralanmıştır. İzolatların kliniklere göre dağılımı Tablo-IX'da gösterilmiştir.

İzolatlar en fazla %28,9 oranında trakeal aspirat, %27,3 yara ve %24,8 oranında kan örneklerinden izole edilmiş ve bunları sırasıyla %8,3 balgam, %5,7 kateter, %5,0 idrar örnekleri izlemiştir. İzolatların örneklere göre dağılımı Tablo-X'da gösterilmiştir.

Tablo IX. İzolatların kliniklere göre dağılımı

Klinik	(sayı) n	%
Anestezi	29	24,0
Genel Cerrahi	18	14,9
Nöroloji	16	13,2
Beyin cerrahisi	10	8,3
Göğüs	9	7,4
Ortopedi	9	7,4
Dahiliye	9	7,4
Kardiyovasküler cerrahi	8	6,6
Nefroloji	3	2,5
İnfeksiyon	3	2,5
Diğer*	7	5,8
TOPLAM	121	100

\* Fizik tedavi ve rehabilitasyon, pediatri, dermatoloji, üroloji, kardiyoloji ve plastik cerrahi kliniklerini içermektedir.

Tablo X. İzolatların örneklere göre dağılımı

Örnek türü	Sayı (n)	%
Trakeal aspirat	35	28,9
Yara	33	27,3
Kan	30	24,8
Balgam	10	8,3
Kateter	7	5,7
İdrar	6	5,0
TOPLAM	121	100

## 4.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI

İki farklı otomatize sistemle elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde sistemler arası bir takım farklılıklar gözlenmiştir.

MicroScan Neg Combo Panel (Dade Behring, ABD) ile elde edilen antibiyotik duyarlılık oranları; IPM için %78,4 MEM için %41,2, TOB için %35,3, LEV için %17,6, SCF için %15,7, AK için %13,7, CİP için %9,8, SAM için %7,8, FEP için %3,9 ve üçüncü kuşak sefalosporinler için %2 olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar Tablo-XI'de sunulmuştur.

Tablo XI. İdentifikasyon-antibiyoqram sistemine göre antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotikler	MicroScan (n=51) %			Vitek 2 (n=70) %		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
SAM	7,8	-	92,2	5,7	4,3	90,0
AMC	2,0	2,0	96,1	-	-	100
AK	13,7	11,8	74,5	51,4	5,7	42,9
CN	11,8	3,9	84,3	47,1	10,0	42,9
TOB	35,3	3,9	60,8	55,7	12,9	31,4
CAZ	2,0	-	98,0	2,9	7,1	90,0
CTX	2,0	-	98,0	-	-	100
CRO	2,0	-	98,0	-	-	100
FEP	3,9	5,9	90,2	15,7	2,9	81,4
SCF	15,7	29,4	54,9	15,7	17,1	67,1
CIP	9,8	11,8	78,4	12,9	10,0	77,1
LEV	17,6	19,6	62,7	17,1	14,3	68,6
SXT	21,6	-	78,4	30,0	-	70,0
TE	39,2	17,6	43,1	30,0	8,6	61,4
TZP	2,0	13,7	84,3	2,9	10,0	87,1
IPM	78,4	5,9	15,7	35,7	10,0	54,3
MEM	41,2	7,8	51,0	34,3	8,6	57,1
TIG				97,1	2,9	-
COL				100	-	-

MicroScan Neg Combo Panel antibiyogram paneli TİG ve COL içermediğinden, 51 suşun bu iki ajana ait duyarlılık sonucu bulunmamaktadır.

Vitek 2 AST N-90 (BioMerieux, ABD) paneli ile elde edilen duyarlılık sonuçları değerlendirildiğinde TİG %97,1, IPM %54,3, MEM %57,1, TOB %55,7, AK %51,4, LEV %17,1, SCF %15,7, CİP %12,9, SAM %5,7 oranında duyarlı iken sefalosporin grubu içerisinde %15,7 oranıyla FEP'in en duyarlı antibiyotik olduğu tespit edilmiştir. Suşların tümünün COL duyarlı olduğu gözlenmiştir. İzolatların kullanılan identifikasyon ve antibiyogram sistemine göre antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo-XI'de sunulmuştur.

Elde edilen 121 *A. baumannii* izolatının toplam olarak antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde COL ve TİG'den sonra, en etkili antibiyotiklerin %62,0 oranıyla IPM ve %47,1 oranıyla TOB olduğu gözlenmiş ve MEM için %43,0, AK için %35,5, TE için %33,9, CN için %32,2, SXT için %26,4, LEV için %17,4, SCF için %15,7, CİP için %11,6, FEP için %10,7, SAM için %6,6, CAZ ve TZP için %2,5, CTX ve CRO için %0,8 şeklinde duyarlılık oranları tespit edilmiştir.

TİG ve COL Microscan otomatize sisteminin antibiyogram panelinde bulunmadığı için antibiyotik duyarlılığı bu sistemle gerçekleştirilen 51 izolatta TİG ve COL duyarlılığı değerlendirilememiştir. Sadece Vitek 2 sistemi ile izole edilen ve antibiyotik duyarlılık testi gerçekleştirilen 70 suş için COL ve TİG duyarlılığı değerlendirilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo-XII'de sunulmuştur.



Tablo XII. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarına göre dağılımı (n=121)

Antibiyotikler	Duyarlı		Orta duyarlı		Dirençli	
	n	%	n	%	n	%
IPM	75	62,0	17	14,0	29	24,0
MEM	52	43,0	20	16,5	49	40,5
AK	43	35,5	10	8,3	68	56,2
CN	39	32,2	9	7,4	73	60,3
TOB	57	47,1	11	9,1	53	43,8
CAZ	3	2,5	5	4,1	113	93,4
CTX	1	0,8	-	-	120	99,2
CRO	1	0,8	-	-	120	99,2
FEP	13	10,7	5	4,1	103	85,1
SCF	19	15,7	27	22,3	75	62,0
SAM	8	6,6	3	2,5	110	90,9
TZP	3	2,5	14	11,6	104	86,0
CİP	14	11,6	13	10,7	94	77,7
LEV	21	17,4	20	16,5	80	66,1
SXT	32	26,4	-	-	89	73,6
TE	41	33,9	15	12,4	65	53,7
TİG * (n:70)	68	97,1	2	2,9	-	-
COL *(n:70)	70	100	-	-	-	-

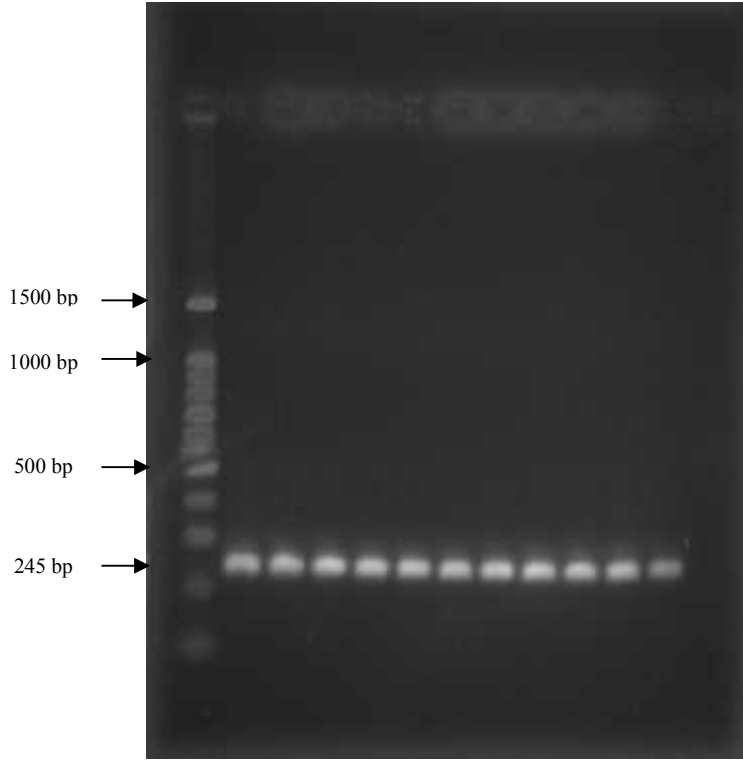
\* Sadece Vitek 2 ile elde edilen veriler sunulmuştur.

### 4.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI

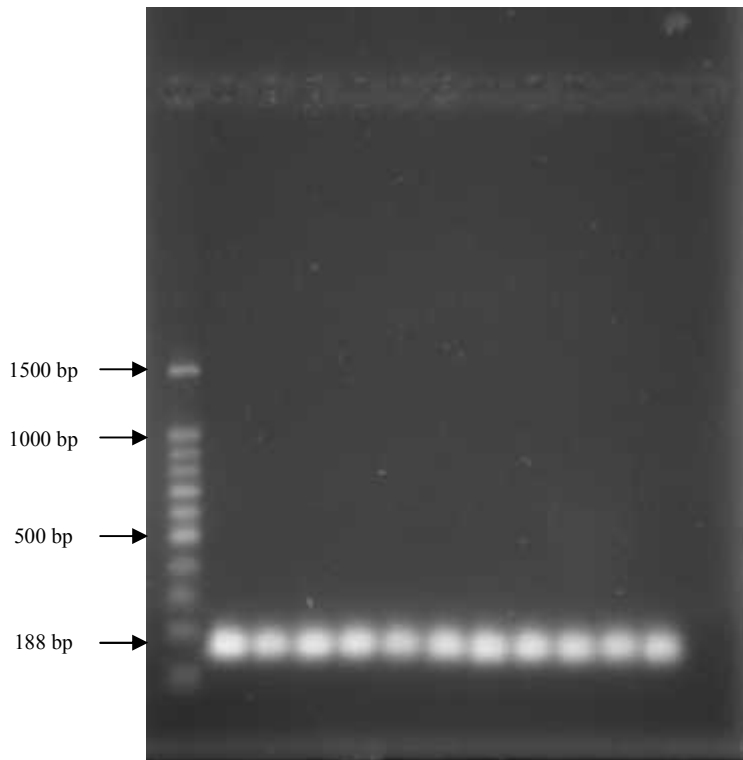
Çalışmamızda kültüre edilen bakteriyel örnekler için sıkça tercih edilen kaynatma yöntemiyle nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'ların kalite ve saflığı spektrofotometrik olarak değerlendirildiğinde A260 /A280 oranının 1,6'dan küçük olduğu görülmüştür. İlave edilen proteazlara rağmen yeterli kalite düzeyi yakalanamamıştır. Bunun üzerine elde edilen nükleik asitlerin PCR çalışmaları için yeterince saf olmadığı, protein kontaminasyonunun sözkonusu olabileceği düşünülmüştür.

Elde edilen bu olumsuz sonuç farklı bir yöntem kullanmak suretiyle nükleik asit izolasyonu aşamasının tekrarlanması gereğini ortaya koymuştur. Çözüm olarak ticari izolasyon kiti kullanımı ile DNA izolasyonu yapılması planlanmıştır. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucu elde ettiğimiz nükleik asitlerin spektrofotometrik ölçümünde A260/A280 oranı 1,6-2,0 aralığında bulunmuştur. Ticari kit kullanılarak elde edilen DNA'lar saf ve kaliteli olarak değerlendirilmiş ve PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

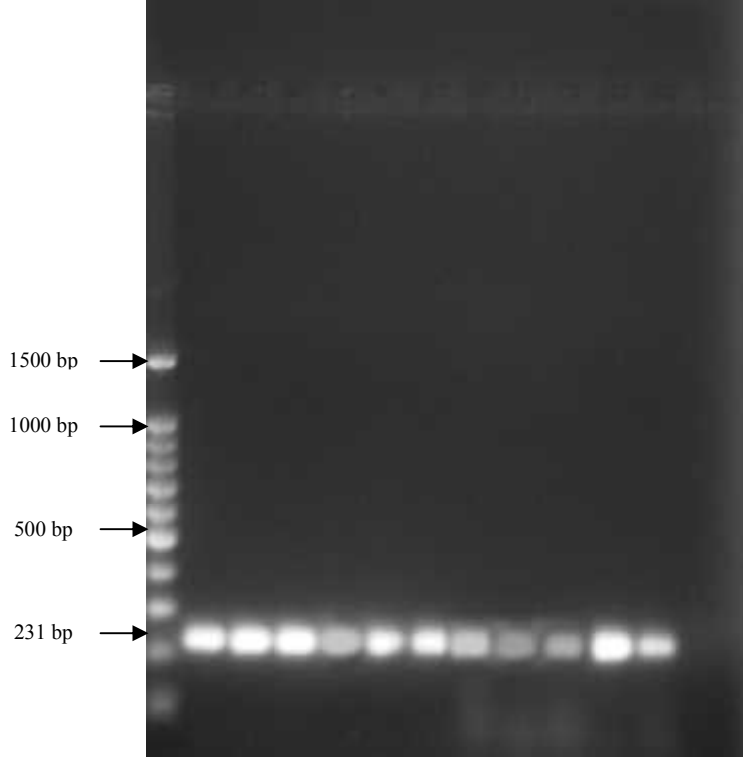
Optimizasyon çalışmaları konvansiyonel PCR aracılığıyla OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 için gerçekleştirilmiştir. Gen bölgeleri için en uygun bağlanma sıcaklığı gradiyent uygulanmak suretiyle optimize edilmiş ve OXA-23, OXA-51, OXA-58 için sırasıyla 51°C, 51°C ve 51,5°C olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanabileceğimiz izolat bulunmaması nedeniyle OXA-24 geni için yapılan gradiyent çalışmalarında sonuç elde edilememiş, bu nedenle OXA-24 için primer prospektüsünde yer alan Tm sıcaklığı (52°C) optimal ısı olarak dikkate alınmıştır. Uygun bağlanma sıcaklığı bulunduğu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezde yürütülerek görüntülenmiştir. OXA-23 (Resim 1), OXA-51 (Resim 2) ve OXA-58'e (Resim 3) ait agaroz jel elektroforez görüntüleri elde edilmiştir.



