

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANELERİ MERKEZ
LABORATUVARINDAN ARDIŞIK OLARAK İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER*
BAUMANNII KLİNİK İZOLATLARINDA KOLİSTİNE DİRENÇ VE
HETERODİRENCİN ARAŞTIRILMASI

Bio. Ecem ÇAĞLAN

Mikrobiyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2017

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANELERİ MERKEZ
LABORATUVARINDAN ARDIŞIK OLARAK İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER*
***BAUMANNII* KLİNİK İZOLATLARINDA KOLİSTİNE DİRENÇ VE**
HETERODİRENCİN ARAŞTIRILMASI

Bio. Ecem ÇAĞLAN

Mikrobiyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Deniz Gür

ANKARA

2017


HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANELERİ MERKEZ LABORATUVARINDAN ARDIŞIK
OLARAK İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER BAUMANNII* KLİNİK İZOLATLARINDA
KOLİSTİNE DİRENÇ VE HETERODİRENCİN ARAŞTIRILMASI

Bio. Ecem Çağlan

Bu çalışma 11/12/2017 tarihinde jürimiz tarafından "Mikrobiyoloji Programı" nda yüksek lisans olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Cumhuri ÖZKUYLU



Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Tez Danışmanı:

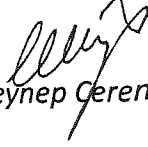
Prof. Dr. Deniz Gür



Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Üye:


Prof. Dr. Zeynep Çeren Karahan



Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

21 Aralık 2017


Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

■ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

o Tezimin/Raporumuntarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

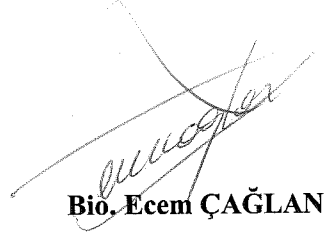
o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

18/12/2017

 Ecem ÇAĞLAN

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Deniz Gür danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.



Bio. Ecem ÇAĞLAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında eğitimim ve hayatımla ilgili beni her an destekleyen, düşünceleriyle yoluma ışık tutan çok değerli hocam Prof. Dr. Deniz Gür'e,

Eğitimim boyunca sorularıyla beni düşünmeye ve daha çok okumaya sevk eden, tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Banu Sancak'a,

Desteğini her zaman, her konuda hissettiğim, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu'ya

Çalışmalarımın her aşamasındaki katkılarından, bilgi ve anlayışını esirgemeyen, her daim güzel şarkılar ile keyifli çalışmalarımızı anımsayacağım Uzm. Aslı Çakar'a,

Tezimin yapım aşamasında destekleri olan Nejla Kılıç'a

Eğitimim süresince dostluğuyla bana destek olan değerli arkadaşım Öznur Gürpınar'a

Hayatım boyunca her koşulda karşılıksız sevgi ve desteklerini hep yanımda hissettiğim, kıymetli annem Dilek Çağlan'a ve kıymetli babam Uğur Çağlan'a,

En değerlim, canımdan öte ablam Merve Zeynep Çağlan'a

Bana olan inancı, desteği ve sevgisi için sevgili arkadaşım Ömür Aksoy'a

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bio. Ecem Çağlan

ÖZET

Çağlan, E., Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarından Ardışık Olarak İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Kolistine Direnç ve Heterodirencin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017.

A. baumannii, hastane ortamlarında sıkça bulunması ve özellikle yoğun bakımlarda salgınlara yol açması nedeniyle son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Tedavi seçenekleri çok kısıtlıdır ve son yıllarda kolistin bu etkene karşı en etkili antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte tüm dünyada kolistine karşı dirençli ve heterodirençli izolatlar bildirilmeye başlanmıştır. Bu çalışmada, hastanemizde izole edilen *A. baumannii*'de kolistine direnç ve heterodirenç oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Hastane merkez laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 200 adet *A. baumannii* izolatında kolistine duyarlılık sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle EUCAST standartlarına göre belirlenmiştir. Heterodirencin saptanması için Gradyent test (G-test) ve PAP yöntemi uygulanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon testine göre 58 izolat (%29) kolistine dirençli bulunmuştur. G-testte zon içi üremesi olan izolatlar heterodirenç için şüpheli olarak değerlendirilmiş ve bu şekilde 3 izolat bulunmuştur. Ayrıca, kolistin duyarlı ve dirençli toplam 120 izolata 0-10mg/L kolistin içeren MHA plaklarında 10^2 ve 10^3 cfu/mL bakteri yoğunluklarında PAP uygulanmıştır. PAP sonuçlarına göre G-testte şüpheli bulunan izolatlar da dahil, hiçbir izolatta kolistine heterodirenç saptanmamıştır. Heterodirencin saptanmasında PAP yöntemi altın standarttır. Emek yoğun ve zaman alıcı olması nedeniyle PAP yönteminin rutin laboratuvarlarda uygulanması güçtür. Bu çalışma Türkiye'de *A.baumannii*'de kolistine PAP yöntemiyle heterodirencin araştırıldığı ilk çalışmadır. *Acinetobacter baumannii*'de kolistine direnç ve heterodirencin belirli aralıklarla izlenmesi klinisyenlere yol göstermesi açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, kolistin direnci, kolistin heterodirenci

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından THD-2016-11837 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ABSTRACT

Caglan, E., Investigation of Colistin Resistance and Heteroresistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Consecutively Isolated in Hacettepe University Hospitals Central Laboratory. Hacettepe University Institute of Health Sciences, MSc thesis in Microbiology, Ankara, 2017. *A. baumannii* has gained importance in recent years as it is common in the hospital environments and causes outbreaks, especially in intensive care units. Treatment options are very limited against this bacteria and in recent years colistin has been used as the most effective drug. However, colistin resistance and heteroresistance are being reported worldwide. In this study, our aim was to determine colistin resistance and heteroresistance rates in *A. baumannii* isolated in our hospital. Susceptibility to colistin was determined by broth microdilution method in 200 isolates of *A. baumannii* isolated from various samples sent to hospital central laboratory. EUCAST standards were used throughout the study. Heteroresistance was investigated by Gradient (G-test) and PAP test. According to broth microdilution tests, 58 isolates (29 %) were resistant to colistin. Bacterial growth in the inner zone of the G-tests predicted heteroresistance and there were 3 isolates with this result. In addition, PAP analysis was employed on a total of 120 isolates including sensitive and resistant isolates. Mueller Hinton agars containing 0-10 mg / L of colistin were inoculated with 10^2 ve 10^3 cfu/mL of isolates and results were recorded. According to the PAP results, heteroresistance was not found in any isolates including the 3 isolates that suggested heteroresistance with the G-test. PAP test is the gold standard for determining heteroresistance in *A.baumannii*, and as it's very labor intensive and time consuming, it cannot be performed easily in routine laboratories. This is the first study in Turkey investigating heteroresistance to colistin in *A.baumannii* with the PAP test. Resistance and heteroresistance to colistin in *A.baumannii* should be monitored periodically to guide the clinicians.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, colistin resistance, colistin heteroresistance, Ankara

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit. Project Number: THD-2016-11837.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> genel özellikler	3
2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> enfeksiyonları	4
2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> virülans ve patojenitesi	5
2.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de antibiyotiklere direnç mekanizmaları	7
2.4.1. Sefalosporin direnci	8
2.4.2. Karbapenem direnci	8
2.4.3. Sulbaktam direnci	9
2.4.4. Rifampin direnci	10
2.4.5. Aminoglikozid direnci	10
2.4.6. Florokinolon direnci	11
2.4.7. Tetrasiklin direnci	12
2.4.8. Kolistin direnci ve heterodirenci	12

3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. İzolatların toplanması ve saklanması	21
3.2. Mikrobiyolojik kültür ve tanımlama işlemleri	21
3.2.1. İzolatların canlandırılması	21
3.2.2. Bakteri tanımlama yöntemleri	21
3.3. İzolatların kolistin direncinin belirlenmesi	23
3.3.1. Antibiyotiğin hazırlanması ve saklanması	23
3.3.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi	24
3.3.3. MİK değerinin belirlenmesi	25
3.4. Kolistine heterodirencin araştırılması	26
3.4.1. G-test yöntemiyle heterodirençli suş varlığının taranması	27
3.4.2. İzolatlarda popülasyon profil analizi (PAP) çalışması ile heterodirenç oranının araştırılması	28
4. BULGULAR	33
4.1. Çalışmaya alınan <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatları	33
4.2. Kolistine duyarlılık sonuçları	35
4.3. Heterodirenç taraması ve saptanmasına ilişkin bulgular	36
4.3.1. Gradyent şerit testi bulguları	36
4.3.2. PAP deneyi bulguları	37
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	50
8. ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGE VE KISALTMALAR

°C: Santigrat derece

µm: Mikrometre

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

BAL: Bronkoalveolar lavaj

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CAP: Toplum kaynaklı pnömoni

