

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**METALLO BETA LAKTAMAZ ÜRETEN  
ACİNETOBACTER KÖKENLERİNDE MEROPENEM AMİKASİN  
KOMBİNASYONUNUN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet ESATOĞLU

**Danışman**

Doç.Dr. Burçin ÖZER

**HATAY-2013**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**METALLO BETA LAKTAMAZ ÜRETEN  
ACİNETOBACTER KÖKENLERİNDE MEROPENEM AMİKASİN  
KOMBİNASYONUNUN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet ESATOĞLU

**Danışman**

Doç.Dr. Burçin ÖZER

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
1202 Y 0103 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY – 2013**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**METALLO BETA LAKTAMAZ ÜRETEN  
ACİNETOBACTER KÖKENLERİNDE MEROPENEM AMİKASİN  
KOMBİNASYONUNUN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Mehmet ESATOĞLU

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından ....../....../ 2013 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:** Jüri başkanı: Doç. Dr. Nizami DURAN  
Üye: Doç. Dr. Burçin ÖZER (Danışman)  
Üye: Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK

Bu tez, Enstitümüz (Tıp) Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında ilgisini, anlayışını, her konuda desteğini ve bilgilerini benden esirgemeyen, tez çalışmalarımın baştan sona büyük bir titizlikle yürütülmesini sağlayan değerli danışman hocam Doç. Dr. Burçin ÖZER'e,

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile her zaman desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Doç. Dr. Nizami DURAN'a,

Tez çalışmamdaki verilerin istatistiksel dönüşümü ve değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Cahit ÖZER'e,

Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarından Dilek Bilgin, Dilek Karakaplan, Süreyya Ezer ve İlkay Atasoy'a yardımlarından ve samimi desteklerinden dolayı,

Yardımları, dostlukları ve bilgi paylaşımlarından dolayı değerli arkadaşlarım Cansu ÖNLEN, Hayat ASLAN, Naciye ERYILMAZ, Saadet Merve OCAK, Burcu GÜLKAN, Esra KARAYİĞİT'e,

İlgi ve desteklerini her fırsatta sunan Arş. Gör. Dr. Gülcan ERKASLAN ALAGÖZ, Arş. Gör. Dr. Şeyda ÖZARSLAN KURTGÖZ'e,

Varlıklarıyla hayatıma can katan aileme

Teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Acinetobacter</i> Cinsi Bakteriler	3
2.1.1. Taksonomi ve Tarihçe	3
2.1.2. Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler	3
2.1.3. Klinik Önemi ve Epidemiyolojisi	4
2.1.4. Patogenez ve Virülans	5
2.1.5. Antibiyotik Duyarlılıkları	7
2.1.6. Laboratuvar Tanısı	7
2.1.7. Tedavi	9
2.1.8. <i>Acinetobacter</i> 'lerde Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	10
2.1.8.1. Beta laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	10
2.1.8.1.1. Beta laktamaz üretimiyle oluşan direnç	11
2.1.8.1.2. Aminoglikozidlere Karşı Direnç Mekanizmaları	14
2.1.8.1.3. Florokinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları	14
2.1.8.1.4. Polimiksinlere Karşı Direnç Mekanizmaları	14
2.1.8.1.5. Tetrasiklin ve Glisilsiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları	15
2.1.8.1.6. Kloramfenikol ve Diğer Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	16
2.1.8.2. Çoklu İlaç Direncinden Sorumlu Mekanizmalar	16
2.2. Metallo-Beta Laktamazlar (MBL)	17
2.2.1. Metallo-beta laktamazların sınıflandırılması	18
2.2.1.1. Kromozomal Kodlanan MBL' ler	19
2.2.1.2. Transfer Edilebilen MBL' ler	19
2.2.1.2.1. IMP Tipi MBL' ler	19
2.2.1.2.2. VIM Tipi MBL' ler	20
2.2.1.2.3. SPM-1 Tipi MBL' ler	21
2.2.1.2.4. GIM-1 Tipi MBL' ler	21
2.2.2. Metallo Beta Laktamazların Biyokimyası	22
2.2.3. MBL varlığının araştırılması	23
2.2.3.1. Fenotipik MBL Tespit Yöntemleri	23
2.2.3.1.1. Modifiye Hodge Testi	23
2.2.3.1.2. Kombine Disk Difüzyon Testi	23
2.2.3.1.3. Çift Disk Sinerji Testi	23
2.2.3.1.4. MBL E Test Yöntemi	24
2.2.3.1.5. Mikrodilüsyon Yöntemi	24
2.2.3.2. Genotipik MBL Enzim Üretiminin Gösterilmesi	24

2.3. Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini ölçen testler	25
2.3.1. Checkerboard (Dama tahtası) Yöntemi	25
2.3.2. Zamana bağlı öldürme (time-kill) Yöntemi	26
2.3.3. E test Yöntemi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Bakteri İzolatları	28
3.2. Çalışmada Kullanılan Başlıca Malzemeler	28
3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasalların Hazırlanması	29
3.3.1. EMB Agar	29
3.3.2. Mueller Hinton Agar	29
3.3.3. Mueller Hinton Broth	30
3.3.4. Mg <sup>++</sup> Stok Solüsyonu	30
3.3.5. Ca <sup>++</sup> Stok Solüsyonu	30
3.3.6. Katyonik Mueller Hinton Broth	30
3.3.7. Koyun Kanlı Agar	31
3.3.8. Meropenem Stok Solüsyonu	31
3.3.9. Amikasin Stok Solüsyonu	32
3.3.10. Bakteri İnokülümünün Hazırlanması	32
3.4. MBL Varlığının E test Yöntemiyle araştırılması	33
3.5. Meropenem ve Amikasin Kombinasyonunun In Vitro Etkinliğinin Ölçülmesi	34
3.5.1. E test Yöntemi	34
3.5.2. Dama Tahtası Yöntemi	36
3.5.2.1. Minimal Bakterisidal Konsantrasyonun Saptanması	44
3.5.2.2. İstatistik	44
4. BULGULAR	45
4.1. MBL E test Yöntemi Sonuçları	45
4.2. Meropenem ve Amikasin Kombinasyonunun In Vitro Etkinliğinin Ölçülmesi	48
4.2.1. E test Yöntemi Sonuçları	48
4.2.2. Dama Tahtası Yöntemi Sonuçları	50
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ	73
7. KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	83

## Şekiller Dizini

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1. Farklı MBL tiplerinin Dünya çapındaki dağılımı.....	22
Şekil 3.1. E test yöntemiyle MBL pozitif bulunan bir köken .....	33
Şekil 3.2. E test yöntemiyle MBL negatif bulunan bir köken .....	34
Şekil 3.3. Amikasin ve meropenem ekleme sonrası mikropleyt çukurlardaki son konsantrasyonlar .....	38
Şekil 3.4. Sinerjik etkileşim gösteren bir kökenin mikropleyt ve grafiksel görünümü .....	40
Şekil 3.5. Aditif etkileşim gösteren bir kökenin mikropleyt ve grafiksel görünümü .....	40
Şekil 3.6. Antagonist etkileşim gösteren bir kökenin mikropleyt ve grafiksel görünümü ..	40
Şekil 3.7. Bir kökeninin dama tahtası yöntemiyle hazırlanan mikropleyt görünümü .....	41
Şekil 3.8. Dama tahtası yöntemiyle aditif bulunan MBL pozitif bir kökenin mikropleyt görünümü .....	42
Şekil 3.9. Dama tahtası yöntemiyle sinerjik bulunan MBL pozitif bir kökenin mikropleyt görünümü .....	43
Şekil 3.10. Dama tahtası yöntemiyle sinerjik bulunan MBL negatif bir kökenin mikropleyt görünümü .....	43
Şekil 3.11. Dama tahtası yöntemiyle aditif bulunan MBL negatif bir kökenin mikropleyt görünümü .....	44
Şekil 4.1. A; Sinerjik etkileşim saptanan bir kökenin meropenem varlığındaki amikasin MİK değeri.....	49
Şekil 4.1. B; Sinerjik etkileşim saptanan bir kökenin amikasin varlığındaki meropenem MİK değeri.....	49
Şekil 4.2. A; Aditif etkileşim saptanan bir kökenin meropenem varlığındaki amikasin MİK değeri .....	49
Şekil 4.2. B; Aditif etkileşim saptanan bir kökenin amikasin varlığındaki meropenem MİK değeri. ....	49
Şekil 4.3. A; Antagonist etkileşim saptanan bir kökenin meropenem varlığındaki amikasin MİK değeri.....	50
Şekil 4.3. B; Antagonist etkileşim saptanan bir kökenin amikasin varlığındaki meropenem MİK değeri.....	50
Şekil 4.4. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan amikasin MİK değerleri .....	53
Şekil 4.5. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan meropenem MİK değerleri.....	53

Şekil 4.6. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan FİK max değerleri .....	54
Şekil 4.7. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan amikasin MBK değerleri .....	54
Şekil 4.8. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan meropenem MBK değerleri .....	55
Şekil 4.9. MBL pozitif ve negatif kökenlerde otomatize sistem ile saptanan meropenem MİK değerleri. ....	55
Şekil 4.10. MBL pozitif ve negatif kökenlerde otomatize sistem ile saptanan imipenem MİK değerleri. ....	56
Şekil 4.11. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan FİKmin değerleri. ....	56
Şekil 4.12. MBL pozitif ve negatif kökenlerde otomatize sistem ile saptanan amikasin MİK değerleri. ....	57



## Çizelgeler Dizini

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 2.1. Yaygın <i>Acinetobacter</i> türlerinin ayırımında kullanılan testler .....	8
Çizelge 2.2. Beta laktamazların sınıflandırılması .....	12
Çizelge 4.1. <i>Acinetobacter</i> kökenlerinin izole edildiği klinik örneklerle ve servislere göre dağılımı .....	45
Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen <i>Acinetobacter</i> kökenlerinin tür dağılımı .....	46
Çizelge 4.3. MBL pozitif ve negatif kökenlerin izole edildikleri hasta örneklerinin gönderildiği klinikler .....	46
Çizelge 4.4. MBL pozitif ve negatif kökenlerin izole edildikleri klinik örneklerin dağılımları .....	47
Çizelge 4.5. MBL pozitif ve negatif kökenlerde imipenem, meropenem ve amikasin direnç durumları .....	47
Çizelge 4.6. MBL pozitif ve negatif kökenlerin amikasin meropenem ve imipenem için MİK 50 ve MİK 90 değerleri .....	48
Çizelge 4.7. MBL pozitif ve negatif kökenlerde ÇİD durumu .....	48
Çizelge 4.8. E test ve dama tahtası yöntemiyle kökenlerdeki meropenem ve amikasin etkileşimleri .....	50
Çizelge 4.9. MBL pozitif ve kökenlerde antibiyotik kombinasyon sonuçları .....	51
Çizelge 4.10. MBL pozitif ve negatif kökenlerde dama tahtası yöntemiyle meropenem amikasin kombinasyonunun etkinliği .....	51
Çizelge 4.11. Aditif/indiferan ve sinerjik bulunan kökenlerde mikrodilüsyon ve otomatize sistemle belirlenen meropenem-amikasin MİK değerleri ortanca değerleri ..	52
Çizelge 4.12. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon FİK, MBK ve MİK değerleri .....	52
Çizelge 4.13. MBL pozitif kökenlerde sinerjistik etkileşim saptanan amikasin meropenem konsantrasyonları .....	58
Çizelge 4.14. MBL negatif kökenlerde sinerjistik etkileşim saptanan amikasin meropenem konsantrasyonları .....	59
Çizelge 4.15. MBL pozitif kökenlerde E test ve Mikrodilüsyon yöntemlerinin sonuçları ..	60
Çizelge 4.16. MBL negatif kökenlerde E test ve Mikrodilüsyon yöntemlerinin sonuçları ..	62

## Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

AbOmpA	: <i>Acinetobacter baumannii</i> Dış Membran Protein A
AK	: Amikasin
CLSI	: Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü
ÇİD	: Çoğul İlaça Dirençli
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FİK	: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu
IP	: İmipenem
IPİ	: İmipenem-EDTA
KAMHB	: Katyonik Mueller Hinton Broth
KIA	: Krigler Demir Agar
MATE	: Çoklu İlaç ve Toksik Bileşik Atımı
MBK	: Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
MBL	: Metallo Beta Laktamaz
MEM	: Meropenem
MFS	: Major Kolaylaştırıcı Süper Aile
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MPA	: Merkaptopropionik Asit
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
RND	: Direnç Nodül Hücresi Üst Ailesi
SMA	: Sodyum Merkptoasetik
TSB	: Triptik Soy Broth
TSI	: Üç Şekerli Demirli Besiyeri
VİP	: Ventilator İlişkili Pnömoni
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
Zn	: Çinko

## ÖZET

### **Metallo Beta Laktamaz Üreten *Acinetobacter* Kökenlerinde Meropenem Amikasin Kombinasyonunun Etkinliğinin Araştırılması**

Nozokomiyal infeksiyonlara sebep olan türler arasında ilk sıralarda yer alan *Acinetobacter* türlerine karşı kullanılan antimikrobiyal ajanların tedavideki yetersizliği, klinisyenleri, sinerji gösteren antibiyotik kombinasyonu kullanımına yönlendirmektedir. Bu çalışmada, Mustafa Kemal Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli bölümlerden gönderilen klinik örneklerden izole edilen metallo beta laktamaz (MBL) üreten *Acinetobacter* kökenlerinde meropenem ve amikasin kombinasyonunun etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Kökenlerdeki MBL varlığı E test yöntemiyle araştırıldı. MBL pozitif ve negatif 50'şer köken çalışmaya dahil edildi. Meropenem amikasin kombinasyon aktivitesi MBL pozitif 50 kökende E test ve dama tahtası yöntemiyle, MBL negatif 50 kökende ise dama tahtası yöntemiyle araştırıldı. Kökenlerin Vitek 2 otomatize sistemle belirlenen antimikrobiyal duyarlılıklarına göre 50 MBL pozitif kökenin %94'ünün meropeneme, %88'inin imipeneme, %40'ının amikasin dirençli olduğu tespit edildi. 50 MBL negatif kökenin ise direnç oranları meropenem için %60, imipenem için %54, amikasin için %46 olarak saptandı. E test yöntemiyle 50 MBL pozitif kökenin %76'sında aditif/indiferan, %14'ünde sinerjistik, %10'unda antagonist etkileşim saptandı. Dama tahtası yöntemiyle 50 MBL pozitif kökende %74 aditif/indiferan, %26 sinerjik ve 50 MBL negatif kökende %72 sinerjik, %28 aditif/indiferan etkileşim tespit edilmiş olup MBL pozitif ve negatif hiçbir kökende antagonist etkileşim saptanmadı. MBL pozitif kökenlerde her iki yöntem sonuçları arasında fark bulunmayarak, test sonuçları uyumlu bulundu. MBL üreten kökenlerde her iki yöntemle tespit edilen ortalama %20 sinerjik etkileşim değerlendirildiğinde, bu kökenlerin oluşturduğu infeksiyonlara karşı uygulanan tedavide bu kombinasyonun bir tercih olmayacağı düşünüldü. MBL üretmeyen *Acinetobacter* türlerine karşı meropenem/amikasin kombinasyonu ile tespit edilen %72 oranındaki sinerjik etkileşim dikkate alındığında MBL negatif kökenlerde bu kombinasyonla tedavide iyi sonuçlar alınabileceği ancak daha ileri klinik çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna ulaşıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter*, amikasin, meropenem, E test, dama tahtası.

## ABSTRACT

### **Investigation the Effectiveness of Meropenem Amikacin Combination in Metallo Beta Lactamase Producing *Acinetobacter* Strains.**

The failure in the treatment of *Acinetobacter* strains which are among the bacteria that cause nosocomial infections, directed clinicians to use of a combination of antibiotics indicating synergy. In this study, it was aimed to investigate the effectiveness of the combination of meropenem and amikacin against metallo beta lactamase producing *Acinetobacter* strains isolated from clinical specimens which were sent to Mustafa Kemal University Hospital Microbiology Laboratory from various departments. The presence of metallo beta lactamase in strains was detected by E test method. 50 MBL positive and 50 MBL negative strains were included in the study. Activity of meropenem in combination with amikacin against 50 MBL-positive isolates was investigated by E test and the checkerboard methods, against MBL negative 50 isolates was investigated by the checkerboard method. According to antimicrobial susceptibilities of strains which were detected by Vitek 2 automated system; 94%, 88% and 40% of 50 MBL positive strains were detected as resistant to meropenem, imipenem and amikacin respectively. And 60%, 54% and 46% of 50 MBL negative strains were detected as resistant to meropenem, imipenem and amikacin respectively. Additive/indifferent, synergistic and antagonistic interactions to 76%, 14% and 10% of 50 MBL-positive strains were detected by E-test method respectively. Also additive/indifferent and synergistic interactions to 74% and 26% of 50 MBL-positive strains and synergistic, additive/indifferent interactions to 72% and 28% were determined by checkerboard method. Antagonistic interaction against none of MBL positive and negative strains were detected by checkerboard method. In MBL positive strains no difference between the results of checkerboard and E test method was found and they were found compatible for MBL positive strains. When about 20% synergistic interaction against MBL-producing strains detected by both methods were evaluated, it was thought this combination will not be a choice of therapy that use in infections caused by these strains. According to the rate of 72% synergistic interaction, it was concluded that good results can be obtained with meropenem and amikacin combination therapy against MBL non producing *Acinetobacter* spp. but further clinical studies are needed.

**Key words:** *Acinetobacter*, amikacin, meropenem, E test, checkerboard.

## 1. GİRİŞ

Doğada yaygın olarak toprak, su, nemli ortamlar ve en önemlisi hastane ortamı florasında bulunabilen fırsatçı patojen olan *Acinetobacter* türleri, immun sistemi baskılanmış bireylerde ve özellikle yoğun bakım ünitesi (YBÜ)'nde yatan hastalarda ciddi infeksiyonlara ve yüksek mortaliteye neden olan en önemli bakterilerdendir. Başlıca nozokomiyal bakteriyemi, sekonder menenjit, ventilatör ilişkili pnömoni (VİP), kateter infeksiyonları, kan dolaşım yolu infeksiyonları ve üriner sistem infeksiyonlarına neden olmaktadır. Bu infeksiyon salgılarında en sık izole edilen ve antibiyotiklere en dirençli tür *Acinetobacter baumannii*'dir (Gürler ve ark. 2008).

*Acinetobacter* türleri, kuru ortamlara dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH değerlerine tolerans göstermeleri ve en önemlisi yeni geliştirilen antimikrobiyaller de dahil olmak üzere klinik kullanımda olan çoğu antibiyotiklere karşı çoğul direnç geliştirmeleri nedeniyle tedavide sorun çıkarmaktadır. Özellikle hasta sirkülasyonunun ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının yüksek olduğu YBÜ'lerde bu sorun daha fazla önem arz etmektedir (Topçu ve ark. 2002).

Beta laktam antibiyotikler *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde sık kullanılmalarına karşın bu antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirme oranı dünya genelinde giderek artmaktadır (Lee ve ark. 2011, Eliopoulos ve ark. 2008). *Acinetobacter* kökenlerine karşı en sık kullanılan beta laktam antibiyotiklerine bu kökenlerin büyük oranda direnç kazanması beta laktamaz üretimlerine bağlıdır (Murray ve ark. 2003). Özellikle metallo beta laktamaz (MBL) üreten kökenler aztreonam dışındaki tüm beta laktam antibiyotikleri hidroliz edebilme yeteneğindedir (Lee ve ark. 2011). Bu kökenler karbapenemlere, sefalosporinlere ve sefamisinlere karşı direnç gösterirler, bu durum MBL üreten *Acinetobacter* kökenlerinin tedavisinde karbapenem kullanımını kısıtlamaktadır (Gürler 2008, Akalın 2003).

Dolayısıyla ciddi *Acinetobacter* infeksiyonlarının farklı mekanizmalarla etki eden ve sinerjik etki gösteren iki antibiyotik ile tedavi edilmesi gerekliliği artık genel olarak kabul edilmiş olup, buna paralel bir sonuç olarak günümüzde kombine antibiyotik kullanılması bir zorunluluk halini almıştır. Ciddi *Acinetobacter* infeksiyonlarında bir beta

laktam ile beraber bir aminoglikozid veya bir florokinolon kombinasyonu bir seçenek olabilmektedir (Gürler 2008, Akalın 2003).

Bu çalışmada Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen metallo beta laktamaz üreten *Acinetobacter* kökenlerinde meropenem ve amikasin kombinasyonunun etkinliğinin araştırılması ve metallo beta laktamaz üretmeyen *Acinetobacter* kökenlerindeki meropenem ve amikasin kombinasyonunun etkinliği ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Acinetobacter* Cinsi Bakteriler

Çoğunlukla nozokomiyal infeksiyonlara sebep olan ve buna bağlı ciddi mortalite ve morbidite gösteren *Acinetobacter* türleri, son yıllarda klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarından izole edilmeye başlanan en yaygın ikinci nonfermentatif Gram negatif bakteri grubu patojenik mikroorganizmalardır (Topçu ve ark. 2002).

#### 2.1.1. Taksonomi ve Tarihçe

*Acinetobacter* 'ler çoğu araştırmacı tarafından farklı isimlerde tanımlanmış ve uzun süre değişik cinslerin içerisinde yer almıştır. Bu cinsler; *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Diplococcus*, *Cytophaga*, *Bacterium*, *Herellea*, *Mima*, *Micrococcus*, *Moraxella* ve *Neisseria* 'dır (Winn ve ark. 2006, Berezin ve Towner 1996 ).

Brisou ve Pre'vot 1954'de genel besiyerlerinde kolayca üreyen, çomak ya da kokoid formda gözlenen bu mikroorganizmalar arasında bazılarının hareketsiz olduklarını göstermişler ve Yunanca hareketsiz anlamına gelen "Akinetos" sözcüğünden esinlenerek bu bakterilere "*Acinetobacter*" adını vermişlerdir (Başustaoğlu ve Özyurt 1998, Berezin ve Towner 1996).

Taksonomik çalışmalar sonucu *Acinetobacter* cinsi günümüzde *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır. Yirmi iki farklı genomik türde *Acinetobacter* cinsi tanımlanmakla birlikte klinik olarak en çok izole edilen ve en sık infeksiyonlara yol açan *Acinetobacter baumannii* türüdür (Espinal ve ark. 2011).

#### 2.1.2. Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler

*Acinetobacter* cinsi bakteriler; optimum 35-37°C'de üreyen nonfermentatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, deoksiribonükleaz, indol negatif, nitratları redükte etmeyen, zorunlu aerob üreyen Gram negatif mikroorganizmalardır (Bahar ve Esen 2008, Topçu ve

ark. 2002). Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar. Flajellaları yok ama fimbriaları vardır ve hareketsizdirler.

*Acinetobacter* cinsi bakteriler antibiyotik içeren (örneğin penisilin) katı besiyerlerinde ve sıvı besiyerlerinde üremenin logaritmik fazında 1-1.5 x 1,5-2,5 µm boyutlarında basil, üreme dışında ise kok şeklinde, daha çok kokobasil, ikişerli, küme halinde veya kısa zincir olarak görüldüğünden Gram boyalı preparatların incelenmesinde *Haemophilus* ve *Neisseria* türleri ile karıştırılabilir. Ayrıca pozitif kan kültür şişesinden hazırlanan preparatlarda kristal violeyi tutmaya eğilimli olduklarından yanlışlıkla Gram pozitif kok olarak tanınırlar (Topçu ve ark. 2002, Bilgehan 1995).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan koyun kanlı agar, triptik soy agar ve McConkey agar besiyerlerinde kolayca ürerler. MacConkey agarda ve Eozin Metilen Blue agar (EMB)'da laktoz negatif koloniler oluştururlar. Opak görünümünde bazen mukoid, pigmentsiz, S tipi koloniler meydana getirirler. Kanlı agardaki kolonileri 24 saat sonunda 2-3 mm çapına ulaşır ve bazı türler (*A.haemolyticus*) hemolitik özellik gösterebilirler. Ayrıca bu türlerde sıklıkla kapsül oluşumu da gözlenmektedir (Schreckenberger ve ark. 2007, Topçu ve ark. 2002, Bilgehan 2000).

### **2.1.3. Klinik Önemi ve Epidemiyolojisi**

Kısa süre içerisinde çoğu antibiyotik gruplarına direnç kazanan *Acinetobacter* türleri ve sıklıkla *A. baumannii*, nozokomiyal infeksiyonların sorumlusu olarak hastanelerde yaptığı küçük salgınlar nedeniyle son 20 yılda dünya genelinde ortak bir sorun haline gelmiştir (Dal ve ark. 2012).

Diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında *Acinetobacter* türleri kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH derecelerinde yaşayabilme özellikleri ile cansız yüzeylerde günlerce canlılıklarını sürdürebilmektedirler (Ayan ve ark. 2003). Doğada yaygın olarak görülen bu türler, vücudun nemli bölgeleri başta olmak üzere normal deri florasında yaşadıklarından klinik örneklerden sıklıkla izole edilmektedirler. Normal sağlıklı bireylerin yaklaşık % 25'inin derisinde kolonize olan bu fırsatçı patojenler, hastane personelinin ciltlerinden en sık izole edilen Gram negatif organizmalardır



(Schreckenberger ve Graevenitz 1999). Faringeal kolonizasyon ise %7 oranında görülmektedir. Ayrıca sağlıklı insanların ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde de bulunduğu gösterilmiştir. Çoğunlukla balgam, idrar ve dışkıdan alınan örneklerde çoğul ilaca dirençli (ÇİD) *Acinetobacter* türlerinin varlığı tespit edilir (Berezin ve ark. 1996, Allen ve Hartman 2000).

Sağlık personeli, rezervuar insanlar ve cansız materyaller, hastalar arasında çapraz kontaminasyon için uygun bir ortam sağlamaktadır. Uzun süre hastanede yatmak, cerrahi takiben endotrakeal tüp takılması, intravasküler, ventriküler veya üriner kateter uygulaması, invaziv alet varlığı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, parenteral beslenme ve mekanik ventilasyon gibi işlemler *Acinetobacter* infeksiyonları için risk faktörü oluşturur (Schreckenberger ve ark. 2007, Allen ve Hartman 2000).

Öncelikli olarak pnömoni, sepsis, menenjit, bakteriyemi, üriner sistem ve yumuşak doku infeksiyonları ve periton diyalizi alan hastalarda peritonit etkeni olarak ciddi sorunlar yaratırlar. Sporadik olarak konjunktivit, osteomyelit ve sinovit olgularına da rastlanmaktadır (Winn ve ark. 2006).

Türkiye’de *A. baumannii*, hastane kökenli pnömoni etkenleri arasında %24 oran ile ilk sırada yer alırken (Akalin ve ark. 1999), *Acinetobacter*’lere bağlı nozokomiyal infeksiyonlarda mortalite oranı yüksek olup değişkenlik göstermektedir (Metan ve ark. 2007).

#### **2.1.4. Patogenez ve Virülans**

Son yıllarda *Acinetobacter baumannii* daha dirençli ve virülan hale gelerek ciddi nozokomiyal bir tehdit oluşturduğundan sebep olduğu infeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde yaşanan zorlukların aşılması adına sadece antimikrobiyal ajanlara direnç mekanizmalarının değil, aynı zamanda bakteri tarafından eksprese edilen virülans mekanizmalarının yapı ve işlevlerinin de anlaşılması gerekmektedir (Towner 2009).

Epitel hücrelerine tutunmada rol alan adezyon molekülleri olan “fimbria” ve “*Acinetobacter baumannii* Outer Membrane Protein A”(AbOmpA), K1 tipi kapsül yapısı,

lipolitik ve sitotoksik aktivite gösteren ekstraselüler enzimlerin varlığı, N-açıl homoserin lakton yapısındaki sinyal moleküllerinin rol oynadığı “Quorum Sensing” (QS) sistemi ve cansız yüzeylerde uygun olmayan çevresel koşullarda (kuruluk, düşük ısı, sınırlı besin miktarı) uzun süre yaşayabilmesine olanak sağlayan hücresel komponentlerinin varlığı virülans faktörleri arasında sayılabilir (Howard ve ark. 2012, Kimn ve ark. 2008).

Son yıllarda ise epitelyum hücreleri üzerinde apopitotik etki gösteren AbOmpA, tip-I pililer ve AbOmpA proteininin katkıda bulunduğu biyofilm oluşumu; siderofor aracılı (acinetobactin) ve hemin sistemlerinin etkili olduğu demir kazanım mekanizmaları da halen çalışılmakta olan virülans faktörleridir (Howard ve ark. 2012, Choi ve ark. 2008).

*Acinetobacter* türlerinde bulunan lipopolisakkarid yapıdaki O antijeni, yapısındaki tekrarlayan deoksi-amino şekerler ve bu polimerlerin çoğunda var olan yapısal dallanmalar nedeniyle hidrofobik özellik göstermektedir. Bu kapsamda Lee ve ark. (2006) tarafından *Acinetobacter* kökenlerinde yapılan çalışmalarda, bazı kökenlerin insan ağız içi epitel hücrelerine hidrofobik yüzey bileşenleri aracılığıyla tutunduğu gösterilmiş, bu tutunmada ince fimbria ve polisakkarid kapsül benzeri yapıların rol oynadığı bildirilmiştir (Tomaras ve ark. 2008, Lee ve ark. 2006).

Ökaryotik hücrelere direkt olarak bağlanan AbOmpA; sitokrom c ve apoptozu indükleyici faktör gibi proapoptotik moleküllerin salınımı sonucu ürettiği sinyallerle, epitel hücrelerinin apoptozuna neden olmaktadır. (Choi ve ark. 2008). Epitel hücrelerinin AbOmpA ile etkileşimi, *A. baumannii* infeksiyonunun erken dönemi süresince oluşan doğal immün yanıt üzerinde oldukça önemli etkiye sahiptir (Kim ve ark. 2008). Yapılan bir çalışmada AbOmpA'nın, dendritik hücre aktivasyonu ve olgunlaşmasını indükleyerek *A. baumannii*'ye karşı oluşan immün yanıtın doğasını belirleyen en önemli özellik olan CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin Th1 yönünde kutuplaşmasına yol açtığı saptanmıştır (Lee ve ark. 2007).

Pilus ve Biyofilm-İlişkili Protein; yüzey adezyon proteininin üretimi, abiyotik yüzeye ilk yapışmayı takiben biyofilm oluşumu ve olgunlaşmasında rol oynar (Gaddy ve ark. 2009). Çoklu ilaç direnci gösteren izolatların belirgin bir şekilde fazla biyofilm oluşturduğu ve bunun diğer membran proteinlerinin birikimi ile ilişkili olduğu görülmüştür (Gordon ve Wareham, 2010). PER-1 beta laktamaz geni taşıyan *A. baumannii* kökenlerinin

biyofilm oluşturma ve epitel hücrelere yapışma kapasitesinin bu geni içermeyen kökenlere göre daha fazla olduğu belirtilmektedir (Lee ve ark. 2008).

*A. baumannii* kökenleri; ortamda bol olmasına rağmen çoğalması sırasında hazırda bulunmayan demir bileşiklerini, demir kazanım kapasitelerindeki farklılığa göre siderofor aracılı ve/veya hemin kazanım fonksiyonlarını eksprese ederler (Tomaras ve ark. 2008) Eksprese edilen sideroforlar, bakterinin demir kazanımının yanı sıra, enfekte olmuş konakta hücre hasarına neden olarak virülans faktörü özelliği gösterir (Wandersman ve Delepelaire, 2004). Sırasıyla *bauA* ve *basD* genleri asinetobaktin transportu ve biyosentezinden, *barA* ve *barB* ise siderofor salınımından sorumlu genlerdir (Zimble ve ark. 2009).

### **2.1.5. Antibiyotik Duyarlılıkları**

Çeşitli antibiyotiklere dirençli olma eğilimi gösteren *Acinetobacter* türlerinin klinik izolatları genel olarak penisilin, ampisilin, sefalotin, kloramfenikole dirençlidirler. Ayrıca 2. ve 3. kuşak sefalosporinlere, aynı zamanda trimetoprim-sulfametoksazole değişen oranlarda direnç gösterirler.

*Acinetobacter*'e karşı en etkili antibiyotiklerden olan karbapenemlerin etkinliği son dönemde azalmaya başlamıştır (Ferrara 2006). Son yıllarda, artan oranda aminoglikozid ve karbapenem direnci de bulunduran ÇİD *Acinetobacter* kökenleri gösterilmektedir (Winn ve ark. 2006).

*Acinetobacter baumannii* klinik kökenlerinde 1980 yılı itibariyle antibiyotik direnci giderek artmaktadır (Paterson 2006). Ama direnç oranları bölgeden bölgeye hatta hastaneden hastaneye göre değişiklik göstermektedir.

### **2.1.6. Laboratuvar Tanısı**

*Acinetobacter*'ler nonfermentatif Gram negatif bakterilerdir ve bu bakterilerin ortak biyokimyasal özelliği, enerji kaynağı olarak karbohidratları kullanmamaları yani glikoz fermentasyonu yapmamasıdır. 24 saatte Krigler iron agar (KIA) veya TSI agar yüzeyinde ürediklerinden burada sarı renkte görünürler fakat buna karşı dip ve eğik kısımda

üreyemediklerinden ve asit oluşturmamadıklarından bu bölgede de kırmızı renkte görünürler (Winn 2006).

Diğer nonfermantatif bakterilerden ayırmada kullanılacak ilk test oksidaz testidir. *Acinetobacter* türleri oksidaz negatiftir.

*Acinetobacter* cinsi bakteriler laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan koyun kanlı agar, triptik soy agar ve McConkey agar besiyerlerinde kolay ürerler. Koyun kanlı agarda 0,5-2 mm çapında, şeffaf veya opak, S tipi koloniler oluştururken bazı türler (*A. haemolyticus*) hemoliz yapar. Ayrıca MacConkey agarda ve EMB agarda laktoz negatif koloniler oluştururlar (Schreckenberger ve ark. 2007).

Klinik örneklerin tanısında çeşitli seçici–ayırtedici besiyerleri kullanılır. Bunlar; Bromkrezol moru, safra tuzları, laktoz ve maltoz şekerleri içeren Herellea agar ve Leeds *Acinetobacter* Besiyeri’dir (Jawad ve ark. 1994).

*Acinetobacter* tür ayrımı ise rutin laboratuvar koşullarında birtakım biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre yapılır (Çizelge 2.1). Glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 44°C’de üreyebilen kökenler *A. baumannii*’dir (Koneman ve ark. 2006).

**Çizelge 2.1.** Yaygın *Acinetobacter* türlerinin ayırımında kullanılan testler.

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

Epidemik kökenlerin tiplendirilmesinde; antibiyotik duyarlılık testleri, serotiplendirme, faj tiplendirme, bakteriyofajlardan, bakteriyosinlerden, plazmid ve protein profillerinden multilokus enzim elektroforezi, pulse-field jel elektroforezi (PFGE), polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), rastgele amplifiye polimorfik DNA analizi (RAPD) gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır (Seifert ve ark. 1993).

### 2.1.7. Tedavi

*Acinetobacter* türlerinin tedavisinde karbapenem grubu antibiyotikler, sulbaktam, minosiklin, tigesiklin ve kolistin en etkin antibiyotikler olmakla birlikte ciddi infeksiyonların tedavisinde bir beta laktam ile beraber bir aminoglikozid ya da bir florokinolon kombinasyonu önerilmektedir (Gürler 2008, Akalın 2003).

*Acinetobacter* türlerinde ve özellikle *A. baumannii*'de günden güne artan çoklu antibiyotik direnci ve hatta panrezistanlık durumu, oluşturdukları infeksiyonların tedavisinde güçlükler yaratmaktadır. Monoterapi ile başarı oranlarının düşmesi artık ÇİD kökenlerin ortaya çıkışının önlenmesi ve tedavisinde sinerjik etki gösteren kombinasyonların kullanımını önemli kılmaktadır.

Sulbaktam/amikasin, kolistin/karbapenem, rifampin/imipenem kombinasyonlarının yanında, in vitro sinerji ve düşük direnç oranı göstermesinden dolayı imipenem/amino glikozid, seftazidim/aminoglikozid, seftazidim/florokinolon, imipenem/siprofloksasin, se foperozon/sulbaktam kombinasyonları en sık tercih edilen kombinasyonlardır (Maragakis ve ark. 2008, Schreckenberger ve ark. 2007).

In vitro ortamda yapılan çalışmalarda, karbapenemlere karşı orta düzeyde direnç gösteren *A. baumannii* kökenlerinde rifampisin/kolistin kombinasyonu sinerjik etkili bulunmuştur (Akalın 2003, Levin 2002, Hogg ve ark. 1998). Karbapenemlere karşı tam direnç gösteren *Acinetobacter* infeksiyonları için ise klinik tedavide imipenem/rifampinin kombinasyonu başarılı bulunmuştur (Saballs ve ark. 2006).

Yukarıda saydığımız antimikrobiyal ajanlara ek olarak *A. baumannii*'de aktif pompa sistemlerini inhibe eden birçok bileşik tanımlanmıştır. Bunlar arasında fenilalanil arginil  $\beta$  naftilamid ilk tanımlanan bileşik olup *A. baumannii*'de RND tipi pompa sistemlerini (AdeABC) inhibe ederek antibiyotik MİK değerlerini belirgin şekilde düşürmektedir (Winfried ve ark. 2006).

### **2.1.8. Acinetobacter' lerde Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları**

*Acinetobacter* türlerinin özellikle nozokomiyal kökenlerinde sıkça görülen direnç mekanizmaları; bakterinin genetik özelliği nedeniyle doğal (intrinsik) olarak ya da sonradan genetik yapısındaki birtakım değişimlere bağlı olarak kazanılmaktadır. Sonradan kazanılan direnç mekanizmaları kromozom, plazmid veya transpozon DNA'sında meydana gelen mutasyonlarla ya da direnç geni taşıyan DNA sekanslarının başka *Acinetobacter* kökenlerinden transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla alınması sonucu ortaya çıkar (Bonomo ve Szabo 2006, Cunha 2000).

*Acinetobacter*'lerde birçok antibiyotik direnç mekanizması mevcuttur. Başlıca olanları beta laktamaz üretimi, hücre membranındaki aktif pompa sistemleri, lipopolisakkarit tabakasında mutasyon, antibiyotik modifiye edici enzimlerin üretimi, ribozomal mutasyon-modifikasyon, dış membran porinlerinin kaybı ve hedefe yönelik nokta mutasyonlarıdır (Gordon ve Wareham 2010).

Direnç mekanizmalarının bazıları antibiyotiğe özgü direnç kazanımından sorumlu iken bazıları (aktif pompa sistemleri) ise çoklu ilaç direncinden sorumludur.

#### **2.1.8.1. Beta laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları**

*Acinetobacter* cinsi bakterilerin beta laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesinde en yaygın mekanizma kromozom veya plazmid kontrolünde beta laktamaz üretimidir. Bunun dışında penisilin bağlayan protein (PBP)' lerdeki değişiklikler ya da beta laktamlara duyarlı olmayan yeni PBP'lerin yapımı ve spesifik dış membran porinlerinin kaybı sayılabilir (Maragakis ve Perl 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre *A. baumannii*'nin çoklu ilaç direncinden sorumlu temel mekanizma aktif pompa sistemleridir. Özellikle AdeABC pompa sistemi, fazla miktarda sentezlendiğinde beta laktamlar başta olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişimine sebep olmaktadır (Lee ve ark. 2011, Wiecek ve ark. 2008).

### 2.1.8.1.1. Beta laktamaz üretimiyle oluşan direnç

Froley ve Chain adlı bilim adamlarının *E. coli*'den penisilinaz enzimini izole ettikleri 1940 yılından bu yana beta laktam antibiyotiklerin çok geniş ölçekte kullanımı, dirençli türlerle beraber yeni birçok beta laktamazın ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Jacoby 2006).

Moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidroliz etkinliği, substrat profili gibi özellikler bakımından birbirinden farklı 530'u aşkın beta laktamaz tanımlanmıştır. Beta laktamazlar penisilinler, sefalosporinler ve benzeri diğer beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek *Acinetobacter* türlerinde direnç gelişimine neden olurlar. Bu enzimler beta laktam halkasındaki karbonil grubu ile ester köprüsü kurup siklik amid bağımlı parçalarlar ve antibiyotiği etkisiz hale getirirler (Börjesson 2009).

Günümüzde beta laktamazların sınıflandırılmasında en çok Ambler ya da Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırılması kullanılmaktadır (Çizelge 2.2). Ambler (1980) enzimlerin kodlandığı nükleotid dizilerine dayanan moleküler sınıflandırmasına göre beta laktamazları A, B, C ve D olmak üzere dört grupta toplamıştır (Walther ve Hoiby, 2006). Bush ve arkadaşları (1995) ise beta laktamazları hidrolitik spektrumları ve klavulanik aside duyarlılıklarının temel alındığı biyokimyasal özelliklerine göre 1'den 4'e kadar gruplandırmışlardır.

**Çizelge 2.2.** Beta laktamazların sınıflandırılması (Sacha ve ark. 2008).

Fonksiyonel Mekanizma	Ambler sınıflandırması	Bush (Gruplar)	Örnekler	Substratlar
Serin beta laktamazlar	Sınıf A penisilinaz	2a, 2b, 2c	Geniş spektrumlu beta laktamazlar: TEM-1, TEM-2, SHV-1	Benzilpenisilin (penisilin), aminopenisilinler (amoksisilin, ampisilin), karboksipenisilinler (karboksipenisilin, tikarsilin), dar spektrumlu sefalosporinler (sefzolin, seforoksim ve diğerleri)
		2be	Genişletilmişspektrumlu betalaktamazlar (ESBL): TEM ve SHV sınıfı	Geniş spektrumlu beta laktamazların substratları, kloksasilin, metisilin ve oksasilinin substratları
			Diğer: BES-1, GES/IBC ailesi, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1/2	TEM ve SHV ailesinin substratları ile aynı
		2br	TEM ailesi (TEM-30, TEM-31) IRT	TEM ve SHV ailesi ile aynı
		2e	CTX ailesi	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların substratları, bazı enzimler için sefepim
		2f	Karbapenemazlar: (KPC-1, KPC-2 ve KPC-3; GES-1, GES-2)	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların substratları, sefamisinler ve karbapenemler (ertapenem, meropenem, imipenem)
Metallo beta laktamazlar	Sınıf B metallo beta laktamazlar	3a, 3b, 3c	Karbapenemazlar: IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2, GIM-1, ve L1, CcrA	Karbapenemaz sınıf A'nın substratları ile aynı
Serin beta laktamazlar	SınıfC sefalosporinazlar	1	AmpC-tip: AAC-1, ACT-1, CFE-1, CMY ailesi, DHA-1, DHA-2, FOX ailesi, LAT ailesi, MIR-1, MOX-1 ve MOX-2	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların substratları, sefamisinler
Serin beta laktamazlar	Sınıf D-kloksasilin hidrolize eden enzimler (OXA)	2d	OXA ailesinin çoğunluğu	Dar spektrumlu grup substratları, kloksasilin, metisilin ve oksasilin
			Diğer OXA: OXA-23, OXA-27 ve OXA-40, OXA-48	IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2 ve GIM-1 'in substratları ile aynı
Bilinmeyen		4	AVS-1	Herhangi bir fonksiyona veya moleküler gruba uymayan karışık veya tanımlanmamış enzimler



*Acinetobacter* kökenlerinde bulunan kromozomal kaynaklı enzimlerin büyük çoğunluğu Ambler sınıf C içerisinde yer alan sefalosporinazlardır. Bu enzimler 1., 2., 3. kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize ederler (Thomson ve Bonomo 2005).

*A. baumannii* intrinsik sınıf D oksasilinaz ve indüklenmeyen kromozomal AmpC sefalosporinaza sahiptir. Bu sefalosporinazlar bütün *A. baumannii* kökenlerinde mevcuttur ve günümüzde *Acinetobacter* kaynaklı sefalosporinazlar olarak da adlandırılırlar (Gordon ve Wareham 2010). *A. baumannii*'de bu enzimin aşırı derecede üretilmesinden “IS*AbaI*” adı verilen bir IS elementi sorumludur ve bu sayede geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç gelişmektedir. *A. baumannii*'de oksasilinazlara bağlı karbapenem direnci başta olmak üzere diğer birçok antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde IS elementleri önemli rol oynar (Gordon ve Wareham 2010, Ruiz ve ark. 2007).

*A. baumannii* oksasilinazları OXA-51 tipi enzim grubunda yer alırlar. *A. baumannii*'de bulunan OXA-51 tipi genler, organizmayı tür seviyesinde tanımlanmasında önemli bir genetik marker haline getirmiştir. OXA-51 tipi enzimler, penisilinleri (benzil penisilin, ampisilin, tikarsilin ve piperasilin) ve karbapenemleri (imipenem ve meropenem) hidroliz edebilir ama geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı aktif değildirler. OXA-51 tipi enzimler, beta laktam direncine yol açabilmek için IS*AbaI* elementinin varlığına ihtiyaç duyarlar (Gordon ve Wareham 2010).

*A. baumannii*'de karbapenem direncinin en yaygın enzimatik modeli *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub> ve *bla*<sub>OXA-58</sub> benzeri genler tarafından kodlanan oksasilinaz üretimidir. Bunlar plazmid veya kromozomal olarak kodlanır ve dünyada yaygın olarak bulunurlar. Ayrıca klavulanik asit ile inhibe olmazlar (Gordon ve Wareham 2010).

*A. baumannii*'de geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı oluşan dirençten sorumlu enzimler, Ambler sınıf A grubunda yer alan geniş spektrumlu beta laktamazlardan (ESBL) TEM, SHV, CTX-M, GES, SCO, PER ve VEB enzim aileleri içerisinde yer alır (Gordon ve Wareham 2010).

Metallo beta laktamazlar *A. baumannii*'de OXA-tip karbapenemazlardan daha az görülürler ama karbapenemlere karşı hidrolitik aktiviteleri daha çoktur. *A. baumannii*'de 3 tip MBL grubu (İMP, VIM ve SIM) gözlenir. Bunlar, aztreonam dışında diğer beta laktamlar ve karbapenemlere karşı yüksek düzeyde direnç gösterirler. (Gordon ve Wareham 2010).

### **2.1.8.2. Aminoglikozidlere Karşı Direnç Mekanizmaları**

Aminoglikozidlerin *Acinetobacter* infeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılması bu antibiyotiklere direnç gelişimini daha da arttırmaktadır. Bu direnç, dışa atım pompa sistemleri ve çeşitli aminoglikozid modifiye enzimleri (fosfotransferazlar, asetiltransferazlar, nükleotidiltransferazlar) ile gelişmektedir. Bu enzimler *Acinetobacter baumannii*'de sıklıkla kombine halinde bulunmaktadır (Lee ve ark. 2011). Aminoglikozid direnç genleri plazmidler, transpozonlar veya sınıf I integronlarla ilişkili olarak taşınmakta ve ekspresyonları farklı aminoglikozidlere değişken düzeyde duyarlılığa sebep olmaktadır (Gordon ve Wareham 2010). Örneğin sadece *A. haemolyticus*'a ait AAC(6')-Ig geni amikasin direncine yol açmaktadır (Bergogne ve Towner 1996) ve bu gen bu türün tanımlanmasında kullanılabilir.

### **2.1.8.3. Florokinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları**

*A. baumannii*'nin kinolonlara özgü direncinde temel mekanizma, *gyrA* ve *parC* genlerinde oluşan mutasyonlar nedeniyle ilacın hedefi olan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerindeki yapısal değişikliklerdir (Lee ve ark. 2011, Gordon ve Wareham 2010). Yalnız *gyrA*' da meydana gelen mutasyon orta düzey dirence yol açarken, *gyrA* ve *parC* nin her ikisinde oluşan mutasyon yüksek düzeyde bir dirence yol açmaktadır (Peleg ve ark.2008). Diğer bir direnç mekanizması ise, çoklu ilaç direncine sebep olan RND tip AdeABC pompası ve MATE AdeM pompa sistemleridir (Gordon ve Wareham 2010).

### **2.1.8.4. Polimiksinlere Karşı Direnç Mekanizmaları**

Toksik potansiyellerinden dolayı 1947-1970 yılları arası yaygın kullanımına ara verilen polimiksinlerin son yıllarda çoklu ilaç direnci gösteren Gram-negatif kökenlerde direnç oranının düşük çıkması kullanımını yeniden gündeme getirmiştir. Polipeptid yapılı

katyonik antibiyotikler olan polimiksinler sınıfında yalnız kolistin (polimiksin E) ve polimiksin B klinikte kullanılmaktadır (Giamarellou ve Poulakou 2009).

*A. baumannii*'de polimiksinlere karşı gün geçtikçe artan direnç gelişimi karşısında henüz direnç mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak dış membran lipopolisakkaritlerinde meydana gelen modifikasyonlar sonucu antibiyotiğin hedef bölgesine olan afinitesinin azalmasıyla ya da hücrenin lipid içeriğinde, spesifik dış membran protein ekspresyonunda (OmpW benzeri), hücresel  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  miktarında ve lipopolisakkarit miktarında azalma gibi nedenlerle direnç geliştiği ileri sürülmektedir (Peleg ve ark. 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda iki komponentli regülatör sistemlerde (pmrA-pmrB ve phoQ-phoP) oluşan mutasyonlardan da direnç geliştiği düşünülmektedir (Gordon ve Wareham 2010).