Şekil 1. 245 bp büyüklüğündeki OXA-23 Agaroz jel görüntüsü (Marker:1500 bp)



Şekil 2. 188 bp büyüklüğündeki OXA-51 Agaroz jel görüntüsü (Marker:1500 bp)

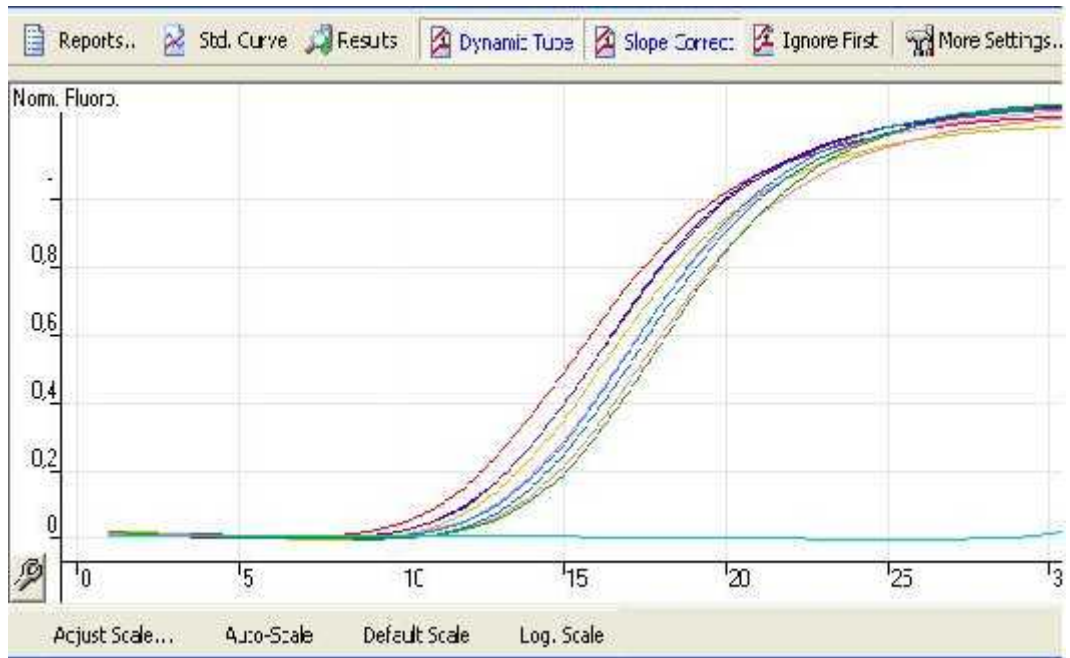


Şekil 3. 231 bp büyüklüğündeki OXA-58 Agaroz jel görüntüsü (Marker:1500 bp)

Real time PCR uygulanan 121 *A. baumannii* suşunda OXA-24 geni saptanmazken, suşların tümünde OXA-51 geninin varlığı gösterilmiştir (Resim-4) Suşların 23'ünde OXA-58 (Resim-5), 21'inde OXA-23 (Resim-6) geni saptanmış ve 12 suşun aynı anda hem OXA-23 hem de OXA-58 genine sahip olduğu görülmüştür. İzolatların direnç genlerinin dağılımı Tablo-XIII'de gösterilmiştir.

Tablo XIII. İzolatların direnç genlerinin dağılımı

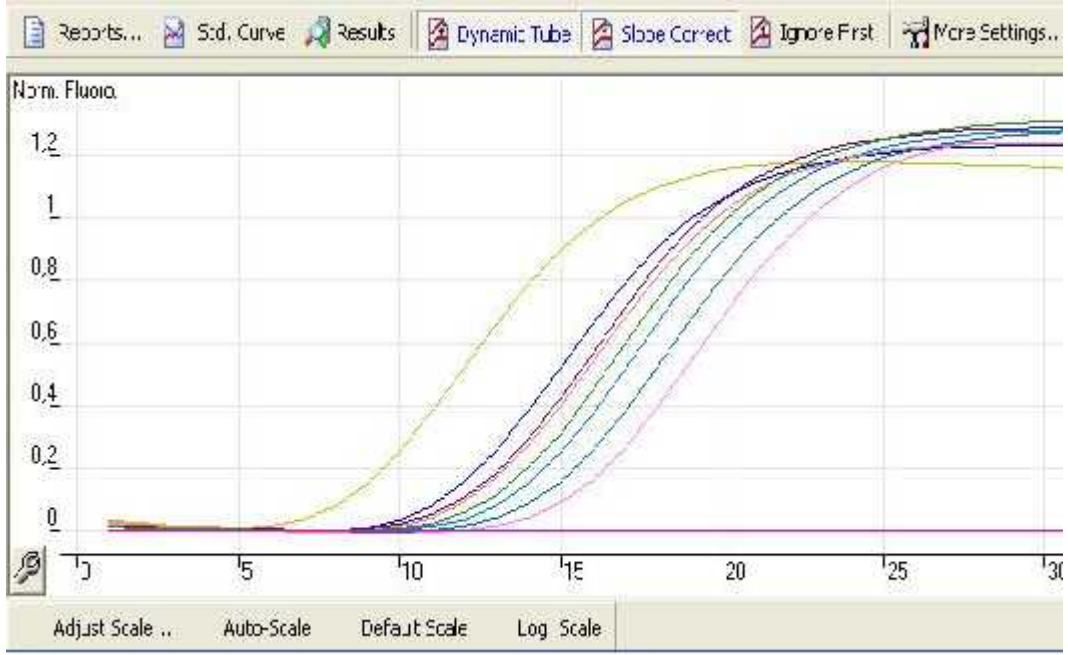
Direnç genleri	n (sayı)	%
OXA-51	121	100
OXA-24	-	-
OXA-23	21	17,4
OXA-58	23	19,0
OXA-23+OXA-58	12	10,1



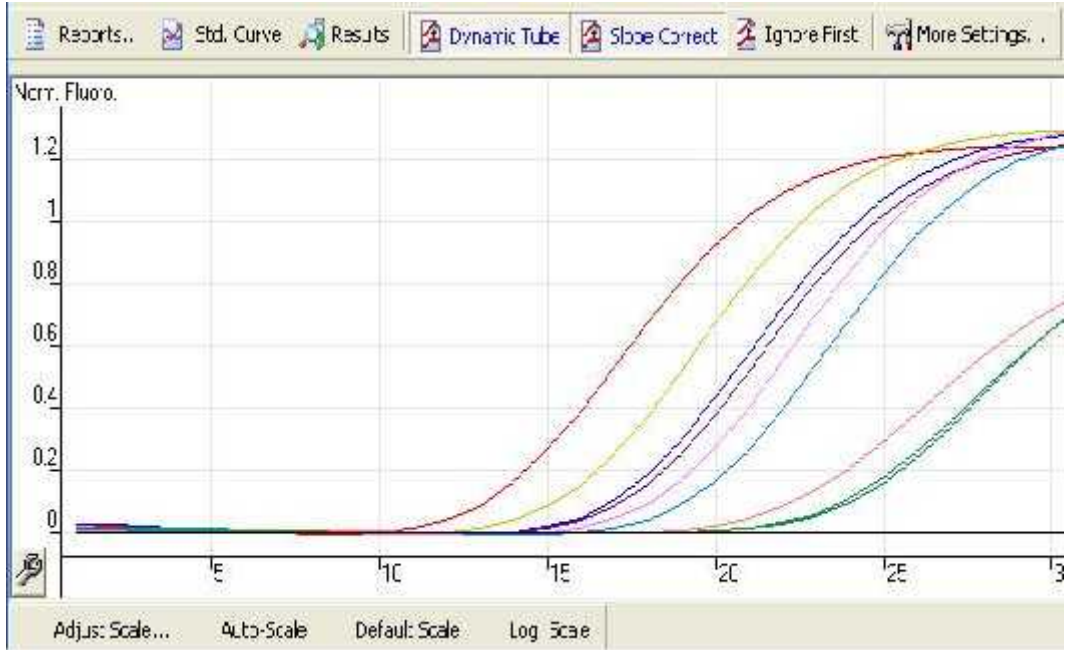
Şekil 4. OXA-51 geninin Real Time PCR görüntüsü

Tür spesifik OXA-51 enziminin tüm suşlarda varlığı görülmüştür.

Negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır.



Şekil 5. OXA-23 geninin Real Time PCR sonuçları



Şekil 6. OXA-58 geninin Real Time PCR görüntüleri

Karbapenem direnci ile direnç genleri arasındaki korelasyon incelendiğinde sadece MEM direnci ve OXA-23 geni korelasyonunda “r” değeri 0,191 bulunmuş; MEM direnci ve OXA-23 gen varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Vitek sonuçlarının çalışmamız kapsamında irdelenen direnç genleri ile daha yüksek korelasyon gösterdiği, MicroScan sonuçlarıyla belirlenen MEM direnci ve OXA-23 geni arasındaki korelasyon düzeyinin düşük ve istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlenmiştir ( $r < 0,200$ )

Total olarak incelendiğinde 121 suşa ait IPM ve MEM direnci sonuçlarının direnç genleri ile anlamlı düzeyde korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar sırasıyla IPM-OXA-23 için 0,561 ( $p=0,000$ ), MEM-OXA-23 için 0,402 ( $p=0,001$ ), IPM-OXA-58 için 0,393 ( $p=0,003$ ), MEM-OXA-58 için 0,425 ( $p=0,001$ ) şeklinde hesaplanmıştır. Karbapenem direnci ve direnç genlerinin korelasyonu Tablo-XIV’de sunulmuştur.

Tablo XIV. Karbapenem direnci ve direnç genlerinin korelasyonu

	MicroScan (n=50)		Vitek 2 (n=71)		Toplam (n=121)	
	r**	p***	r	p	R	p
IPM-MEM	0,420	0,002	0,960	0,000	0,709	0,000
IPM-OXA23	0,444	0,001	0,534	0,000	0,561	0,000
IPM-OXA58	0,415	0,002	0,367	0,005	0,393	0,003
MEM-OXA23	0,191*	0,180*	0,507	0,000	0,402	0,001
MEM-OXA58	0,377	0,004	0,452	0,001	0,425	0,001

\*MicroScan için hesaplanan MEM-OXA-23 korelasyonu anlamsız bulunmuştur.

\*\* $r \geq 0,200$  anlamlı kabul edilmiştir.

\*\*\* $p \leq 0,005$  anlamlı kabul edilmiştir.

## V- TARTIŞMA

Düşük virülansa sahip olduğu bilinen *Acinetobacter* cinsi bakteriler içerisinde, insan infeksiyonlarda en sık *A. baumannii* türü karşımıza çıkmaktadır. Özellikle düşükün hastalarda olmak üzere oldukça ciddi infeksiyonlara neden olan bu fırsatçı patojenin son yıllarda klinik önemi giderek artmıştır. Günümüzde *Acinetobacter* cinsi bakterilerin infeksiyon etkeni olan hastane patojenleri arasında önde gelen ve sorunlu mikroorganizmalar olarak ciddi bir yere sahip olduğu gözlenmektedir.