DTA: Derin trakeal aspirasyon

DNA: Deoksiribonükleik asit

EUCAST: Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi

GSBL: Genişlemiş spektrumlu β-laktamaz

IDSA: Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği

kb: Kilobaz

MALDI-TOF MS: Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi

MHA: Mueller Hinton agar

MHB: Mueller Hinton broth

MBL: Metallo- β-laktamaz

MDR: Çok ilaca dirençli

MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

PAP: Populasyon analiz profili

PAP-AUC: Populasyon analiz profili – eğri altında kalan alan

PBP: Penisilin bağlayıcı protein

PDR: Tüm antibiyotiklere dirençli

PFGE: Pulse Field Gel Electrophoresis

RNA: Ribonükleik asit

rRNA: Rribozomal ribonükleik asit

SENTRY: Antimikrobiyal sürveyans programı

SF: Serum fizyolojik

VAP: Ventilator ilişkili pnömoni

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Kolistin ve kolistimetat sodyumun kimyasal yapısı	13
2.2.	Bakteri hücre membranında kolistinin etki mekanizması	14
2.3.	PetN ve galaktozaminin eklenme mekanizması	16
2.4.	Bakterinin antibiyotiğe yanıtı ve tanımlamalar	17
2.5.	Heterodirenç saptama algoritması	20
3.1.	Ependorf tüplerde kolistin çözeltisi	23
3.2.	Steril mikroplaklara otomatik pipet ve şırınga ile 50'şer µl MHB eklenmesi	25
3.3.	MİK değerlerinin aynalı okuyucuda saptanması	26
3.4.	Kullanılan E-test şeritleri	27
3.5.	Populasyon analiz profili (PAP) yapım aşamaları	29
3.6.	Sırasıyla, (A): Kolistin içeren antibiyotik plakları hazırlanması (B): Ertesi gün çalışmak üzere plakların soğuduktan sonra +4 °C buzdolabına kaldırılması (C): Plakların dizilmesi ve steril otomatik pipet ile ekim işlemi (E): Plakların etüve kaldırılması.	31
3.7.	Çalışmada uygulanan PAP basamakları	32
4.1.	<i>A. baumannii</i> izole edilen örnekler; çeşitleri ve sayıları	33
4.2.	<i>A. baumannii</i> izole edilen örneklerin dağılımı	34
4.3.	G-test yöntemi sonucunda zon içi üreme gözlenen izolatlar	36
4.4.	Dirençli bir izolatın (MİK ≥ 32) artan kolistin konsantrasyonuna sahip MHA plaklarında 10^3 ve 10^2 dilüsyonlarda üremesi	38
4.5.	Kolistine dirençli ve duyarlı izolatların PAP grafiği	39

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
4.1.	<i>A. baumannii</i> izolatlarında dirençli izolat sayıları	35
4.2	Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri (n=200)	36
4.3.	Kolistin için G-test ve mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri (n=120)	37

1. GİRİŞ

Acinetobacter baumannii kompleksi, bakteriyemi, pnömoni, menenjit ve üriner sistem enfeksiyonları gibi sıklıkla hastanede kazanılan enfeksiyonlarla ilişkili olan bir Gram negatif patojendir. *A. baumannii* kompleks, ayrıca, nozokomiyal salgınların dünya çapında ortaya çıkmakta olan bir nedeni olarak kabul edilmiş ve Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) tarafından altı öncelikli tehlikeli mikroorganizmadan biri olarak belirtilmiştir (1). Özellikle endişe konusu olan, *A. baumannii* kompleksinin, β -laktamlar, florokinolonlar, tetrasiklinler ve aminoglikozitler de dahil olmak üzere mevcut antibiyotiklere çoklu direnç (MDR) göstermesidir. Çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonu tedavisinde tigesiklin ve kolistin son çare antibiyotikler olarak kullanılmaktadır (2).

Kolistin, gram negatif bakterilerde yer alan lipopolisakkarid (LPS) tabakanın lipid A kısmı ile etkileşime girerek dış membranın düzensizleşmesiyle bakterisidal etki gösterir (3). Nefrotoksik ve nörotoksik etkisi nedeniyle, klinik kullanımı bırakılan kolistin, MDR bakteri enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla yeniden kullanılmaya başlanmıştır. Buna karşın, *A. baumannii*'de kolistine direnç gözlenmeye başlanmıştır.

Kolistine dirençli *Acinetobacter spp.* ilk kez 1999'da Çek Cumhuriyeti'nde bildirilmiş olup tüm dünyadaki bildirim sayısı her geçen yıl artmaktadır (4). Buna ek olarak, 2006'da in-vitro testlerle kolistine duyarlı (Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ≤ 2 mg / l) olmasına karşın dirençli alt popülasyonlar gözlenmiş ve bu suşlar için "heterojen dirençli" tanımı yapılmıştır (5). *A. baumannii*'deki kolistin heterodirenç oranının %18,7-%100'e kadar oldukça geniş bir aralıkta olduğu ve bu dağılımın farklı örneklem kullanımı ve heterodirenç belirlemek için kullanılan değişik yöntemlere bağlı olabileceği belirtilmektedir. (6-9). Klinikte heterodirençli *A. baumannii* izolatlarına bağlı enfeksiyonlarda kolistin uygun olmayan bir şekilde kullanılması halinde dirence ve tedavide başarısızlığa yol açma olasılığı olabileceği belirtilmektedir (10). Antimikrobiyal Sürveyans Programı (SENTRY) 2001'den 2011 yılına kadar ABD, Avrupa, Latin Amerika ve Pasifik Asya'dan gelen raporlarla kolistin direncinin düşük bir düzeyde (%0,9-3,3) kaldığını ortaya koymuştur (11, 12). Asya, Avrupa, Kuzey Amerika ve Güney Amerika'dan gelen diğer raporlarda ise kolistin direnci %7

olarak bildirilmiştir (13-15). Bununla birlikte, Bulgaristan ve İspanya'dan bildirilen raporlarda, %16,7 ve %19,1 olmak üzere yüksek direnç oranları saptanmıştır (16, 17). Genel olarak, *A. baumannii*'deki kolistin heterodirencinin, direnç oranından çok daha yüksek bulunmasına karşın, heterodirenç rutinde saptanmayıp özel yöntemler gerektirdiği için, ülkemizdeki ve dünyadaki heterodirencin sıklığı bilinmemektedir.

Bu araştırmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinde yatan ve ayaktan tedavi alan hastalardan gönderilmiş çeşitli örneklerden etken olarak izole edilen *A. baumannii* izolatlarının mikrobiyolojik özellikleri ortaya konulmuş, izolatların kolistin duyarlılık profilleri belirlenerek kolistine duyarlı bulunmasına karşın kolistin tedavi başarısızlıklarına yol açabilecek dirençli alt popülasyon bulunup bulundurmadığı Gradyent test (G-test) yöntemi ile araştırılmış ve heterodirenç belirlenmesinde altın standart yöntem olarak kabul edilen "popülasyon analiz profili" (PAP) ile değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Acinetobacter baumannii* genel özellikler

İlk kez Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck, 1911 yılında toprağa kalsiyum asetat katarak hazırladığı zenginleştirilmiş besiyerinde mikroorganizmayı izole etmiştir. Başlangıçta *Micrococcus calcoaceticus* olarak tanımlanan *Acinetobacter* cinsi (Yunanca "akinetos", hareketsiz anlamına gelir) 43 yıl sonra *Achromobacter* cinsindeki hareketli organizmalardan ayırt edilerek Brisou ve Prevot tarafından tanımlanmıştır (18). Karşılaştırmalı çalışmalar sonucunda, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola* ve *Bacterium anitratum* bakterilerinin tek bir cinsine ait olduğunu ve fenotipik özelliklerine bakılarak alt sınıflandırmanın yapılamayacağını belirtmişlerdir (19). Günümüzde klinikte en sık görülen 20'den fazla *Acinetobacter* türü tespit edilmiştir (20). *Acinetobacter nosocomialis* (genetik tür 13TU) ve *Acinetobacter pittii* (genetik tür 3) hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sık bulunmaktadır. Buna karşın, *Acinetobacter calcoaceticus* çok az klinik önem taşıyan bir çevresel patojendir. Bu dört tür, biyokimyasal olarak ayırt edilemez ve klinik uygulamada "*Acinetobacter baumannii* kompleksi", "*Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*" veya sadece "*Acinetobacter baumannii*" olarak bir araya toplanır. *A. baumannii*, antibiyotiklere daha dirençli olup yüksek mortalite ile ilişkilendirilmektedir (21). Bu tezde "*Acinetobacter baumannii* kompleksi" yerine "*Acinetobacter baumannii*" terimi kullanılmıştır.

Acinetobacter baumannii, zorunlu aerob, pleomorfik, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketsiz, non-fermenter gram negatif basildir. Saprofit olarak her yerde bulunabilir, doğada ve hastane ortamında bulunur ve mekanik solunum cihazları gibi nemli yüzeylerde, deri gibi kuru yüzeylerde yaşayabilir. Sağlıklı bireylerin çok az bir kısmında normal orofarengeal floranın bir elemanı olarak, ayrıca vücudun farklı bölgelerinde bulunabilir ve değişik ağırlıkta seyreden enfeksiyonlara yol açabilir (2).

Fırsatçı bir patojen olan *A. baumannii*, bağışıklığı baskılanmış bireylerde, özellikle de hastanede kalış süresi uzayan (>90 gün) kişiler arasında yüksek bir insidansa sahiptir (22).

İnsandan izole edilen türler klinik mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak kullanılan, koyun kanlı agar veya triptik soy agar gibi katı besiyerlerinde 37 °C'de iyi ürerler. Mikroorganizmanın izolasyonunda karbon kaynağı olarak asetat, nitrojen kaynağı olarak nitrat içeren zenginleştirilmiş ve pH'sı düşük olan sıvı besiyerlerinin kullanımını önerilmektedir (20).

2.2 *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları

Acinetobacter baumannii, cins içinde enfeksiyonlarla en sık ilişkili insan patojenidir. Bu fırsatçı patojen özellikle düşkün hastalarda oldukça yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan enfeksiyonlara sebep olabilir. *Acinetobacter*'ler fırsatçı patojenlerden olup, solunum yolu, üriner sistem ve yaralarda enfeksiyonlara yol açar; ayrıca sepsise neden olurlar. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, cerrahi operasyon geçirmiş veya mekanik solunum altındaki hastalar, *Acinetobacter* enfeksiyonları için risk altındadır. Karbapenemleri de içerecek şekilde çoklu antibiyotik direnci göstermesi nedeniyle hastanede yatan hastalarda nozokomiyal yara ve akciğer enfeksiyonları önemli bir sorun haline gelmiştir (147).