#### **2.1.8.5. Tetrasiklin ve Glisilsiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları**

*A. baumannii*'de spesifik tetrasiklin direnci iki mekanizma ile kazanılır. Birincisi tetA ve tetB aktif pompa sistemleridir. TetA IS elementi ile ilişkili olup sadece tetrasiklin direncine neden olur ve minosikline karşı etkili değildir. TetB ise hem tetrasiklin hem de minosiklin direncine sebep olmaktadır. İkinci mekanizma ise tetrasiklinin ribozomal hedefinde değişikliğe yol açan mutasyonlardır. Bu ribozomal savunma tetO ve nadiren tetM genleri tarafından eksprese edilen proteinlerin minosiklin, tetrasiklin ve doksisisiklinin ribozomdaki hedef bölgelerine bağlanmalarını engelleme şeklinde gerçekleşmektedir (Gordon ve Wareham 2010, Peleg ve ark. 2008).

Ayrıca AdeABC pompa sistemine sahip *A. baumannii*'de adeB gen ekspresyonundaki artış ile glisilsiklinlere (tigesiklin) direnç geliştiği gösterilmiştir (Peleg ve ark. 2007).

### **2.1.8.6. Kloramfenikol ve Diğer Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları**

*A. baumannii*'de *caf* geni tarafından eksprese edilen enzimler ile ilacın modifikasyonu ve CmIA aktif pompa sistemi ile ilacın dışarı atılımı şeklinde kloramfenikollere direnç gelişmiştir. Bu direnç genleri integron yapılarının içinde kodlanmıştır. (Gordon ve Wareham 2010, Peleg ve ark. 2008).

*Acinetobacter*'lerde varolan doğal transformasyon kapasitesi, sahip oldukları direnç genlerinin türler arası kolayca yayılımına olanak sağlamaktadır. *A. baumannii*'de çeşitli direnç genlerini bir arada taşıyan direnç adalarının varlığı tespit edilmiştir. (Peleg ve ark. 2007). Sonrasında yapılan çalışmalarda ÇİD *A. baumannii* kökenlerinde 86kb uzunluğunda 45 direnç geni barındıran "AbaR1" direnç adası ve takiben "AbaR2, AbaR3, AbaR5" direnç adaları saptanmıştır. (Gordon ve Wareham 2010, Fournier ve ark. 2006). Bu genomik adaların ATPaz genleriyle aynı pozisyonda olduklarının bulunması transpozon kaynaklı olduklarını düşündürmüştür. Başta AmpC, OXA-10, VEB-1 beta laktamazlar ve çeşitli aminoglikozid modifiye edici enzimleriyle dışa atım pompa sistemi proteinleri bu direnç genlerinde kodlanmıştır (Fournier ve ark. 2006).

ÇİD *A. baumannii* kökenlerinde yaygın görülen integronlar sülfonamid ve trimetoprim direncinden de sorumludur. Ayrıca dihidrofolat redüktaz enzimi ve aktif pompa sistemleri de trimetoprim direncine katkı sağlar (Gordon ve Wareham 2010).

### **2.1.9. Çoklu İlaç Direncinden Sorumlu Mekanizmalar**

Son yıllarda yapılan çalışmalar, *A. baumannii*'de çoklu ilaç direncinden sorumlu temel mekanizmanın dışa atım pompa sistemleri olduğunu göstermiştir. Dışa atım pompaları, beta laktam antibiyotiklerini uzaklaştırmanın yanı sıra kinolonları, tetrasiklinleri, kloramfenikölü, tigesiklini ve daha birçok antimikrobiyali etkin biçimde dışarı atar.

Dışa atım pompa sistemleri 5 protein ailesinin üyesi olup bunlar: "ATP Bağlayan Kaset" (ABC), "Major Kolaylaştırıcı Süper Aile" (MFS), "Çoklu İlaç ve Toksik Bileşik Atımı" (MATE), "Küçük Çoklu İlaç Direnci" (SMR) ve *A. baumannii* kökenlerinde ve

diğer Gram negatif bakterilerde en yaygın bulunan “Direnc Nodül Hücresi Üst Ailesi” (RND)‘dir.

Çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* genomu çok sayıda dışa atım pompası kodlamaktadır. MFS içinde yer alan dar spektrumlu pompalar, tetrasiklin (TetA, TetB) ve minosiklin (TetB) direncinde rol alır ve aynı zamanda kloramfenikolün dışarı atılımını sağlayan CmlA sistemini de içerir. Ama TetA ve TetB tigesikline karşı etkisizdir (Gordon ve Wareham 2010).

MATE ailesine ait AbeM pompasının da aşırı ekspresyonu, kinolonlara, gentamisine, kanamisine, eritromisine, kloramfenikole ve trimetoprime duyarlılığın azalmasına sebep olur (Gordon ve Wareham 2010).

RND tipi pompalar periplazmik iç ve dış membran bölümlerini içeren üç bileşenli pompalardır. *A. baumannii*’de AdeABC ve AdeIJK olmak üzere iki sistem karakterize edilmiştir. AdeIJK pompası AdeABC ile beraber sinerjik etkiyle tigesiklin direncine neden olmakla birlikte bugüne kadar en iyi tanımlanan ve substrat profili en geniş olanı AdeABC pompa sistemidir (Gordon ve Wareham 2010).

## **2.2. Metallo Beta Laktamazlar (MBL)**

Metallo beta laktamazlar, Bush sınıflamasında fonksiyonel grup 3 (3a, 3b, 3c) veya Ambler sınıflamasında sınıf B’de yer alan ve diğer beta laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde Çinko ( $Zn^{+2}$ ) iyonu bulunan enzimlerdir. Klinik açıdan en önemli karbapenemazlar olan bu enzimler, klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken diaminotetra asetik asit (EDTA), merkaptopropionik asit (MPA) ya da Sodyum merkptoasetik (SMA) asit gibi metal şelatörleriyle inaktive olurlar. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar hariç tüm beta laktamları ve özellikle karbapenemleri de hidroliz edebilmeleridir. (Nordmann ve Poirel, 2002).

### 2.2.1. Metallo beta laktamazların sınıflandırılması

MBL'ler 1980'de ilk olarak serin beta laktamazlardan Ambler'in sınıflandırmasına göre sınıflandırılmışlardır. O zamana kadar L1 (*Stenotrophomonas maltophilia*) ve BCII (*Bacillus cereus*) dışında çok az MBL tanımlanmıştı. 1989'da MBL'ler, Bush tarafından fonksiyonel özelliklerine göre ayrı bir grup (grup 3) olarak sınıflandırılmış ve bu sınıflandırma genel olarak beta laktamazlar için referans sistem olarak önerilmiştir. Bu sınıflandırma substrat profilleri (özellikle imipenem hidrolizi), EDTA'ya olan duyarlılıkları ve serin beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmamalarına dayanılarak yapılmıştır. 1997'de güncellenen bu sınıflandırma tablosuna göre, *Bacteroides fragilis* CcrA ve *P.aeruginosa*'dan elde edilen IMP-1 olmak üzere yalnız 2 tip transfer edilebilen MBL tespit edilmiştir (Walsh ve ark. 2005).

Bakterinin sahip olduğu direnç düzeyine göre MBL'lerin etki güçleri değişken olmakla birlikte, yine de tüm MBL'ler, imipenemi hidrolize edebilirler. Substrat ve inhibitör profil ilişkisi baz alınarak MBL'ler Bush-Jacoby-Mederos fonksiyonel sınıflandırma tablosunda üç alt gruba ayrılmıştır (Walsh ve ark. 2005).

**Grup 3a:** Bu gruptaki enzimler genelde penisilinleri imipenemden daha hızlı hidrolize ederler. Bu grup içerisinde *B. cereus* II, *B. fragilis*'in Cer A, *B. cepacia*'nın PCM-1, *S. maltophilia*'nın L1 enzimlerinin yanı sıra, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Shigella flexneri*, *K. pneumoniae* gibi değişik türlerde saptanan IMP 1-8 ve *P. aeruginosa*'da saptanan VIM 1-3 enzimleri yer alır (Walsh ve ark. 2005).

**Grup 3b:** Karbapenemler dışındaki beta laktamlara etkileri çok az olan ve *Aeromonas* türlerinde saptanan bu enzimler esas karbapenemazlardır.

**Grup 3c:** Yüksek sefalosporinaz aktivitesi ile diğer alt gruplardan ayrılan bu kategorideki enzimler, sadece *Legionella gormanii* de saptanmıştır. Bu enzim, geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler de dahil sefalosporinleri çok yüksek oranda hidrolize eder (Walsh ve ark. 2005).

Aminoasit benzerliğini temel alan Ambler moleküler sınıflandırma tablosuna göre MBL'ler sınıf B de yer alıp 3 alt grupta kategorize edilir (Walsh ve ark. 2005).

**Sınıf B1 enzimleri;** çinko iyonu ile birleşecekleri aktif bölgelerinde 3 histidin ve 1 sistin aminoasidinde sahip olup transfer edilebilir IPM, VIM, GIM ve SPM-1 enzimlerini içerir.

**Sınıf B2 enzimleri;** çinko ile bağlanma bölgesinde histidin yerine asparagine (örnek; SFH-1) sahip olan bir gruptur.

**Sınıf B3 enzimleri** ise tüm beta laktamazlar arasında tetramer yapıdaki tek enzim olan LI'yi içerir.

#### **2.2.1.1. Kromozomal Kodlanan MBL'ler**

Genellikle çevresel habitatlardaki bazı bakteriler kromozomlarında MBL genleri taşımakta olup nedeni ise tartışmalıdır. Belirli bir süre beta laktam veya beta laktam tipi bileşiklere maruz kalma sonucu ya da hücrel bir fonksiyonu yerine getirme amacı doğrultusunda bu enzimlerin var olduğu iddia edilmektedir (Walsh ve ark. 2005).

Kromozomlarca kodlanan MBL'ler *B. cereus* (BCII), *B. anthracis*, *S. maltophilia* (LI), *Aeromonas hydrophilia* (CphA), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB veya GOB- 1), *Chryseobacterium indologenes* (IND- 1), *Legionella gormanni* (FEZ- 1), *Caulobacter crescentus* (Mb11B), *Myroides* spp. (TUS- 1, MUS-1) ve *Janthinobacterium lividum* (THIN B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) ve *Serratia fonticola* (SFH- 1) dir (Walsh ve ark. 2005).

#### **2.2.1.2. Transfer Edilebilen MBL'ler**

##### **2.2.1.2.1. IMP Tipi MBL'ler**

Hareketli MBL'ler ilk olarak 1988'de Japonya'da GN 17203 *P. aeruginosa* kökeninin plazmidinde bulunmuştur. Akabinde 1991 yılında Okazaki'deki (Japonya) bir hastanede aynı gene *S. marcescens* Tn9106 kökeninde rastlanılmış ve takip eden yıllarda aynı gene sahip farklı birçok köken bildirilmeye başlanmıştır. Başta imipenem olmak üzere diğer beta laktam ajanları hidroliz etme özelliğinden ötürü IMP-1 adı (*bla<sub>IMP-1</sub>* geni) verilen bu enzim sınıf 3 integron üzerinde kodlanmıştır. Hali hazır *bla<sub>IMP-1</sub>* yönünden pozitif

bulunan kökenlerde ölçülen imipenem minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri 2 µg/ ml- 128 µg/ ml arasında olmuştur (Walsh ve ark. 2005).

Yine Japonya'da *S. flexneri*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes* spp. kökenlerinde IMP-1' in minör varyantları olan IMP-3, IMP-6 ve IMP-10 tespit edilmiş ve *bla<sub>IMP-10</sub>* geni bir *P. aeruginosa* izolatında plazmid aracılı, bir tanesinde ise kromozomal aracılı olarak bulunmuştur. *bla<sub>IMP-10</sub>* ve *bla<sub>IMP-1</sub>* genleri 49. pozisyonda valin yerine fenilalanin gelmesine neden olan tek baz değişikliği ile birbirinden ayrılırlar (Walsh ve ark. 2005).

1997'de *bla<sub>IMP-2</sub>*, 1998'de *bla<sub>IMP-5</sub>* genlerinin önce İtalya sonra Portekiz'de, IMP-12 ve IMP-13 enzimlerinin ise 2000 yılında İtalya'da görülmesi MBL genlerinin Japonya'ya özgü olmadığını göstermiştir (Walsh ve ark. 2005).

Hong Kong'da 1994 yılında *Acinetobacter* spp. kökenlerinde IMP-4, 1995 yılında Kanada'da *P. aeruginosa*'da IMP-7, 2000'de Çin'de yine *P. aeruginosa*'da IMP-4, Brezilya'da IMP-1 ve IMP-6 ve akabinde New Mexico'da *P. aeruginosa*'da IMP-18 gösterilmiştir (Walsh ve ark. 2005).

Ülkemizde MBL genlerinin saptandığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Türkiye'de IMP-1 enziminin ilk kez *K. pneumoniae* kökeninde bulunduğu belirtilirken (Bal, 2005), 2007 yılında Özgümüş ve ark. tarafından 100 *P. aeruginosa* kökeninin 9'unda IMP-1 tipi MBL geni saptanmıştır.

#### **2.2.1.2.2. VIM Tipi MBL'ler**

Kazanılmış MBL'lerin ikinci temel grubu olan VIM tipi enzimlerden VIM-1 ilk defa 1997'de İtalya'nın Verona şehrinde bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmış ve piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonamı içeren çeşitli beta laktamlara son derece etkili olduğu gösterilmiştir. *bla<sub>IMP</sub>* gibi *bla<sub>VIM</sub>* geni de sınıf 1 integron içinde, aminoglikozidlere direnci kodlayan *aacA4* gen kasetiyle yan yana bulunmaktadır (Walsh ve ark. 2005).



VIM-1 Yunanistan'da *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinde, Fransa'da ise *K. pneumoniae*'de saptanmıştır. *bla*<sub>VIM-2</sub> ise 1996' da Fransa'da bir hastanın kan kültüründe üreyen *P. aeruginosa*'da bulunmuştur (Walsh ve ark. 2005).

*P. aeruginosa* kökenlerinde saptanan VIM-2 enzimi daha sonra İtalya, Yunanistan, Güney Kore, Portekiz, İspanya, Polonya, Hırvatistan, Şili, Venezuela, Arjantin, Belçika ve yakın zamanda ABD'de görülmüş, VIM-3 enzimi ise Taiwan'da saptanmıştır (Walsh ve ark. 2005).

VIM-4 önce Yunanistan'da sonra 2002 de İtalya'da *K. pneumoniae* izolatlarında, VIM-5 2004'te Türkiye'de *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*' de, VIM-6 Singapur'da *P. putida*, VIM-7 Houston'da (Texas) gösterilmiştir (Walsh ve ark. 2005).

Son olarak 2004 yılından bu yana yeni bulunan *bla*<sub>VIM</sub> genlerine; Kolombiya'da *P.aeruginosa*'dan *bla*<sub>VIM-8</sub>, İngiltere'den *bla*<sub>VIM-9</sub> ve *bla*<sub>VIM-10</sub>, Arjantin ve İtalya'dan *bla*<sub>VIM-11</sub> dahil edilmiştir (Walsh ve ark. 2005).

#### **2.2.1.2.3. SPM-1 Tipi MBL'ler**

Bu MBL enzimi ilk defa 1997 yılında Brezilya'nın Sao Paulo kentinde, 4 yaşındaki lösemi hastası çocuğun kanından izole edilen bir *P.aeruginosa* kökeninde tanımlanmış ve kodlandığı gen *bla*<sub>SPM-1</sub> (Sao Paulo MBL) olarak adlandırılmıştır (Walsh ve ark. 2005).

Sefalosporinlere olan afinitesi penisilinlerden ve karbapenemlerden daha fazla olan bu enzime sahip kökenin, tüm Gram negatif bakterilerin tedavisinde kullanılan kolistin dışındaki diğer antibiyotiklere direnç gösterdiği görülmüştür. Genel olarak SPM-1 enzimi, IMP-1 ve GIM-1 enzimlerine oranla daha etkili olmakla birlikte IMP-1 ve VIM-1 gibi klavulanik asit ve aztreonamı hidroliz edemez (Walsh ve ark. 2005).

#### **2.2.1.2.4. GIM-1 Tipi MBL' ler**

Almanya'da 2002 yılında 5 farklı hastadan izole edilen ve sadece polimiksin B ye duyarlı olduğu görülen *P. aeuginosa* kökenlerindeki bu enzim, GIM-1 (Alman imipenemaz) olarak adlandırılmıştır (Walsh ve ark. 2005).

*bla<sub>GIM-1</sub>* geni, 45 kb lik küçük bir plazmitteki Sınıf 1 integron üzerinde *aaaA4* ve *aadA1* adı verilen 2 aminoglikozid direnç gen kasedi ve *bla<sub>OXA-2</sub>* beta laktamaz gen kasetleriyle birlikte lokalize olmuştur (Walsh ve ark. 2005). Farklı MBL tiplerinin Dünya çapındaki dağılımı Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Farklı MBL tiplerinin Dünya çapındaki dağılımı (Cornaglia ve ark. 2011).

### 2.2.2. Metallo Beta Laktamazların Biyokimyası

Serin beta laktamazlar ve MBL'lerin her ikisi de beta laktam halkasındaki amid bağınyı parçaladıkları halde beta laktamları bağlama ve hidrolize etme konusundaki etki mekanizmaları değişken olabilmektedir. Birçoğunun aktif bölgesinde iki çinko iyonu bulunurken bazılarında (sınıf B2'de) tek çinko iyonu bulunur (Walsh ve ark. 2005).

MBL'ler serin inhibitörleri olarak bilinen klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmez ve de hiçbiri aztreonamı tam olarak hidrolize edemez.

Aktif bölge yapısı bakımından ortak özellikler barındıran bu enzimlerin, farklı kinetik değerler göstermesi (örnek; VIM-1>VIM-2), beta laktamlara bağlanma ve hidrolize etme konusunda araştırmacıları katalitik mekanizmayı araştırmaya yönlendirmiştir (Walsh ve ark. 2005).

### **2.2.3. MBL varlığının araştırılması**

*Acinetobacter* cinsi bakterilerde çoğul ilaç direncinin göstergesi olan MBL enzim üretiminin belirlenmesi, infekte hasta tedavisinin doğru ve hızlı yapılabilmesi ve direnç genlerinin yayılımının önlenmesi noktasında hayati önem taşımaktadır. MBL enzim varlığını fenotipik olarak tespit etmek için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından standardize edilmiş bir yöntem henüz bildirilmemesine rağmen bu hususta önerilen birtakım testler aşağıda belirtilmektedir.

#### **2.2.3.1. Fenotipik MBL Tespit Yöntemleri**

##### **2.2.3.1.1. Modifiye Hodge Testi**

*E.coli* ATCC 25922 kökeninin 0,5 McFarland'ın 1/10 bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlanarak Mueller Hinton Agar (MHA) plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekilir. Plağın merkezine imipenem diski (10 mg) yerleştirilir. Test kökenleri, bu diskin dört bir kenarından periferine doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekilir. 35°C'de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra disk etrafındaki inhibisyon zonundaki çarpıklık veya yonca görünümü pozitif olarak kabul edilir (Lee ve ark. 2001).

##### **2.2.3.1.2. Kombine Disk Difüzyon Testi**

Test kökenlerinin 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu MHA plağının yüzeyine yayıldıktan sonra imipenem/imipenem-EDTA içeren diskler petri kenarları arasında 1,5-2 cm mesafe olacak şekilde yerleştirilir. 35°C de 16-18 saatlik inkübasyon sonrasında zon çapları ölçülür. İmipenem-EDTA için ölçülen inhibisyon zon çapı, imipenem için ölçülen inhibisyon zon çapından 7 mm ve üstü daha geniş ise test sonucu MBL yönünden pozitif olarak değerlendirilir (Yong ve ark.2002).

##### **2.2.3.1.3. Çift Disk Sinerji Testi**

Bu test için imipenem veya seftazidim disklerinin EDTA, MPA veya SMA emdirilmiş diskleri kullanılır. Amaç antibiyotik zonunun inhibitör varlığında genişleyip genişlemediğini tesbit ederek MBL pozitif bakteri izolatlarını tanımlamaktır. Test kökenlerinin 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu MHA besiyerine

yayılır. Petriye önce imipenem diski ve 10 mm uzağına da boş disk yerleştirilir. Boş disk üzerine daha önce hazırlanan 0,5 M EDTA solüsyonundan 10 µl eklenir. 35°C de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak yani MBL varlığı açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilir (Yana ve ark.2004).

#### **2.2.3.1.4. MBL E Test Yöntemi**

Test kökenlerinin 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu MHA plağının yüzeyine yayılır. Plaklar kuruduktan sonra imipenem (IP)/imipenem-EDTA (IPI) E test şeridi plağa dikkatlice yerleştirilir. 35°C de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra IP/IPI oranı yani imipenem MİK değerinin EDTA'nın olduğu diğer taraftaki MİK değerinden 8 kat ve üzeri bir değer olması MBL pozitifliği olarak değerlendirilir (Yana ve ark.2004).

#### **2.2.3.1.5. Mikrodilüsyon Yöntemi**

Test edilen kökenin imipenem MİK değeri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendikten sonra metal şelatörlerden EDTA ya da fenantrolin eklenerek tekrar MİK değerlerine bakılır. MİK değerleri arasında 8 kat azalma MBL açısından pozitif olarak yorumlanır (Migliavacca ve ark.2002).

#### **2.2.3.2. Genotipik MBL Enzim Üretiminin Gösterilmesi**

Fenotipik yöntemler karbapenem direnci hakkında bilgi verse de bu direncin MBL aracılı olup olmadığı noktasında her zaman doğru sonucu vermeyebildiğinden yalancı pozitif sonuçlar karşısında genotipik doğrulama yapmak gerekmektedir. Ayrıca genotipik yöntemler fenotipik yöntemlere göre daha duyarlıdır.

MBL enzim genlerinin tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), DNA prob yöntemi, Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE), İzoelektrik Fokuslama Yöntemi (IEF), moleküler altın standart olarak klonlama ve sekans analizi kullanılabilir.

### 2.3. Antibiyotik Kombinasyonlarının In Vitro Etkinliğini Ölçen Testler

Antibiyotik kombinasyon etkinliğini ölçmede esas olarak aşağıdaki üç yöntem kullanılmakta ve ölçmede uygulanan tüm in vitro duyarlılık işlemlerine sinerji testleri denilmektedir. Bunlar; E test, zamana bağlı öldürme (time-kill) ve dama tahtası yöntemleridir.

#### 2.3.1. Checkerboard (Dama Tahtası) Yöntemi

In vitro ortamda antimikrobiyal kombinasyonları değerlendirmede zahmetli ve zaman alıcı olmasına rağmen en sık kullanılan ve standart test olarak kabul edilen yöntemdir. Antibiyotiklerin farklı kombinasyonlarının varlığında mikroorganizmaların üreme inhibisyon oranlarının tespit edilmesini sağlar (Köksal 2010).

Kombinasyon etkinlikleri araştırılmak istenen farklı antibiyotiklerin, değişik konsantrasyonları bir araya getirilerek iki antibiyotik için de üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyonun olduğu MİK değerleri esas alınır. Her bir antimikrobiyalin MİK değerinin 4-5 kat altı ve üzerindeki iki katlık dilüsyonları kullanılır. Antibiyotiklerin kombinasyondan elde edilen MİK değerleri ile tek başlarına olan MİK değerleri oranlanarak, Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) değerleri elde edilir. Daha sonra kombinasyondaki tüm antibiyotiklerin FİK değerleri toplanarak  $\Sigma FİK$  hesaplanır. Sonuçlar sinerji ( $\Sigma FİK \leq 0,5$ ), aditif veya indiferan (farksız) ( $0,5 < \Sigma FİK \leq 4$ ), ve antagonist etkileşim ( $\Sigma FİK > 4$ ) olarak değerlendirilir (Pillai ve ark. 2005).

Sinerji, antibiyotiklerin tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha fazla etki elde edilmesi durumu için,

Aditif etkileşim, antibiyotiklerin tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamına eşit bir etki elde edilmesi durumu için,

Antagonist etkileşim ise, antibiyotiklerin tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerinin toplamından daha düşük etki elde edilmesi durumunda kullanılan tabirlerdir.