İnsan derisinin doğal konakçısı olan *Acinetobacter* türlerinin, deri dışında sağlıklı insanların ağız florası, üst solunum yolları, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde de bulunduğu gösterilmiştir (6,52). *Acinetobacter* türleri hastane personelinin derisinde sürekli taşınan en yaygın Gram negatif bakterilerdir. Rezervuar insanlar, sağlık personeli, cansız hastane ekipmanları ve materyalleri hastalar arasında geçiş için elverişli ortam oluşturmaktadır (6).

Bakterinin çevre koşullarına uyum sağlama yeteneği, yaygın antibiyotik kullanımı, invaziv girişim olanaklarının artması gibi nedenler giderek artan oranda izole edilmelerine ve nozokomiyal infeksiyonlara yol açmalarına neden olmaktadır. *Acinetobacter* infeksiyonları özellikle yoğun bakımlarda olmak üzere ciddi salgınlara yol açabilmekte hatta hastaneler arasında yayılım söz konusu olabilmektedir. Ülkemizde yoğun bakım ünitelerini içeren çok merkezli bir çalışmada *Pseudomonas* türlerinin ardından en sık görülen ikinci mikroorganizma olarak %21,9 oranında bildirilirken (53) bazı çalışmalarda yoğun bakım ünitesi infeksiyonlarında saptanan en sık etken olduğu bildirilmiştir (58,60).

Son yıllarda hastane ortamında yeni, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanımı, hem *Acinetobacter* türleri ile gelişen hastane infeksiyonları oranını arttırmış hem de bu bakterilerde birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmesine neden olmuştur. Dirençli suşlardaki artış, tedavide kullanılacak antibiyotiklerin etkisiz kalmasına yol açarak mikroorganizmanın kontrol edilmesini ve gelişen infeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir.



Antibiyotik kullanma alışkanlıkları ve çevresel faktörlerin katkısı ile antibiyotik direnci hastaneler, şehirler ve ülkeler arasında farklılık göstermektedir (58).

Özdemir ve ark (157) Konya’da 217 suşla yaptıkları çalışmalarında izolatların çoğunun anestezi ve reanimasyon kliniğinden elde edildiğini ve bunu cerrahi kliniklerin izlediğini belirtmişlerdir. Balcı ve ark (158) 79 *Acinetobacter* suşunu inceledikleri çalışmalarında %25 oranıyla anestezi ve reanimasyon yoğun bakım birimi, %14 oranıyla nörolojinin izolatların en sık elde edildiği klinikler olduğunu bildirmiştir. Eskişehir’de Erben ve ark (159) tarafından yapılan ve 100 suşun dahil edildiği çalışmada *Acinetobacter* kökenlerinin en sık görüldüğü servisler arasında anestezi ve reanimasyon yoğun bakım %38, genel cerrahi %14, ortopedi ve travmatoloji %12 yer almıştır. Çetin ve ark (160) Isparta’da gerçekleştirdikleri 129 *Acinetobacter* izolatını irdeledikleri çalışmada suşların çoğunun yoğun bakım birimlerinden izole edildiğini ve bunu cerrahi kliniklerin izlediğini ifade etmektedir.

Benzer şekilde çalışmamızda *A. baumannii*’nin en sık izole edildiği klinikler %24,0 oranı ile anestezi ve %14,9 genel cerrahi iken; nöroloji %13,2, beyin cerrahisi %8,3, göğüs, ortopedi ve dahiliye %7,4, kardiyovasküler cerrahi %6,6, nefroloji ve enfeksiyon %2,5, Tablo IX’da diğer olarak ifade edilen fizik tedavi, pediatri, dermatoloji, üroloji, kardiyoloji ve plastik cerrahi klinikleri ise %5,8 olarak saptanmıştır. *Acinetobacter* izolatlarının, anestezi ve reanimasyon yoğun bakım ünitesi ve genel cerrahi başta olmak üzere diğer cerrahi kliniklerde daha sık enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmasının nedeni; bu kliniklerde kritik hastaların bulunması ve bu hastalara uygulanan mekanik ventilasyon, trakeostomi, entübasyon, damar içi kateterizasyon, üriner kateterizasyon gibi invaziv girişimlerin daha sık uygulanıyor olması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca bu veriler hastanemizde *A. baumannii* enfeksiyonlarının sadece yoğun bakım ünitelerinin problemi olmadığını, zamanla diğer servislerde de sorun haline gelebileceği konusunu gündeme getirmektedir. Bu durum dikkate alınmalı ve aralıklarla takip edilmelidir.

*Acinetobacter* türleri ile en sık infekte olan bölgeler solunum yolu, üriner sistem ve yaralar olup sonuçta septisemiye dönüşmektedir (7). Neden olduğu infeksiyonların içinde solunum yolu infeksiyonları en sık karşılaşılan türdür (161). *Acinetobacter* türleri hastane kaynaklı pnömonilerin *P. aeruginosa*'dan sonra ikinci en sık etken ve yumuşak doku infeksiyonlarının en sık nedeni olarak değerlendirilmektedir (162).

*Acinetobacter* suşlarının izole edildiği örneklerin dağılımı çeşitli çalışmalarda farklılıklar göstermektedir. *Acinetobacter* suşlarının izole edildikleri klinik örneklerin dağılım oranları ve sıklık sırasını Balcı ve ark (158) solunum sistemi örnekleri (%43), yara (%24), idrar (%14); Kuşcu ve ark (163) derin trakeal aspirat (%40,5), yara (%22), idrar (%20), kan (%13); Yavuz ve ark (164) trakeal aspirat (%27), idrar (%21), balgam (%16), yara (%13); Özdemir ve ark (157) derin trakeal aspirat (217/90), kan (217/58), yara (217/53) olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bu verilerle uyumlu olarak izolatlar en fazla %28,9 oranında trakeal aspirat, %27,3 yara ve % 24,8 oranında kan örneklerinden izole edilmiş ve bunları sırasıyla %8,3 oranıyla balgam, %5,7 kateter, %5,0 idrar örnekleri izlemiştir. Sağlıklı bireylerin cilt florasında bulunabilen *Acinetobacter* cinsi bakterilerin özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda cilt, solunum ve sindirim sisteminde hızla kolonize olduğu bilinmektedir (22). Kolonizasyonu takiben infeksiyonun bu bölgelerde daha sık görülüyor olması beklenen sonuçtur.

*Acinetobacter* türleri birden fazla mekanizma ile antibiyotik direnci geliştirebilirler ve bunu antibiyotik varlığında daha kolay ve çabuk yapabilmektedirler. Antibiyotik kullanma alışkanlıkları, epidemiyolojik koşullar ve çevresel faktörlerin katkısı ile antibiyotik direnci ülkeler, şehirler, hastaneler ve hatta hastanelerin bölümleri arasında farklılık göstermektedir (165).

*Acinetobacter* suşlarında beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç; beta-laktamaz üretimi, aktif atım pompası veya porin değişimi yoluyla beta-laktam antibiyotiğin dış membrandan girişinin azalması ve penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik sonucu meydana gelmektedir. Beta laktam ajanlardan

karbapenemler çok geniş etki spektrumları, antimikrobiyal aktivite, iyi bir klinik etkinlik ve olumlu güvenlik profili ile bir çok ciddi infeksiyonun ampirik tedavisinde ilk tercih olarak değerlendirilmektedir (166). Nozokomiyal Gram negatif çomaklarda karbapenemler in-vitro olarak en etkin antibiyotik sınıfı olma özelliklerini korumalarına rağmen, son yıllarda gittikçe artan oranlarda karbapenem direnci bildirilmeye başlanmıştır. Ülkemizde yapılan çok merkezli çalışma sonuçlarına göre *Acinetobacter* türlerinde karbapenemlere direnç oranları % 40'a yaklaşmıştır (167). Altı yıllık süre içinde 1532 *Acinetobacter* izolatında İspanya' da yapılan direnç araştırmasında, yıllar içerisinde birçok antibiyotiğe karşı en az iki katı direnç geliştiği, imipenem direncinin ise %1,3'den %80'e ulaştığını bildirilmiştir (168).

MYSTIC olarak bilinen sürveyans çalışmasının 2006 yılı Türkiye sonuçlarına göre karbapenemlerin *Acinetobacter* türleri üzerine en etkili antibiyotikler olduğu bildirilirken, Avrupa genelinde yapılan 2007 MYSTIC çalışmasında ise *Acinetobacter* türlerindeki direnç oranlarında, 2006 yılının verilerine göre azalma olduğu bildirilmiş ve bunun sebebi olarak, 2007 yılındaki bu çalışmaya, Türkiye ve Yunanistan'ın katılmaması gösterilmiştir (163). Çetin ve ark.'nın (160) verilerini yansıtan 129 *A. baumannii* izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada IPM'e %43,3, MEM'e %49,6 oranında direnç saptamışlardır. Zer ve ark (169) çalıştıkları suşlarda IPM direncini %38 olarak bildirirken, Balcı ve ark (158) IPM direncinin %49, MEM direncinin %63 oranında olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda IPM direnci %38, MEM direnci %57 olarak saptanmıştır. *A. baumannii* suşlarında MEM direncinin IPM direncine göre daha fazla olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiş olup bu durumun farklı biyotiplerin farklı duyarlılıklara sahip olması ile açıklanabileceği bildirilmiştir (170).

Çalışmamızda yüksek karbapenem direnci tespit etmemize rağmen beta laktam grubu antibiyotikler arasında en yüksek duyarlılığa sahip olan karbapenemlerdir. Ancak gelişebilecek direnç düşünülerek karbapenemler *A. baumannii* infeksiyonlarında ampirik antibiyotik kullanımlarında ilk seçenek olarak düşünülmemeli, YBÜ'nde yatan ve riskli hastalarda tercih edilmelidir.

Bunun dışındaki durumlarda, antibiyogram sonuçlarına göre tedavi uygulanmalıdır.

Ülkemizde doksanlı yıllardan günümüze kadar geçen süre içerisinde yapılan araştırmalarda beta laktam antibiyotiklerin diğer üyesi olan sefalosporinlere direnç oranının gittikçe arttığı görülmektedir (158). Ülkemizde izole edilen *Acinetobacter* türlerinin %80-95 kadarı geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli bulunmuştur (171) Yavuz ve ark (164) 2006 yılında *Acinetobacter* suşlarının CAZ, CRO ve FEP direnç oranlarının sırasıyla %82, %88 ve %61 olduğunu saptamıştır. Balcı ve ark'nın (158) 2010 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında CAZ, CRO, CTX, FEP için direnç oranları sırasıyla, %99, %97, %96 ve %95 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda, FEP için %89,3, CAZ için %97,5, CRO ve CTX için %99,2 oranlarında saptanan direnç ülkemizde yapılan diğer çalışmaların bir kısmıyla uyumlu bulunurken bazılarında yüksek olduğu görülmüştür. Hastanemizden izole edilen suşlarda üçüncü kuşak sefalosporinlere bu kadar yüksek düzeyde direnç olması, söz konusu ilaçların yöremizde ve hastanemizde çok yaygın kullanımlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

*A. baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde sulbaktam ve tazobaktamın beta laktam grubundan bir antibiyotikle kombine edilmesinin etkinliği arttıracığı düşünülmektedir. SAM, SCF ve TZP klinik kullanımda olan sulbaktam ve tazobaktam içeren kombinasyonlardır. Higgins ve ark (172) 115 *A. baumannii* suşu ile yaptıkları çalışmada *A. baumannii* infeksiyonlarında sulbaktamın tazobaktamdan daha etkili olduğunu göstermiştir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *Acinetobacter* türlerinin SAM'a %42-95, SCF'a %60-88 ve TZP'a %84-98 oranlarında dirence sahip olduğu gösterilmiştir (157,158,160, 163,164,173). Çalışmamızda SCF, SAM ve TZP için direnç oranları sırasıyla %84,3, %93,4 ve %97,5 olarak saptanmış ve diğer çalışmalarla uyumlu olarak beta laktam+beta laktamaz inhibitörü içeren antimikrobiyal ajanların içinde SCF'in en duyarlı kombinasyon olduğu görülmüştür. Yüksek oranda saptanan

direncin hastanemizde ampirik tedavide genellikle bu grup antibiyotiklerin tercih ediliyor olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

*Acinetobacter* türlerinde aminoglikozidlere direnç asetiltransferaz, fosfotransferaz, adeniltransferaz gibi aminoglikozid modifiye edici enzimlerle hedef ribozomal proteinlerde bozulma, aminoglikozidlerin bakteri içerisine girişinin engellenmesi ve efflux pompası yolu ile gelişmektedir. 2004 yılında yayınlanan SENTRY Latin Amerika çalışmasında Tognim ve ark (174) AK, CN ve TOB için direnç oranlarını sırasıyla % 66, % 69,1, % 58,5 olarak tespit etmiştir. Ülkemizde Gülhan ve ark (175) çalışmalarında AK ve CN için direnç oranları sırasıyla %62 ve %86 olarak, Özdemir ve ark (157) ise AK için %76 ve CN için %82 direnç bildirmiştir. Zer ve ark (169) ise çalışmalarına her üç aminoglikozidi dahil etmiş ve AK % 45, CN %37, TOB %13 dirençli bulunmuştur. Çalışmamızda üç farklı aminoglikozid ajana karşı saptadığımız direnç oranları CN için %67,8, AK için %64,5 ve TOB için %52,9 olarak saptanmıştır. Diğer çalışmalarla benzer şekilde test edilen üç aminoglikozid arasında TOB'in *A. baumannii* infeksiyonlarında en etkili ajan olduğu görülmüştür.