Acinetobacter baumannii'ye bağlı gelişen hastane kaynaklı pnömoni ciddi ve hayatı tehdit eden bir enfeksiyondur. Hastanede kalış süresinin uzaması, mekanik ventilasyona uzun süreli maruz kalma ve daha önceden antibiyotik kullanımı, *A. baumannii*'ye bağlı ventilatör ilişkili pnömoni (VAP) riskini arttıran faktörlerdir. Hastanede çalışan sağlık görevlilerinin bozuk kişisel hijyenleri ve ellerinde bakteri kolonizasyonu nozokomiyal salgınların yaşanmasında belirleyici etkenler arasındadır (20). Kontamine olmuş ventilatörler ile birlikte solunum cihazları salgının başlamasında neden olabilecek diğer faktörlerdendir (23).

Acinetobacter baumannii toplum kaynaklı pnömoni (CAP) enfeksiyonuna yol açabilir. Bu enfeksiyonda aşırı derecede alkol tüketimi risk faktörü olarak

sayılmaktadır. Aşırı alkol tüketen kişilerin %10' unda boğaz kolonizasyonu olabileceği belirtilmektedir (24, 25).

ABD'de 1995-2002 yılları arasında yapılan bir çalışma sonucunda *A. baumannii*'ye bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarının, toplam kan dolaşımı enfeksiyonlarının %1,3'ünü oluşturduğu saptanmıştır (26). Yoğun bakım ünitelerinden edinilen kan dolaşımı enfeksiyonunda mortalite oranları %34- %43,4 arasındayken, yoğun bakım ünitesi dışında %16,3 oranında bulunmuştur (26). Yoğun bakım ünitesinde *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida* spp. enfeksiyonları ile karşılaştırıldığında en yüksek üçüncü mortalite sırasına sahiptir (26).

Nöroloji cerrahisi sonrası gelişen *Acinetobacter* menenjitleri birçok diğer gram negatif bakterilerin de operasyon sonrası bakımda sorunlu hale gelmesi ile giderek daha yaygın hale gelmektedir (27).

Ağır yanıkları olan hastalarda *A. baumannii* enfeksiyon tedavisi oldukça zordur. Bunun dışında derinin ve yumuşak dokunun hastane dışında enfeksiyonu oldukça nadirdir (28).

Acinetobacter baumannii kurşun yaralanmaları olan askerlerden sıklıkla izole edilmiştir. Açık tibia kırıkları olan hastaların değerlendirilmesinde en sık izole edilen bakteridir (29).

Yoğun bakım ünitesinden kazanılmış idrar yolları enfeksiyonlarının %1,6'sını oluşturduğu belirtilmiştir (30). Çoğunlukla, bakteri kateterle ilişkili enfeksiyon veya kateter kolonizasyonu ile bağlantılıdır. Sağlıklı hastalarda bu bakterinin idrar yolları enfeksiyonuna yol açması olağan değildir (30).

2.3. *Acinetobacter baumannii*'nin virülans ve patogenezi

Çok ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının giderek artan önemine karşın patogenezi mekanizmaları konusunda bilinenler çok kısıtlıdır. Klinik *A. baumannii* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri ve antibiyotik direnç paternleri ile ilgili yeterince bilgi birikimi olmasına karşın, bakterinin virülans faktörleri ve çevresel fizyolojisi ile ilgili bilgiler göreceli olarak sınırlı kalmıştır. Dizi analizleri tekniklerinin ilerlemesiyle *A. baumannii* gen yapısı ve bakteriler arasındaki DNA transferi konusunda bilgilerimiz artış göstermiştir (31). Bakteriyel mutagenез ile birleştirilmiş

hayvan modelleri (hem memeli hem de omurgasız hayvanlar), *A. baumannii* patogenezinin mekanizmalarına ilişkin değerli bilgiler sağlamıştır. Enfeksiyon sırasında bakterinin virülansını arttıran özellikler ise şöyle sıralanabilir: (i) Dış membran porinleri (32-34), (ii) kapsül ve lipopolisakkarid gibi yüzey yapıları (35), (iii) fosfolipaz D gibi enzimler (36), (iv) demir kazanım mekanizmaları (37).

Kolonizasyon ve enfeksiyon ile sonuçlanan konak-patojen arasındaki etkileşimin ilk basamağı, etkenin konak hücrelerine tutunmasıdır. Bakterinin konak hücrelere tutunması, fimbria ve membran komponentleri ile olmaktadır. Dış membran proteini OmpA, *A. baumannii*'nin epitelyal hücrelere yapışmasından ve invazyonundan sorumludur. Biyofilm oluşturması, abiyotik yüzeylerde *A. baumannii*'nin uzun süre hayatta kalmasına katkıda bulunarak bulaşı sağlayabilir. Bununla birlikte, salgın suşları, biyofilm oluşumu ve konak hücrelere yapışma arasında kesin bir bağlantı kurulamamıştır. Üriner kateterler, santral venöz kateterler ve endotrakeal tüpler gibi hasta vücudunda kalıcı cihazlarda biyofilm üretimi, patojenlerin antibiyotiklerden ve konağın bağışık yanıtından kaçmasına olanak sağlayarak enfeksiyonların patogenezine katkıda bulunmaktadır. Özellikle, biyofilmler içindeki bakteriler, kurumaya, bağışık yanıtı, antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. *A. baumannii*'nin biyofilm oluşturmasına katkıda bulunan faktörlerin arasında pili, dış membran proteinleri ve hücre dışı polisakarit bulunur (38, 39). Bakterilerin biyofilm oluşturabilmesi için gerekli ilk basamak, biyofilmin oluşacağı bölgeye kamçı hareketi ile ulaşabilme özelliğidir. Ancak taksonomik olarak *A. baumannii* kamçı içermeyen hareketsiz bir bakteri olarak tanımlanmıştır. *A. baumannii* polistren ve cam gibi abiyotik yüzeylerde olduğu gibi epitel hücreleri ve fungal filamentler gibi biyotik yüzeylerde de biyofilm oluşturur. Pilus ve Bap yüzey adezyon proteininin üretimi, abiyotik yüzeye ilk yapışmayı takiben biyofilm oluşumu ve olgunlaşmasında rol oynar. Bugün için *Acinetobacter* türlerinde biyofilm üretimi ile ilgili en önemli hücresel bileşenlerin pili oluşum sistemleri ve hücre dışı salgılanan OmpA proteini olduğu bilinmektedir (40, 41).

Pek çok *A. baumannii* izolatu, yapısı ve antijenik özellikleri iyi bilinen ve gerek klinik gerekse tanısal önemleri belirlenmiş olan çeşitli lipopolisakkaridler (LPS) üretmektedir. Bu yapıların, serum direnci, konağın endotoksine karşı bağışık yanıtı ve klinik semptomlar ile ilişkili virülans faktörleri olabileceği düşünülmektedir (40, 41).

Acinetobacter suşları, farklı demir kaynaklarını kullanabilme yeteneğine ve konağa kolonize olmayı sağlayan bağımsız demir kazanım sistemine sahiptir (42). *A. baumannii*'nin siderofor aracılı kazanım sistemi olan asinetobaktin (acinetobactin) ilk kez *A. baumannii* 19606 suşunda tanımlanmıştır (43). Klinik izolatların incelenmesiyle *Acinetobacter* türlerinin farklı demir alım sistemi ve farklı biyofilm oluşturma mekanizmalarına sahip oldukları belirtilmiştir (44).

Çevreye uyum sağlamak ve çevreden gelen uyarınları algılayarak yanıt geliştirmek bakterinin patogenezi için gerekli olan koşullardandır. Bakteri, pH, ozmolarite, besin kaynağı ve popülasyon yoğunluğu gibi çevresel koşullardaki değişiklikleri birçok farklı mekanizma ile algıladığında, metabolizmasında birtakım değişiklikler yaparak yeni koşullara kendini adapte etmeye çalışır. “Quorum Sensing (QS)” mekanizması ile bakteri etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptar ve birçok genin işleyişini kontrol eder. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını kontrol ederek besin kaynaklarına uyum geliştirir ve enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin düzenlenmesi sonucu konağın bağışık yanıtından kaçabilir (45).

2.4 *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç mekanizmaları dört ana başlık altında toplanabilir:

1. Hücredeki antibiyotik miktarının azaltılması;
 - a. Dış membran geçirgenliğinin azaltılması,
 - b. İç membrandan geçişin engellenmesi,
 - c. Aktif atım pompası ile olabilir.
2. İlacın hedefinde değişiklik oluşturulması;
 - a. Mutasyon ile,
 - b. Enzimatik değişiklik ile oluşabilir.
3. Sentezlenen enzimle ilacın inaktive edilmesi,
4. Antibiyotikten etkilenmeyen farklı bir metabolik yol kullanılması.

Bir bakteri bu mekanizmalardan birkaçını aynı anda kullanarak antibiyotiklere çoklu dirençli hale gelebilmektedir (148). Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren *A. baumannii* suşlarının hızlı bir şekilde ortaya çıkışı, bu bakterinin antibiyotik kullanımına bağlı oluşan baskılayıcı ortam koşullarına hızla adapte olma yeteneğininin sonucudur (20).

Fournier ve ark. (46) Fransa’da dirençli ve duyarlı suşların genom dizilerini karşılaştırarak, dirençli olan suşlarda 45 gen kümesi içeren 86 kb’lık “direnç adası” bulunduğunu belirtmişlerdir (47). Dizi benzerliği ve filogenetik analizler sonucunda dirençli suşun genlerini *Pseudomonas*, *Salmonella* veya *Escherichia* bakterilerinden elde ettiği belirlenmiştir (46).

2.4.1. Sefalosporin direnci

Acinetobacter baumannii klinik izolatlarının çoğunluğu üçüncü kuşak (örneğin, seftazidim) ve dördüncü kuşak (örneğin sefepim) ajanlar da dahil olmak üzere sefalosporinlere dirençlidir. *A. baumannii* doğal olarak AmpC tipi β -laktamaz üretir. AmpC üretiminin kalıcı olarak baskılanabileceği diğer gram negatif bakterilerin aksine, *A. baumannii*’de AmpC üretimi baskılanamaz (48). AmpC tipi β -laktamaza ek olarak, *A. baumannii* genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üretebilir, bu da sefalosporin direncine yol açar (49, 50).