### **2.3.2. Zamana bağlı öldürme (time-kill) Yöntemi**

Sadece inhibisyon sonuçları veren dama tahtası yönteminin aksine test edilen kombinasyonun bakterisidal aktivitesini ve belirli bir antibiyotik konsantrasyonundaki öldürme hızını ölçer. Bu nedenle bakterisidal tedavinin istendiği klinik durumlar için uygun bir yöntemdir. Bir avantajı da, sadece bir kez değerlendirilen dama tahtası yöntemine göre, antimikrobiyal etkileşimin zaman içindeki dinamik davranışını ortaya koymasındır. Ancak bu yöntemde tekrarlayan koloni sayımı için gerekli işlemler oldukça yorucu ve zaman alıcıdır. Bu nedenle herhangi bir izolat ile test edilebilen ilaç kombinasyon ve dilüsyon sayıları belirgin oranda sınırlanır (Mukherjee ve ark. 2005).

Bu yöntemde standart hücre süspansiyonu farklı zaman aralıkları için ilaç kombinasyonlarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılır. Belirli zaman aralıklarında besiyerine pasaj yapılarak inkübasyona bırakılır. Her zaman aralığı için canlı kalan hücreler hesaplanıp test edilen her ilaç konsantrasyonu için öldürme-zaman eğrisi elde edilir. Koloni sayımları tespit edildiğinde sonuçları görmek için en kolay yol semilogaritmik bir kağıtta değerlerin işaretlenmesidir. Bu kağıtta zaman için apsis, ordinat için de logaritmik ölçek kullanılır (Mukherjee ve ark. 2005).

Sonuçlar tek başına en etkili tek ilaçla karşılaştırıldığında kombinasyonun etkilerine bakılarak alınır. Sinerji, kombinasyon ile 24 saatteki öldürmede en etkili ilacın tek başına kullanılmasına göre 100 kat ya da daha fazla bir artış göstermesi olarak tanımlanır. Antagonizma, en etkili tek ilaçla karşılaştırıldığında kombinasyonda 100 kat ya da daha fazla bir azalma olarak tanımlanır. Aditif (ya da indiferan), en etkili tek ilaçla karşılaştırıldığında kombinasyonda 24 saatteki öldürmede 10 kattan daha az bir değişme (artma ya da azalma) olarak tanımlanır (Mukherjee ve ark. 2005).

### **2.3.3. E test Yöntemi**

Ticari firmalardan hazır olarak temin edilen ve belli bir antibiyotik gradienti içeren difüzyon striplerinin kullanılarak, antibiyotik kombinasyonlarının potansiyel aktivitelerinin kantitatif olarak değerlendirilmesine imkan veren, laboratuvarlarda kolay kullanımlı, iş gücü ve zaman kaybı düşük olan bir yöntemdir.

EMB agar besiyerinde tek koloni halinde düşen test kökenlerinin 3ml MHB içinde 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu, MHA plağının yüzeyine steril pamuklu eküvyon çubuğu yardımıyla yayılır. Plaklar kuruduktan sonra besiyerine önce A antibiyotik E test sribi yerleştirilir. Daha sonra 37°C’de 1 saat inkübe edildikten sonra, sribin petri arkasından alt ve üst kısmı ile kenarları işaretlenir. A antibiyotik E test sribi dikkatli bir şekilde kaldırılarak daha önce işaretlenen çizgilerle çakışacak şekilde bu defa B antibiyotik E test sribi yerleştirilir. Besiyerleri 35°C de 16-24 saat inkübasyona bırakılır. Aynı işlem önce B ve sonra A antibiyotiği olacak şekilde tekrarlanır.

İnkübasyon sonrası ilk hazırlanan besiyeri plağındaki inhibisyon zon çapının E test strip kenarını kestiği noktadaki sayısal değer A varlığında B’nin MİK değeri olarak kaydedilir. İkinci hazırlanan besiyeri plağındaki inhibisyon zon çapının E test strip kenarını kestiği noktadaki sayısal değer ise B varlığında A MİK sayısal değeri olarak kaydedilir.

Her bir antibiyotik için fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksini belirlemek için gerekli olan B ve A ilaçlarının tek başlarına yani özgül MİK değerleri ise tek başına antibiyotik E test stripleri kullanılarak ölçülür.

Kombinasyonun etkinliğini tespit etmek için her ilacın FİK değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{FİK Amikasin} = \frac{\text{B varlığında A MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına A MİK sayısal değeri}}$$

$$\text{FİK Meropenem} = \frac{\text{A varlığında B MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına B MİK sayısal değeri}}$$

Daha sonra her iki ilacın FİK değerleri toplanarak  $\Sigma\text{FİK}$  bulunur ve sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre sinerji, aditif, antagonist etkileşim olarak değerlendirilir.

$$\Sigma\text{FİK} = \text{FİK A} + \text{FİK B}$$

$$\Sigma\text{FİK} \leq 0,5 \text{ sinerji}$$

$$0,5 < \Sigma\text{FİK} \leq 4 \text{ aditif veya indiferan (farksız),}$$

$$\Sigma\text{FİK} > 4 \text{ ise antagonist etkileşim olarak değerlendirilir.}$$

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu tarafından 1202 Y 0103 numaralı proje ile desteklenerek Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü'nde yapılmış olup öncesinde Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

#### 3.1. Bakteri İzolatları

Çalışmaya Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mart 2009-Haziran 2012 tarihleri arasında farklı bölümlerden gönderilen çeşitli klinik örneklerden (idrara, abse, yara, balgam, kan) izole edilen *Acinetobacter* kökenleri arasından 50 MBL pozitif köken bulununcaya kadar toplamda 114 köken E test ile MBL varlığı yönünden incelendi. MBL ürettiği saptanan 50 köken çalışmaya alındı. Bulunan negatif kökenler içinden ise izole edildiği örneğin geldiği tarihe göre ilk MBL negatif 50 köken çalışmaya dahil edildi. Böylelikle MBL ürettiği saptanan 50 köken ile üretmediği tespit edilen 50 köken olmak üzere toplamda 100 *Acinetobacter* kökeni in vitro antibiyotik kombinasyon çalışmasına dahil edildi. MBL negatif kontrol kökeni olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, pozitif kontrol kökeni olarak da *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700 603 kökeni kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılıkları Vitek 2 otomatize sistem (bioMérieux, Fransa) ile saptanmış olan bu kökenlerden seftazidim, levofloksasin, gentamisin ve imipenemden en az üçüne dirençli olanlar ÇİD olarak tanımlandı. İzole edilen kökenler çalışılincaya kadar %20 gliserin ekli Triptik Soy Broth (TSB) besiyeri içeren ependorf tüplerine pasajlanarak -70°C'de saklandı.

#### 3.2. Çalışmada Kullanılan Başlıca Malzemeler

- Eozin Metilen Blue Agar (EMB, bioMérieux, Fransa)
- Mueller Hinton Agar (MHA, bioMérieux, Fransa)
- Mueller Hinton Broth (MHB, Merck, Almanya)
- Koyun kanlı agar (KKA, bioMérieux, Fransa)



- Katyonik Mueller Hinton Broth (KAMHB)
- Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD)
- MBL E Test (IP/IPI) (bioMérieux, Fransa)
- Amikasin E Test (bioMérieux, Fransa)
- Meropenem E Test (bioMérieux, Fransa)
- Meropenem Trihidrat Tozu (Sigma-Aldrich, ABD)
- Amikasin Disülfat Tozu (Sigma-Aldrich, ABD)
- Kalsiyum Klorid Dihidrat (Merck, Almanya)
- Magnezyum Klorid Hekzahidrat (Merck, Almanya)
- McFarland cihazı (bioMérieux, Fransa)
- Etüv (WiseCube, Almanya)
- Derin dondurucu (Indesit, İtalya)
- Steril endorf tüpleri (2ml'lik) ve steril plastik deney tüpleri (100ml'lik)
- Steril pamuklu eküvyon çubuğu (cultiplast, İtalya)
- Otomatik pipetler (10-100 µl, 100-1000 µl) (Axygen, ABD)
- Steril pipet uçları (1-100µl, 100-1000µl) ve steril petrilere (90x15mm)
- Steril mikropleytlar (96 kuyucuklu ve U tabanlı)

### **3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasalların Hazırlanması**

#### **3.3.1. EMB Agar**

Ticari firmadan 500 gr'lık kutuda hazır olarak temin edilen toz halindeki EMB (bioMérieux, Fransa) agar, üzerindeki tarife göre 36 gr tartılarak 1000 ml distile suda homojen bir şekilde çözünmesi sağlandı. Ardından kaynatılıp otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilize edildi. 45°C'ye kadar soğutularak steril petrilere 20'şer ml dökülen besiyeri, +4°C lik buzdolabına kaldırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

#### **3.3.2. Mueller Hinton Agar**

Ticari firmadan 500 gr'lık kutuda hazır olarak temin edilen toz halindeki MHA (bioMérieux, Fransa), üzerindeki tarife göre 38 gr tartılarak 1000 ml distile suda homojen bir şekilde çözünmesi sağlandı. Ardından kaynatılıp otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak

sterilize edildi. 45°C'ye kadar soğutularak steril petrilere 20'şer ml dökülen besiyeri, +4°C lik buzdolabına kaldırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

### **3.3.3. Mueller Hinton Broth**

Ticari firmadan 500 gr'lık kutuda hazır olarak temin edilen toz halindeki MHB (Merck, Almanya), üzerindeki tarife göre 21 gr tartılarak 1000 ml distile suda homojen bir şekilde çözünmesi sağlandı. Ardından kaynatılıp otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilize edildi. 45°C'ye kadar soğutulan broth besiyeri +4°C lik buzdolabına kaldırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

### **3.3.4. Mg<sup>++</sup> Stok Solüsyonu**

Ticari firmadan 250 gr'lık kutuda hazır olarak temin edilen toz halindeki Mg<sup>++</sup> (Magnezyum Klorid Hekzahidrat, Merck-Almanya) tuzu, CLSI kriterlerine göre, 8,36 gr tartılarak 100 ml'lik distile suda homojenize bir şekilde karıştırılarak çözünmesi sağlandı.

### **3.3.5. Ca<sup>++</sup> Stok Solüsyonu**

Ticari firmadan 250 gr'lık kutuda hazır olarak temin edilen toz halindeki Ca<sup>++</sup> (Kalsiyum Klorid Dihidrat, Merck-Almanya) tuzu da, 3,68 gr tartılarak 100 ml'lik distile suda homojenize bir şekilde karıştırılarak çözündürüldü.

### **3.3.6. Katyonik Mueller Hinton Broth (KAMHB)**

Ticari firmadan 500 gr'lık kutuda hazır olarak temin edilen toz halindeki MHB (Merck, Almanya), üzerindeki tarife göre 21 gr tartılarak 1000 ml distile suda homojen bir şekilde çözünmesi sağlandı. Daha sonra, yukarıda hazırlanışı anlatılan her bir Mg<sup>++</sup> ve Ca<sup>++</sup> stok solüsyonundan 0,1'şer ml'lik hacimler, hazırlanmış MHB içine ilave edildi. Tekrar homojen bir şekilde karıştırılan KAMHB, kaynatılıp otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilize edildi. 45°C'ye kadar soğutulan KAMHB, +4°C'lik buzdolabına kaldırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

### 3.3.7. Koyun Kanlı Agar

Ticari firmadan 500 gr'lık kutuda hazır olarak temin edilen toz halindeki koyun kanlı agar (bioMérieux, Fransa), üzerindeki tarife göre 40 gr tartılarak 1000 ml distile suda homojen bir şekilde çözünmesi sağlandı. Ardından kaynatılıp otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak sterilize edildi. 45°C'ye kadar soğutulan besiyeri içerisine %5 oranında (50 ml) defibrine koyun kanı ilave edilip homojen bir şekilde karıştırıldı. Steril petrilere 20'şer ml dökülen besiyeri, +4°C lik buzdolabına kaldırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

### 3.3.8. Meropenem Stok Solüsyonu

Üretici firmanın önerilerine uygun olarak -20°C'de saklanan toz halindeki meropenem trihidrat (100 mg, Sigma-Aldrich, ABD) antibiyotiği CLSI kriterleri ve ürün üzerindeki analiz sertifika verileri göz önünde bulundurularak potensleri hesaplanmış, ml'de elde edilmek istenen konsantrasyonuna göre sulandırım yapılacak sıvı hacimleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Hacim (ml)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Konsantrasyon (}\mu\text{g/ml)}}$$

**Örneğin;** Dama Tahtası yöntemi ile 1 günde çalışacağımız toplam beş *Acinetobacter* spp. kökeni için 8 ml meropenem stok solüsyonu hazırlandı. Başlangıç (dilüsyon öncesi) stok solüsyonunun 128 µg/ml olması planlandı. Buna göre tartılacak meropenem miktarını bulmak için kullanılan yukarıdaki formüle göre toz miktarı;

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{8 \text{ ml (Hacim)} \times 128 \mu\text{g/ml (Konsantrasyon)}}{500 \mu\text{g/mg (Potens)}} = 2,05 \text{ mg}$$

Tartılması gereken miktar 2,05 mg olarak bulunan meropenem tozu hassas terazide aynı miktarda tartıldıktan sonra steril bir tüpte 1 ml DMSO ile çözünmesi sağlandı. Çözündükten sonra üzerine 7 ml KAMHB eklendi ve böylelikle başlangıç stok solüsyonu 128 µg/ml olan meropenem stok solüsyonu kullanıma hazır hale getirildi (Öztürk 2001).

### 3.3.9. Amikasin Stok Solüsyonu

Üretici firmanın önerilerine uygun olarak +4°C’de buzdolabında saklanan toz halindeki amikasin disülfat (1gr, Sigma-Aldrich, ABD) antibiyotiği, ürün üzerindeki potensi dikkate alınarak günlük gerekli olan 6 ml stok solüsyonu yukarıdaki formülle hesaplanarak hazırlandı. Başlangıç (dilüsyon öncesi) stok solüsyonunun 1024 µg/ml olması planlandığından tartılacak amikasin toz miktarı;

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{6 \text{ ml (Hacim)} \times 1024 \text{ µg/ml (Konsantrasyon)}}{730 \text{ µg/mg (Potens)}} = 8,4 \text{ mg}$$

Tartılması gereken miktar 8,4 mg olarak bulunan amikasin tozu hassas terazide aynı miktarda tartıldıktan sonra steril bir tüpte 1 ml DMSO içinde çözünmesi sağlandı. Çözündükten sonra üzerine 5 ml KAMHB eklendi ve böylelikle başlangıç stok solüsyonu 1024 µg/ml olan amikasin stok solüsyonu kullanıma hazır hale getirildi.

### 3.3.10. Bakteri İnokülümünün Hazırlanması

MBL varlığını tespit etmek için yapılan E test yöntemi için; -70°C’de saklanan *Acinetobacter* spp. kökenleri, EMB agar besiyerine azaltma yöntemiyle pasajlandı ve 35°C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübe edilip üretilen kolonilerden 3ml MHB içinde McFarland cihazı (bioMèrieux, Fransa) ile 0,5 McFarland bulanıklığa eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı.

Dama Tahtası yöntemi için; yine çalışmanın 24 saat öncesinde -70°C’de saklanan *Acinetobacter* spp. kökenleri, oda ısısına gelmesini bekledikten sonra EMB agar besiyerine tek koloni düşürme yöntemine uygun şekilde pasajlandı ve 35°C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübe edilip üretilen kolonilerden 4-5 tanesi steril öze ile alınarak 3cc KAMHB içinde karıştırılıp 2 saat süreyle tekrar etüve kaldırıldı. Etüvden çıkarılan bakteri süspansiyonu yeni bir 3ml KAMHB içinde 0,5 McFarland bulanıklığa eşit olacak şekilde tekrar süspansiyon edildi. Son hazırlanan bu bakteri süspansiyonundan, son konsantrasyon  $5 \times 10^5$  cfu/ml olacak şekilde 0,8 ml alınıp 25 ml KAMHB içinde dilüe edildi. Elde edilen bakteri inokülümü böylece mikroplyet kuyucuklarına pipetlenmek üzere hazır hale getirildi (Öztürk 2001).

### 3.4. MBL Varlığının E test Yöntemiyle Araştırılması

Kökenlerdeki MBL varlığı E test yöntemiyle üreticinin talimatlarına uygun olarak araştırıldı. EMB agar besiyerinde tek koloni halinde düşen test kökenlerinin 3ml MHB içinde 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu MHA plağının yüzeyine steril pamuklu eküvyon çubuğu yardımıyla yayıldı. Plaklar kuruduktan sonra imipenem (IP)/imipenem-EDTA (IPI) E test sribi (bioMérieux, Fransa) plağa dikkatlice yerleştirildi. 35°C de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra IP/IPI oranı yani imipenem MİK değerinin EDTA'nın olduğu diğer taraftaki MİK değerinden 8 kat ve üzeri bir değerde olması o köken için MBL pozitif olarak değerlendirildi.

MBL pozitif bulunan bir köken ile negatif bulunan bir köken sırasıyla Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. E test yöntemiyle MBL pozitif bulunan bir köken.



Şekil 3.2. E test yöntemiyle MBL negatif bulunan bir köken.

### 3.5. Meropenem ve Amikasin Kombinasyonunun In Vitro Etkinliğinin Ölçülmesi

#### 3.5.1. E test Yöntemi

MBL pozitif olan 50 kökünde E test yöntemiyle meropenem ve amikasin kombinasyonunun etkinliği araştırıldı. EMB agar besiyerinde tek koloni halinde düşen kökenlerin 3ml MHB içinde 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu, MHA plağının yüzeyine steril pamuklu eküvyon çubuğu yardımıyla yayıldı. Plaklar kuruduktan sonra besiyerine önce amikasin E test sribi yerleştirildi. Daha sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra, sribin petri arkasından alt ve üst kısmı ile kenarları işaretlendi. Böylece tam olarak yeri tespit edilen amikasin E test sribi dikkatli bir şekilde kaldırılarak daha önce işaretlenen çizgilerle çakışacak şekilde bu defa meropenem E test sribi yerleştirildi. Ardından besiyerleri 35°C de 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Aynı işlem önce meropenem ve sonra amikasin antibiyotiği olacak şekilde tekrarlandı.

İnkübasyon sonrası ilk hazırladığımız MHA plağındaki inhibisyon zonunun E test strip kenarını kestiği noktadaki sayısal değer amikasin varlığında meropenemin MİK değeri olarak kaydedildi. İkinci hazırladığımız MHA plağındaki inhibisyon zonunun E test

strip kenarını kestiği noktadaki sayısal değer ise meropenem varlığında amikasin MİK sayısal değeri olarak kaydedildi.

Her bir antibiyotik için FİK değerini belirlemek için gerekli olan meropenem ve amikasin ilaçlarının tek başlarına yani özgül MİK değerleri ise mikropleyt kullanılarak broth mikrodilüsyon yöntemiyle ölçülüp kaydedildi.

Kombinasyonun etkinliğini tespit etmek için her ilacın FİK değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{FİK Amikasin} = \frac{\text{Meropenem varlığında Amikasin MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına Amikasin MİK sayısal değeri}}$$

$$\text{FİK Meropenem} = \frac{\text{Amikasin varlığında Meropenem MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına Meropenem MİK sayısal değeri}}$$

Daha sonra her iki ilacın FİK değerleri toplanarak  $\Sigma\text{FİK}$  bulundu ve sonuçlar aşağıdaki kriterlere göre sinerji, aditif, antagonist etkileşim olarak değerlendirildi.

$$\Sigma\text{FİK} = \text{FİK Amikasin} + \text{FİK Meropenem}$$

$$\Sigma\text{FİK} \leq 0,5 \text{ sinerji}$$

$$0.5 < \Sigma\text{FİK} \leq 4 \text{ aditif veya indiferan (farksız),}$$

$$\Sigma\text{FİK} > 4 \text{ ise antagonist etkileşim olarak değerlendirildi.}$$

**Örneğin;** Bir izolat için E test yöntemiyle amikasin MİK değeri 48, meropenem MİK değeri ise 16 olarak saptandı. Daha sonra her iki ilacın mikropleyt kullanılarak broth mikrodilüsyon yöntemiyle ölçülen MİK değerleri amikasin için 128, meropenem için ise 32 olarak kaydedildi. Her ilacın FİK değeri ve  $\Sigma\text{FİK}$  değeri aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\text{FİK Amikasin} = \frac{48}{128} = 0,375 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{FİK Meropenem} = \frac{16}{32} = 0,5 \mu\text{g/ml}$$

$\Sigma \text{FİK} = 0,375 + 0,5 = 0,875 \mu\text{g/ml}$  yani aditif/indiferan etkileşim olarak bulundu.

### 3.5.2. Dama Tahtası Yöntemi

Çalışmada kullanılan her bir bakteri için meropenem ve amikasin kombinasyon etkinliği dama tahtası yöntemiyle ölçüldü (Öztürk 2001). Bu yöntemde her bir antibiyotiğin tek başına özgül MİK değerleri de ölçülüp kaydedildi.

Her bir antibiyotiğin *Acinetobacter*'ler için CLSI tarafından belirlenmiş olan MİK değerleri esas alınarak, bu MİK değerlerinin 2-3 kat dilüsyon üstünden, 4-8 kat dilüsyon altına kadar olan değerlerini içeren antibiyotik dilüsyonları kullanıldı. Her bir antibiyotik için hazırlanan başlangıç stok solüsyonları ayrı ayrı steril tüplerde KAMHB ile sulandırılarak çift kat seri dilüsyonları yapıldı ve kullanıma hazır hale getirildi.

Her antibiyotiğin başlangıç konsantrasyonu (1. tüp), kombinasyon ölçüm yöntemini uygularken elde edilmek istenen başlangıç (en yüksek) konsantrasyonunun 2 katı fazla konsantrasyonda antibiyotik içerecek şekilde hazırlandı. Çünkü mikroplyet üzerindeki kuyucuğa aynı miktarda diğer antibiyotik de eklendiğinden dolayı her bir antibiyotik konsantrasyonu 1 kat daha dilüe edilmiş oldu.

Örneğin; CLSI verileri doğrultusunda Amikasin için MİK değeri 64  $\mu\text{g/ml}$ , Meropenem için MİK değeri 16  $\mu\text{g/ml}$  değerleri göz önünde bulundurularak steril dilüsyon tüpleri hazırlandı. Amikasin için 11 tüp, meropenem için 7 tüp hazırlandı.

Amikasin için, kuyucuktaki en yüksek başlangıç konsantrasyonunun 64'ün 3 dilüsyon üstü olan 512  $\mu\text{g/ml}$  olması istenildiği için aynı miktarda diğer antibiyotik de eklendiğinde konsantrasyonun 1024  $\mu\text{g/ml}$ 'den 512  $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşeceği hesaplanarak başlangıç tüpü



1024 µg/ml olarak hazırlandı. Daha sonra ilk tüpten başlayıp 11. tüpe kadar çift kat seri dilüsyon yapıldı.

Meropenem için ise, kuyucuktaki en yüksek başlangıç konsantrasyonunun 16'nın 2 dilüsyon üstü olan 64 µg/ml olması istenildiği için aynı miktarda diğer antibiyotik de eklendiğinde konsantrasyonun 128 µg/ml den 64 µg/ml ye düşeceği hesaplanarak başlangıç tüpü 128 µg/ml olarak hazırlandı. Daha sonra ilk tüpten başlayıp 7. tüpe kadar çift kat seri dilüsyon yapıldı.

Kombinasyonda kullanılacak her iki antibiyotiğin dilüsyonları hazırlandıktan sonra, 96 kuyucuklu steril U tabanlı mikroplyet alınarak, plağın A1 çukuru üreme kontrolü (ÜK), H12 çukuru ise sterilit kontrolü (SK) olarak işaretlenip ve bu kuyucuklara antibiyotik eklenmedi.

Mikroplyet çukurlarına antibiyotik, besiyeri (KAMHB) ve bakteri süspansiyonu pipetleme işlemi aşağıda belirtilen 4 aşamada gerçekleştirildi (Öztürk 2001).

### **1. Aşama;**

1. satırdaki çukurlara (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12), 1. sütundaki çukurlara (B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1) ve Sterilite kontrol çukuru olan H12 çukuruna 50 µl KAMHB eklendi.

### **2. Aşama;**

2. sütundaki tüm çukurlara 1 µg/ml
3. sütundaki tüm çukurlara 2 µg/ml
4. sütundaki tüm çukurlara 4 µg/ml
5. sütundaki tüm çukurlara 8 µg/ml
6. sütundaki tüm çukurlara 16 µg/ml
7. sütundaki tüm çukurlara 32 µg/ml
8. sütundaki tüm çukurlara 64 µg/ml
9. sütundaki tüm çukurlara 128 µg/ml
10. sütundaki tüm çukurlara 256 µg/ml
11. sütundaki tüm çukurlara 512 µg/ml
12. sütundaki tüm çukurlara 1024 µg/ml

konsantrasyonluk amikasin solüsyonundan 50 µl eklendi.

### 3. Aşama;

B satırındaki tüm çukurlara 2 µg/ml

C satırındaki tüm çukurlara 4 µg/ml

D satırındaki tüm çukurlara 8 µg/ml

E satırındaki tüm çukurlara 16 µg/ml

F satırındaki tüm çukurlara 32 µg/ml

G satırındaki tüm çukurlara 64 µg/ml

H satırındaki tüm çukurlara 128 µg/ml

konsantrasyonluk meropenem solüsyonundan 50 µl eklendi.