Florokinolonlara direnç DNA giraz ve topoizomeraz 4 enzimi etkileri ile, kromozomal ilaç giriş ve ilaç pompa sistemlerinde mutasyon sonucu gelişmektedir. Florokinolonlar ülkemizde kullanıma girdikten sonra fazla miktarda kullanılmaya başlanan antibiyotiklerdir. Yapılan çalışmalarda *A. baumannii* suşlarının bu antibiyotiklere oldukça yüksek oranda dirence sahip olduğu bildirilmektedir. İspanya'da yapılan bir çalışmada 1532 *Acinetobacter* izolatının siprofloksasin direncinin yıllar içerisinde %54,4'den %90,4'e yükseldiği saptanmıştır (168). Ülkemizde de farklı yıllarda kinolon direncini bildiren çalışmalarda CİP direnci %75-86 aralığında bildirilirken (157,169,175); CİP ve LEV direnci Balcı ve ark (158) tarafından sırasıyla %82, %76; Kuşcu ve ark (163) tarafından %96,7, %90,1 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda CİP direnci %88,4 ve LEV direnci %82,6 oranında bulunmuştur. Sonuçlarımız kinolon direncinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, hastanemizde *A.*

*baumannii* infeksiyonu düşünölen hastalarda florokinolonların ampirik tedavide uygun bir seçim olamayacağını söyleyebiliriz.

Tetrasiklin (TE) direnci ilaç efflux pompası veya ribozomal koruyucu sistemle ortaya çıkmaktadır. SENTRY çalışmasında 2001 yılı verilerine göre *Acinetobacter* türlerinde tetrasiklin direnci %66,3 olarak bulunmuştur (174). Ülkemizde 2006 yılında yapılan bir çalışmada TE direnci %49,6 olarak bildirilirken (160), 2010 yılında gerçekleştirilen başka bir çalışmada bu oranın %92 olarak (158) bildirildiği görölmüştür. Çalışmamızda tetrasiklin direnci %66,1 olarak bulunmuş ve sonuçlarımızın SENTRY verilerine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir.

SXT direnci en sık dihidrofolat redüktaz mutasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Bu direncin İspanya'da yıllar içerisinde %41,1'den % 88,9'a ulaştığı bildirilirken aynı çalışmada Türkiye için bu oran %56,2 olarak bildirilmiştir (86). Ülkemizde son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda SXT için direnç oranları %76-81 aralığında bildirilmiştir (158,163,169,175). Çalışmamızda saptadığımız sonuçların diğer çalışmalarla uyum gösterdiği ancak %74,6 direnç oranı ile SXT'un *A. baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde bir seçenek olmaktan uzak olduğu görölmektedir.

*A. baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde sık kullanılan karbapenem ve sulbaktamda görölen ve artış gösteren direnç oranları hekimleri, yeni tedavi seçeneklerinin arayışına sevk etmektedir. Bu arayış doğrultusunda dış membran üzerine etkili eski bir ilaç olan COL tartışılmaya başlamıştır. Son yıllarda sadece COL'e duyarlı bulunan etkenler ile infeksiyonlar ortaya çıkmış ve COL kullanımı ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir (176). Uzun yıllardır kullanım dışı olan COL çaresizlik dolayısı ile sadece COL duyarlı izolatların ortaya çıkması ile tekrar gündeme gelmiştir (177). Ancak bu ilaçla klinik deneyimin sınırlı olması ve ciddi yan etkilerinin bulunması kullanımında sorunlar yaratmaktadır (165). Daha önemlisi COL için heterorezistan suşlar bildirilmiş ve heterorezistan suşların tespitinin zorluğuna vurgu yapılmıştır (78) Dobrewski ve ark (178) Bulgaristan'da

*Acinetobacter* suşlarının genotipik varyantlarını ve antibiyotik duyarlılıklarını araştırmak için yaptıkları çalışmada travma nedeniyle cerrahi yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole ettikleri 18 çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter* suşunun COL duyarlı olduğunu saptamıştır. Ülkemizde bu ilacın piyasada bulunmaması nedeniyle duyarlılığı konusunda kısıtlı veri mevcuttur. Yapılan literatür taramalarında COL ile ilgili sadece 2 farklı çalışmaya rastlanmış ve bu çalışmalarda tüm suşların COL'e duyarlı olduğu, direnç saptanmadığı bildirilmiştir (157,169). Çalışmamızda da Vitek 2 yardımıyla gerçekleştirilen antibiyogram çalışmalarında en etkili antibiyotik COL olarak bulunmuş olup çalışılan izolatlarda dirence rastlanmamıştır.

Glisilsiklin derivativesi olan TİG, çoğul dirençli *A. baumannii* kökenlerine in vitro etkili bir antibiyotiktir. Yapısal olarak tetrasiklinlere benzerlik göstermesine karşın TİG, TE'e karşı bakterilerin geliştirdiği direnç mekanizmalarından etkilenmezler. TE'e özgü pompa mekanizması TİG için zayıf substrat özelliği göstermektedir. Ayrıca bakteri ribozomlarında TE bağlanmasını engelleyen proteininin neden olduğu değişikliklerden TİG etkilenmemekte ve ribozomlara bağlanabilmeyi sürdürebilmektedir (179). TİG ile yapılan çok sayıda çalışmada farklı sonuçlar bildirilmektedir. Ibanez ve ark (180) IPM'e dirençli *A. baumannii* suşlarından %92'sini TİG duyarlı olarak bildirmişken, Venezia ve ark (181) klinik örneklerden elde edilmiş ÇİD'ne sahip 82 *A. baumannii* suşlarında yaptıkları benzer bir çalışmada suşların %22'sini TİG duyarlı olarak bulmuşlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda Zer ve ark (169) YBÜ'den izole edilen 62 *A. baumannii* suşunun TİG'e %80,64'ünün duyarlı, %12,90'ının orta derecede duyarlı, %6,45' nin dirençli olduğunu göstermiştir. Kuşcu ve ark (163) TİG duyarlılığını E-test yöntemiyle araştırdıkları çalışmalarında 121 izolattan 96'sını(%79) TİG'e duyarlı, 19'unu (%16) orta duyarlı, 6'sını (%5) ise dirençli bulmuştur. Çalışmamızda Vitek 2 otomatize sistemi ile tanımlanan ve antibiyotik duyarlılıkları değerlendirilen 70 suşun 68'i (%97,1) TİG duyarlı, 2'si (%2,9) orta duyarlı olarak saptanırken dirençli suşa rastlanmamıştır. Ülkemizde TİG'in kullanım onayı sadece intraabdominal ve cerrahi sonrası gelişen yumuşak doku infeksiyonlarında olduğu için ilaç her infeksiyonda kullanılmamaktadır. Dünyada

ve ülkemizde az da olsa TİG'e dirençli *A. baumannii* suşları bildirilmektedir. TİG direncinde zamanla artan bir direnç olabileceği endişesi taşımaktayız. İleride daha yüksek direnç oranlarının gelişmemesi için uygun endikasyonlarda kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, TİG ve COL MicroScan otomatize sisteminin antibiyogram panelinde bulunmadığı için antibiyotik duyarlılığı bu sistemle gerçekleştirilen 51 izolatta duyarlılık değerlendirilememiştir. Sadece Vitek 2 sistemi ile izole edilen ve antibiyotik duyarlılık testi gerçekleştirilen 70 suş için COL ve TİG duyarlılığı değerlendirilmiştir.

*Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci birden fazla mekanizmayla ortaya çıkabilse de direnç en sık beta laktamaz enzimleri yoluyla gerçekleşmektedir. Bu araştırmada IPM direnci %38, MEM direnci %57 olarak saptanmıştır. Karbapenem dirençli *Acinetobacter* türlerinin pek çoğunun karbapenem hidrolize edebilen OXA türü beta laktamazlara sahip olduğu gözlenmiştir (116). OXA türü beta laktamaz üreten *Acinetobacter* suşlarının çoğunun sadece karbapenemlere değil, COL ve TİG dışındaki diğer tüm antibiyotiklere dirençli olduğu bildirilmiştir (4). Çalışmamızda test edilen her iki karbapeneme de dirençli suşların çokluğunun, hastane ortamında yaygın karbapenem kullanımına ve suşlarda karbapenemaz üretimine bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu düşünceden yola çıkılarak karbapenemaz aktivitesi gösteren enzimlerden biri olan OXA türü beta laktamaz enzimlerinin varlığı araştırılmıştır.

Kolombiya'da 7 farklı hastaneden toplanan *A. baumannii* suşlarından seçilen 66 karbapenem dirençli izolata dahil edildiği çalışmada suşların tümünde OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 bakılmıştır. İzolatların tamamında OXA-51, 65'inde OXA-23 geni saptanırken OXA-24 ve OXA-58 genine rastlanmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada OXA-23 geni saptanamayan tek izolatta *ISAbal* bakılmış ve *bla<sub>OXA51</sub>-ISAbal* birlikteliğine rastlanmadığından bu suşdaki karbapenem direncinden diğer mekanizmaların sorumlu olduğu düşünülmüştür. Ayrıca bu çalışmanın Güney Amerika'daki *A. baumannii*



suşlarında karbapenem direncinde OXA-23 enziminin en sık rastlanan mekanizma olduğunu sunan ilk rapor olduğu bildirilmiştir (182).

Güney Kore'deki çeşitli hastanelerden toplanan 144 *Acinetobacter* spp. izolatında karbapenem direncinin nedeninin saptamak amacıyla MBL ve OXA türü enzimlerin araştırıldığı çalışmada suşların %19,4'ünün MBL enzimine, %74,3'ünün OXA enzimlerinden birine sahip olduğu bildirilmiştir. OXA geni eksprese eden suşlardan 47'sinde OXA-23 enzimi saptanmıştır. Çalışmada Güney Kore'deki *Acinetobacter* türlerinde IPM direncindeki artıştan çoğunlukla OXA türü karbapenemazların sorumlu olduğu bildirilmiştir (183).

Feizabadi ve ark (184) İran'da Tahran hastanesinde yara yeri, trakeal örnekler ve kan örneğine ait, çoğunluğu YBÜ'de yatan hastalar olmak üzere 7 farklı servisten izole edilen 128 *Acinetobacter* türünü dahil ettikleri çalışmalarında, 108 izolat *A. baumannii* olarak tanımlanmıştır. *A. baumannii* izolatlarının hepsinde türe spesifik OXA-51 geni saptanırken *A. baumannii* dışındaki diğer 20 *Acinetobacter* türünün OXA-51 genine sahip olmadığı bildirilmiştir. OXA-51 haricindeki diğer OXA enzimlerine sahip 34 (%26,5) suş saptanmıştır. İki farklı OXA enzim geni taşıyan 62 şusun 32'sinde (%25)  $bla_{OXA51}+bla_{OXA23}$ , 23'ünde (%17,9)  $bla_{OXA51}+bla_{OXA24}$ , 5'inde (%9)  $bla_{OXA51}+bla_{OXA58}$  ve 2'sinde (%1,5)  $bla_{OXA24}+bla_{OXA23}$  gözlenmiştir. İki suşun 4 OXA enzimine de sahip olduğu, üç farklı enzim geni taşıyan suşların dağılımının 6 suşta  $bla_{OXA51}+bla_{OXA23}+bla_{OXA24}$ , 5 suşta  $bla_{OXA51}+bla_{OXA23}+bla_{OXA58}$ , 1 suşta  $bla_{OXA51}+bla_{OXA23}+bla_{OXA24}$  şeklinde olduğu görülmüştür. Karbapenemler *A. baumannii* infeksiyonlarında tedavide ilk seçilecek antibiyotiklerdir. Bununla birlikte son yıllarda bu antibiyotiklere direnç gittikçe artmıştır. Dirençle ilgili temel enzimler OXA karbapenemazlardır. OXA tip karbapenemazları kodlayan genlerin yayılımı küresel olarak oluşmuş fakat arasıra ortaya çıkmıştır. Bu enzimleri üreten *Acinetobacter* türleri ile oluşan nozokomiyal salgınlar Brezilya, Fransız Polonezyası, İspanya, Türkiye, Balkanlar, Kore ve Arjantin'den bildirilmiştir. Karbapenem duyarlılığı ne olursa olsun 108 *A. baumannii* suşunun tamamında OXA-51 pozitif bulunurken *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus* ve *A.*

lwoffi'yi içeren diğer *Acinetobacter* türlerinde bu genin saptanmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının *bla*<sub>OXA51</sub>-like geninin *A. baumannii* için tür spesifik olduğunu düşündüren önceki çalışmaların sonuçlarını desteklediği belirtilmiştir. *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direnci ve *bla*<sub>OXA51</sub>-like geni arasındaki ilişkinin araştırılması gerektiği, ancak bu ilişkinin doğru korelasyon göstermeyebileceği belirtilmiştir. Özellikle *bla*<sub>OXA51</sub>-like genine bitişik olan *ISAbal*'nin karbapenem direncinde asıl rolü oynadığı bildirilmiştir (184).