2.4.2. Karbapenem direnci

Acinetobacter baumannii’de karbapenemlere direnç: (i) karbapenemaz üretimi, (ii) dış membran porinlerinin kaybı, (iii) atım pompalarının fazla ifade edilmesi (iv) penisilin bağlayıcı protein değişiklikleri ile birarada olabilen beta-laktamaz üretimi mekanizmalarının birikimine bağlı olarak ortaya çıkar. Ancak *A. baumannii*’de en önemli direnç mekanizması, doğal veya kazanılmış yolla karbapenemaz üretimi sunucunda gelişen dirençtir. *A. baumannii* doğal olarak düşük düzeyde kromozomal olarak kodlanmış OXA-51-grup karbapenemaz üretir (51, 52).

Acinetobacter baumannii, plazmidler üzerinde belirli OXA-grubu β -laktamaz genleri kazandığında karbapenemlere karşı dirençli hale gelir. *A. baumannii*’de, OXA-23, -40, -58, -143 ve -235 grupları dahil olmak üzere beş ana grup kazanılmış OXA

grubu karbapenemaz bulunmaktadır (53). Karbapenemazlar arasında, OXA-23 en sık görülen ve çoğunlukla epidemik suş tarafından üretilen gruptur (54).

Son zamanlarda Enterobacteriaceae'de yaygın olan non-OXA grup karbapenemazlar *A. baumannii*'de de ortaya çıkmıştır. Bunlardan en önemlisi metallo-beta-laktamaz (MBL) NDM-1'dir. NDM-1, çok ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae*'ye bağlı idrar yolu enfeksiyonu tanısıyla Yeni Delhi'de tedavi gören İsveçli bir hastada ilk olarak 2008 yılında saptanmıştır (55). Karbapeneme dirençli NDM-1 üreten *A. baumannii* izolatları ise, 2011 yılından itibaren tüm dünyada bildirilmeye başlanmıştır (56, 57). *bla*NDM-1 genin ürünü olan NDM-1, son çare antibiyotik olarak kabul edilen karbapenemler de dahil olmak üzere pek çok beta-laktam antibiyotiği hidrolize eden bir enzimdir. Son birkaç yılda, NDM-1'in 17 yeni varyantının ortaya çıktığı bildirilmiştir (58-60). NDM-1, üreten bakterilerde saptanan çoğu plazmitle transfer edilebilir ve bakteriler arasında yatay olarak geçebilir. MBL üreten izolatların asemptomatik taşıyıcılarda sıklığının yüksek oluşu ve tedavi için mevcut antibiyotik seçeneğinin kısıtlı olması nedeniyle bu konu önem taşımaktadır (61, 62).

Kazanılan diğer metallo- β -laktamazlardan VIM-1, SIM-1 ve IMP-1 ise nadir olarak bildirilmiştir (63-65).

2.4.3. Sulbaktam direnci

Sulbaktam, genellikle β -laktamazların hidrolizini azaltmak için ampisilin veya sefoperazon ile birlikte kullanılan bir β -laktamaz inhibitörüdür ancak aynı zamanda *A. baumannii* de dahil olmak üzere birçok *Acinetobacter* türüne karşı penisilin-bağlayıcı protein PBP2'ye bağlanarak intrinsik bir aktivite gösterir (66). PBP2'nin azaltılmış ifadesi ve TEM-1 β -laktamaz üretimi *A. baumannii*'de sulbaktam direnci ile ilişkilendirilmiştir (67, 68).

Sulbaktam ampisilin, karbapenem veya sefoperazon ile kombine edildiğinde *A. baumannii* 'ye karşı sinerjik bir etki sağlamaktadır (69).

Karbapenemlere dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı meropenem-sulbaktam (%70) veya kolistin-sulbaktam (%53) kombinasyonu kullanıldığında

sinerjik etkilerin görüldüğü *A. baumannii* izolatları bildirilmiştir (70) Ancak *A. baumannii* klinik izolatlarında sulbaktam direncinin artışı gözlenmektedir (71).

2.4.4. Rifampin Direnci

Rifampin, bakterinin RNA polimerazına bağlanıp, transkripsiyonu başlatmayı inhibe ederek aktivitesini gösterir. Hedef proteinin β -alt birimindeki amino asitlerindeki değişiklik, rifampin direncine yol açar. (72). Bu mekanizmaların yanı sıra, rifampinin enzimatik modifikasyonu ve atım pompaları direncin diğer nedenlerindedir. Çoklu dirençli *Acinetobacter* spp. de kolistin ile rifampin kombinasyonunun etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (73).

2.4.5. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozitler, 30S ribozomal alt biriminin 16S ribozomal RNA'sına bağlanarak bakterilerde protein sentezini inhibe etmektedirler. Dış membran geçirgenliğinin azalması, atım pompalarının aktifleşmesi, ribozomal proteinlerde amino asitlerin değişimi ilaç direncine yol açar. Ancak, *Acinetobacter* türlerinde aminoglikozid direnci çoğunlukla aminoglikozidleri modifiye edici enzimlerin üretiminden kaynaklanır (74-76).

Son zamanlarda, 16S ribozomal RNA'nın metilasyonu, gram negatif bakterilerde görülen ve antibiyotik hedefinin modifikasyonuna karşılık gelen başka bir direnç mekanizmasıdır. Metilazlar, antibiyotiğin etki alanlarına bağlanmasını engellemektedir. 16S rRNA metilazlar, amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi klinik olarak yararlı aminoglikozitlere yüksek direnç kazandırır (77). Metilaz üretimini sağlayan genler, plazmidler üzerine konumlanan transpozon yapılarıyla ilişkilidir ve yatay geçiş ile aktarılırlar. 16S rRNA metilazları üreten izolatlar, özellikle GSBL veya MBL'lerin üretimi yoluyla β -laktam antibiyotiklere dirençli izolatlarda daha yaygındır. Gram negatif bakterilerde on adet 16S rRNA metilaz (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtD2, RmtE, RmtF, RmtG ve NpmA) tanımlanmıştır. Bu genlerin kökeni muhtemelen *Streptomyces*'tir ve büyük olasılıkla Asya'da daha sık görülmesine karşın coğrafi bölgelere bağlı sıklığı bilinmemektedir (78-80)

Acinetobacter türlerinde diğer pek çok patojen grubuna göre aminoglikozid direnci daha fazladır. 16S ribozomal RNA metil transferazlardan özellikle yüksek

düzyey aminoglikozid direncini sağlayan ArmA'nın üretimi Çin, Güney Kore, Vietnam, Japonya, Norveç, İtalya gibi farklı coğrafik bölgelerden bildirilmektedir (81-85) *armA* geninin Tn1548 transpozonu üzerinde bulunduğu gösterilmiş, genin henüz bilinmeyen bir kaynaktan yatay olarak edinildiği düşünölmüştür (86). Dikkat çekici olarak, ArmA kodlayan genin OXA-23 üreten *A. baumannii* suşları arasında olduğu, ancak her iki direnç geninin tek bir plazmid üzerinde fiziksel olarak bağlantılı olmadığı belirtilmektedir (81).

Vietnam'dan dokuz adet *A. baumannii* izolatında 16S rRNA metilaz RmtB tanımlanmıştır (83).

2.4.6. Florokinolon direnci

Florokinolonlar, DNA giraz ve topoizomeraz IV'e bağlanarak DNA sentezini durdurur ve bakteri ölümine yol açarlar. 1990'a kadar kinolonlar *Acinetobacter* türlerine karşı oldukça iyi aktivite göstermişler ancak daha sonra klinik izolatlar bu antibiyotiklere hızla direnç geliştirmişlerdir (148). Gram negatif bakterilerde florokinolonlara direnç, topoizomerazları kodlayan genlerde veya atım pompalarını düzenleyen sistemlerde oluşan mutasyonlarla ilişkilidir. Buna ek olarak, Enterobacteriaceae' de plazmid aracılı kinolon direnç genleri (Qnr proteinlerini kodlayan) saptanmıştır. Bu kazanılmış Qnr proteinleri, non-fermenter bakterilerde tespit edilmemiştir. *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'de, DNA girazı kodlayan *gyrA* geninde tek bir mutasyon, florokinolonlara klinikte yüksek düzeyde MİK değerleri vermek için yeterlidir. Bunun nedeni, bu türlerde düşük permeabilite ve atım pompalarının yapısal ifadesi nedeniyle içsel olarak florokinolonlara düşük duyarlılık olmasıdır (87).

Acinetobacter baumannii'de kazanılmış florokinolon direnci atım pompalarının yüksek düzeyde ifade edilmesiyle de sağlanır (88). Sadece florokinolonlar değil aynı zamanda aminoglikozitler, tetrasiklinler, kloramfenikol ve trimetoprim de bu atım sisteminin substratlarıdır (89).

2.4.7. Tetrasiklin direnci

Tetrasiklinler, 30S alt birime bağlanıp protein sentezininin inhibisyonuna yol açarak bakteriyostatik etki gösteren bileşiklerdir. Tetrasikline direnç, atım pompası, ribozomal koruyucu proteinler veya enzimler ile ilacın inaktive edilmesiyle oluşabilmektedir. Gram negatif bakterilerde tetrasiklin direnci için *tetA*'dan *tetE*'ye kadar farklı genler tanımlanmıştır. Bu genlerden bazıları atım pompasında rol alan proteinleri, bazıları ise ribozomal koruyucu proteinleri kodlamaktadır. Bu genlerin genellikle plazmid veya transpozonla ilişkili olduğu ifade edilmiş olup *Acinetobacter* türleri için de bu genel kuralın geçerliliği söz konusudur (90).