### 4.Aşama;

Dama tahtası yöntemi için hazırlanma şekli daha önce anlatılan taze bakteri süspansiyonundan, sterilite kontrol çukuru olan H12 hariç tüm çukurlara 10 µl olmak üzere eklendi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ÜK	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
E	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
F	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
G	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
H	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	SK

Şekil 3.3: Amikasin ve meropenem eklendikten sonra mikropleyt çukurlarındaki son konsantrasyonlar.

Mikropleytlere bakteri eklendikten sonra üstleri kapakla kapatılarak, 35°C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. 18-24 saatlik inkübasyonun sonunda üreme ve sterilite

kontrol kuyucukları başta olmak üzere diğer kuyucuklar üremenin olup olmadığını gösteren bulanıklık durumları gözle değerlendirilip kaydedildi.

A1 satırında (A1 hariç) üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon amikasin için tek başına özgül MİK değeri, A1 sütununda ise üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon meropenem için tek başına özgül MİK değeri olarak kaydedildi.

Kombine antibiyotik içeren kuyucuklar değerlendirilirken her antibiyotiğin FİK değerlerinin ve kombinasyonun  $\Sigma$ FİK değerinin tespit edilmesi esas alındı. Bu amaçla aşağıdaki formüller kullanıldı.

$$\text{FİK Amikasin} = \frac{\text{Amikasinin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{Tek başına Amikasin MİK değeri}}$$

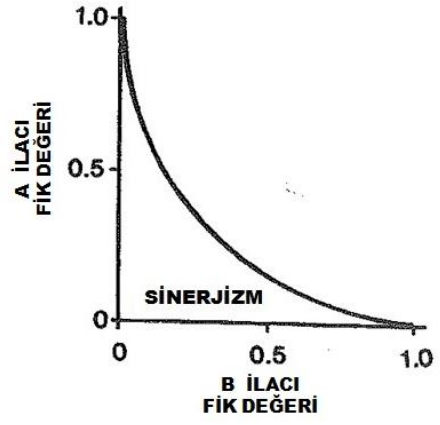
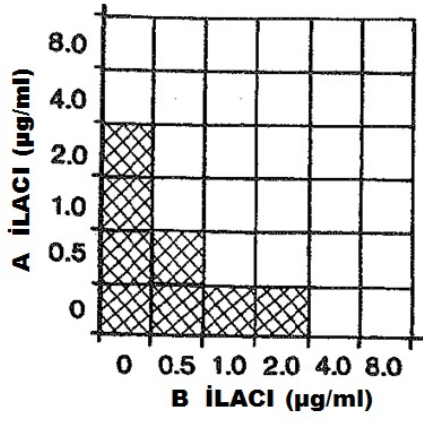
$$\text{FİK Meropenem} = \frac{\text{Meropenemin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{Tek başına Meropenem MİK değeri}}$$

Daha sonra her iki antibiyotiğin FİK değerleri toplanarak  $\Sigma$ FİK bulundu.

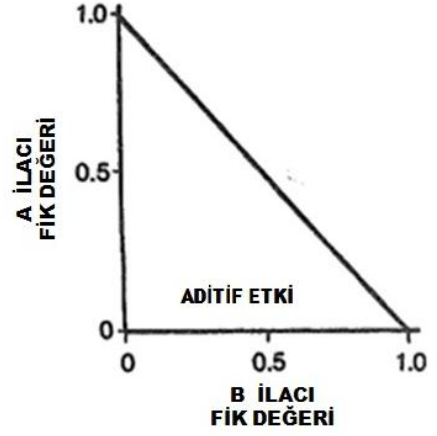
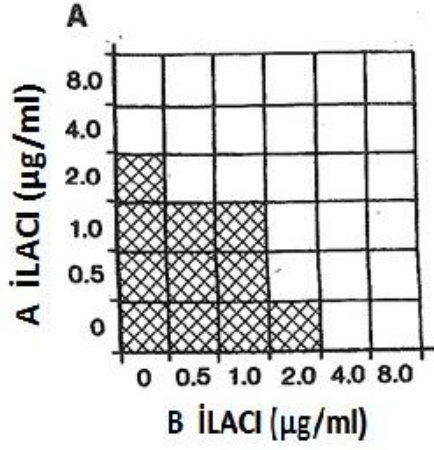
$$\Sigma\text{FİK} = \text{FİK Amikasin} + \text{FİK Meropenem}$$

Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonlu kuyucuklar için ayrı ayrı FİK değerleri ve sonrasında  $\Sigma$ FİK değerleri hesaplandı. Elde edilen en düşük  $\Sigma$ FİK değeri minimum FİK değeri  $\Sigma\text{FİK}_{\min}$ , en yüksek  $\Sigma$ FİK değeri  $\Sigma\text{FİK}_{\max}$  olarak kaydedildi.

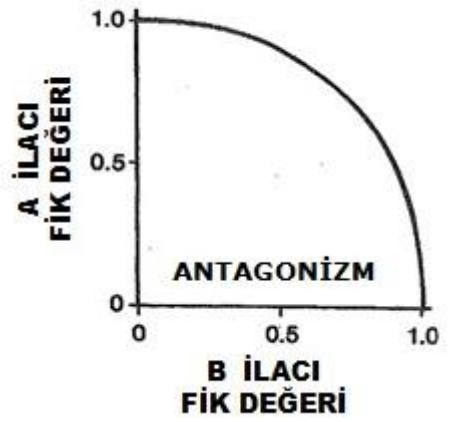
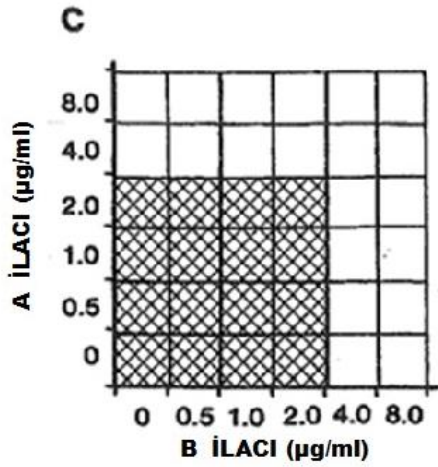
Tüm veriler hesaplandıktan sonra bir köken için kombinasyon sonuç etkileşimi belirlenirken aşağıda gösterilen ve mikroplyette üreme olan kuyucuk görünümüne dayalı grafiksel yorumlama yöntemi kullanıldı (Köksal 2010).



Şekil 3.4. Sinerjik etkileşim gösteren bir kökenin mikroyeğit ve grafiksel görünümü.



Şekil 3.5. Aditif etkileşim gösteren bir kökenin mikroyeğit ve grafiksel görünümü.



Şekil 3.6. Antagonist etkileşim gösteren bir kökenin mikroyeğit ve grafiksel görünümü.

Bir bakteri kökeni için renkli taranan kuyucuklarda üreme olan mikropleyt görünümü Şekil 3.7’de gösterilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ÜK	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
B	1	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
C	2	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
D	4	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
E	8	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
F	16	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
G	32	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
H	64	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	SK

Şekil 3.7. Bir bakteri kökeninin dama tahtası yöntemiyle hazırlanan mikropleyt görünümü.

Yukarıdaki mikropleyt görünümüne göre; amikasin MİK değeri 128 µg/ml, meropenem için MİK değeri ise 32 µg/ml’dir.

$$\text{B için FİK Amikasin} = \frac{128}{128} = 1 \quad \text{FİK Meropenem} = \frac{1}{32} = 0,03 \quad \Sigma\text{FİK} = 1,03 \quad \mu\text{g/ml}$$

$$\text{C için FİK Amikasin} = \frac{64}{128} = 0,5 \quad \text{FİK Meropenem} = \frac{2}{32} = 0,06 \quad \Sigma\text{FİK} = 0,56 \quad \mu\text{g/ml}$$

$$\text{D için FİK Amikasin} = \frac{64}{128} = 0,5 \quad \text{FİK Meropenem} = \frac{4}{32} = 0,125 \quad \Sigma\text{FİK} = 0,625 \quad \mu\text{g/ml}$$

$$\text{E için FİK Amikasin} = \frac{32}{128} = 0,25 \quad \text{FİK Meropenem} = \frac{8}{32} = 0,25 \quad \Sigma\text{FİK} = 0,5 \quad \mu\text{g/ml}$$

$$\text{F için FİK Amikasin} = \frac{4}{128} = 0,03 \quad \text{FİK Meropenem} = \frac{16}{32} = 0,5 \quad \Sigma\text{FİK} = 0,53 \quad \mu\text{g/ml}$$







Şekil 3.9. Dama tahtası yöntemiyle sinerjik bulunan MBL pozitif bir kökenin mikropleyt görünümü.

MBL negatif bir kökende dama tahtası yöntemiyle amikasin ve meropenem kombinasyonunun sinerjik etkili bulunduğu mikropleyt görüntüsü Şekil 3.10'de, aditif etkili bulunduğu mikropleyt görüntüsü ise Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Dama tahtası yöntemiyle sinerjik bulunan MBL negatif bir kökenin mikropleyt görünümü.



Şekil 3.11. Dama tahtası yöntemiyle aditif bulunan MBL negatif bir kökenin mikropleyt görünümü.

### 3.5.2.1. Minimal Bakterisidal Konsantrasyonun (MBK) Saptanması

Mikropleytin A satırı ve 1 sütununda her iki antibiyotiğin MİK değerleri belirlendikten sonra yine A satırı ve 1 sütununda gözle görülür üremenin olmadığı kuyucuklardan pipetle 25 µl alınıp koyun kanlı agara aktarılarak yayma şeklinde ekim yapıldı. 35°C’de 18-24 saatlik inkübasyonun ardından besiyerinde %99 ve daha fazla oranında üremenin sonlandığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu test edilen *Acinetobacter* kökeni için MBK değeri olarak kaydedildi.

### 3.5.2.2. İstatistik

Veriler SPSS 13,0 paket programında analiz edildi. Sürekli değişkenler normal dağılım ve varyansların eşitliği yönünden incelendi. Gruplar arası karşılaştırmalarda sürekli değişkenler için Mann-Whitney U testi, isimsel değişkenler için ki-kare testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı olarak 0,05 kabul edildi.



## 4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan 100 *Acinetobacter* kökeninin çoğunlukla Dahiliye yoğun bakım (%32), Cerrahi yoğun bakım (%22), Ortopedi ve Travmatoloji (%12) servislerinden gönderilen klinik örneklerden izole edildiği tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm kökenlerin izole edildiği örnekler ve gönderildiği klinikler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *Acinetobacter* kökenlerinin izole edildiği klinik örneklerle ve servislere göre dağılımı.

	İdrar (n)	Yara (n)	Trakeal Aspirat (n)	Balgam (n)	Plevra Sıvısı (n)	Kan (n)	BOS (n)
Dahiliye Yoğun Bakım	2	-	9	13	-	8	-
Cerrahi Yoğun Bakım	5	1	3	10	-	3	-
Ortopedi ve Travmatoloji	-	12	-	-	-	-	-
Dermatoloji	-	7	-	-	-	-	-
Göğüs Hastalıkları	-	-	-	5	1	1	-
Beyin Cerrahi	2	1	-	2	-	-	1
Dahiliye	1	1	-	1	-	1	-
Çocuk Cerrahisi	1	1	-	-	-	-	-
Plastik Cerrahi	-	2	-	-	-	-	-
Genel Cerrahi	-	1	-	1	-	-	-
Enfeksiyon Hastalıkları	-	1	-	-	-	-	-
Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	1	-	-	-	-	-	-
Çocuk Sağ. Ve Hast.	1	-	-	-	-	-	-
Üroloji	1	-	-	-	-	-	-
<b>Toplam</b>	14	27	12	32	1	13	1

### 4.1. MBL E test Yöntemi Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 50 MBL pozitif köken tespit edilinceye kadar 114 *Acinetobacter* kökeni MBL varlığı yönünden incelendi. MBL negatif bulunan 64 köken içinden izolasyon tarihine göre ilk 50 köken çalışmaya dahil edildi. MBL negatif ve pozitif her iki grubun %47’si *A. baumannii*, %3’ü *A. lwoffii* idi (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Çalışmaya dahil edilen *Acinetobacter* kökenlerinin tür dağılımı.

	<i>A. baumannii</i> n (%)	<i>A. lwoffii</i> n (%)	Toplam n (%)	P
MBL negatif	47 (94)	3 (6)	50 (100)	>0,05
MBL pozitif	47 (94)	3 (6)	50 (100)	
<b>Toplam</b>	94 (94)	6 (6)	100 (100)	

Bu kökenlerin %54'ünün yoğun bakım servislerinden gönderilen hasta örneklerinden izole edildiği tespit edildi. MBL pozitif olan kökenlerin 36'sının (%72) ve MBL negatif olan kökenlerin 18'inin (%36) yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edildiği saptandı (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** MBL pozitif ve negatif kökenlerin izole edildikleri hasta örneklerinin gönderildiği klinikler.

KLİNİKLER	MBL negatif n(%)	MBL pozitif n(%)	Toplam n
Cerrahi Yoğun Bakım	10 (20)	12 (24)	22
Dahiliye Yoğun Bakım	8 (16)	24 (48)	32
Beyin Cerrahisi	4 (8)	2 (4)	6
Çocuk Cerrahisi	1 (2)	1 (2)	2
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	1 (2)	0 (0)	1
Dahiliye	4 (8)	0 (0)	4
Dermatoloji	6 (12)	1 (2)	7
Enfeksiyon Hastalıkları	1 (2)	0 (0)	1
Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	1 (2)	0 (0)	1
Genel Cerrahi	2 (4)	0 (0)	2
Göğüs Hastalıkları	5 (10)	2 (4)	7
Ortopedi ve Travmatoloji	6 (12)	6 (12)	12
Plastik Cerrahi	1 (2)	1 (2)	2
Üroloji	0 (0)	1 (2)	1
<b>Toplam</b>	50 (100)	50 (100)	100

MBL pozitif kökenlerin sıklıkla (%48) alt solunum yolu örneklerinden (balgam, trakeal aspirat ve plevra sıvısı) ve kandan (%20) izole edildiği tespit edilirken MBL negatif kökenlerin ise %42'sinin alt solunum yolu örneklerinden, %38'inin yara örneklerinden izole edildiği saptandı (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** MBL pozitif ve negatif kökenlerin izole edildikleri klinik örneklerin dağılımları.

Klinik Örnek	MBL negatif n (%)	MBL pozitif n (%)	Toplam n (%)
Balgam	12 (37,5)	20 (62,5)	32 (100)
Yara	19 (67,9)	9 (32,1)	28 (100)
Trakeal aspirat	8 (72,7)	3 (27,3)	11 (100)
İdrar	7 (53,8)	6 (46,2)	13 (100)
Kan	3 (23,1)	10 (76,9)	13 (100)
Plevra sıvısı	1 (50)	1 (50)	2 (100)
Beyin Omurilik Sıvısı	0 (0)	1 (100)	1 (100)
Toplam	50 (50)	50 (50)	100 (100)

MBL pozitif bulunan 50 kökenin 47 tanesi (%94) meropeneme, 44 tanesi (%88) imipeneme dirençli bulundu. Çizelge 4.5'te gösterildiği gibi MBL pozitif olan kökenlerde imipenem ve meropeneme direnç oranları daha fazla bulundu ( $p<0,05$ ).

**Çizelge 4.5.** MBL pozitif ve negatif kökenlerde imipenem, meropenem ve amikasin direnç durumları.

Antibiyotik	Duyarlılık	MBL negatif n (%)	MBL pozitif n (%)	Toplam n (%)	P
İmipenem	Dirençli	27 (54)	44 (88)	71 (71)	0,001
	Orta duyarlı	2 (4)	1 (2)	3 (3)	
	Duyarlı	21 (42)	5 (10)	26 (26)	
Meropenem	Dirençli	30 (60)	47 (94)	77 (77)	<0,001
	Orta duyarlı	1 (2)	0 (0)	1 (1)	
	Duyarlı	19 (38)	3 (6)	22 (22)	
Amikasin	Dirençli	23 (46)	24 (48)	47 (47)	0,083
	Orta duyarlı	4 (8)	11 (22)	15 (15)	
	Duyarlı	23 (46)	15 (20)	38 (38)	

Kökenlerin Vitek 2 otomatize sistem (bioMérieux, Fransa) ile belirlenmiş MİK değerlerine göre hesaplanan meropenem, imipenem ve amikasin antibiyotiklerinin MİK 50 ile MİK 90 değerleri Çizelge 4.6'da gösterildi.

**Çizelge 4.6.** MBL pozitif ve negatif kökenlerin amikasin meropenem ve imipenem için MİK 50 ve MİK 90 değerleri.

Antibiyotik		MBL pozitif	MBL negatif
Amikasin	MİK 50 (µg/ml)	64	16
	MİK 90 (µg/ml)	128	64
Meropenem	MİK 50 (µg/ml)	16	8
	MİK 90 (µg/ml)	32	16
İmipenem	MİK 50 (µg/ml)	16	16
	MİK 90 (µg/ml)	16	16

Çalışmaya dahil edilen tüm kökenlerin 58 tanesinin (%58) ÇİD olduğu tespit edildi. MBL negatif olan kökenlerin 36'sının (%72), MBL pozitif olan kökenlerin ise 22'sinin (%44) ÇİD olduğu saptandı. MBL negatif olan kökenlerde ÇİD durumu daha fazla ( $p=0.005$ ) bulundu (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** MBL pozitif ve negatif kökenlerde ÇİD durumu.

	ÇİD değil n (%)	ÇİD n (%)	Toplam n (%)	P
MBL negatif	14 (28)	36 (72)	50 (100)	0.005
MBL pozitif	28 (56)	22 (44)	50 (100)	
Toplam	42 (42)	58 (58)	100 (100)	

## 4.2. Meropenem ve Amikasin Kombinasyonunun In Vitro Etkinliğinin Ölçülmesi

### 4.2.1. E test Yöntemi Sonuçları

Çalışmaya alınan toplamda 50 MBL pozitif kökenin meropenem-amikasin antibiyotiklerinin kombine kullanımı sonucu hesaplanan  $\Sigma$ FİK değerlerine göre; kökenlerin %76'sında (38/50) aditif veya indiferan (farksız), %14'ünde (7/50) sinerjik, %10'unda (5/50) antagonist etkileşim tespit edildi.

Çalışmada E test yöntemiyle meropenem amikasin kombinasyonlarından elde edilen 4 farklı etkileşime ait meropenem ve amikasin MİK değerleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3'de gösterilmiştir.



**A**



**B**

**Şekil 4.1. A;**Sinerjik etkileşim saptanan bir kökenin meropenem varlığındaki amikasin MİK değeri.  
**B;**Sinerjik etkileşim saptanan bir kökenin amikasin varlığındaki meropenem MİK değeri.

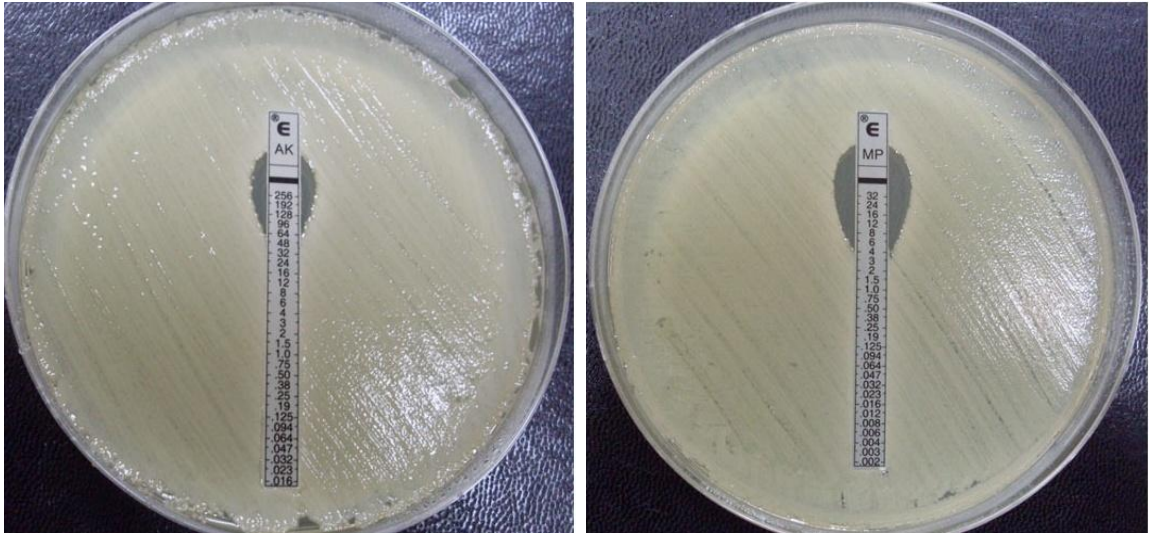


**A**



**B**

**Şekil 4.2. A;** Aditif etkileşim saptanan bir kökenin meropenem varlığındaki amikasin MİK değeri.  
**B;** Aditif etkileşim saptanan bir kökenin amikasin varlığındaki meropenem MİK değeri.



**Şekil 4.3. A;** Antagonist etkileşim saptanan bir kökenin meropenem varlığındaki amikasin MİK değeri.  
**B;** Antagonist etkileşim saptanan bir kökenin amikasin varlığındaki meropenem MİK değeri.

#### 4.2.2. Dama Tahtası Yöntemi Sonuçları

Çalışmaya alınan 50 MBL pozitif kökende E test yöntemiyle belirlenen antibiyotik kombinasyon etkileşim sonuçlarına göre %10 (5/50) antagonist, %76 (38/50) aditif, %14 (7/50) sinerjik etkileşim tespit edildi. MBL pozitif ve negatif tüm kökenlerde dama tahtası yöntemiyle %51 aditif, %49 sinerjik etkileşim saptanmış olup antagonist etkileşim saptanan köken olmadı (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8.** E test ve dama tahtası yöntemiyle kökenlerdeki meropenem ve amikasin etkileşimleri.

Yöntem	Antagonist n (%)	Aditif n (%)	Sinerji n (%)	Toplam n (%)
E test	5 (10)	38 (76)	7 (14)	50 (100)
Dama Tahtası	0 (0)	51 (51)	49 (49)	100 (100)

Dama tahtası yöntemiyle meropenem amikasin kombinasyonuna karşı 37 kökende (%74) aditif etki gözlenirken 13 kökende (%26) sinerjik etki gözlemlendi. Her iki yöntem ile tespit edilen sonuçlar kıyaslandığında kökenlerin 28'inde (%56) her iki test ile aditif etkileşim saptanırken üçünde (%6) sinerjik etkileşim saptandı. Böylece 31 (%62) kökende aynı etkileşim (sinerji veya aditif) sonucu bulundu. Bu iki yöntemin sonuçları kıyaslandığında her iki yöntem arasında fark olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** MBL pozitif kökenlerde antibiyotik kombinasyon sonuçları.

Yöntem		E test			Toplam n (%)	P
		Antagonist n (%)	Aditif n (%)	Sinerji n (%)		
Dama tahtası	Aditif	5 (10)	28 (56)	4 (8)	37 (74)	>0,05
	Sinerji	0 (0)	10 (20)	3 (6)	13 (26)	
<b>Toplam</b>		5 (10)	38 (76)	7 (14)	50 (100)	

MBL negatif kökenlerde dama tahtası yöntemiyle meropenem amikasin kombinasyonuna karşı 14 kökünde (%28) aditif, 36 kökünde (%72) sinerjik etki gözlemlendi. (Çizelge 4.10).

**Çizelge 4.10.** MBL pozitif ve negatif kökenlerde dama tahtası yöntemiyle meropenem-amikasin kombinasyonunun etkinliği.

Metallo beta laktamaz	Dama Tahtası Yöntemi İle		Toplam n (%)	P
	Aditif n (%)	Sinerji n (%)		
MBL negatif	14 (28)	36 (72)	50 (100)	<0,001
MBL pozitif	37 (74)	13 (26)	50 (100)	
<b>Toplam</b>	51 (51)	49 (49)	100 (100)	

Aditif/indiferan ve sinerjik bulunan kökenlerde mikrodilüsyon ve Vitek 2 otomatize sistemle (bioMérieux, Fransa) belirlenen meropenem/amikasin MİK değerlerinin ortanca değerleri Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.11.** Aditif/indiferan ve sinerjik bulunan kökenlerde mikrodilüsyon ve otomatize sistemle belirlenen meropenem-amikasin MİK değerlerinin ortanca değerleri.