Çin'de 11 farklı hastaneden toplanan 221 *Acinetobacter* türü ile yapılan çalışmada *A. baumannii* olarak tanımlanan 187 izolatın tümünde OXA-51 geni varlığı saptanırken diğer türlerde bu genin bulunmadığı, %97,7'sinde OXA23-like geni olduğu bildirilmiştir. Çok merkezli olarak yapılan bu çalışmada OXA-23 enziminin, Çin'in çoğu bölgesinde IPM dirençli izolatlar arasında en yaygın karbapenemaz olduğu; ayrıca OXA-23 enziminin birçok farklı *Acinetobacter* türü tarafından da üretildiği ve bu enzimi üreten suşların tümünün kromozomal *ISAbal* ile bitişik *bla*<sub>OXA23</sub> geni taşıdığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada *bla*<sub>OXA51</sub>-like geninin sadece *A. baumannii*'de bulunduğu, diğer *Acinetobacter* türlerinde olmadığı vurgulanmıştır (185).

Tayvan'da 2010 yılında yapılan çalışmada 2 üniversite hastanesi ve bir bölge hastanesinden toplanan 83 IPM dirençli *Acinetobacter* türünde Multipleks PCR yöntemi ile OXA enzimini kodlayan genlerin varlığı araştırıldığında, hastanelerden ikisine ait tüm izolatlarda OXA-51 geni bulunurken diğer hastaneden izole edilen türlerde %91 oranında saptandığı bildirilmiştir. Üniversite hastanelerinden birinde OXA-23 ve OXA-24 enzimi üreten suşa rastlanmazken diğer üniversite hastanesinde %26 oranında OXA-51+OXA-23, %12 oranında OXA-51+OXA-24 ve bölge hastanesinde de %58 oranında OXA-51+OXA-23, %3 oranında OXA-51+OXA-24 üreten suş varlığı raporlanmıştır. Sonuçta IPM dirençli *Acinetobacter* türlerinin hastaneler arası yayılımının olmadığı, ancak Tayvan'da OXA-23 oranının artışı nedeniyle dikkatli olunması gerektiği vurgulanmıştır (186).

Avrupa kıtasında ki karbapenem dirençli *Acinetobacter* türlerinde OXA-58 enziminin coğrafik dağılımını incelemek üzere yapılan bir çalışmada Fransa, Türkiye, Yunanistan, İtalya, Romanya ve İspanya’ında içinde bulunduğu 6 Avrupa ülkesinden 12 şehire ait izolatlardan toplanmış; biri *A. junii* kalan 47’si *A. baumannii* olarak tiplendirilen suşlarının 42’si IPM dirençli, 5’i orta duyarlı bulunmuştur. *A. junii* ve 22 *A. baumannii* izolatında OXA-58 geni, *A. junii* ve 2 *A. baumannii* izolatında OXA-23 geni varlığı bildirilmiştir. OXA-23 enzimi üreten suşların 3’ünde Romanya’ya ait olduğu, İspanya’ya ait 9 suşta da OXA-24 subgrubundan OXA-40 geninin saptandığı ve OXA-40 enziminin İspanya’da endemik olduğu belirtilmiştir. Karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direncinden OXA karbapenemazların en sık sorumlu enzim olduğu ve merkezi Türkiye olmak üzere Balkanlar ve Güney Avrupa’da OXA-58 enziminin yaygın olduğu bildirilmiştir (122).

*A. baumannii* izolatlarında karbapenem direnci için gen dağılımı ve antibiyotik direncinin sıklığının araştırıldığı bir çalışmada 2 yıllık bir süreçte 1265 *A. baumannii* izolatı toplanmış ve ÇİD olarak tanımlanan 192 (%15,18) suşun çoğunda (185/192) birden fazla OXA genine sahip olduğu bildirilmiştir. ÇİD suşların tümünde OXA-51 geninin bulunduğu, %96,35 oranında OXA-23 geni ve %0,52 oranında OXA-24 geninin saptandığı belirtilmiştir (187).

SENTRY antimikrobiyal surveyans programı kapsamında Asya-Pasifik bölgesinde ki 10 ülkeden ve 41 hastaneden toplanan 544 *Acinetobacter* spp. ile yapılan çalışmada izolatların %94,1’i *A. baumannii* olarak tanımlanmış ve OXA-51-like geni varlığı gösterilerek doğrulandığı bildirilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılığı %99,1 COL, %98,9 TİG, %52 IPM, %51,3 MEM ve izolatların 230’u (%42,3) IPM ya da MEM dirençli olarak tespit edilmiştir. Karbapenem dirençli bu suşların %70’inde OXA türü karbapenemaz, %0,8’de MBL saptandığı bildirilmiştir. OXA enzimlerini kodlayan genlerin içinde *bla<sub>OXA23</sub>* %95 oranıyla en yaygın olanı iken bunu *bla<sub>OXA58</sub>* (%11,9) ve *bla<sub>OXA24-40</sub>* (%5,6) izlediği belirtilmiştir (188).

Yunanistan'da yeni kurulan bir hastanede 164 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının dahil edildiği bir çalışmada karbapenem direncinden sorumlu OXA türü enzimlerin dağılımına bakılmış ve izolatların 159'unda (%96,9) OXA-58 geni saptanırken OXA-23 ve OXA-24 genine rastlanmadığı bildirilmiştir (189).

İran'da 80 *A. baumannii* izolatıyla yapılan bir çalışmada karbapenemlere direnç oranı %52,5 olarak saptanırken izolatların 7'si (%8,8) COL ve TIG dahil tüm antibiyotiklere dirençli olarak bildirilmiştir. OXA-51, OXA-23, OXA-58 ve OXA-24 direncine bakılmış ve direnç genlerinin sırasıyla %100, %25, %21,5, %15 oranında tespit edildiği belirtilmiştir. OXA-51 geni taşıyan 6 izolat hariç diğerlerinin tümünün birden fazla *bla*<sub>OXA</sub> taşıdığı, 2 gen varlığı %41,2, 3 gen varlığı %6,2, 4 gen varlığı %2,5 oranında olduğu bildirilmiştir (190).

ARPAC (Antibiotic Resistance Prevention and Control) çalışma grubunun Türkiye'nin de içinde bulunduğu 17 Avrupa ülkesi ve 25 hastaneden toplanan 100 *Acinetobacter* türü ile gerçekleştirdikleri çalışmada izolatların 4 tanesinde PCR ile OXA-51 geni gösterilemediğinden çalışma dışı bırakıldığı, kalan 96 *A. baumannii* suşunun dahil edildiği belirtilmiştir. *A. baumannii* suşlarından CLSI break point değerlerine göre IPM MIC değeri  $\geq 16$  olan 28 suşda Multipleks PCR ile OXA-23, OXA-24, OXA-58 geni bakılmış ve OXA-51 geni taşıyan 28 suşdan 26'sında (%92,9) diğer OXA genlerinden birinin pozitif olduğu bildirilmiştir. Bunlardan 15'inin OXA-58, 6'sının OXA-23, 5'inin OXA-24 geni taşıdığı belirtilmiştir. IPM MIC değeri  $>16$  olan diğer 68 izolatda ise %7,3 (n=5) oranında OXA-51'e ek olarak ikinci bir OXA geni varlığı saptanmış, 2 izolatda OXA-23, 3 izolatda OXA-58 geni bildirilmiştir. Sonuçta Avrupa'dan izole edilen *A. baumannii* izolatlarının yüksek düzey karbapenem direnci gösterdikleri ve intrinsik OXA-51 enzimine ek olarak en az bir OXA türü karbapenemaz enzimini içerdiği vurgulanmıştır. Ayrıca OXA-24 enziminin İspanya ve Portekiz'i içeren İber yarımadasında sınırlıyken OXA-23 enziminin daha geniş bir coğrafik dağılım gösterdiğini, OXA-58 enziminin ise Yunanistan, Güney Avrupa ve merkezi Türkiye olmak üzere

Balkanlar'daki *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direnci ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir (191).

OXA türü karbapenemazların dağılımının incelendiği bir başka çalışmada OXA-24 subgrubunda bulunan OXA-40 enziminin İber yarımadasında, OXA-58 enziminin Avrupa'da, OXA-23 enziminin Güney Amerika ve Asya genelinde yaygın olduğu ifade edilmiştir (192).

Ülkemizde 6 şehirde 7 üniversite hastanesi yoğun bakım ünitesinden izole edilen CAZ dirençli 72 *Acinetobacter* türü ile yapılan bir çalışmada suşların 56'sının (%77,8) spesifik OXA-51 geni taşıdığı, bu suşlardan 10'unda OXA-58 geninde mevcut olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmada klonal olarak *bla*<sub>OXA-51</sub>-like geninin kromozoma lokalize olduğu, plazmidik OXA-58 geninin ise kolayca yayılabildiği belirtilmiştir. Ayrıca OXA-51 türü enzim üreten *Acinetobacter* türlerinin oldukça yaygın ve ülkemizin farklı bölgelerine dağılmış olduğu, OXA-51 ve OXA-58 birlikteliğinin ÇİD'nden sorumlu olabileceğini bildirmiştir (99).

Çalışmamızda OXA türü enzim varlığını araştırmak amacıyla konvansiyonel PCR ve Real time PCR uygulanan 121 *A. baumannii* suşunun tamamında OXA-51 geninin varlığı gösterilmiştir. *A. baumannii* türüne spesifik OXA-51 geninin tüm suşlarda tespit edilmiş olması *bla*<sub>OXA51</sub>-like geninin sadece *A. baumannii*'de bulunduğunu, diğer *Acinetobacter* türlerinde olmadığını bildiren diğer çalışmaları desteklemektedir.

İspanya ve Portekiz gibi İber yarımadası ülkelerinden yapılan çalışmalarda *bla*<sub>OXA-24</sub> geni varlığı bildirilmektedir (86). Henüz sınırlı sayıda çalışmanın bulunduğu *bla*<sub>OXA-24</sub> hakkında bizim çalışmamızda da pozitiflik saptanmamıştır. Yapılacak geniş katımlı yeni çalışmalarda konunun aydınlanacağı inancındayız.

Papa ve ark (189) Yunanistan'da *A. baumannii* suşlarında karbapenem direnci ile ilişkili olarak % 96,9 oranında OXA-58 enzimi bildirirken, Avrupa kıtasında yapılan ve ülkemizi de içeren bir başka çalışmada %18,8 olarak bildirilmiştir (86,89). OXA-58 enzimi Türkiye'de Vahaboğlu ve ark. (99)

tarafından %17,9 oranında bildirilmiştir. Bahsedilen tüm bu çalışmaların verileri doğrultusunda ülkemizde yaygın olduğu bildirilen OXA-58 enzimini kodlayan gen, suşlarımızın 21'inde (%19) saptanmış ayrıca bu genle IPM direnci arasında korelasyonun 0,393 (p=0,003), MEM direnci ile korelasyonunun 0,425 (p=0,001) olduğu ve anlam ifade ettiği gösterilmiştir.