Glisilsiklin grubu bir ilaç olan tigesiklin, geniş spektrumlu ve ribozomlar üzerine tetrasiklinlerle aynı bağlanma bölgesine sahip olmasına karşın tetrasiklinler için sözü edilen direnç mekanizmalarından etkilenmemektedir. Tigesiklin bu mekanizmaların çoğunluğuna direnç gösterecek şekilde tasarlanmıştır, ancak *A. baumannii*'deki Ade tipi atım pompaları tarafından, özellikle de bu pompalar aşırı ifade edildiğinde hücre dışına atılmaya eğilimlidir (91).

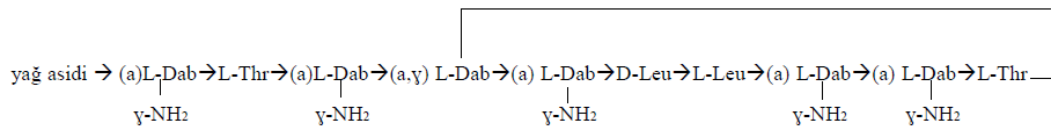
2.4.8. Kolistin direnci

Kolistin, siklik yapıli katyonik polipeptid antibiyotikler olan polimiksinlerin bir üyesidir. 1947 yılında keşfedilen polimiksinler, 1962 yılından itibaren gram-negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde parenteral olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1980'li yıllarda ciddi nefrotoksisiteleri nedeniyle yerini daha az toksik etkileri olan yeni grup antibiyotiklere bırakmıştır. Son yıllarda izlenen çoklu ilaç direnci bulunan gram-negatif bakteriler (özellikle *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp.) ile oluşan enfeksiyonların sıklığında artış ve tedavilerinde yaşanan sorunlar polimiksinleri tekrar gündeme getirmiştir. Klinikte, çoklu ilaç direnci bulunan bakteriler (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) ile oluşan enfeksiyonlarda ve özellikle de kolistin dışındaki diğer antibiyotiklere direnç varlığında kullanılması önerilmektedir (92). Ticari olarak piyasada bulunan iki tip kolistin vardır. Bunlardan birincisi olan kolistin sülfat, oral ve topikal kullanım için uygundur. İkincisi ise, kolistimetat sodyum (sodyum kolistin methansulfonat, kolistin sülfometat sodyum) parenteral kullanım için uygundur. İki kimyasal form da inhalasyon yoluyla kullanılabilir. Optimal dozun oluşturulması için gerekli olan farmakokinetik,

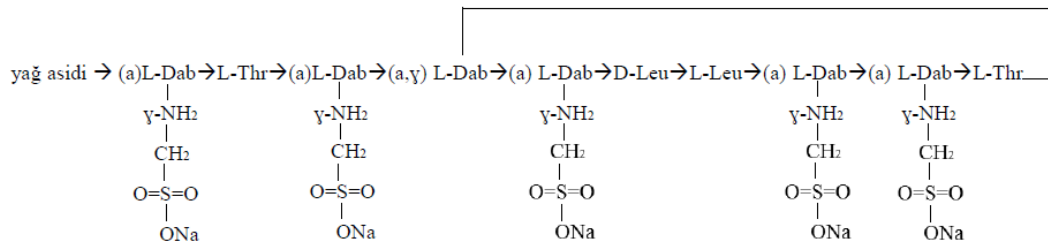
farmakodinamik ve toksikodinamik açıdan bilgi eksikliği, çok ilaca dirençli *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae*'nin yol açtığı enfeksiyonlara karşı başarılı olsa da klinikte kolistinin kullanımını sınırlandırmıştır (92).

Escherichia coli ve *K. pneumoniae*'da horizontal geçiş ile yayılan plazmid aracılı kolistin direnç geni *mcr-1* tanımlanmıştır. Bu gen kıtaların çoğuna yayılmış olup, gıda hayvanlarından, çevresel örneklerden, enfekte hastalardan ve uluslararası seyahat eden asemptomatik kişilerden izole edilen bakterilerde gösterilmiştir (93, 94). Şu an için *A. baumannii*'de *mcr-1* varlığını gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Şekil 2.1.'de kolistin ve kolistimetat sodyumun kimyasal yapıları gösterilmiştir.

Kolistin



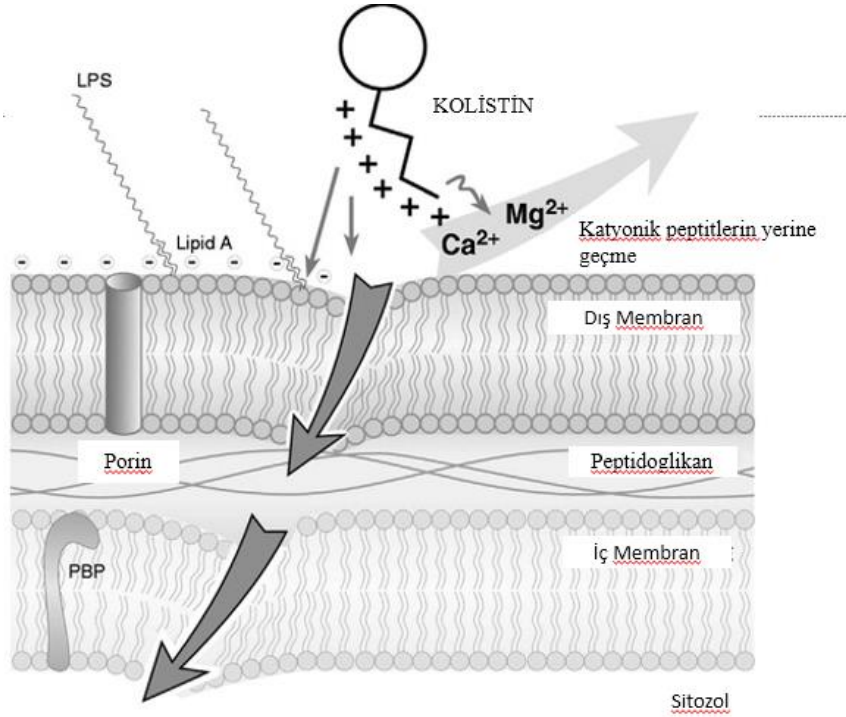
Kolistimetat Sodyum



Şekil 2.1. Kolistin ve kolistimetat sodyumun kimyasal yapısı. Yağ asidi molekülü kolistin için 6-metiloktanoik asit, kolistimetat sodyum için 6-metilheptanoik asittir. α ve γ peptit bağında yer alan ilgili $-\text{NH}_2$ 'yi gösterir. Dab, diaminobütirik asit; Leu, lösin; Thr, treonin (149).

Kolistinin Etki Mekanizması

Kolistinin hedefi bakteri hücre membranıdır. Katyonik bir peptid olan kolistin, gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan ve anyonik yapıda olan lipopolisakkaridlere (LPS) bağlanır. Lipopolisakkarid moleküllerini bir arada stabil halde tutan divalant katyonların (Ca^{+2} , Mg^{+2}) yerini değiştirerek, dış membranda bozulma ve permeabilite artışı ile hücre içeriğinin dışarı sızmasına ve bakteri ölümüne neden olur (95, 96). Antibakteriyel etkisine ek olarak kolistin, lipopolisakkaridin lipid A kısmına bağlanarak endotoksinin etkisini bloke eder. Bakterilerin kolistine duyarlılığı, hücre membranının içerdiği fosfolipid miktarı ve ortamda bulunan divalant katyonların düzeyi ile ilişkilidir (97). Şekil 2.2’de bakteri hücre membranına kolistinin etki mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bakteri hücre membranına kolistinin etki mekanizması (Abed Zahedi Bialvaei ve ark. (150)’dan uyarlanmıştır.)

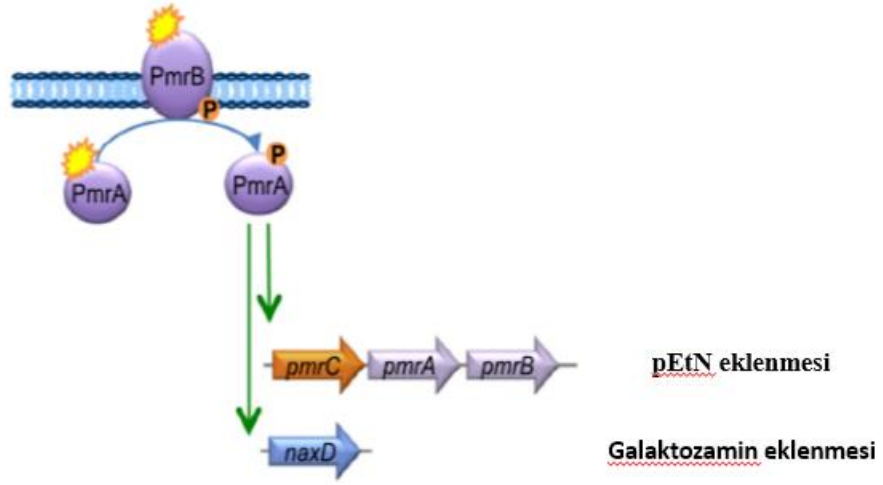
Kolistine Direnç Mekanizması

Acinetobacter baumannii'deki kolistin direncinin esas mekanizması, LPS tabakaya katyonik grup eklenmesidir. Ayrıca LPS üretiminin tamamen kaybı da dirence yol açar. *A. baumannii*'de katyonik grup eklenmesi PmrAB gen bölgesindeki mutasyona bağlıdır. (98-105).