	Aditif Ortanca (min.-max.)	Sinerji Ortanca (min.-max.)	P
MEM-MİK (vitek 2)	16 (0,25-16)	16 (0,25-16)	0,035
IPM-MİK (vitek 2)	16 (1-16)	16 (1-16)	0,016
AK-MİK (mikrodilüsyon)	64 (8-256)	32 (4-128)	0,002
MEM-MİK (mikrodilüsyon)	16 (4-32)	8 (2-32)	<0,001

MBL pozitif ve negatif kökenlerdeki mikrodilüsyonla belirlenen meropenem-amikasin FİK değerleri, MBK değerleri ve otomatize sistemle belirlenen amikasin, meropenem, imipenem MİK'lerinin ortanca değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.12'de gösterildi.

**Çizelge 4.12.** MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon ve otomatize sistem ile saptanan FİK, MBK ve MİK değerleri.

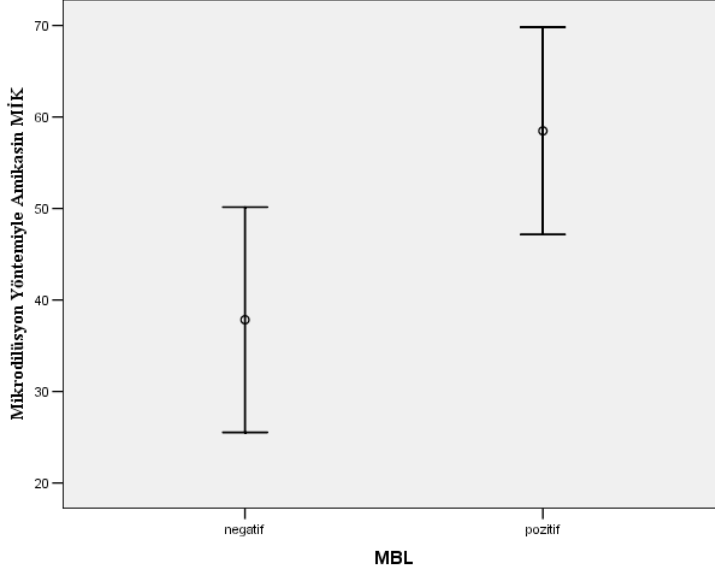
	MBL negatif Ortanca (min-max)	MBL pozitif Ortanca (min-max)	P
MİK - amikasin (mikrodilüsyon)	16 (4-256)	64 (4-128)	0,001
MİK - meropenem (mikrodilüsyon)	8 (2-16)	16 (2-32)	<0,001
FİK-min. (mikrodilüsyon)	0,38 (0,16-0,75)	0,37 (0,18- 1,5)	>0,05
FİK-max. (mikrodilüsyon)	0,63 (0,52-1,13)	1,02 (0,52-1,5)	<0,001
MBK- amikasin (mikrodilüsyon)	64 (16-512)	128 (32-512)	0,004
MBK meropenem (mikrodilüsyon)	32 (8-64)	32 (16-64)	<0,001
MİK amikasin (Vitek 2)	32 (2-64)	32 (2-128)	>0,05
MİK meropenem (Vitek 2)	16 (0,25-16)	16 (0,25-16)	<0,001
MİK imipenem (Vitek 2)	16 (1-16)	16 (1-16)	<0,001

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu. MBK: Minimal bakterisidal konsantrasyonu.

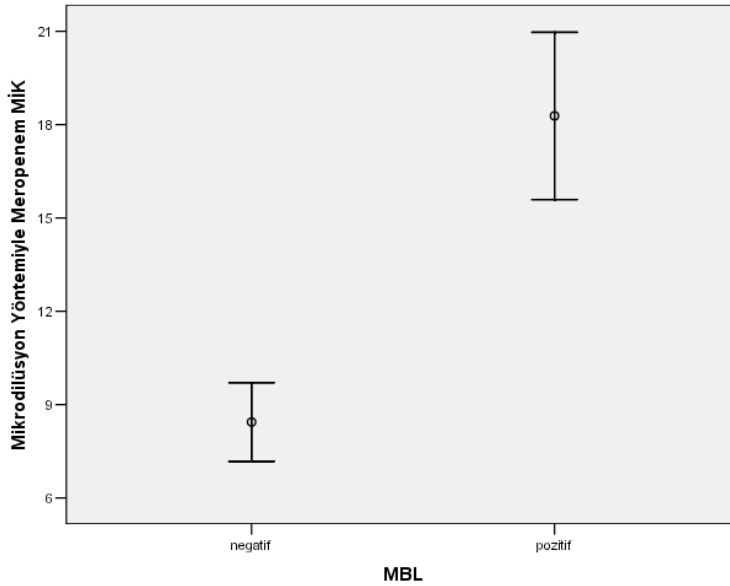
MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu.



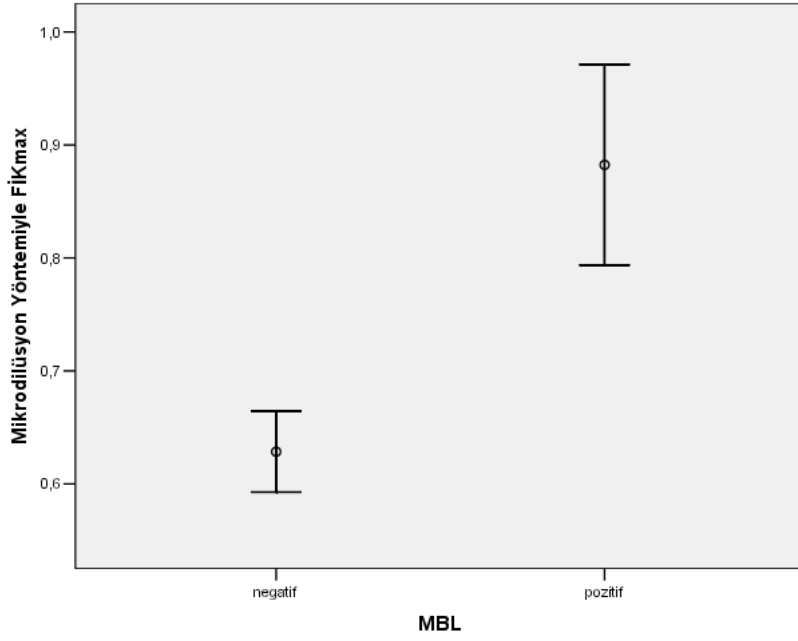
MBL pozitif olan kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan amikasin MİK (p=0,001), meropenem MİK (p<0,001), FİK max (p<0,001), amikasin MBK (p=0,04), meropenem MBK (p<0,001) değerleri daha yüksek olarak bulundu (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8).



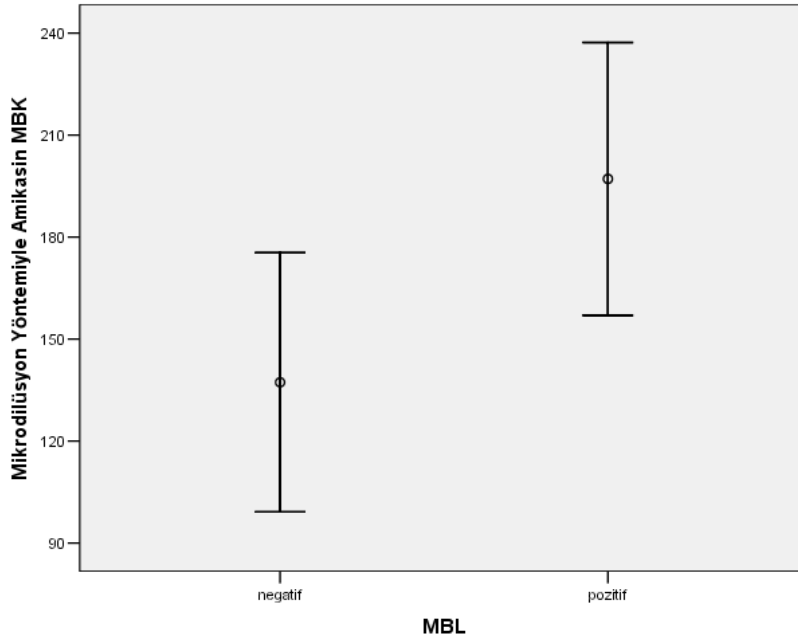
Şekil 4.4. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan amikasin MİK değerleri.



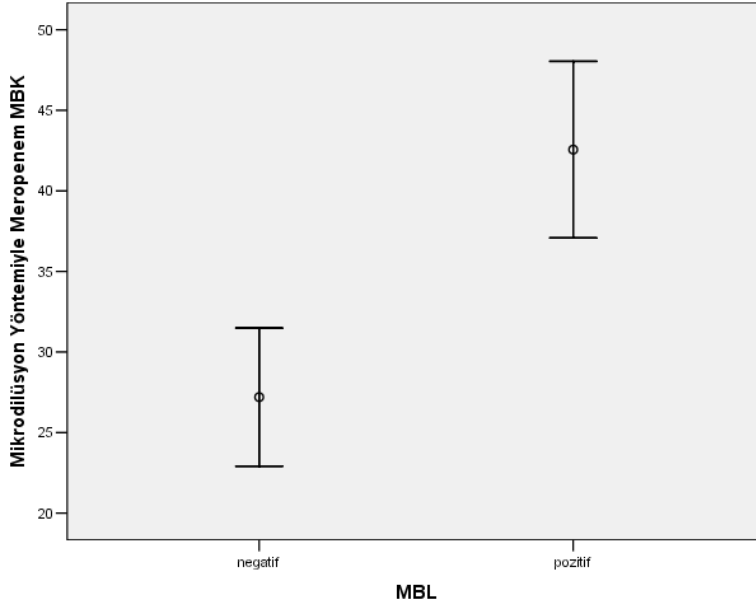
Şekil 4.5. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan meropenem MİK değerleri.



Şekil 4.6. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan FİK max değerleri.

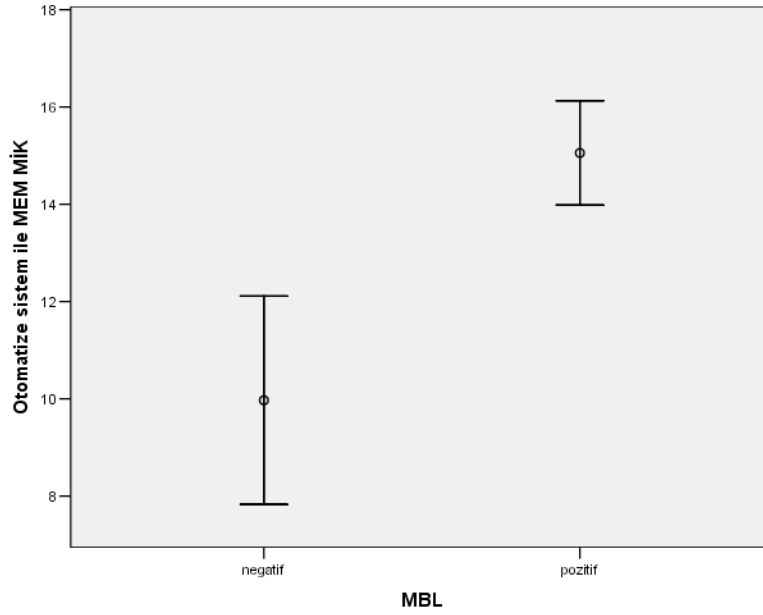


Şekil 4.7. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan amikasin MBK değerleri.

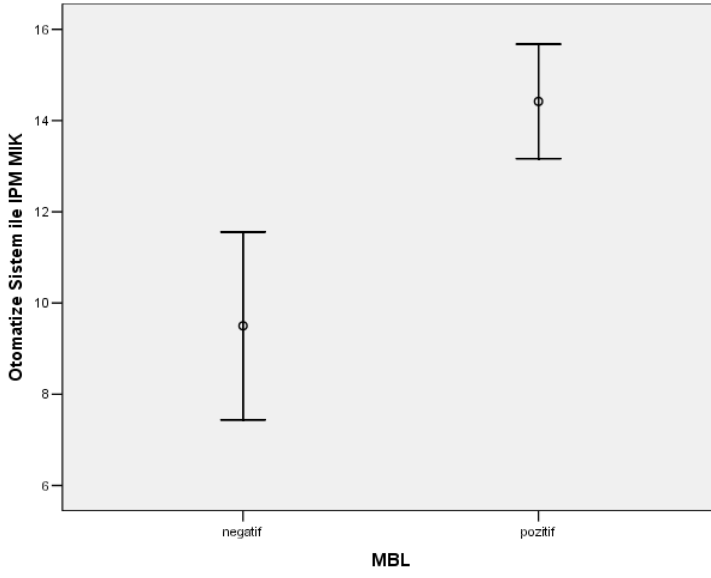


**Şekil 4.8.** MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan meropenem MBK değerleri.

MBL pozitif kökenlerde otomatize sistem ile saptanan meropenem MİK ( $p < 0,001$ ) ve imipenem MİK ( $p < 0,001$ ) değerleri daha yüksek olarak bulundu (Şekil 4.9, 4.10).

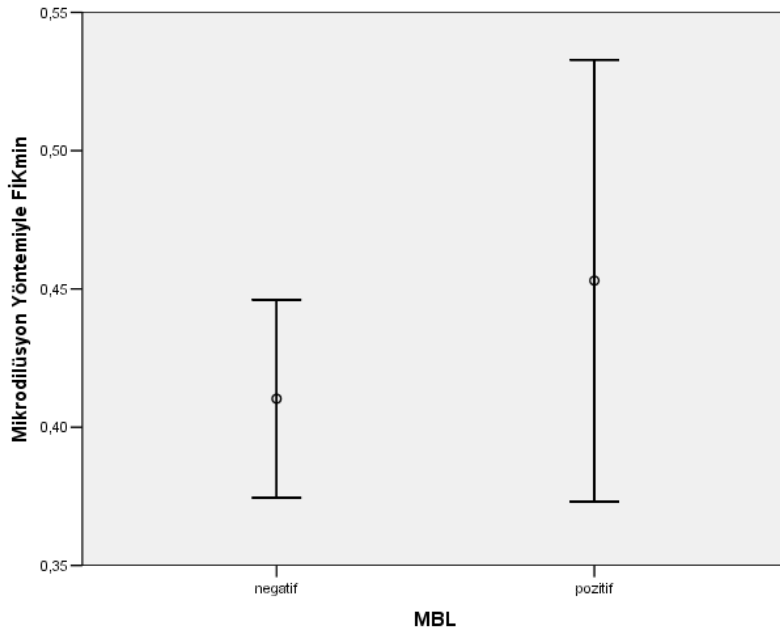


**Şekil 4.9.** MBL pozitif ve negatif kökenlerde otomatize sistem ile saptanan meropenem MİK değerleri.

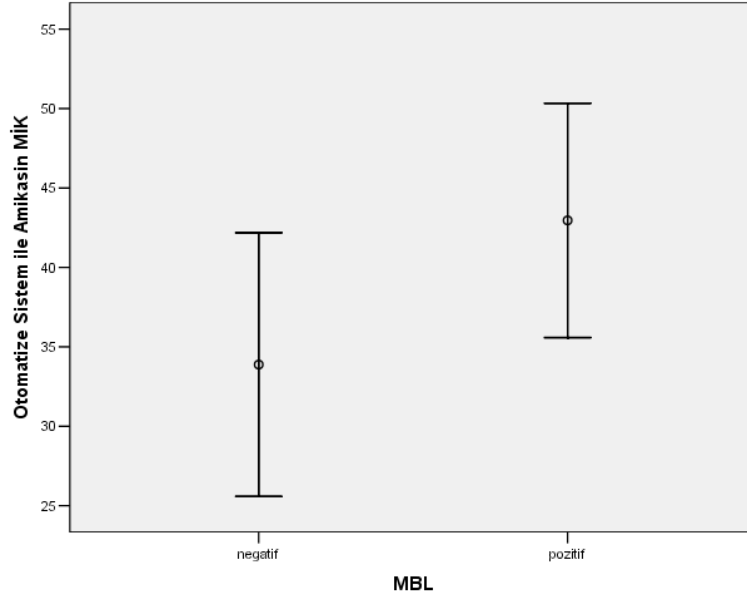


Şekil 4.10. MBL pozitif ve negatif kökenlerde otomatize sistem ile saptanan imipenem MİK değerleri.

Mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan  $FİK_{min}$  ve otomatize sistem ile saptanan amikasin MİK değerleri arasında MBL pozitif ve negatif kökenlerde farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



Şekil 4.11. MBL pozitif ve negatif kökenlerde mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan  $FİK_{min}$  değerleri.



**Şekil 4.12.** MBL pozitif ve negatif kökenlerde otomatize sistem ile saptanan amikasin MİK değerleri.

MBL pozitif kökenlerde sinerjik etkileşim saptanan meropenem amikasin konsantrasyonları Çizelge 4.13’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.13.** MBL pozitif kökenlerde sinerjistik etkileşim saptanan amikasin meropenem konsantrasyonları.

KÖKEN NO	KONSANTRASYONLAR (µg/ml)			KÖKEN NO	KONSANTRASYONLAR (µg/ml)		
	AMİKASİN/MEROPENEM				AMİKASİN/MEROPENEM		
1	--	---	---	30	8/2	4/4	2/8
2	---	---	---	31	32/1	8/2	4/4
3	16/4	---	---	32	8/4	--	--
4	8/8	---	---	33	8/4	--	--
5	8/1	---	---	34	16/2	8/4	--
6	16/2	---	---	35	32/1	16/2	8/4
7	16/4	8/8	--	36	8/2	4/4	--
8	8/2	---	---	37	2/2	2/4	--
9	8/2	---	---	38	2/2	2/4	--
10	8/1	4/2	---	39	16/2	8/4	--
11	---	---	---	40	16/2	4/4	--
12	---	---	---	41	16/2	8/4	--
13	---	---	---	42	16/2	8/4	--
14	---	---	---	43	8/2	--	--
15	8/8	---	---	44	2/4	--	--
16	8/4	---	---	45	8/1	4/2	2/4
17	8/4	---	---	46	4/1	2/2	--
18	32/8	---	---	47	8/1	4/2	2/4
19	8/4	---	---	48	2/4	--	--
20	32/1	32/2	16/4	49	8/2	4/4	--
21	16/2	---	---	50	8/1	8/2	2/4
22	---	---	---				
23	16/4	16/8	---				
24	8/4	---	---				
25	8/8	---	---				
26	---	---	---				
27	8/4	8/8	---				
28	2/8	4/2	2/4				
29	16/2	16/4	8/8				

MBL negatif kökenlerde sinerjik etkileşim saptanan meropenem-amikasin konsantrasyonları Çizelge 4.14’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.14.** MBL negatif kökenlerde sinerjistik etkileşim saptanan amikasin meropenem konsantrasyonları.

KÖKEN NO	KONSANTRASYONLAR (µg/ml)			KÖKEN NO	KONSANTRASYONLAR (µg/ml)		
	AMİKASİN/ MEROPENEM				AMİKASİN/MEROPENEM		
51	8/1	4/2	2/4	81	4/2	--	--
52	4/2	--	--	82	2/1	--	--
53	--	--	--	83	2/1	--	--
54	4/2	--	--	84	1/1	--	--
55	16/1	16/2	--	85	1/1	--	--
56	8/2	--	--	86	16/1	8/2	4/4
57	8/1	8/2	--	87	2/1	--	--
58	16/1	8/2	--	88	16/2	--	--
59	16/4	--	--	89	2/1	--	--
60	--	--	--	90	8/2	--	--
61	8/1	4/2	--	91	2/1	--	--
62	8/2	--	--	92	1/1	--	--
63	4/1	2/2	--	93	1/1	--	--
64	64/4	--	--	94	1/1	--	--
65	32/2	--	--	95	--	--	--
66	8/2	--	--	96	16/1	8/2	8/4
67	--	--	--	97	8/2	1/4	--
68	2/1	--	--	98	1/1	--	--
69	4/1	2/2	--	99	16/1	4/2	4/4
70	4/1	4/2	--	100	16/1	4/2	2/4
71	16/1	8/2	4/4				
72	4/2	--					
73	2/2	--	--				
74	16/1	2/2	2/4				
75	2/1	--	--				
76	8/1	8/2	4/4				
77	1/1	1/2	--				
78	2/1	1/2	--				
79	4/2	--	--				
80	32/1	8/2	--				

Çalışmaya dahil edilen tüm kökenlerin izole edildiği örnekler, geldiği klinikler, E test yöntemi ile saptanan ΣFİK ve mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen amikasin ve meropenem için MİK, FİK<sub>max.</sub>, FİK<sub>min.</sub> ve MBK değerleri Çizelge 4.15 ve 4.16'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.15.** MBL pozitif kökenlerde E test ve Mikrodilüsyon yöntemlerinin sonuçları.

KÖKEN NO	ÖRNEK*	KLİNİK**	E TEST	MİKRODİLÜSYON <sup>††</sup>					
			ΣFİK <sup>†</sup> (µg/ml)	MİK-AK (µg/ml)	MİK-MEM (µg/ml)	ΣFİK <sub>max.</sub> (µg/ml)	ΣFİK <sub>min.</sub> (µg/ml)	MBK AK (µg/ml)	MBK MEM (µg/ml)
1	Yara	Ortopedi	2,5	16	8	1,125	0,75	32	16
2	Yara	Ortopedi	3	128	32	1,125	0,625	512	64
3	Yara	Dermatoloji	2,25	64	16	1,06	0,5	256	64
4	T.asp	CYB	2,25	64	32	1,25	0,375	128	64
5	Balgam	Göğüs	2,5	32	4	0,75	0,5	128	16
6	Yara	Ortopedi	3	128	16	1	0,25	256	32
7	İdrar	Çocuk Cerrahi	0,625	64	32	0,56	0,375	256	64
8	İdrar	DYB	3	32	8	0,625	0,5	128	32
9	Balgam	DYB	2,5	64	16	1,06	0,375	256	64
10	Kan	DYB	3	32	8	0,75	0,375	256	16
11	Balgam	DYB	2	64	8	1,5	1,25	128	32
12	Balgam	Göğüs	0,3	16	8	1,5	1,125	64	16
13	T.asp	DYB	5	16	4	1,5	1,25	128	16
14	Yara	Ortopedi	0,24	4	2	1,5	1,5	32	16
15	BOS	Beyin Cerrahi	1,125	32	32	1,125	0,5	128	64
16	Balgam	DYB	2,75	32	16	1,06	0,5	128	32
17	Kan	DYB	1,75	32	16	1,25	0,5	64	32
18	Balgam	CYB	0,5	128	32	1,03	0,5	256	64
19	Yara	Ortopedi	2	64	16	1,06	0,375	256	32
20	Kan	DYB	1,1	128	32	0,515	0,25	512	64
21	Balgam	DYB	2,25	64	8	1,125	0,5	256	32
22	Kan	CYB	2,5	64	8	1,125	0,75	128	32
23	Yara	Ortopedi	1	64	32	0,625	0,375	128	64
24	Balgam	CYB	2	64	16	1,125	0,375	256	32
25	Balgam	DYB	0,8	128	32	0,53	0,375	512	64
26	Kan	DYB	3	128	32	1,125	0,53	256	64
27	Kan	DYB	1,1	32	32	1,03	0,375	128	64
28	Kan	CYB	2,125	16	32	0,56	0,25	64	64
29	T.asp	DYB	4	64	32	1,03	0,375	256	64
30	Kan	DYB	0,59	64	32	1,03	0,185	128	64



**Çizelge 4.15.** MBL pozitif kökenlerde E test ve Mikrodilüsyon yöntemlerinin sonuçları (devam).

KÖKEN NO	ÖRNEK*	KLİNİK**	E TEST	MİKRODİLÜSYON ††					
			ΣFİK † (µg/ml)	MİK-AK (µg/ml)	MİK-MEM (µg/ml)	ΣFİK <sub>max.</sub> (µg/ml)	ΣFİK <sub>min.</sub> (µg/ml)	MBK AK (µg/ml)	MBK MEM (µg/ml)
31	Balgam	CYB	1,5	128	16	0,515	0,185	512	32
32	Balgam	DYB	2,5	32	16	0,625	0,5	128	64
33	Balgam	CYB	3,5	64	16	0,625	0,375	256	32
34	Balgam	DYB	1	64	16	0,56	0,185	256	64
35	İdrar	CYB	3	128	32	0,515	0,185	512	32
36	Balgam	CYB	1,1	32	16	1,06	0,375	64	16
37	Balgam	DYB	0,1	16	16	0,625	0,25	64	32
38	Balgam	DYB	0,26	8	16	1,06	0,375	32	16
39	Balgam	DYB	1,5	128	16	0,56	0,25	256	32
40	Yara	Plastik Cerrahi	4,5	64	16	0,56	0,31	128	32
41	Balgam	CYB	2,75	64	16	0,56	0,375	256	64
42	Kan	DYB	0,55	128	16	0,56	0,25	512	32
43	İdrar	Beyin Cerrahi	1,5	32	8	1,125	0,5	128	16
44	Yara	Üroloji	1,125	16	16	0,625	0,375	64	32
45	İdrar	CYB	4	32	16	0,53	0,25	128	64
46	Balgam	DYB	0,28	16	8	0,625	0,375	32	32
47	T.asp	DYB	0,9	32	16	0,56	0,25	64	32
48	Balgam	DYB	0,2	16	16	1,06	0,375	64	32
49	Kan	DYB	1,25	64	16	0,56	0,25	256	64
50	İdrar	CYB	6,5	32	16	0,56	0,31	128	64

\* T.asp: Trakeal aspirat. BOS: Beyin omurilik sıvısı.