Asya-Pasifik, Avrupa ülkeleri, Çin, Tayvan, İran gibi dünyanın farklı bölgelerinden yapılan bildirimlerle OXA-23 enzimi %6,3-97,7 oranında bildirilmiştir. Dünyada oldukça geniş dağılım gösteren ancak ülkemizde ki sıklığı ve dağılımı hakkında henüz ulaşılabilen bir veri olmayan OXA-23 geni suşlarımızın 19'unda (%17,4) saptanmış ve 12 suşun (%10,1) aynı anda hem OXA-23 hem de OXA-58 genine sahip olduğu görülmüştür. OXA-23 geni ile IPM direnci arasında 0,561 (p=0,000), MEM direnci ile 0,402 (p=0,001) korelasyon saptanmış ve anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızda karbapenem direnci ve OXA genleri arasında anlamlı korelasyon saptanmış, ancak MEM direnci ile *bla*<sub>OXA-23</sub> geni arasında anlamlı bir ilişki ifade edilememiştir. Bu durumun antibiyogram çalışmalarında kullanılan otomatize sistemlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Zira Vitek 2 otomatize sistemi karbapenemlerin MIC değerleri doğrultusunda antibiyogram sonuçlarına müdahale ederek muhtemel direncin varlığı düşüncesiyle düzeltme yapmaktadır. MicroScan otomatize sistemi karbapenemaz varlığını saptayamamakta ve otomatik düzeltme yapmamaktadır. Sadece MIC değerleri ölçütünde değerlendirmeye imkan vermektedir.

Çalışmamızda izole edilen *A. baumannii* suşlarının birçok antibiyotiğe yüksek direnç oranları gösterdiği, sadece COL ve TİG duyarlılığın yüksek olduğu, hatta dirençli *A. baumannii* infeksiyonunun tedavisinde yaygın olarak kullanılan karbapenem grubu antibiyotiklere de duyarlılığın azalmakta olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlardan karbapenemlere yüksek oranda direnç gözlenmesi, *A. baumannii* izolatlarındaki direncin endişe verici boyutlara ulaşmış olduğunu vurgulamaktadır. Yoğun bakım ünitelerinde *A. baumannii*'nin gittikçe daha sık

infeksiyon etkeni olarak izole edilmesi, yanısıra antibiyotik direnç oranlarının ve özellikle karbapenem direncinin sürekli artış göstermesi ve tedavide yaşanan sorunlar nedeniyle bu bakterinin neden olduğu infeksiyonların hastaneler için ana problemlerden biri olmaya başladığını düşündürmektedir. Bu gözlemlerden yola çıkarak hastanemizde ÇİD paternine sahip *A. baumannii* izolatlarında yüksek karbapenem direncinin olası nedenlerinden biri olan OXA enzimlerini araştırdığımız bu çalışmadaki verilerin mevcut durumu saptamak açısından önemli olduğu ve ileride yapılacak olan izlem çalışmalarına ışık tutacağı inancındayız.

Tablo XV. *Acinetobacter* türlerinde OXA genlerinin dağılımı ile ilgili yapılan çalışmaların verileri

Kaynak	Yer	Yıl	Suş sayısı (n)	<i>bla</i> OXA-23 (%)	<i>bla</i> OXA-24 (%)	<i>bla</i> OXA-51 (%)	<i>bla</i> OXA-58 (%)
Marque' S. ve ark..	Avrupa kıtası	2005	48*	6,3	18,8	-	45,8
Vahaboğlu H. ve ark.	Türkiye	2006	72*	-	-	77,7	17,9
Villegas MV. ve ark.	Colombia	2007	66**	98,4	0	100	0
Wang H. ve ark.	Çin	2007	221*	97,7	-	84,6	-
Feizabadi MM ve ark.	İran-Tahran	2008	128*	25,0	17,9	84,4	9,0
Towner KJ ve ark.	Avrupa ülkeleri(ARPAC)	2008	100*	8,3	5,2	96,0	18,8
Lee K ve ark.	Güney Kore	2009	144*	46,0	-	-	-
Mendes RE ve ark.	Asya-Pasifik(SENTRY)	2009	544 <sup>a</sup>	95,0	5,6	94,1	11,9
Papa A ve ark.	Yunanistan	2009	164**	0	0	100	96,9
Morovat T ve ark.	İran	2009	80**	25,0	15,0	100	21,5
Kuo HY ve ark.	Tayvan	2010	83*	28,0	5,0	96,4	-
Yang SC ve ark.	Tayvan	2010	1265 <sup>b</sup>	96,3	0,5	100	-
Çalışmamız	Türkiye-Afyonkarahisar	2010	121**	17,4	0	100	19

\**Acinetobacter* spp.

\*\**A. baumannii* izolatları

a: ÇİD olan 230 suşda OXA geni bakılmıştır.

b: ÇİD olan 192 suşda OXA geni bakılmıştır.



## SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Çalışmamızda *A. baumannii* izolatlarıyla ilgili demografik veriler (örnek türü, klinik) *Acinetobacter* ile ilgili diğer yayınlarla uyumlu bulunmuştur. İzolatlar en sık anestezi ve reanimasyon kliniğinden ve solunum sistem örneklerinden elde edilmiştir.

2. Çalışmamızda dirençli *A. baumannii* infeksiyonunun tedavisinde yaygın olarak kullanılan karbapenem grubu antibiyotiklere duyarlılığın azalmakta olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte sefalosporinler gibi klinikte yaygın kullanımı olan antibiyotiklere %90'nın üzerinde olan direnç oranlarının kinolonlar içinde %90'lara yaklaştığının gözlenmesi direncin endişe verici boyutlara ulaşmış olduğunu göstermektedir.

3. İzole edilen *A. baumannii* suşlarının COL ve TİG hariç birçok antibiyotiğe dirençli olduğu, karbapenem grubu antibiyotiklere direnç oranının da oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle antibiyotiklerin kontrollü ve akılcı kullanımı önem arz etmektedir. Aksi halde çoğul dirençli *Acinetobacter* suşlarının yerini tam dirençli suşların alacağı endişesi gündeme gelmektedir.

4. Vitek 2 sistemi MicroScan otomatize sistemi ile karşılaştırıldığında karbapenemaz aktivitesinin saptanması açısından avantajlı gibi görünmektedir.

5. OXA türü enzimlerin her dört grubuna ait birer *bla<sub>OXA</sub>* geni bakılmış ve tür spesifik *bla<sub>OXA-51</sub>* geninin tüm suşlarda varlığı gösterilmiş, *bla<sub>OXA-58</sub>* %19, *bla<sub>OXA-23</sub>* %17,4, *bla<sub>OXA-23+58</sub>* %10,1 oranında saptanmıştır.

6. Çalışmamız bu tür enzimlerin varlığı ve dağılımı açısından ön çalışma niteliğinde olup, dört subgruba ayrılan OXA türü enzimlerin çalışma sonrasında takibi, dağılım ve direnç sorunu hakkında ayrıntılı bilgi edinmemiz açısından önemli olduğu inancındayız.

7. Karbapenem direnci ve OXA direnç genleri arasında korelasyon saptanmış, ancak MEM direnci ile *bla*<sub>OXA-23</sub> arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanamamıştır. Bu durumun iki farklı otomatize sistem ile antibiyogram sonuçlarının elde edilmiş olması ve MicroScan otomatize sisteminin karbapenem MIC değerlerine göre düzeltme yapmaması kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

8. Çalışmamız ile gerçekleştirilen moleküler analizlerde tüm izolatlar için *bla*<sub>OXA-51</sub> varlığı gösterilmiş bu sayede tüm suşların *A. baumannii* olduğu doğrulanmıştır. Ancak OXA-51 enzimleri karbapenemaz direncinin ifadesi için tek başına yeterli değildir. Karbapenem direncinin ayrıntılı olarak gösterilebilmesi için *bla*<sub>OXA-51</sub> IS*Abal* komşuluğunun yeni çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

9. Çalışmamızda karbapenem dirençli suşların arasında klonal ilişki olup olmadığını araştırmak için PFGE yapmayı planlanmış ancak kaynak yetersizliği nedeniyle gerçekleştirilememiştir.

10. Karbapenem direncinin en sık nedeni olan beta laktamaz enzimlerinden karbapenemaz aktivitesine sahip CDHL (OXA türü enzimler) araştırılmış, diğer grup olan MBL enzimlerinin araştırılması planlanmıştır.

11. *A. baumannii* karbapenemaz aktivitesini belirlemede fenotipik testlerin yanında EDTA'lı antibiyotik disklerinin rutin laboratuvar uygulaması kapsamına alınmasının direnç çalışmalarına katkı sağlayacağı düşüncesiyle *A. baumannii* için rutin çalışmalara dahil edilmesi planlanmıştır.

12. Yoğun bakım ortamında ve yatan hastalarda dirençli suşların kolonizasyonunun engellenmesine yönelik önlemlerin alınması, kolonize hastaların belirlenmesi, salgınların önlenmesi amacıyla hizmetiçi eğitim faaliyetlerinin önemli olduğu kanısına varılmıştır.

13. Salgınlar sırasında bakterinin diğer hastalara bulaşının önlenmesi amacıyla, infekte hastaların izole edilmesine imkan verecek ortamların hazırlanmasının insan sağlığı açısından önemli olduğu gözlenmiştir.

## ÖZET

Karbapenemleride içeren çok geniş bir spektrumda birçok antimikrobiyal ajana genellikle dirençli olan *Acinetobacter baumannii* önemli nozokomiyal infeksiyon etkenlerindendir. Karbapenemler çoklu ilaç direncine (ÇİD) sahip suşlar ile oluşan *Acinetobacter* infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir seçenek olarak kabul edilirler ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar gibi beta-laktamaz enzimlerinin çoğundan etkilenmezler. Bununla birlikte oksasilinazlar (OXA) gibi karbapenem hidrolize eden enzimlerin görülmesiyle etkinlikleri giderek azalmaya başlamıştır. *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direncinin temel sebebi OXA-türü beta-laktamazlardır ve bunlardan OXA-51 türevleri, OXA-58 ve OXA-23 en çok görülenidir. Özellikle bu enzimlerin birden fazlasının bir arada olması ÇİD fenotipinin ortaya çıkmasına neden olur.

Bu çalışmada, bir yıllık süreçte hastanemizde toplanan *A. baumannii* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları ve karbapenem dirençli suşların epidemiyolojisi değerlendirilmiş yanısıra bu dirençten sorumlu olası mekanizmalardan biri olan OXA türü karbapenemazların varlığı araştırılmıştır.

Temmuz 2008 - Haziran 2009 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesinde, farklı kliniklerden gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 121 *A. baumannii* suşu bu çalışmaya alınmıştır. İzolatların tümü konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış, otomatize sistemlerle doğrulanmıştır. Antibiyogram duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve otomatize sistemlerle birlikte gerçekleştirilmiştir.

Bakterinin DNA'sı iki farklı yöntemle izole edilmiş, öncelikle konvansiyonel PCR ile *bla<sub>OXA</sub>* genleri için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyonu takiben real time PCR ile OXA karbapenemaz enzimlerinden 4 gruba ait (*bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>* ve *bla<sub>OXA-58</sub>*) genlerin varlığı araştırılmıştır.

Duyarlılık testleri sonucunda, izolatların çoğu kolistin ve tigesiklin dışındaki birçok antimikrobiyal ajana dirençli bulunmuştur. ÇİD suşlarla oluşan infeksiyonlarda genellikle tercih edilen karbapenem grubu antibiyotiklere direnç oranlarının da oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Karbapenem direncinden sorumlu OXA türü enzimlerden tür spesifik *bla*<sub>OXA-51</sub> geni izolatların tümünde, yanısıra *bla*<sub>OXA-58</sub> geni izolatların %19, *bla*<sub>OXA-23</sub> genide izolatların %17,4 kadarında saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu suşlarda yaygın klinik kullanıma sahip olan antibiyotiklere direnç oranlarının oldukça yüksek olduğu gözlenmiş, karbapenem direncinin temel nedeni olarak *bla*<sub>OXA</sub> genlerinin varlığı gösterilmiştir. Bu çalışma hastanemizdeki ilk çalışma olup *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direnci ve epidemiyolojisi ile ilgili yapılacak diğer çalışmaların öncüsü niteliğindedir.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, karbapenem direnci, OXA-türü enzimler

## SUMMARY

*Acinetobacter baumannii*, which are usually resistant in a wide range of antimicrobial agents covering carbapenems, is an important causative agent of nosocomial infections. Carbapenems are accepted an important option for the treatment of *Acinetobacter* infections caused by multidrug-resistant (MDR) isolates and not affected most of the  $\beta$ -lactamases, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. However, their effects has been decreased gradually with the recently discovered carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase enzymes such as oxacillinases (OXA). The main reason of carbapenem resistance among *Acinetobacter* spp, is OXA-type beta-lactamases and OXA-51, OXA-23 and OXA-58 are frequently observed types. Especially, when OXA-type enzymes are coexistent, they reveal MDR phenotype.