A. baumannii'de kolistin direnci *pmrA* ve *pmrB* genlerindeki mutasyon ile ilişkilidir. Bu mutasyonlar ile PmrAB düzenleyici sistem aktifleşir ve *pmrCAB* operonunun fazla ifade edilmesini sağlar. *pmrC* geni Ept-A benzeri fosfoetanolamin transferaz kodlar ve bu enzim de Lipid A'nın 1'4' fosfat grubuna fosfoetanolamin (pEtN) eklenmesini katalize eder. Çevresel faktörlerden yüksek Fe^{+3} ve düşük Mg^{+2} , gen işleyişini değiştirebilir. *pmrA* ve *pmrB* mutasyonu olan hastane klinik izolatlarında kolistin MİK değerlerinin 4 mg/L – 256 mg/L arasında değişebildiği gösterilmiştir. Bu da pEtN ile ilişkili LPS değişikliğinden başka şu anda bilinmeyen bazı faktörlerin de direnç düzeyinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca kolistine dirençli klinik suşların *pmrA* ve *pmrB* mutasyonlarıyla yeniden duyarlı fenotipe dönebildiği gösterilmiştir. Bunun yanında, *A. baumannii*'de kolistine düşük veya orta düzeyde direncin (MİK 1,5 – 48 mg/L) *pmrB*'nin aktivasyonu sonucunda Lipid A'nın 1'fosfat pozisyonuna galaktozamin eklenmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür (106).

Son zamanlarda lipid A'ya eklenmeden önce N-asetil galaktozamini, galaktozamine dönüştürmek için gereken bir D-asetilaz enzimini kodlamak için *naxD* geninin ifadesine gereksinme olduğu, bunun da *pmrB*'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (106).

Kolistin direncinin ikinci mekanizması ise, lipid A biyosentez genlerindeki (*lpxA*, *lpxC* ve *lpxD*) değişiklikler sonucunda LPS'nin tamamen kaybedilmesine bağlıdır. *A. baumannii*'nin in-vitro mutantlarında yapılan çalışmalar çok yüksek kolistin MİK'lerinin (128 mg/L) LPS biyosentez genleri olan *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* ve *lpsB*'nin inaktivasyonu ile oluştuğunu göstermiştir; lipid A veya lipopolisakkarit korunun tamamen kaybı söz konusudur. Bu mutantların üreme ve in-vitro dayanıklılıklarının düşmesi nedeniyle bunlara klinikte sık rastlanmaz (107, 108).



Şekil 2.3. PetN ve galaktozamin eklenme mekanizması. (Jeannot K ve ark. (151)'dan uyarlanmıştır.)

Kolistine Heterodirenç

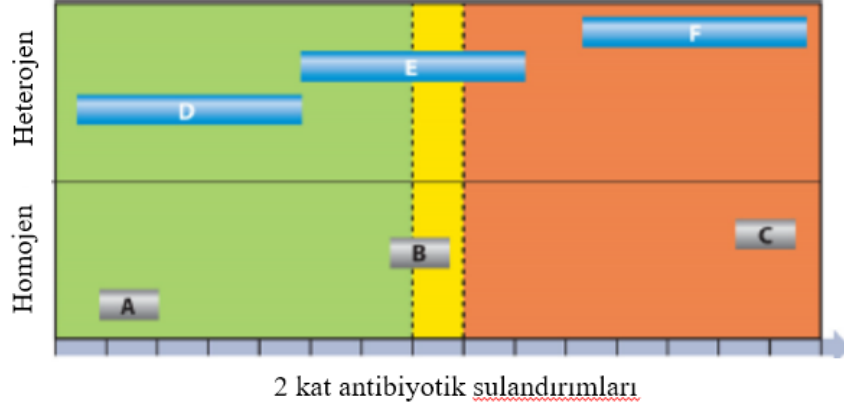
Aynı popülasyon içinde yer alan farklı bakterilerin antibiyotiklere verdiği yanıtlar farklı olabilir. “Heterodirenç” olarak tanımlanan bu durum, antibiyotik direnci çalışmalarını karmaşık hale getirmiş ve klinik olarak önemi tam olarak anlayamamıştır. Heterojen antibiyotik direnci ilk olarak 1947 yılında gram negatif bakterilerden *Haemophilus influenzae*'da, 20 yıl sonra ise gram pozitif bakterilerden stafilokoklarda gösterilmiş ancak ilk bildirim 1970 yılında gerçekleştirilmiştir (109-111). Bu olguyu tanımlamak için “heterojen direnç”, “direncin popülasyon çapında değişimi”, “antibiyotiklere heterojen yanıt” tanımları da kullanılabilir.

Heterodirenç bir bakteri topluluğu içinde antibiyotiğe farklı yanıtlar olduğunu belirtmek için kullanılan terimdir. Bazı yayınlarda, özel bir antibiyotik konsantrasyon aralığı belirtilmez iken; *A. baumannii*'de bu aralıklar belirtilmiştir (110, 112, 113). *Acinetobacter baumannii*'de kolistin MİK'i 0,25 ila 2 mg/L iken alt popülasyonların 3 ila 10 mg/L kolistin aralığında ürettiği belirtilmiştir (5).

Heterodirencin Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Helicobacter pylori* ve *Mycobacterium* spp. için tanımları değişiklik göstermektedir (115).

Heterodirenç, antibiyotiklere verilen homojen yanıtı karşıdır. Şekil 2.4'de noktalı çizgi ile görülen alan direnç için sınır değerlerini temsil etmektedir. Geleneksel in-vitro duyarlılık testlerine göre (A): Bakteri kültürü duyarlı olabilir, (B): Orta duyarlı olabilir, (C): Dirençli olabilir. Duyarlılık sınır değerinin altında farklı alt popülasyonlar antibiyotiğe yanıt verebilir bu şekilde bakteri tamamen duyarlı olabilir. (D): Antibiyotiğe direnç geliştirmediği sürece, daha az saptanabilir ve olasılıkla klinik olarak en az öneme sahiptir. (E): Bakteri popülasyonunun büyük bir kısmı duyarlıdır, düşük bir kısmı antibiyotiğe direnç gösterir. Geleneksel duyarlılık testleri temel alınarak yapılan tedavide, dirençli alt popülasyonun seçilmesine yol açılmasıyla başarısız olunabilir. (F) Az dirençli alt popülasyon da dahil tüm popülasyon antibiyotiğe dirençli olabilir. Bu tür bakteri popülasyonunda endişe verici olan şey

yüksek direnç içeren bakterilerden düşük direnç içeren bakterilere gen aktarımıdır (114).



Şekil 2.4. Bakterinin antibiyotiğe yanıtı ve tanımlamalar (Halfawy ve ark. (114)'dan alıntılanmıştır.)

Bakteri popülasyonunda heterodirenç, genetik, epigenetik ve non-genetik mekanizmalara bağlı olabilir. *A. baumannii*'deki kolistin heterodirençinin mekanizması; yüksek düzeyde kolistin direnci gösteren alt popülasyonlarda LPS kaybına bağlıdır. LPS kaybı Lipid A biyosentez genleri olan *lpxA* ve *lpxC* genlerini inaktive eden insersiyon dizisine (IS) bağlıdır (115). Bu mutantlar artan kolistin konsantrasyonunda sürekli pasajlanarak elde edilir (116).

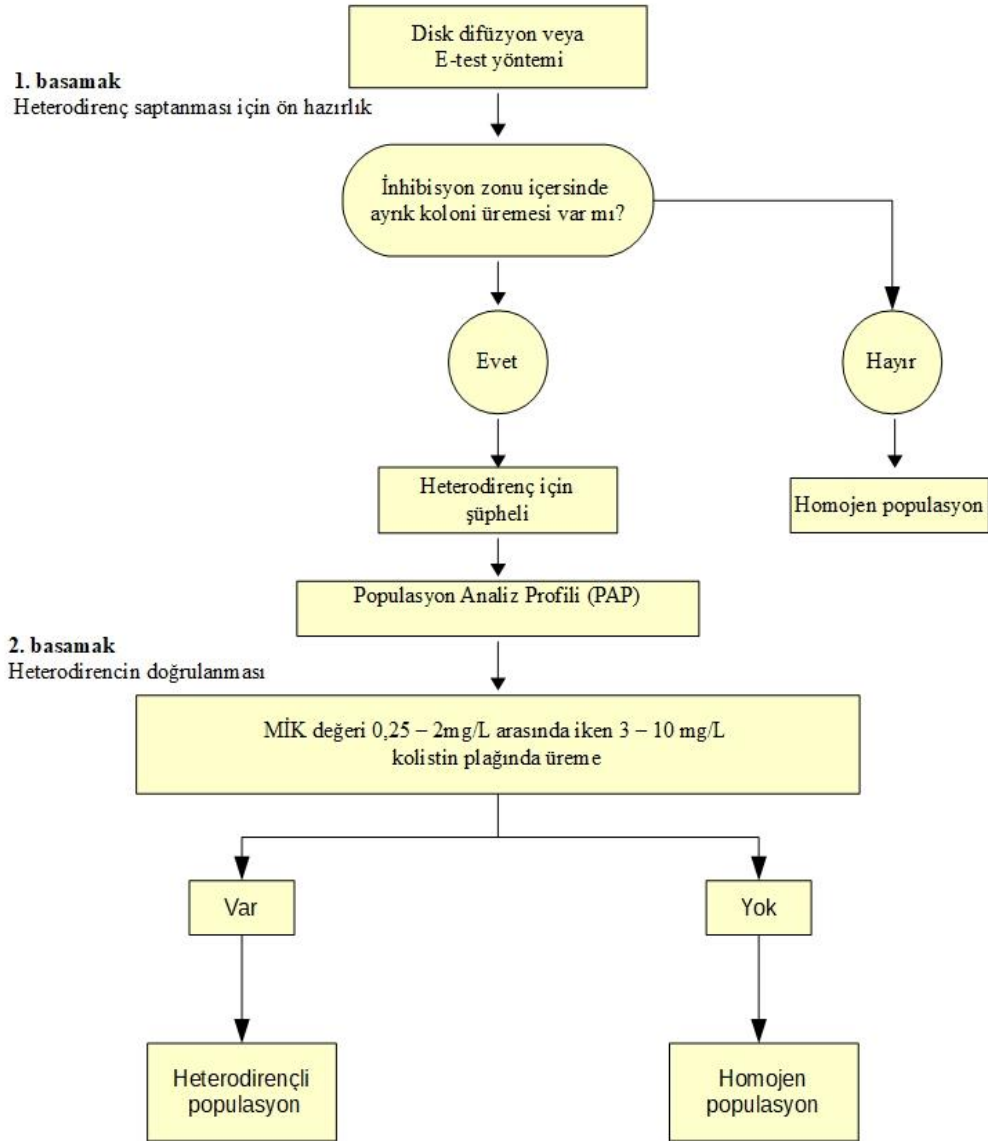
Heterodirençin ölçülmesi başlıca iki temel yöntemeye dayanır. Bunlardan birincisi olan, “populasyon analiz profili (PAP)” heterodirenç saptamada altın standart yöntemdir. Bu yöntem göre, belirli farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren katı ya da sıvı besiyerine, farklı dilüsyonlardaki bakteri süspansiyonu inoküle edilir ve koloni sayımı yapılarak bakteri üremesi kontrol edilir. PAP, standart MİK değeri saptama yöntemleri gibi antibiyotik sulandırımı hazırlamaya ve daha sonra üreyen kolonileri koloni oluşturan birim (KOB, CFU) bazında sayma işlemlerine dayanır (113).