\*\* CYB: Cerrahi yoğun bakım. DYB: Dahiliye yoğun bakım. FTR: Fizik tedavi ve rehabilitasyon.

† ΣFİK: Toplam fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi.

† † MİK-AK: Amikasin için minimal inhibisyon konsantrasyonu.

MİK-MEM: Meropenem için minimal inhibisyon konsantrasyonu.

ΣFİK<sub>min.</sub>: Minimum fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu.

ΣFİK<sub>max.</sub>: Maksimum fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu.

MBK-MEM: Meropenem için minimal bakterisidal konsantrasyonu.

MBK-AK: Amikasin için minimal bakterisidal konsantrasyonu.

**Çizelge 4.16.** MBL negatif kökenlerde E test ve Mikrodilüsyon yöntemlerinin sonuçları.

KÖKEN NO	ÖRNEK*	KLİNİK**	MİKRODİLÜSYON †					
			MİK-AK (µg/ml)	MİK-MEM (µg/ml)	ΣFİK <sub>max.</sub> (µg/ml)	ΣFİK <sub>min.</sub> (µg/ml)	MBK AK (µg/ml)	MBK MEM (µg/ml)
51	Yara	Ortopedi	32	16	0,56	0,25	64	32
52	T.asp	DYB	16	8	0,625	0,5	64	16
53	Yara	Ortopedi	16	4	0,75	0,625	32	16
54	T.asp	CYB	16	8	0,625	0,5	64	32
55	Yara	Dermatoloji	64	8	0,625	0,375	256	32
56	Balgam	Göğüs	64	8	0,625	0,375	128	16
57	T.asp	DYB	32	8	0,625	0,375	128	16
58	T.asp	DYB	64	8	0,53	0,375	256	32
59	Balgam	CYB	64	16	1,125	0,5	256	64
60	Yara	Dahiliye	32	8	0,75	0,625	128	32
61	Yara	Enfeksiyon	32	8	0,56	0,375	256	32
62	Balgam	CYB	32	8	1,125	0,5	128	32
63	Yara	Dermatoloji	16	8	0,56	0,375	64	16
64	Balgam	CYB	256	16	0,625	0,5	512	32
65	Balgam	DYB	128	8	0,75	0,5	512	32
66	Kan	CYB	32	8	0,75	0,5	128	32
67	İdrar	Dahiliye	8	4	0,75	0,75	64	16
68	İdrar	CYB	8	4	0,625	0,5	64	8
69	T.asp	DYB	32	8	0,53	0,25	64	16
70	Yara	Dermatoloji	16	8	0,625	0,375	32	16
71	Kan	Dahiliye	64	16	0,53	0,25	256	32
72	Balgam	B.Cerrahi	16	8	0,625	0,5	64	16
73	Yara	Dermatoloji	16	8	0,625	0,375	64	32
74	Balgam	Dahiliye	64	16	0,53	0,155	128	64
75	Vücut Sıvısı	Göğüs	8	4	0,75	0,5	32	16
76	T.asp	DYB	32	16	0,53	0,31	128	32
77	Yara	B.Cerrahi	8	8	0,56	0,25	32	16
78	Yara	Ortopedi	8	8	0,56	0,375	64	32
79	Yara	Ortopedi	16	8	0,625	0,5	64	32
80	İdrar	FTR	128	8	0,515	0,31	512	64

**Çizelge 4.16.** MBL negatif kökenlerde E test ve Mikrodilüsyon yöntemlerinin sonuçları (devam).

KÖKEN NO	ÖRNEK*	KLİNİK**	MİKRODİLÜSYON †					
			MİK-AK (µg/ml)	MİK-MEM (µg/ml)	ΣFİK <sub>max.</sub> (µg/ml)	ΣFİK <sub>min.</sub> (µg/ml)	MBK AK (µg/ml)	MBK MEM (µg/ml)
81	Yara	Çocuk Cerrahisi	16	8	0,625	0,5	64	32
82	Yara	Plastik Cerrahi	8	4	0,625	0,5	32	16
83	İdrar	CYB	8	4	0,75	0,5	32	8
84	Balgam	Göğüs	4	4	0,75	0,5	16	8
85	Yara	Ortopedi	8	4	0,56	0,375	64	16
86	Yara	Ortopedi	64	16	0,53	0,25	256	32
87	İdrar	Çocuk	8	4	0,625	0,5	32	16
88	Yara	CYB	64	8	0,625	0,5	128	32
89	Yara	Dermatoloji	8	4	0,625	0,5	64	16
90	Balgam	CYB	64	8	0,625	0,375	256	32
91	Balgam	Beyin Cerrahi	8	4	0,56	0,5	64	16
92	İdrar	Beyin Cerrahi	8	4	0,56	0,375	32	16
93	T.asp	CYB	8	4	0,56	0,375	64	32
94	T.asp	DYB	16	4	0,56	0,31	64	16
95	İdrar	DYB	16	2	0,56	0,56	64	8
96	Balgam	Göğüs	64	16	0,53	0,25	256	64
97	Kan	Göğüs	64	16	0,56	0,25	128	32
98	Yara	Dermatoloji	8	4	0,56	0,375	64	16
99	Balgam	Genel Cerrahi	64	16	0,53	0,185	512	64
100	Yara	Genel Cerrahi	64	16	0,515	0,185	128	32

\*T.asp: Trakeal aspirat. BOS: Beyin omurilik sıvısı.

\*\*CYB: Cerrahi yoğun bakım. DYB: Dahiliye yoğun bakım. FTR: Fizik tedavi ve rehabilitasyon.

† MBK-AK: Amikasin için minimal bakterisidal konsantrasyonu.

MİK-MEM: Meropenem için minimal inhibisyon konsantrasyonu.

MBK-MEM: Meropenem için minimal bakterisidal konsantrasyonu.

ΣFİK<sub>max.</sub>: Maksimum fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu.

MİK-AK: Amikasin için minimal inhibisyon konsantrasyonu.

ΣFİK<sub>min.</sub>: Minimum fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu.

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda özellikle YBÜ’nde nozokomiyal infeksiyonlara sebep olan türler arasında *Acinetobacter* türleri ilk sıralarda yer almaktadır. *Acinetobacter* türleri ÇİD olabilmeleri ötesinde, kullanımda olan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirme potansiyeline sahip olmaları ve sonuçta sebep oldukları mortaliye varan tedavi çıkmazında aşılması zor bir problem haline gelmiştir.

Hastane ortamında hastalarda kolayca kolonize olabilen *Acinetobacter* türleri, kuru ortamlara dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH değerlerine tolerans göstermeleri ve klinik kullanımdaki çoğu antibiyotiklere karşı çoğul direnç geliştirmeleri nedeniyle tedavide sorun çıkarırken özellikle hasta sirkülasyonunun ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının yüksek olduğu YBÜ’lerde bu sorun daha fazla önem arz etmektedir (Topçu ve ark. 2002).

Neden oldukları infeksiyonların tedavisinde öncelikli ve en sık kullanılan beta laktam antibiyotiklerine karşı *Acinetobacter* türlerinin büyük oranda direnç kazanması çoğunlukla ürettikleri beta laktamaz enzimlerine bağlıdır (Murray ve ark. 2003). Bu enzimlerden özellikle MBL enzimi üreten kökenler aztreonam dışındaki tüm beta laktam antibiyotikleri hidroliz edebilme yeteneğini kazanarak karbapenemlere, sefalosporinlere ve sefamisinlere karşı direnç kazanırlar ve buna bağlı olarak da MBL üreten bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde beta laktam antibiyotikler kullanım dışı kalırlar. Ayrıca MBL üretici genler ile birlikte aminoglikozid direnç genlerinin aynı lokasyonda bir arada bulunması tedavide aminoglikozid kullanımını da kısıtlamaktadır (Murray ve ark. 2003).

*Acinetobacter baumannii* klinik kökenlerinde; 1980 yılı itibariyle antibiyotik direnci giderek artmaktadır (Paterson 2006). ABD “Ulusal Nozokomiyal İnfeksiyonlar Sürveyansı’nın (NNIS) 1986-2003 yılları arasını kapsayan bir çalışmada *A. baumannii* kökenlerinde, amikasin direncinin %3’den %20’ye, seftazidim direncinin %24’den %67’ye imipenem direncinin de %20’lere çıktığı ortaya konmuştur (Gaynes ve Edwards 2005).

İngiltere’de yapılan başka bir çalışmada ise 399 *Acinetobacter* kökeninde karbapenem direnci 1998’de tespit edilmezken, 2006’da %55 olarak tespit edilmiştir (Wareham ve ark. 2008).

Ülkemizde dokuz hastanenin dahil olduğu ve 2000-2003 yıllarını içine alan bir çalışmaya göre, izole edilen *Acinetobacter* türlerinin %42’sinin meropeneme, %48’inin imipeneme, %84’ünün seftazidime, %91’inin sefotaksime, %82’sinin piperasilin-tazobaktama, dirençli olduğu görülmüştür (Korten ve ark. 2007). Yine Gözütok ve ark. yaptıkları çalışmada 161 *A. baumannii* kökeninin %59’unun amikasinine, %91’inin imipenem ve meropeneme, %97’sinin ise piperasilin-tazobaktama dirençli olduğunu tespit etmişlerdir (Gözütok ve ark. 2013). Çalışmamızda ise kökenlerin Vitek 2 otomatize sistemle belirlenmiş duyarlılık sonuçlarına göre; %94’ü meropeneme, %88’i imipeneme, %40’ı da amikasinine dirençli bulunmuştur.

MBL üreten kökenlerin başını çektiği ciddi *Acinetobacter* infeksiyonlarının tek bir antibiyotik çeşidiyle uygulanan tedavisindeki artan başarısızlık artık, tedavinin, farklı mekanizmalarla etki eden ve sinerjik etki gösteren en az iki antibiyotik kombinasyonu ile uygulanmasını gerekli hatta zorunlu kılmıştır. Kombine antibiyotik kullanımı, dirençli kökenlere karşı ampirik tedavide klinisyenlere alternatif bir seçenek sunarak sinerjik bir etki sağlanması, dozaja bağlı toksisitesinin azaltılması ve infeksiyon hastalığının ilerlemesinin durdurulması noktasında önem arz etmektedir (Gürler ve ark. 2008).

*Acinetobacter* türlerinin tedavisinde karbapenem grubu antibiyotikler, sulbaktam, minosiklin, tigesiklin ve kolistin en etkin antibiyotikler olmakla birlikte ciddi infeksiyonların tedavisinde bir beta laktam ile beraber bir aminoglikozid ya da bir fluorokinolon kombinasyonu başarılı tedavide iyi bir seçenek olabilmektedir (Gürler 2008, Akalın 2003).

Antimikrobiyallerin birbirleriyle kombinasyonlarının yarattığı sinerjik, aditif ya da antagonist etkilerin klinisyenlerce bu kombinasyonların tercihi öncesi bilinmesi, *Acinetobacter* türlerinin tedavisinde faydalı olmaktadır. Bu noktada in

vitro sinerji testleri kombinasyonların meydana getirdiği etkileşimlerin tespitinde yol gösterici olmaktadır (Falagas ve ark 2007).

Ülkemizde (Aşık ve Torun 2006) yapılan bir çalışmada 45 *Acinetobacter* kökeninde metallo beta laktamaz varlığı araştırılmış, E test ile %44,4, modifiye hodge testi ile %26,7, kombine disk metodu ile %28,8, imipenem-EDTA çift disk sinerji testi ile %20 oranında pozitiflik tespit edilmiştir.

Kan kültürü örneklerinden izole edilen 100 *Acinetobacter* kökeninde yapılan başka bir çalışmada ise E test ile %51, imipenem/imipenem-EDTA ile %54, meropenem/meropenem-EDTA ile %59 ve modifiye hodge testi ile %54 oranında MBL pozitif köken saptanmıştır (Sarigüzel ve ark 2008). Yapılan başka bir çalışmada (Tetik 2008), tamamı imipenem ve meropenem dirençli 61 *A. baumannii* kökeninde E test ile %80, modifiye hodge testi ile %74 ve kombine disk metodu ile %75 oranında MBL pozitif köken tespit edilmesi dirençli (özellikle imipenem) kökenlerde MBL enzim sıklığının daha fazla oranda bulunması görüşünü desteklemektedir.

Diğer ülkelerde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Pakistan'da tamamı karbapenem dirençli 50 *A. baumannii* kökeninde yapılan MBL E testinde %78 (39/50) oranında pozitiflik bulunmuştur (Kaleem ve ark 2010). Yine Hindistan'da Gupta ve ark.(2012) tarafından yapılan bir çalışmada %54,1'i imipenem dirençli 85 *Acinetobacter*'de E test ve imipenem-EDTA kombine disk testi ile %41,3 oranında MBL pozitifliği saptanmıştır.

In vitro kombinasyon etkinliğinin ölçülmesinde en çok kullanılan yöntemler E test, dama tahtası ve zamana bağlı öldürme yöntemleri olmakla birlikte E test yöntemi ticari olarak kolay tedarik edilmesi, zahmetinin diğerlerine nazaran daha az oluşu, basitçe uygulanması ve dama tahtası yöntemiyle yüksek oranda korelasyon göstermesi açısından çokça tercih edilmektedir.

*Acinetobacter*'lerde sinerjik aktivitelerinden dolayı klinikte ampirik tedavide halen en çok tercih edilen ve in vitro çalışmalarda en çok denemesi devam eden,

bizim de çalıştığımız kombinasyon bileşenleri olan bir beta laktam ile bir aminoglikozid seçiminden oluşmaktadır.

Çalışmamızda meropenem ve amikasin kombinasyonunun in vitro etkinliğinin ölçülmesinde kullandığımız ilk yöntem olan E testte, 50 MBL pozitif kökenin %76'sında (38/50) aditif veya indiferan (farksız), %14'ünde (7/50) sinerjistik, %10'unda (5/50) antagonist etkileşim tespit edilmiştir. %94 (47/50)'ü meropeneme, %88 (44/50)'i imipeneme ve %48 (24/50)'i amikasine dirençli olduğunu Vitek 2 otomatize sistemle belirlediğimiz kökenlerin büyük kısmının aditif veya indiferan (farksız) olması, ürettikleri MBL sayesinde kazandıkları yüksek antibiyotik direncinden ileri geldiği düşünülmektedir.

Sarıgüzel ve ark. (2010) tarafından kombinasyonda meropenemin sefoperazon/sulbaktam ile kombine kullanıldığı ve E test ile yapılan bir çalışmada, toplamda 100 *A. baumannii* kökeninde %49 sinerji, %51 aditif veya indiferan etkileşimleri tespit edilmiş olup antagonist etkileşim tespit edilmemiştir. Sinerji oranının çalışmamızdan biraz yüksek çıkması, meropenemin amikasin yerine sefoperazon/sulbaktam ile kombine çalışılmasından kaynaklanabileceği ve/veya ÇİD kökenlerin seçilmesine rağmen MBL enzimi üreten kökenlerin azlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda ve yapılan diğer birçok çalışmada karbapenem direnci gösteren kökenlerde MBL enzim varlığı yüksek çıkarsa da dirençli MBL negatif kökenlerin de söz konusu olduğu görülmektedir.

Benzer başka bir E test çalışmasında Kiratisin ve ark. (2010) ÇİD ve geniş ilaç direnci (XDR) gösteren kökenlerin da olduğu toplamda 40 *A. baumannii* kökeninde meropenem/sefoperazon için %44 sinerjistik aktivite tespit etmişlerdir. Antagonist etkileşimin saptanmadığı çalışmada diğer kökenler aditif ya da indiferan aktivite göstermişlerdir.

Çalışmamızda kullandığımız diğer kombinasyon ölçüm yöntemi olan ve mikrodilüsyon esasına dayanan dama tahtası metodu zaman alıcı ve de yorucu olmasına rağmen en sık kullanılan ve standart test olarak kabul edilen bir yöntemdir (Köksal 2010). Bu yöntemle yaptığımız çalışmada, %94'ü meropeneme, %88'i imipeneme ve %48'i amikasine dirençli toplamda 50 MBL pozitif kökende %74

aditif/indiferan, %26 sinerjik etkileşim tespit edilmiş ve antagonist bir aktivite saptanmamıştır. %54'ü imipeneme, %60'ı meropeneme, %46'sı amikasin dirençli diğer 50 MBL negatif kökenin aynı yöntemle belirlenen kombinasyon etkileşim sonuçlarına göre kökenlerin %72'si sinerjik ve %28'i aditif/indiferan bulunurken antagonist etkileşim yine saptanmamıştır.

Sopirala ve ark. (2010) E test ve dama tahtası yöntemleriyle yaptıkları amikasin/tigesiklin kombinasyon çalışmasında, 32 *A. baumannii* kökeninde her iki yöntemde de tüm kökenler için aditif/indiferan etkileşim tespit etmişler %100 uyum oranını bildirmişlerdir. Yine Öz ve ark.(2008) 30 izolatta yaptıkları kombinasyon etkileşim sonuçlarında, metodlar arasında %87 uyum hesaplamışlardır. Çalışmamızdaki MBL pozitif kökenlerin E test ve dama tahtası yöntemleriyle tespit edilen sonuçları kıyaslandığında kökenlerin %56'sında her iki test ile aditif etkileşim saptanırken %6'sında sinerjik etkileşim saptanmıştır. Böylece her iki yöntemle aynı etkileşim (sinerji ve aditif) sonucunu veren kökenlerdeki uyum ise %62 olarak bulunmuştur.

Fakat Martin ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada 30 *A. baumannii* kökeninde kolistin/tobramisin kombinasyonunun ve 25 *A. baumannii* kökeninde ise rifampisin ve tobramisin kombinasyonunun etkinliğini her iki yöntemle ölçmüşler ve dama tahtası yöntemiyle tamamiyle sinerjik bulunurken, E test ile tamamı bu sefer aditif/indiferan olarak tespit edilmiştir. Böylece her iki kombinasyon yöntemleri arasında tam bir uyumsuzluk bildirmişlerdir.

MBL pozitif olan 50 kökende dama tahtası yöntemi ile bulduğumuz %26 sinerjik, %74 aditif/indiferan (farksız) etkileşim oranı ayrıca E testle tespit edilen %14 sinerjik, %76 aditif/indiferan, %10 antagonist etkileşim oranı; ÇİD gösteren ve/veya MBL üreten *Acinetobacter* kaynaklı infeksiyonlara karşı başarılı bir tedavi için, meropenem/amikasin kombinasyonunun kullanımını kısıtlamaktadır.

Öte yandan 50 MBL negatif kökende meropenem/amikasin için bulduğumuz %72 sinerjik ve %28 aditif/indiferan (farksız) etkileşim oranlarına ve hiçbir kökende antagonist etkileşim saptanmamış olmasına bakarak; MBL enzimi üretmediği



saptanan *Acinetobacter* kökenlerin oluşturduğu infeksiyonların karşı uygulanan tedavide meropenem/amikasin kombinasyonu bir seçenek olarak değerlendirilebilmekle birlikte ileri klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

MBL enzimine sahip kökenlerin büyük çoğunluğu karbapenemlere karşı direnç göstermektedirler. Farklı antibiyotik kombinasyonlarıyla çalışılıp dirençli kökenler üzerinde sinerjik etkileşim saptanan birçok çalışma mevcuttur.

Şener ve ark. (2005) ÇİD 12 *Acinetobacter* kökeni ile dama tahtası yöntemiyle yaptıkları çalışmada amikasin/sulbaktam-ampisilin (SAM) kombinasyonu için %25 sinerji ve %75 etkisiz, amikasin/imipenem kombinasyonu için %17 sinerji ve %83 etkisiz, SAM/siproflaksasin kombinasyonu için ise %9 sinerji ve %92 etkisiz etkileşim tespit etmişlerdir. Yine aynı metodla Marques ve ark. (1997) 14 *Acinetobacter* kökeninde SAM/amikasin kombinasyonu için %21 oranında sinerjik etkileşim saptarken Altoparlak ve ark. (2003) 15 ÇİD *A. baumannii*'yi dahil ettikleri çalışmalarında disk difüzyon yöntemiyle amikasin/imipenem kombinasyonunda %33,3 sinerji ve amikasin/piperasilin-tazobakt kombinasyonunda ise % 20 sinerji oranı tespit etmişlerdir.

Özseven ve ark. (2011) tarafından dama tahtası yöntemiyle yapılan bir çalışmada ÇİD 34 *A. baumannii* kökeninde meropenem/SAM kombinasyonunda %94,1 oranında sinerji, imipenem/SAM kombinasyonunda ise %88,2 oranında sinerji saptanmıştır.

Diğer yapılan çalışmalar incelendiğinde, çalışmamızda amikasin yerine meropenemle birlikte SAM ya da meropenem yerine amikasin ile birlikte SAM kullanıldığında daha sinerjik bir aktivite elde edileceği düşünülmektedir.

Bu düşüncüyü destekleyen bir çalışmaya göre; Ko ve ark. (2003) in vivo olarak yaptıkları bir araştırmada farelere öncelikle  $2,1-2,6 \times 10^7$  cfu/ml ÇİD *A. baumannii* inokule etmişlerdir. Daha sonra farelerde meropenemi tek başına (monoterapi) ve sonrasında sulbaktamla kombine olarak doz şeklinde vermişler.

Monoterapi ile sağlanan %35'lik iyileşme durumunun, meropenem/sulbaktam şeklinde kombine kullanımı sonucu %87'ye yükseldiğini gözlemlemişlerdir.

*A. baumannii* kaynaklı infeksiyonlara karşı bazı araştırmacılar (Gordon ve ark. 2010) için “son çare” olarak görülen polimiksinler ile yapılan mikrodilüsyon temelli bir çalışmada (Özseven ve ark. 2011) 34 ÇİD *A. baumannii* kökeni için polimiksin B (PB)/imipenem kombinasyonunda %38,2 oranında sinerji ve meropenem/PB kombinasyonunda ise %2,9 sinerji oranı saptanmıştır. Yine aynı yöntemle Martin ve ark. (2010) tarafından ÇİD 30 *A. baumannii* izolatında yapılan polimiksin E (kolistin)/tobramisin kombinasyonunda, 30 izolatta sinerjik etkileşim saptanırken E test yöntemiyle 30 izolat bu defa aditif/indiferan bulunmuştur.

Kolistin, bakterisidal etkili olmasına rağmen 1980'lerde nefrotoksisite, nörotoksisite göstermesi sebebiyle kullanımında ciddi bir azalma olmuştur. Yine de Petrosillo ve ark. (2005) tarafından bildirilen bir çalışmada, VIP tanısı konulan 14 hastada kolistin/rifampisin kombinasyon tedavisiyle hastaların yarısında (7/14) iyileşme görüldüğü gözlemlenmiştir.

ÇİD 121 *A. baumannii*'de tigesiklin duyarlılık oranının araştırıldığı bir çalışmada (Kuşcu ve ark. 2009) tüm kökenlerin %5'i dirençli bulunurken, başka bir çalışmada (Çıkman ve ark. 2011) yarısı imipeneme dirençli 130 *A. baumannii* kökeninde tigesikline direnç oranı %14 olarak saptanmıştır.

Tigesiklin, tek başına kullanımda yüksek derecede etkin gözükmemektedir. Bununla birlikte, bir çalışmada (Madhuri ve ark. 2010) 32 panrezistan *A. baumannii* kökenindeki tigesiklin/imipenem kombinasyonunda E test ve zamana bağlı öldürme yöntemi ile %13 sinerjistik ve amikasin/tigesiklin kombinasyonunda ise E test ve dama tahtası yöntemi ile %100 etkisiz bir etkileşim gösterilmiştir.

Tan ve ark. (2010) tarafından 16'sı XDR olmak üzere toplamda 48 *A. baumannii* kökeninde yapılan PB/tigesiklin/rifampin 3'lü kombinasyonunda zamana bağlı öldürme yöntemi ile %40, dama tahtası yöntemi ile de %17 sinerjik aktivite kaydedilmiştir.

Rifampisin/meropenem ve rifampisin/imipenem kombinasyonu ile yapılan başka bir çalışmada (Özseven ve ark. 2011) 34 ÇİD *A. baumannii* kökeninde sırasıyla %17,6 ve %73,5 sinerjik etkileşim saptanmıştır.