In this study, antimicrobial susceptibility of *A. baumannii* strains which had been isolated throughout over one year period and the epidemiology of carbapenem-resistant *A. baumannii* were evaluated; also the presence of OXA-type carbapenemases that is one of the responsible mechanisms in the carbapenem-resistance, were investigated.

One hundred twenty-one *A. baumannii* strains isolated from miscellaneous clinical samples from hospitalized patients in Afyon Kocatepe University Hospital, between July 2008 to June 2009, were enrolled for this study. All isolates were identified by using conventional methods and advance identification done with the automatized systems. Antibiotic susceptibility tests were performed both by the Kirby-Bauer disk diffusion method and the same automatized systems.

Bacterial DNA was extracted from the isolates by two different methods. At the first step, the extractes were used for optimization of *bla*<sub>OXA</sub> genes by in-house PCR methodology. Subsequent to this optimization process, the existance

of the four groups of OXA-carbapenemase genes (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>OXA-58</sub>) were investigated by real time PCR.

As a result of susceptibility tests, most of these isolates were found to be resistant for many antimicrobial agents, except colistin and tigecycline. The resistance against to carbapenems was observed quite high, which generally chosen agent for the treatment of infections caused by MDR *Acinetobacter* species. was observed quite high. Among OXA-types enzymes responsible from carbapenem resistance; species spesific *bla*<sub>OXA-51</sub> genes encoding oxacillinases showing carbapenemase activity were detected in all *A. baumannii* isolates, 19,0% strains with *bla*<sub>OXA-58</sub> genes and 17,4 % carried *bla*<sub>OXA-23</sub> genes also were detected.

In conclusion, the resistance rates were observed relatively higher against antibiotics which are commonly used in clinical practices for this strains. The presence of *bla*<sub>OXA</sub> genes were seen the main reason of the carbapenem resistance. In this study constitutes as the first study in our hospital and also a pioner for prospective studies on carbapenem resistance and epidemiology with *A. baumannii* isolates.

**Key words:** *A. baumannii*, carbapenem resistance, OXA-type enzymes

## KAYNAKLAR

1. Usluer G. Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol. Flora derg, 2002; 7: 135-41.
2. Çaylan R. Çok ilaca dirençli hastane kökenli Gram negatif nonfermentatif bakteriler: Ülkemizdeki durum, tedavi ve kontrol politikaları. Klimik Dergisi, 2003; 16 (Özel sayı): 18-20.
3. Akova M. Gündemdeki Beta laktamazlara Klinik yaklaşım. İçinde: Gür D (editör). 8. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı. Ankara: Sim mtb 2008;121-22.
4. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-Like Carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Collected over 10 Years in Three Continents. Antimicrob Agent Chemother 2006;50:756-758.
5. Dijkshoorn L, Nemec A. The diversity of the genus *Acinetobacter*. In: Gerischer U, eds. *Acinetobacter* molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic press 2008;1-34.
6. Bergogone-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological and epidemiological features. Clin Microbiol Rew 1996;(2):48-165.
7. Schreckenberge PC, Daneshaver MI, Hollis DN. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella* and other Nonfermentative Gram-Negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. Manuel of Clinical Microbiology 10th ed. Washington DC: ASM pres 2009;770-802.



8. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer Gram negatif nonfermentatif basiller. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008; 2195-2201.
9. Bauvet PJM and Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* spp. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriology 1986;36:228-40.
10. Tjenberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS 1989;97:595-605.
11. Nishimura Y, Ino T, Lizuka H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from cotton and soil. Int J Syst Bacteriology 1988;38:209-11.
12. Nemeč A, De Baere T, Tjenberg I, Vaneechoutte M, Van Der Reijden TJ, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* spp. nov. and *Acinetobacter schindleri* spp. nov. isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiology 2001;51:1891-99.
13. Nemeč A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, Van Der Reijden TJ, Jezek P, Vaneechoutte M. *Acinetobacter parvus* spp. nov. a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiology 2003;53:1563-67.
14. Carr EL, Kampfer P, Patel BK, Gurtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. Int J Syst Evol Microbiology 2003;53:953-63.

15. Vaneechoutte M, Tjenberg I, Baldi F, Pepi M, Fani R, Sullivan ER, Van Der Reijden TJ, Dijkshoorn L. Oil degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as *Acinetobacter venetianus* spp. nov. belong to the same genomic species. Res Microbiology 1999;150:69-73.
16. Bauvet PJ and Jeanjean S. Delineation new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res Microbiol 1989;140:291-99.
17. Gerner Smidt P, Tjenberg I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex. APMIS 1993;101:826-32.
18. Harrington BJ. Letter to the editors. Clin Microbiol Newslett 1997;19:191.
19. Winn W. Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The nonfermentative Gram Negative bacilli. In: Winn W. Jr, eds. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia:Lippincott Williams&Wilkins, 2006;303-91.
20. Siau E, Yuen K-Y, Ho P-L, Luk WK, Wong S-Y, Woo PC-Y, Lee RA, Hui W-T. Identifications of *Acinetobacters* on blood agar in presence of D-glucose by unique browning effect. Journal of Clin Microbiol 1998;36:1404-7.
21. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp. and comparison with Herellea agar and Holton's agar. J Clin Microbiol 1994;32(10):2353-8.
22. Altunçekiç A, Arman D. *Acinetobacter* cinsi bakterilerin mikrobiyolojisi, direnç mekanizmaları ve çoklu dirençli suşlarda tedavi. İçinde: Arman D,

Ünal S (editörler). Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp yayınevi 2009; 123-36.

23. Rosenberg E. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter cacoaceticus* RAG-1 on hexadecane. Appl Env Microbiol 1982;44:929-37.
24. Rosenberg M, Perry A, Bayer EA, Gutnick DL, Rosenberg E, Ofe I. Adherence of *Acinetobacter cakoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. Infect Immun 1981;33:29-33.
25. Boujaafar N, Freney J, Bouvet PJ, Jeddi M. Cell surface hydrophobicity of 88 clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. Res Microbiol 1990;141:477-82.
26. Koljalg S, Vuopio-Varkila J, Lyytikäinen O, Mikelsaar M, Wadstrom T. Cell surface properties of *Acinetobacter baumannii*. APMIS 1996;4:659-65.
27. Vinogradov EV, Duus JO, Brade H, Holst O. The structure of the carbohydrate back-bone of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606. Eur J Biochem 2002;269:422-30.
28. Garcia A, Solar H, Gonzalez C, Zemelman R. Effect of EDTA on the resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to the bactericidal activity of normal human serum. J Med Microbiol 2000;49:1047-50.
29. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, Akira S, van der Poll T. Differential roles of CD14

- and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:122-9.
30. Poh CL, Loh G.K. Enzymatic profile of clinical isolates of *Acinetobacter cakoaceticus*. Med Microbiol Immunol 1985;174:29-33.
  31. Obana Y. Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. Microbiol Immunol 1986;30:645-57.
  32. Hostacka A, Kovacikova Z. Effect of amikacin on cytotoxic activity and hydrophobicity of *Acinetobacter baumannii*. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1999;21:653-57.
  33. Kleinman R, Piha A. Bacteria-immune system interactions. II. Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* strains to human lymphocytes. Immunol Commun 1983;12:473-80.
  34. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, van der Reijden T, van der Meer J, van de Gevel J, Dijkshoorn L. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. Res Microbiol 2006;157:360-6.
  35. Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004;99:839-44.
  36. Gospodarek E, Grzanka A, Dudziak Z, Domaniewski J. Electron-microscopic observation of adherence of *Acinetobacter baumannii* to red blood cells. Acta Microbiol Pol 1998;47:213-17.
  37. Lee JC, Oh JY, Kim KS, Jeong YW, Park JC, Cho JW. Apoptotic cell death induced by *Acinetobacter baumannii* in epithelial cells through caspase-3 activation. APMIS 2001;109:679-84.

38. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 1999;283:1837-39.
39. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93.
40. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 2006;188:3572-81.
41. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997;35:1394-97.
42. Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:611-47.
43. Litwin CM, Calderwood SB. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:137-49.
44. Yamamoto S, Okujo N, Sakakibara Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch Microbiol* 1994;162:249-54.
45. Brickman TJ, Armstrong SK. Bordetella AlcS transporter functions in alcaligin siderophore export and is central to inducer sensing in positive regulation of alcaligin system gene expression. *J Bacteriol* 2005;187:3650-61.
46. Echenique JR, Arienti H, Tolmasky ME, Read RR, Staneloni RJ, Crosa JH, Actis LA. Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 1992;174:7670-9.

47. Çakar A. Bakteriyel iletişim: “Quorum-sensing”. *Microbiyol Bült* 2004;38:273-84.
48. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*. 2003;46:207-14.
49. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:56-60.
50. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to cell communication: Acyl Homoserine Lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*. 2001;35:439-68.
51. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005;2:2632-6.
52. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2003;54(1):39-45.
53. Aksaray S, Dokuzoğuz B, Güvener E, Yücesoy M, Yuluğ N, 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.
54. Das I, Lambert P, Hill D, Noy M, Bion J, Eliot T. Carbapenem resistant *Acinetobacter* and role of curtains in an outbreak in intensive care units. *J of hospital infection* 2002;50:110-114.

55. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* Infection. N Engl J Med 2008;358(12):1271-81.
56. Öncül O, Keskin O, Acar HV, et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. J Hosp Infect 2002;51:47-51.
57. Scott P, Deye G, Srinivasan A, et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex* infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin Infect Dis 2007;44:1577-84.
58. Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH. Nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonları. Flora 1999;4:170-6.
59. Firdevs A. Gram negatif bakterilerin hastane infeksiyonlarındaki rolü ve epidemiyolojisi. İçinde: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (editörler). Önemli ve sorunlu Gram negatif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp yayınevi 2004; 183-206.
60. Dizbay M, Altunçekiç A, Kanat Özcan D, et al. Anestezi-Reanimasyon ve Nöroloji Yoğun Bakım Ünitelerinde Gelişen Nozokomiyal İnfeksiyonlar: İki Yılın Değerlendirilmesi. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2007;4:252-57.
61. Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. Medicine (Baltimore) 1995;74:340-9.
62. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, et al. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. Clin Infect Dis 1996;22:1026-32.

63. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J of Hospital Infection 2009;73:355-63.
64. Akalın H, Özakın C, Kahveci F, Sütçü Ş, Helvacı S, Gedikoğlu S ve ark. Hastane kökenli pnömoniler. Flora 1999; 4(4):253-57.
65. Paterson DL, Doi Y. A step closer to extreme drug resistance (XRD) in gram negative bacilli. Clin Infect Dis 2007;45:1179-81.
66. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pundrug resistance (PDR), Extensive drug resistance (XRD) and multidrug resistance (MDR) among gram negative bacilli:need for international harmonization in terminology. Clin Infect Dis 2008;46:1121-2.
67. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis 2008;46:1254-63.
68. Jones RN, Deshpande L, Fritsche TR, Sader HS. Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999–2003). Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 49:211–6.
69. Akalın H. Dirençli Gram negatif bakterilerde tedavi yaklaşımı. İçinde: Başustaoğlu A (editör). Gülhane Mikrobiyoloji Günleri program ve özet kitabı. Ankara: Sim mtb,2010;34-43.
70. Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA, Costa SF. Severe nosocomial infections with imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin sulbactam. Int J Antimicrob Agents 2003;21:58-62.



71. Jellison TK, Mc Kinnon PS, Rybak M. Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii*, bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy* 2001;21:142-8.
72. Betrosian AP, Frantzeskaki F, Xanthaki A, Douzinas EE. Efficacy and safety of high-dose ampicillin/sulbactam vs. colistin as monotherapy for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Infect* 2008;56:432–6.
73. Choi JY, Kim CO, Park YS, Yoon HJ, Shin SY, Kim YK, Kim MS, Kim YA, Song YG, Yong D, Lee K, Kim JM. Comparison of efficacy of cefoperazone/sulbactam and imipenem/cilastatin for treatment of *Acinetobacter* bacteremia. *Yonsei Med J.* 2006; 28:47:63-9.
74. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40:1333-41.
75. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ, Barrero-Almodóvar AE, García-Garmendia JL, Bernabeu-Wittel IM, et al. Treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis* 2003;36:1111–8.
76. Ho Yh, Wang LS, Chao HJ, Chang KC, Su CE. Successful treatment of meningitis caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with intravenous and intrathecal colistin. *J Microbiol Immunol Infect* 2007;40:537-40.