Diğer bir yöntem olan, “modifiye PAP yöntemi (PAP-AUC)” özellikle *S. aureus* izolatlarının vankomisine heterodirençli olup olmadığını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Plaklar üzerinde üremeleri sayılan koloniler, bir grafik çizilerek bu grafiğin “y” eksenine üreyen koloni sayılarının logaritmaları, “x” eksenine ise antibiyotik konsantrasyonları yazılır ve her bir suş için bir eğri elde edilir. Buna

göre, test edilen her bir suş için elde edilen eğrinin altında kalan alan (Area under the curve, AUC), referans heterodirençli suşu için elde edilen eğrinin altındaki alana bölünerek bir oran elde edilir ve karşılaştırarak yorumlanır (114).

Heterodirenç saptamada disk difüzyon yöntemi ve gradiyent-test (G-test) şartları da kullanılabilir. Disk difüzyon yöntemi ve G-test şartları, geleneksel in-vitro duyarlılık testleri için önerilen heterodirenci tespit etmek için kullanılmıştır. İnhibisyon zonunda üreyen farklı koloniler heterodirenç için şüpheli olarak değerlendirilir (114).

MRSA'da heterodirenci saptamak için "akım sitometrisi" kullanılmıştır. Ayrıca, zamana bağlı öldürme eğrileri ve "skip well" şeklindeki MİK sonuçları da tanımlama için kullanılabilir. "Skip well" mikrodilüsyon testinde daha yüksek konsantrasyonda ürediği halde bazı kuyucuklarda üreme olmaması durumudur. *Enterobacter cloace* ve *Enterobacter aerogenes*'de polimiksin B'ye karşı bu tanım yapılmıştır (114).



Şekil 2.5 Heterodirenç saptama algoritması. (Halfway ve ark. (114)'dan uyarlanmıştır.)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzolatların toplanması ve saklanması

Bu çalışmaya Haziran 2016 – Ocak 2017 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Bakteriyojoloji Laboratuvarı'nda çeşitli örneklerden izole edilen 200 adet *Acinetobacter baumannii* kompleks izolatu dahil edilmiştir. Her hastadan tek bir örnek çalışmaya dahil edilmiştir.

Elde edilen bakteriler çalışma için yapılan canlandırma işlemine kadar %10 gliserol içeren beyin infüzyon buyyon içerisinde – 20 °C'de saklanmıştır.

3.2. Mikrobiyolojik kültür ve tanımlama işlemleri

3.2.1. İzolatların canlandırılması

Acinetobacter baumannii izolatlarına ait stok bakteri kültürlerinin oda sıcaklığında bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Kanlı agar ve MacConkey agar plaklarına öze ile tek koloni düşürme tekniği ile pasajları yapılmıştır. Besiyerleri 35 °C'lik etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem ile canlandırılmayan izolatlar çalışmadan çıkarılmıştır. Pasajları karışık üreyen stok bakteri kültürlerinden geleneksel ve otomatize yöntemlerle *Acinetobacter baumannii* kompleks olduğu belirlenen kolonilerin tek koloni pasajları yapılmıştır.

3.2.2. Bakteri tanımlama yöntemleri

Hastanemizde kullanılan yöntemler değişiklik göstermekle birlikte izolatların tanımlanması amacıyla konvansiyonel ve otomatize yöntemler ile kütle spektrometrisi temelli yöntemler bir arada kullanılmıştır.

Konvansiyonel bakteri tanımlama yöntemleri

Tek koloni pasajları yapılan bakteri izolatlarına oksidaz testi yapılarak *Pseudomonas aeruginosa*'dan ayırt edilmesi sağlanmıştır.

- Oksidaz testi: Oksidaz testi, sitokrom oksidaz enzimi üretiminin gösterilmesine dayanır. Bazı bakteriler, demir içeren bir hemoprotein olan sitokrom oksidaz

veya indofenol oksidaza sahiptirler. Bu testte %1 tetrametil p-fenilen diamin dihidroklorid kullanılmıştır. Bir parça filtre kağıdı petri kabına konulmuştur. Taze kültürden test edilecek koloni öze veya kürdan ile alınıp; şeridin ayrıç damlatılmış (ıslatılmış) kısmına sürülmüştür. Sitokrom oksidaz aktivitesi bulunan bakteri kolonilerinin rengi 10 saniye içinde koyu mavi-mor rengini alacaktır. Renk değişimi gözlenmeyen izolat sonuçları kaydedilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir. Sitokrom oksidaz aktivitesi gösteren izolatlar çalışmadan çıkarılmıştır. Bu testte kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 (pozitif kontrol) ve *E. coli* ATCC 25922 (negatif kontrol) kullanılmıştır.

Otomatize bakteri tanımlama yöntemleri

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Bakterioloji Laboratuvarı'nda bakterilerin tanımlanması için otomatize sistemler kullanılmaktadır. İzolatların toplandığı süre içerisinde Vitek 2 ID/AST (bioMérieux, Fransa) otomatize bakteri tanımlama sistemi kullanılmıştır. Bu gibi sistemler fermentasyon, oksidasyon, degradasyon ve çeşitli substratların hidrolizi gibi biyokimyasal yöntemlerle bakterileri tanımlamaktadır.

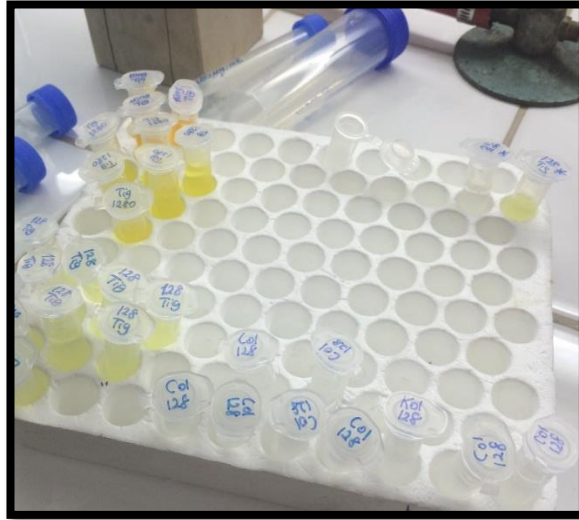
Kütle spektrometrisi temelli yöntemler

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Bakterioloji Laboratuvarı'nda tanımlama amaçlı kütle spektrometri yöntemi olarak “matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi” (“matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight Mass Spectrometry”; MALDI-TOF MS) kullanılmaktadır. Çalışmamızda VITEK MS (bioMérieux, Fransa) ile tanımlanan ve stok kültürleri alınan *A. baumannii* izolatları canlandırıldıktan sonra MALDI-TOF MS ile de tanımlanmıştır. Bu amaçla, bakteri kolonisi metal plak üzerindeki işaretli alana sürüldükten sonra üzerine 1 µl matriks solüsyonu pipetlenerek oda şartlarında kurumaya bırakılmıştır. Metal plak, kütle spektrometri cihazı içine yerleştirilip lazer ışınları ile vuruşlar yapıldıktan sonra matriks içinde bakteri moleküllerine (DNA, protein vb) ayrıştırılır. Proteinlerin hepsi +1 yükle yüklenir, böylece uçuşları süresince sadece kütlelerin farklılıkları ile analizöre ulaşırlar. Ulaşan veriler, cihazın veri kütüphanesinde değerlendirilerek bakteri tanımlaması gerçekleştirilir.

3.3. İzolatların kolistin direncinin belirlenmesi

3.3.1. Antibiyotiğin Hazırlanması ve Saklanması

1. İzolatların kolistin duyarlılıklarının belirlenmesinde kolistin toz antibiyotiği (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır.
2. Kolistin 10 mg tartılarak $V = w \times P / c$ formülüne göre 1280 mg/L stok çözeltisi hazırlanmıştır. (V: Sulandırıcı, w: Antibiyotik ağırlığı, P: Antibiyotik potansi, c: İstenilen konsantrasyon)
3. 10 mg kolistin 7,8 ml su ile sulandırılarak 1280 mg/L konsantrasyon elde edilmiş, diğer kullanımlar için mikrosantrifüj tüplerine 1,5 ml hacimde ayrılarak -20 °C’de dondurulmuştur.
4. -20 °C’de saklanan antibiyotik çözeltilerinin, kullanım öncesinde oda sıcaklığında çözünmesi beklenmiştir.