Günümüzde geniş spektrumlu antibiyotiklerin fazlaca ve bazen gereksiz yere kullanılmasından ötürü kazandırılan bakteri direnci, ayrıca çoklu ilaç direnci gösteren kökenlerle diğer kökenler arasında gerçekleşen horizontal gen transferi, araştırmacıları antibiyotik dışı birtakım alternatif tedavi arayışlarına yöneltmiştir. Çeşitli polipeptid çalışması bunlardan biridir. Örneğin; Malone ve Kwon (2013) tarafından zamana bağlı öldürme ve dama tahtası yöntemi kullanılarak aztreonam/poliamin kombinasyonu çalışılmıştır. Çalışmada karbapenem grubunu da içeren ÇİD standart kökenler (*A. baumannii* ATCC 19606 ve A118) kullanılmıştır. Çalışma sonucunda aztreonam MİK değerinin (>128) poliaminle kombinasyonu sonucu 0.25-8 aralığına düştüğü saptanmıştır.

Kombinasyon çalışmamız için incelediğimiz literatürlerin genelinde bir sonuca varmamız gerekirse karbapenem/sulbaktam, karbapenem/tigesiklin, karbapenem/kolistin, karbapenem/rifampisin kombinasyonları çalıştığımız ilaç grubuna ek olarak dirençli *Acinetobacter*'lerde sinerjik aktivite gösteren kombinasyon çeşitleridir. Karbapenemli kombinasyonların test edildiği çoğu çalışmada ÇİD *Acinetobacter* kökenlerinde imipenem meropenemden daha sinerjik aktivite göstermiştir. Özellikle ÇİD kökenlerin infeksiyon tedavisinde tercih aşamasında ilk seçenek olarak meropenemden önce imipenem kullanılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Bu çalışmada E test ve dama tahtası yöntemiyle toplam 450 ΣFİK hesaplandı. ΣFİK hesaplanırken;  $\Sigma FİK \leq 0,5$  için sinerji,  $0,5 < \Sigma FİK \leq 4$  için aditif veya indiferan (farksız) ve  $\Sigma FİK > 4$  için ise antagonist etkileşim değerlendirilmesinde bulunuldu. Dama tahtası yöntemindeki etkileşim sonuçlarında ise üreme olan kuyucuk görünümüne dayalı grafiksel yorumlama yöntemi baz alındı. Bu çalışmadaki hesaplama ve değerlendirme yöntemiyle aynı birçok çalışma mevcut olmakla birlikte bazı çalışmalarda sinerji için  $< 1$  değerlendirmesi yapan (Yoon ve ark. 2004) ya da  $1 < \Sigma FİK < 4$  aralığını genişletip aditif ve indiferan olarak ayrı ayrı değerlendirmelerde

bulunan (Sopirala ve ark. 2010) çalışmalar da vardır. Ama tüm çalışmalarda antagonist etkileşim için  $\Sigma FİK >4$  aralığının alınması bu etkileşimin tespitinde hatalı sonuçlar kaydedilmesini en aza indirmektedir. Böylelikle in vitro kombinasyon sonuçlarına dayandırılarak yapılan ampirik tedavide olası kontrendikasyonların bir adım daha engelleneceği düşünülmektedir.

MBL pozitif 50 kökende; dama tahtası yöntemi ile bulduğumuz %74 aditif/indiferan (farksız), %26 sinerji oranı ve E test yöntemi ile bulduğumuz %76 aditif/indiferan (farksız), %14 sinerji, %10 antagonist oranı, ÇİD ve/veya MBL üreten *Acinetobacter* kaynaklı infeksiyonlara karşı tatmin edici, başarılı bir tedavi için, meropenem/amikasin kombinasyonunun kullanımını rasyonel kılmamaktadır. Her ne kadar iki yöntemle ortalama %20 sinerjik etkileşim saptanmasına dayanarak “alternatifsiz” durumlarda kullanılabilir olsa da, in vitro ileri çalışmaların veya farklı kombinasyon testlerinin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Öte yandan 50 MBL negatif köken için bulduğumuz %72 sinerjik ve %28 aditif/indiferan (farksız) etkileşim oranlarına bakarak; MBL enzimi üretmediği saptanan ve/veya ÇİD olmayan *Acinetobacter* kökenlerinin oluşturduğu infeksiyonlara karşı uygulanan tedavi seçenekleri arasında, meropenem/amikasin kombinasyonunun rahatlıkla yer edineceği düşünülmektedir. In vitro kombine kullanımında antagonist etkileşimin hiçbir kökende saptanmadığı bu antibiyotik grubunun, MBL negatif kökenlerde daha ileri çalışmalarla desteklenmesi koşuluyla tedavi seçeneği olarak seçilebileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli bölümlerden gönderilen klinik örneklerden (idrara, abse, yara, balgam, kan) izole edilen *Acinetobacter* kökenleri içerisinde metallo beta laktamaz üreten *Acinetobacter* kökenlerinde meropenem ve amikasin kombinasyonunun etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

MBL varlığı E test yöntemiyle araştırıldı. Çalışmaya MBL pozitif 50, MBL negatif 50 köken olmak üzere 100 köken dahil edildi. Meropenem ve amikasin kombinasyonunun etkinliği MBL pozitif 50 kökende E test yöntemiyle, MBL pozitif ve negatif 100 kökende dama tahtası yöntemiyle araştırıldı.

MBL pozitif kökenlerde mikrodilüsyon ve dama tahtası yöntemiyle amikasin için MİK, meropenem için MİK,  $F_{IK_{max}}$ , amikasin için MBK, meropenem için MBK, değerleri daha yüksek olarak bulundu ( $p < 0,05$ ).

MBL pozitif kökenlerde otomatize sistem ile saptanan meropenem için MİK, imipenem için MİK değerleri daha yüksek olarak bulundu ( $p < 0,05$ ).

Mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan  $F_{IK_{min}}$  ve otomatize sistem ile saptanan amikasin için MİK değerleri arasında MBL pozitif ve negatif kökenlerde farklılık bulunmadı ( $p > 0,05$ ).

E test yöntemiyle 50 MBL pozitif kökenin %76'sında (38/50) aditif veya indiferan (farksız), %14'ünde (7/50) sinerjik, %10'unda (5/50) antagonist etkileşim tespit edildi. Aynı kökenlerde dama tahtası yöntemiyle kökenlerin %74'ünde (37/50) aditif, %26'sında (13/50) sinerjik etkileşim tespit edildi. Antagonist etkileşim saptanan köken olmadı. 50 MBL negatif kökenin aynı yöntemle belirlenen kombinasyon etkileşim sonuçlarına göre %72 (36/50)'si sinerjik ve %28 (14/50)'i aditif bulunurken antagonist etkileşim saptanmadı. Böylece MBL negatif kökenlerde sinerjik etkileşim daha fazla oranda bulundu. E test ve dama tahtası yöntemlerinin sonuçları kıyaslandığında yöntemler arasında fark olmadığının ( $p > 0,05$ ) tespit

edilmesi kombinasyon çalışmalarında her iki yöntemin kullanabileceğini göstermektedir. E test yöntemi kolay uygulanabilir olmasına karşı diğer yöntemlere göre daha pahalıdır. Dama tahtası yöntemi ise daha ucuz olmasına rağmen fazla emek gerektiren ve zaman alıcı ancak en sık kullanılan bir yöntemdir.

Bu çalışmada MBL negatif kökenlerde meropenem/amikasinine karşı sinerji oranı, MBL pozitif kökenlerden daha yüksek bulunmuş olması MBL negatif *Acinetobacter* kökenlerinde bu kombinasyonun seçilebileceğini göstermekle birlikte, MBL pozitif kökenlerde bu kombinasyonun etkinliği çok düşük olarak bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda meropenem/sefaperazon-sulbaktam, kolistin/tobramisin, meropenem/sulbaktam-ampisilin, rifampisin/tobramisin kombinasyonları ile sinerjik etkileşim oranı daha yüksek bulunmuştur. Rifampisin, tigesiklin, kolistinin içinde bulunduğu kombinasyonların daha etkin olduğu düşünülmekte olup bu yönde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Akalın H, Özakın C, Kahveci F, Sütçü Ş, Helvacı S ve ark.** Hastane kökenli pnömoniler. *Flora Derg*, **1999**, s. 4:253–257.
2. **Akalın H.** *Çoğul dirençli gram negatif bakteriler*. 1. baskı. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, **2003**, s. 269–289.
3. **Allen DM, Hartman BJ.** *Acinetobacter* species. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5<sup>th</sup> Ed., **2000**, s. 2339- 2344.
4. **Altıparlak Ü, Özkurt Z, Erol S.** Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının invitro etkileşiminin araştırılması. *Ankem Derg*, **2003**, s. 17:46-50.
5. **Ardıç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T.** Yatan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşları karbapenemlere ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Ankem derg*, **2004**, s. 18:145–148.
6. **Aşık L.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* klinik izolatlarında metallo beta laktamaz üretiminin araştırılması. Yüksek lisans tezi. İstanbul Üni. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, İstanbul, **2006**.
7. **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**, s. 54:39–45.
8. **Bahar İH, Esen N.** *Acinetobacter türleri ve diğer gram negatif Nonfermentatif basiller*. In: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2<sup>nd</sup> Ed., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, **2008**, s. 2195-2201.
9. **Bal Çiğdem.** Metallo Beta Laktamazlar ve Klinik Önemi. *Klinik Derg*, **2005**, s:65-146-148.
10. **Başustaoglu A, Özyurt A.** Nozokomiyal patojen olarak *Acinetobacter*'lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **1998**, s. 2:88-93.
11. **Berezin BE, Towner KJ.** *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens:microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, **1996**; s. 9:148- 165.
12. **Bhargava N, Sharma P, Capalash N.** Quorum sensing in *Acinetobacter*:an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol*, **2010**, s. 36:349-360.
13. **Bilgehan H.** *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 2. Baskı, Fakülteler Kitabevi Şafak Matbaacılık, İzmir, **1995**, s. 471-472.
14. **Bilgehan H.** *Klinik Mikrobiyoloji:Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları*. 10. Baskı. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, **2000**, s. 345-346.
15. **Çetin ES, Kaya S, Tetik T, Arıdoğan BC.** Klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* suşlarının örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*, **2006**, s. 20:202-205.
16. **Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS ve ark.** *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol*, **2008**, s. 10:309-319.

17. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams?. *Lancet Infect Dis*, **2011**, s.11:381-393.
18. **Cunha BA.** Antibiotic resistance.. *Medical Clinics of North America*, **2000**, s. 84:1407-1429.
19. **Çıkman A, Parlak M, Gültepe B, Güdücüoğlu H, Berktaş M.** Hastane kökenli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında tigesiklin duyarlılığının E test yöntemiyle araştırılması. *Ankem Derg*, **2011**, s. 25:79-83.
20. **Dal T, Dal SM, Ağır İ.** *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri: Literatürün Gözden Geçirilmesi. *Van Tıp Dergisi*, **2012**, s. 19:137-148.
21. **Drawz SM and Bonomo RA.** Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev*, **2010**, s. 23:160-201.
22. **Eliopoulos GM, Maragakis LL, Perl TM.** *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Oxford Journals* (Electronic Journal), **2008**, s. 46 (8):1254-1263.  
Erişim: <http://cid.oxfordjournals.org/content/46/8/1254.long#F2>
23. **Espinal P, Roca I, Vila J.** Clinical Impact and Molecular Basis of Antimicrobial Resistance in Non-*baumannii* *Acinetobacter*. *Future Microbiol*, **2011**, s. 6:495-511.
24. **Falagas ME, Bliziotis IA.** Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int. J Antimicrob Agents*, **2007**, s. 630-636.
25. **Ferrara AM.** Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia, *Int J Antimicrob Agents*, **2006**, s. 27:183-195.
26. **Fournier PE, Vallet D, Barbe V, Audic S, Ogata H ve ark.** Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Plos Genet*, **2006**, s. 2-7.
27. **Gaddy JA, Actis L.** Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol*, **2009**, s. 4:273-278.
28. **Gaynes R, Edwards JR.** Overview of nosocomial infections caused by gramnegative bacilli. *Clin Infect Dis*, **2005**, s. 41:848-854.
29. **Giamarellou H, Poulakou G.** Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs*, **2009**, s. 69:1879-1901.
30. **González RH, Dijkshoorn L, Van den Barselaar M, Nudel C.** Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources. *Rev Argent Microbiol*, **2009**, s. 41:73-78.
31. **Gordon NC, Wareham DW.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, **2010**, s. 35:219-226.
32. **Gupta V, Sidhu S, Chander J.** Metallo-  $\beta$ -lactamase producing nonfermentative gram-negative bacteria: an increasing clinical threat among hospitalized patients. *Asian pacific journal of tropical medicine*, **2012**, s. 5:718-721.
33. **Gürler B, Ağaçfidan A, Anđ Ö, Aydın MD, Berkiten R ve ark.** *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 3.baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2008**, s. 272-273.
34. **Hogg GM, Barr JG, Webb CH.** In-vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, **1998**, s. 41:494-495.



35. **Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD.** *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* (Electronic Journal), **2012**, 3(3):243-250.  
Eriřim:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3442836/>
36. **Jacoby GA.** Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother*, **2006**, s. 1123-1129.
37. **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**, s. 32:2353–2358.
38. **Kaleem F, Usman J, Hassan A, Khan A.** Frequency and susceptibility pattern of metallo beta lactamase producers in a hospital in pakistan. *Infect dev ctries*. **2010**, s. 23:810-813.
39. **Kim SA, Yoo SM, Hyun SH, Choi CH, Yang SY ve ark.** Global gene expression patterns and induction of innate immune response in human laryngeal epithelial cells in response to *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2008**, s. 54: 45-52.
40. **Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Kaewdaeng S.** Çok ilaca dirençli ve yaygın ilaca dirençli izolatlar da dahil olmak üzere *Acinetobacter baumannii* karşı karbapenem ve diğer antimikrobiyal ajanlar arasındaki sinerjistik faaliyetleri. *Int J Antimicrob Agents*, **2010**, s. 36:243-246.
41. **Ko WC, Lee HC, Chiang SR, Yan JJ, Wu JJ ve ark.** In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2004**, s. 53:393–395.
42. **Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B.** Turkish MYSTIC Study Group. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2007**, s. 59:453-457.
43. **Köksal İ.** Sinerji Testleri: Laboratuvardan kliniğe yaklaşımlar. 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Girne, Türkiye, 11 Kasım **2010**, s. 10-12.
44. **Kuşcu F, Öztürk B, Tütüncü EE, Uslu M, Gürbüz Y ve ark.** Çoğul Antibiyotik Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Tigesiklin Duyarlılık Oranlarının E test Yöntemiyle Araştırılması. *Klinik Dergisi*, **2009**, s. 22:48-51.
45. **Lee JC, Koerten H, Vandenbroek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R ve ark.** Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol*, **2006**, s. 157:360-366.
46. **Lee JS, Lee JC, Lee CM, Jung ID, Jeong YI ve ark.** Outer membrane protein A of *Acinetobacter baumannii* induces differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells toward a Th1 polarizing phenotype through the activation of dendritic cells. *Biochem Pharmacol*, **2007**, s. 74:86-97.
47. **Lee HW, Kah YM, Kim J, Lee JC, Lee YC ve ark.** Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect*, **2008**, s. 14: 49-54.
48. **Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D ve ark.** Modified Hodge and EDTA synergy tests to screen metallo-β- lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*, **2001**, s. 7:88-102.
49. **Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD ve ark.** Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla (SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, **2005**, s. 49:4485–4491.

50. **Lee K, Yong D, Jeong SH and Chong Y.** Multidrug-Resistant *Acinetobacter* spp.: Increasingly Problematic Nosocomial Pathogens. *Yonsei Medical Journal*, **2011**, s. 52:879-891.
51. **Levin AS.** Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin Microbiol Infect*, **2002**, s. 8:144-153.
52. **Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T ve ark.** Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2010**, s. 54:4678-4683.
53. **Malone L, Kwon DH.** Carbapenem-associated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* are sensitised by aztreonam in combination with polyamines. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2013**, s. 70-74.
54. **Mandell GL, Douglass RG, Bennet JE.** *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3. Baskı, Churchill Livingstone Publishing Company, New York, **1990**, s. 1696-1699.
55. **Maragakis LL, Perl TM.** *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. *Clin Infect Dis*, **2008**, s. 46:1254-1263.
56. **Marques Mb, Brookings Es, Moser Sa, Sonke Pb and Waites Kb.** Comparative In Vitro Antimicrobial Susceptibilities of Nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and Synergistic Activities of Nine Antimicrobial Combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1997**, s. 881-885.
57. **Martin S.** In vitro antimicrobial synergy testing of *Acinetobacter baumannii*. MMed, Stellenbosh Üniversitesi Department Medical Microbiology, Güney Afrika, **2010**.
58. **Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B.** *Acinetobacter baumannii* meningitis in postneurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother*, **2007**, s. 60:197-199.
59. **Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C.** Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, **2002**, s. 40:4388- 4390.
60. **Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA. and Ghannoum MA.** Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, **2005**, s. 18:163-194.
61. **Murray PR, Baron ER, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White** **RH.** Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup>. Ed., American Society for Microbiology Press, ABD, **2003**, s.770-775.
62. **Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E.** Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *International Journal of Antimicrob Agents*, **2011**, s. 37:102-109.
63. **N. Petrosillo, P. Chinello, M. F. Proietti, L. Cecchini, M. Masala ve ark.** Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: clinical outcome and adverse events. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **2005**, s. 11:682-684.
64. **Nordmann P, Poirel L.** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol Infect*, **2002**, s. 8:321-333.
65. **Nordmann P, Naas T, Poirel L.** Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Disease Journal*, **2011**, s. 17:1792-1795.
66. **Oncül O, Keskin O, Acar HV, Küçükardalı Y, Evrenkaya R ve ark.** Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J Hosp Infect*, **2002**, s. 51:47-51.

67. **Öz Y, Akşit F, Kiraz N, Kiremitçi A.** Candida albicans İzolatlarına Karşı Amfoterisin B ile Flukonazol Ve Vorikonazol Kombinasyonlarının İn Vitro Etkinliği. *Mikrobiyoloji Bülteni Derg*, **2008**, s. 42: 149-155.
68. **Özseven AG, Çetin ES, Arıdoğan BC, Özseven L.** In vitro synergistic activity of carbapenems in combination with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *African Journal of Microbiology Research*, **2012**, s. 6:2985-2987.
69. **Özgümüş OB, Ceylan R, Tosun I, Sandallı C, Aydın K ve ark.** Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a university hospital in Turkey. *Microbial Drug Resistance*, **2007**, s. 13:191-198.
70. **Öztürk D.** Çoğul dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde sinerjistik antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne, **2001**.
71. **Paterson DL.** The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant. *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis*, **2006**, s. 43:43-48.
72. **Peleg AY, Adams J, Paterson DL.** Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2007**, s. 51:2065–2069.
73. **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, **2008**, s. 21:538-582.
74. **Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM.** Antimicrobial combinations. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, **2005**, s. 365-440.
75. **Rasmussen WJ, Hoiby N.** OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, **2006**, s. 57: 373-83.
76. **Routsias JG, Karagounis P, Parvulesku G, Legakis NJ, Tsakris A.** In vitro bactericidal activity of human  $\beta$ -defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides*, **2010**, s. 31:1654–1660.
77. **Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J.** Prevalence of IS(Aba1) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett*, **2007**, s. 274:63-66.
78. **Saballs M, Pujol M, Tubau F.** Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J Antimicrob Chemother*, **2006**, s. 58:697-700.
79. **Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszanska D, Tryniszewska E.** Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiologica Journal*, **2008**, s. 46:137-142.
80. **Safdar N, Dezfulian C, Collard HR.** Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review. *Critical care medicine*, **2005**, s. 33:2184-2185.
81. **Sarıgüzel FM, Sümerkan B, Metan G.** Karbapenem-Sefaperazon/Sulbaktam Kombinasyonlarının *Acinetobacter baumannii* Suşları Üzerine in vitro Aktivitesi. *Erciyes Medical Journal*, **2010**, s. 15-18.
82. **Sarıgüzel FM.** *Acinetobacter baumannii* bakteriyemisi: Epidemiyoloji ve kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları. Uzmanlık tezi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, Kayseri, 2008.

83. **Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG.** *Manuel of Clinical Microbiology.* In: *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods.* 9<sup>th</sup> Ed., Washington ASM Pres, USA, **2007**, s. 770- 802.
84. **Schreckenberger PC, Graevenitz A.** *Manuel of Clinical Microbiology.* In: *Acinetobacter, Achromobacter, Alcaligenes, Moraxella, Methylobacterium* and other nonfermantative gram-negative rods. 7<sup>th</sup> Ed., Washington ASM Press, USA, **1999**, s. 539–560.
85. **Schreckenberger PC, Von GA, Baron EJ, Pfaller MA, Yolken RH.** *Manual of Clinical Microbiology.* 7<sup>th</sup> Ed., Washington ASM Pres, USA, **2000**, s. 749–760.
86. **Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G.** The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl Bakteriol*, **1993**, s. 279:544-552.
87. **Shankar R, He LK, Szilagyi A, Muthu K, Gamelli RL ve ark.** A novel antibacterial gene transfer treatment for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* induced burn sepsis. *Burn care Res*, **2007**, s. 28:6-12.
88. **Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T ve ark.** Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2010**, s. 54:4678-4679.
89. **Stefan Börjesson.** Antibiotic Resistance in Wastewater. *Linköping University Medical Dissertations*, **2009**, s. 1128-1129.
90. **Şener AG, Türk M, Afşar İ, Türker M.** Çoğul dirençli *Acinetobacter* kökenlerinde ampisilin/sulbaktam-siprofloksasin, ampisilin/sulbaktam-amikasin, imipenem–siprofloksasin, imipenem- amikasin kombinasyonlarının in vitro etkileşimlerinin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **2005**, s. 19:107-110.
91. **Tan TY, Lim TP, Lee WHL, Sasikala S, Hsu LY ve ark.** In Vitro Antibiotic Synergy in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: the Effect of Testing by Time-Kill, Checkerboard, and Etest Methods. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2011**, s. 55:436-437.
92. **Thomson MJ, Bonomo AR.** The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria:  $\beta$ -lactams in peril. *Curr Opin Microbiol*, **2005**, s. 8:518–524.
93. **Tetik T.** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde İzole Edilen Gram Negatif Nonfermenter Bakterilerde Metallo Betalaktamaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması. Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, **2008**.
94. **Tomaras AP, Dorsey CW, McQueary CN, Actis LA.** *Molecular basis of Acinetobacter virulence and pathogenicity*, In: *Acinetobacter Molecular Biology.* 2<sup>nd</sup> Ed. Caistr Academic Press, UK, **2008**, s. 265-297.
95. **Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M.** İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2002**, s.1618-1624.
96. **Towner KJ.** *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* (Electronic Journal), 2009, Dec;73(4):3563-3564.  
Erişim:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700220>
97. **Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo beta laktamaz araştırılması. *İnfeksiyon Derg*, **2005**, s. 19:101-105.
98. **Tsai T, Chien HF, Wang TH, Huang CT, Ker YB ve ark.** *Antimicrob Agents Chemother*, **2011**, s. 55:1883-1890.

99. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, **2005**, s. 18:306-325.
100. **Wandersman C, Delepelaire P.** Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol*, **2004**, s. 58: 611-647.
101. **Wareham DW, Bean DC, Khanna P.** Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2008**, s. 27: 607-612.
102. **Whitchurch CB.** *Biogenesis And Function Of Type IV Pili In Pseudomonas Species.* In: *Pseudomonas*. 2<sup>nd</sup> Ed., Springer, Netherlands, **2006**, s. 139-188.
103. **Winn W, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Woods G.** *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6<sup>th</sup> Ed., Lippincott W&W Publishing, USA, **2006**, s. 316-355.
104. **Vila J, Marti S, Sanchez CJ.** Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, **2007**, s. 59:1210-1215.
105. **Yana JJ, Wub JJ, Tsaia TS, Chuang LC.** Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo B-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2004**, s. 49:5-11.
106. **Yang H, Liang L, Lin S, Jia S.** Isolation and Characterization of a Virulent Bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Micro Journal*, **2010**, s. 29:100-131.
107. **Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM ve ark.** Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*, **2002**, s. 40:3798-3801.
108. **Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N ve Rahal JJ.** In Vitro Double and Triple Synergistic Activities of Polymyxin B, Imipenem, and Rifampin against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**, s. 48:753-754.
109. **Yücel M, Gündüz E, Yağcı S, Karakoç AE, Önde U ve ark.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. *30.Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Kongresi*. Antalya, Türkiye, 1-5 Ekim **2002**, s. 280-281.
110. **Zimblér DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP.** Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *A. baumannii*. *Biometals Journal*, **2009**, s. 22:23-32.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Antakya'da doğdu. 2005 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2010 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.