77. Owen RL, Li J, Nation RL, Spelman D. In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:473-477.
78. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:351-2.
79. Peleg AY, Potoski HA, Rea R, et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline a cautionary report *Antimicrob Chemother* 2007;59:128-31.
80. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug resistance *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J of Antimicrob Agents* 2010;35:219-26.
81. Gönüllü N, Aktaş Z, Şalcıoğlu M, Bal Ç, Anđ Ö. Comparative in vitro activities of five quinolone antibiotics, including gemifloxacin, against clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2001;7: 499-503.
82. Montero A, Ariza J, Corbella X, et al. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:1085-91.
83. Rodriguez-Hernandez MJ, Pachon J, Pichardo C, Cuberos L, Ibanez-Martinez J, Garcia-Curiel A et al. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:493-501.
84. Joly-Guillou ML, Wolff M, Farinotti R, Bryskier A, Carbon C. In vivo activity of levofloxacin alone or in combination with imipenem or

- amikasin in a mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. J Antimicrob Chemother 2000;46:827–30.
85. Petrosillo N, Chinello P, Proietti MF, et al. Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: clinical outcome and adverse events. Clin Microbiol Infect 2005;11:682-3.
86. Van Looveren M, Goosens H, and the ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004;10:684-704.
87. Coelho J, Woodford N, Turton J, Livermore DM. Multi resistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? J Hosp Infect 2004;58:167-69.
88. Poriel L and Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006;12:826-836.
89. Towner KJ. Molecular basis of antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp.. In: Gerischer U, eds. *Acinetobacter* molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic press 2008;322-43.
90. Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. İçinde: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;39-52.
91. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J Antimicrob Chemother 2003;52:629-35.

92. Segal H, Nelson EC, Elisha BG. Genetic environment and transcription of ampC in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:612-4.
93. Hereiter C, Poriel L, Nordmann P. Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:123-30.
94. Segal H, Garny S, Elisha BG. Is IS(Aba1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett* 2005;243:425-9.
95. Brown S, Amyes SGB. The sequences of seven class D  $\beta$ -lactamases isolated from carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:15-23.
96. Hereiter C, Poriel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4174-9.
97. Brown S, Amyes SGB. OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1-3.
98. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;258:72-7.
99. Vahaboğlu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, Kolaylı F, Eroğlu C. High prevalence of OXA-51 type class D  $\beta$ -lactamases among ceftazidime resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centers. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:537-42.

100. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, Pitt TL. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2005;43:3074-82.
101. Merkier AK, Centron D. *bla*<sub>OXA-51</sub> type beta lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:110-3.
102. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:351-3.
103. Walsh TR, Toleman MA, Poriel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306-25.
104. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM, Rossolini GM, Chong Y. Molecular characterization of metallo beta lactamase producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* gonomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*<sub>VIM-2</sub> gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:837-40.
105. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo beta lactamase gene, *bla*<sub>SIM-1</sub> in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4485-91.
106. Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G, Çoşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioğlu H, Balık I, Aydın K, Oktun M. Widespread detection of

- PER-1 type extended spectrum beta lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2265-9.
107. Poriel L, Karim A, Mercat A, Le Thomas I, Vahaboğlu H, Richard C, Nordmann P. Extended spectrum beta lactamases producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:157-8.
108. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. High prevalence of PER-1 extended spectrum beta lactamase producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1749-51.
109. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended spectrum beta lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:178-82.
110. Poriel L, Meuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended spectrum beta lactamase VEB-1 producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003;41:3542-7.
111. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol* 2003;42:3978-84.

112. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of *bla*<sub>CTXM</sub> and *bla*<sub>PER</sub> beta lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:975-8.
113. Poriel L, Cabanne L, Vahaboğlu H, Nordmann P. Genetic environment and expression of the extended spectrum beta lactamase *bla*<sub>PER</sub> gene in gram negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1708-13.
114. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:583-8.
115. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Pentead-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3403-6.
116. Yu YS, Yang Q, Xu XW, Kong HS, Xu GY, Zhong BY. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital. *J Med Microbiol*. 2004;53:653-6.
117. Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4826-9.
118. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-

resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. J Clin Microbiol. 2005;43:2241-5.

119. Da Silva GJ, Quinteira S, Bertolo E, Sousa JC, Gallego L, Duarte A, Peixe L; Portuguese Resistance Study Group. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. J Antimicrob Chemother 2004;54:255-8.
120. Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. Clin Microbiol 2002;40:4741-3.
121. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:202-8.
122. Marque S, Poirel L, Héritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P. Regional Occurrence of Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. J of Clin Microb 2005;43:4885-88.
123. Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3198-202.
124. Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-58</sub> in



- Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1442-8.
125. Clark RB. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. J Antimicrob Chemother 1996;38:245-51.
126. Limanski AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer-membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. J Clin Microbiol 2002;40:4776-8.
127. Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, De E. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4876-83.
128. del Mar Tomas M, Beceiro A, Perez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Marinez-Beltran J, Bou G. Cloning a functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:5172-5.
129. Mussi MA, Limanski AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multi-drug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:1432-40.

130. Dupont M, Pages JM, Lafitte D, Siroy A, Bollet C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *Proteome Res* 2005;4:2386-90.
131. Gehrlein M, Leying H, Cullman W, Wendt S, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 1991;41:405-12.
132. Urban C, Go E, Mariano N, Rahal JJ. Interaction of sulbactam, clavulanic acid and tazobactam with penicillin-binding proteins of imipenem-resistance and susceptible *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 1995;125:193-8.
133. Fernandez-Cuenca E, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between  $\beta$ -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:565-74.
134. Rudant E, Bouvet P, Courvalin P, Lambert T. Phylogenetic analysis of proteolytic *Acinetobacter* strains based on the sequence of genes encoding aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases. *Syst Appl Microbiol* 1999;22:59-67.
135. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* 1998;47:455-62.
136. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter*

- baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3375-80.
137. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, Arakawa Y, Chong Y. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:305-12.
138. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol* 2004;53:1233-40.
139. Ruiz J, Navia MM, Casals C, Sierra JM, Jiménez De Anta MT, Vila J. Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:907-11.
140. Seward RJ, Towner KJ. Molecular epidemiology of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:248-254.
141. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:757-62.
142. Spence RP, Towner KJ. Frequencies and mechanisms of resistance to moxifloxacin in nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:687-90.
143. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance

- determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. J Med Microbiol 2000;49:929-36.
144. Huys G, Cnockaert M, Vanechoutte M, Woodford N, Nemec A, Dijkshoorn L, Swings J. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. Res Microbiol 2005;156:348-55.
145. Agerso Y, Guardabassi L. Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. J Antimicrob Chemother 2005;55:566-9.
146. Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (*bla*<sub>IMP-4</sub>) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1382-90.
147. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2005;56:20-51.
148. Derbentli Ş. Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisinde moleküler yöntemlerin yeri. İçinde: Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S (Editörler). İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları 2002;6-13.
149. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin microbiol infect 2006;12:826-836.

150. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J of Clin Microbiol 2005;43:4382-90.
151. Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of ribotyping and pulsed field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. J Clin Microbiol 1995;33:1402-7.
152. Gouby A, Nurit MJC, Bouzuges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet P. Use of pulsed field gel electrophoresis for investigation hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 1992;30:1588-91.
153. Olive DM, Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. J Clin Microbiol 1999;37:1661-9.
154. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları 2004; 650-712.
155. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A9 [ISBN 1-56238-586-0]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
156. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.

157. Özdemir M, Erayman İ, Gündem NS, Baykam M, Baysal B. Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. ANKEM Derg 2009;23:127-32.
158. Balcı M, Bitirgen M, Kandemir B, Arıbaş ET, Erayman İ. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılığı. ANKEM Derg 2010;24:28-33.
159. Erben N, Kiremitçi A, Özgüneş İ: Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz ve indüklenebilir beta-laktamaz sıklığının ve antimikrobiyal duyarlılığın değerlendirmesi, Osmangazi Tıp Derg 2006;28:135-46.
160. Çetin ES, Kaya S, Tetik T, Arıdoğan BC. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları, ANKEM Derg 2006;20:202-5.
161. Özkuyumcu C. Hacettepe Mikrobiyoloji serisi-1 Klinik bakteriyoloji el kitabı. Özkuyumcu C editör. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri;2009:171-4.
162. Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram negative bacilli in intensive care units in five European countries. JAMA 1999;281:67-71.
163. Kuşcu F, Öztürk BD, E. Tütüncü E, Uslu M, Gürbüz Y, Gülen G, Şencan İ. Çoğul antibiyotik dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında Tigesiklin duyarlılık oranlarının E-Test yöntemiyle araştırılması. Klimik Dergisi 2009;22: 48-51.

164. Yavuz MT, Şahin İ, Behçet M, Öztürk E, Kaya D: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, ANKEM Derg 2006;20:107-10.
165. Saltoğlu N. *Acinetobacter baumannii* infeksiyonları ve tedavisi. İçinde: XIII. Türk Klimik Kongresi (14-18 Mart 2007 Antalya), Kongre Kitabı. İstanbul: 2007;20:204-7.
166. Bonfoglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. Expert Opin Investig Drugs 2002;11:529-44.
167. Gülay Z. Gram Negatif Çomaklarda Antibiyotik Direnci: 2003–2004 Türkiye Haritası. Ankem Derg 2005;19:66-77.
168. 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.
169. Zer Y, Akın ÖFE, Namıduru M: *Acinetobacter baumannii* suşlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması, İnfeksiyon Derg 2007;21:193-6.
170. Duenas Diez AI, Bratos Perez MA, Eiros Bouza JM et al: Susceptibility of the *Acinetobacter calcoaceticus-A.baumannii* complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin, Int J Antimicrob Agents 2004;23:487-93.
171. 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.

172. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. *In vitro* activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam and tazobactam alone or in combination with  $\beta$ - lactamas against epidemiologically characterized multidrug- resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1586- 92.
173. Kaya I, Göker G, Bal Kayacan Ç, Gürler N. Yoğun bakım izolatu Gram negatif bakterilerde tigesiklin duyarlılığı. *ANKEM Dergisi* 2007;21:142-5.
174. Tognima MCB, Andradea SS, Silbert S, Galesa AC, Jonesc RN, Sader HS. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Infect Dis* 2004;8:284-91.
175. Gülhan B, Özekinci T, Atmaca S ve ark: 2004-2006 yıllarında izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnci, *ANKEM Derg* 2007;21:32-6.
176. Aygün G. Yoğun bakım birimlerinde antibiyotik direnç problemi ve tedavide güncel durum: Nonfermentatifler. III. Ulusal Yoğun Bakım İnfeksiyonları Simpozyumu. *Simpozyum Kitabı* 2007;16-8.
177. Vahapoğlu H. *Acinetobacter* infeksiyonları. *Ankem Derg* 2008;22:44-5.
178. Dobrewski R, Savov E, Bernards AT: Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital, *Clin Microbiol Infect* 2006;12:1135-7.



179. Hawkey P, Finch R. Tigecycline: *in vitro* performance as a predictor of clinical of efficacy. *Clin Microbiol Infect Dis* 2007;13:354-62.
180. Pachon Ibanez ME, Jimenez Mejias ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachon J. Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. *Antimicrob Agent Chemother* 2004;48:4479-81.
181. Navon Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:772-4.
182. Villegas MV, Kattan NJ, Correa A, Karen L et al. and the Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* Clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian Hospitals. *Antimicrob Agent Chemother* 2007;51:2001-4.
183. Lee K, KIM MN, Choi TY, Cho S et al. and KONSAR Group. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:520-4.
184. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, Soroush S, Mohammadi-Yegane S. Antimicrobial susceptibility patterns and ditrubition of blaOXA genes among *Acinetobacter* spp. isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect Dis* 2008;61:274-8.
185. Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, Xu Y, Zhu Y. Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese Hospitals. *Antimicrob Agent Chemother* 2007;51:4022-8.

186. Kuo HY, Yang CM, Lin MF, Cheng WL, Tien N, Liou ML. Distribution of *bla*OXA-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in 3 hospitals in Taiwan. *Diag Microb Infect Dis* 2010;66:195-9.
187. Yang SC, Chang WJ, Chang YH, Tsai YS, Yang TP, Juan CW, Shiau MY. Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in central Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:601-4.
188. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Ronald N, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:55-9.
189. Papa A, Koulourida V, Souliou E. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Newly Established Greek Hospital. *Microbial Drug Resistance* 2009;15(4):257-60.
190. Morovat T, Bahram F, Mohammad E, Setareh S, Feizabadi MM. Distribution of different carbapenem resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in Tehran Hospitals. *New Microbiologica* 2009;32:265-71.
191. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M and ARPAC Steering Group. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:161-7.
192. Evans BA, Hamouda A, Amyes SGB. OXA-type beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii*: emerging from the shadow of the extended-spectrum beta-lactamases. *Rev Med Microbiol* 2007;18(4):63-72.