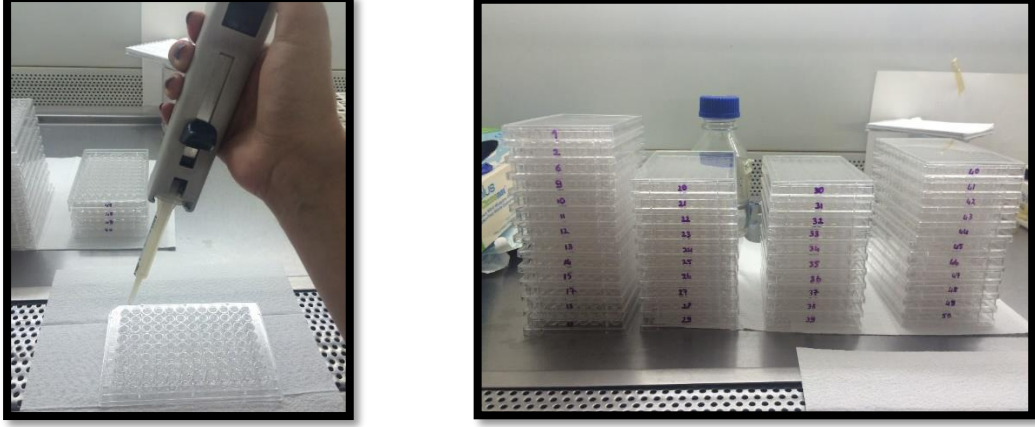


Şekil 3.1. Mikrosantrifüj tüplerinde kolistin çözeltisi.

3.3.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

1. Mikrodilüsyon yöntemi için steril U tabanlı mikroplaklar kullanılmıştır.
2. En alt sıradaki çukurlar dışındaki tüm kuyucuklara 50 µl MHB konmuştur. Bu işlem steril otomatik pipet ile gerçekleştirilmiştir. En alt sıradaki çukurlarda üç çukur steril besiyeri kontrol diğer üç çukur ise bakteri üreme kontrol olarak ayrılmıştır. Pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.
3. Mikrosantrifüj tüpü içerisindeki antibiyotik çözeltisi oda sıcaklığında çözünerek vortekslendi, 1/10 sulandırım hazırlanmış (128mg/L) ve mikroplaklarda her sıranın en sol çukurlarına (en alt sıra hariç) 50'şer µl konulmuştur.
4. Kolistin, mikroplağın ilk kuyucuklarına konulmuş, ilk kuyucuklardan diğerlerine çok kanallı pipet ile 50'şer µl dağıtılmıştır. 12. kuyucuktan alınan 50 µl karışım dışarı atılmıştır. Bu sayede soldan sağa doğru azalacak şekilde antibiyotiğin 32-0,01 mg/L aralığında seri sulandırmaları hazırlanmıştır.
5. Standart inokulum doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Bir gün öncesinden kanlı agara pasajlanmış taze kültürden bakteri kolonileri alınarak serum fizyolojik (SF) içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığa (2×10^8 üzeri 8 koloni oluşturan birim; KOB/ml) süspansiyonları hazırlanmış, dansitometre ile okunmuştur.
6. 0,5 McFarland olan tüpten 50 µl alıp 4950 µL Mueller-Hinton Broth (Merck, ABD) besiyeri içeren tüpe aktarılmıştır. Daha sonra aktarılan tüpten 400 µl alıp 3600 µl MHB içeren ikinci tüpe aktarılmıştır.
7. Son hacmi 4000 µl olacak şekilde bakteri süspansiyonu içeren tüp vortekslenerek besiyeri ve antibiyotik karışımı içeren, besiyeri kontrol dışındaki her bir kuyucuğa 50'şer µl eklenmiştir.
8. Sonuç olarak her kuyucuğun içerisinde toplam 100 µl hacimde besiyeri, bakteri, antibiyotik karışımı bulunurken, kolistinin ilk konsantrasyonu 32 mg/L olmuştur.
9. İnoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 35°C'de 24 saat süre ile aerobik koşullarda etüvde inkübe edilmiştir. Tüm kültürlerde aynı inkübasyon sıcaklığını sağlayabilmek için mikrodilüsyon plakları üst üste dört adetten fazla dizilmemiştir.

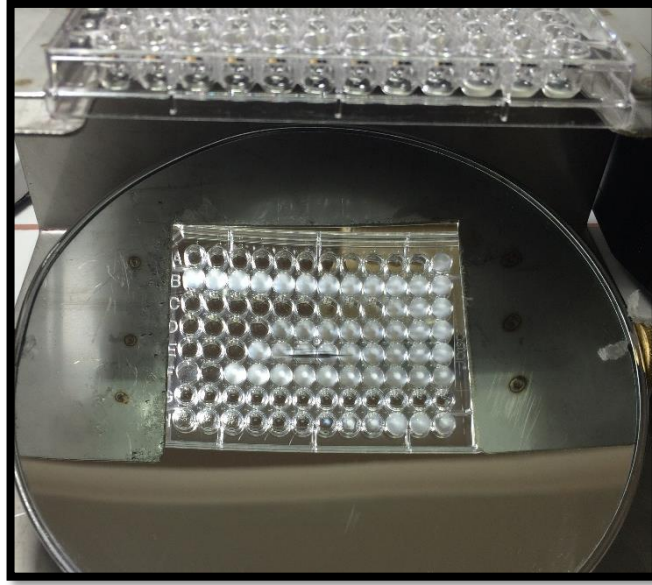
10. Her mikropalak kurumayı önlemek amacıyla inkübasyon sırasında steril plastik bir kapakla kapatılmıştır.



Şekil 3.2. Steril mikropalalara otomatik pipet ve şırınga ile 50'şer µl MHB eklenmesi.

3.3.3. MİK Değerlerinin Belirlenmesi

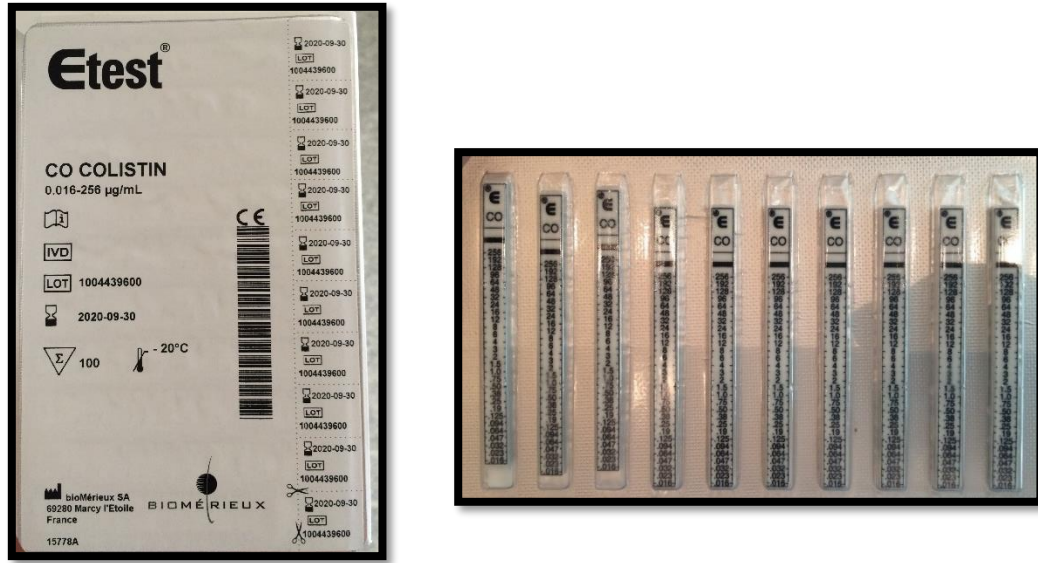
MİK, bakterilerinin mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden ve çıplak gözle gözlenebilen en düşük antibiyotik konsantrasyonudur. Duyarlılık kategorileri EUCAST v 7.1'de belirtilen klinik duyarlılık sınır değerlerine göre belirlenmiştir. Kolistin için MİK ≤ 2 mg/L bulunan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir (152).



Şekil 3.3. MİK değerlerinin aynalı okuyucuda saptanması.

3.4. Kolistine heterodirencin araştırılması

Acinetobacter baumannii izolatlarında heterodirençli alt popülasyonların varlığı El-Halfawy'nın (114) uyguladığı G-test yöntemi ile taranmıştır. G-test olarak E-test (BioMerieux, Fransa) kullanılmıştır. EUCAST'ın kolistin direncini saptamada kolistin gradiyent şerit yönteminin güvenilir olmadığı açıklamasını yaptıktan sonra üretici firmadan yeni G-test şerit elde edilemediğinden sadece 120 izolata G-test yöntemi uygulanabilmiştir. Uygulanan çalışmalar sonucunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değeri ile G-test yöntemi ile belirlenen MİK değerleri karşılaştırılmış, zon içi üreme tespit edilen izolatlar heterodirenç için şüpheli olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.4. Kullanılan E-test şeritleri

3.4.1 G-test yöntemi ile heterodirençli suş varlığının taranması

1. İlk önce doğrudan koloni süspansiyon yöntemi ile 0,5 McFarland yoğunluğunda inokulum hazırlanmıştır. İnokulum süspansiyonu hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde MHA'a inoküle edilmiştir. MHA'a ekim yapmadan önce besiyeri yüzeyinin tamamen kuru olmasını sağlamak için etüvde kapakları açık olmak kaydıyla ters çevrilerek 10-30 dakika tutulduktan sonra kullanılmıştır.
2. Steril pamuklu eküvyon inokulum süspansiyonuna batırılıp fazla sıvının bırakılmasından sonra inokülasyona geçilmiştir. Tüm agar yüzeyine yaklaşık 60 derecelik açılarla üç kez yayıldıktan sonra eküvyon son olarak plağın çevresinde gezdirilmiştir.
3. Kolistin şeriti yerleştirilmeden önce nemin absorbe olması için 10 dakika beklenmiştir. Agar yüzeyinin tamamen kuru olmasına dikkat edilerek şeritler aplikatörle ya da bir ince uçlu pensetle uç tarafından tutularak alınmış ve inokulumla kaplı agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Şeritin agar

yüzeyine tam olarak temas etmesi sağlanmıştır. Hava kabarcığı oluşması halinde düşük konsantrasyondan yükseğe doğru pensetle hafifçe bastırarak kabarcık çıkartılmıştır.

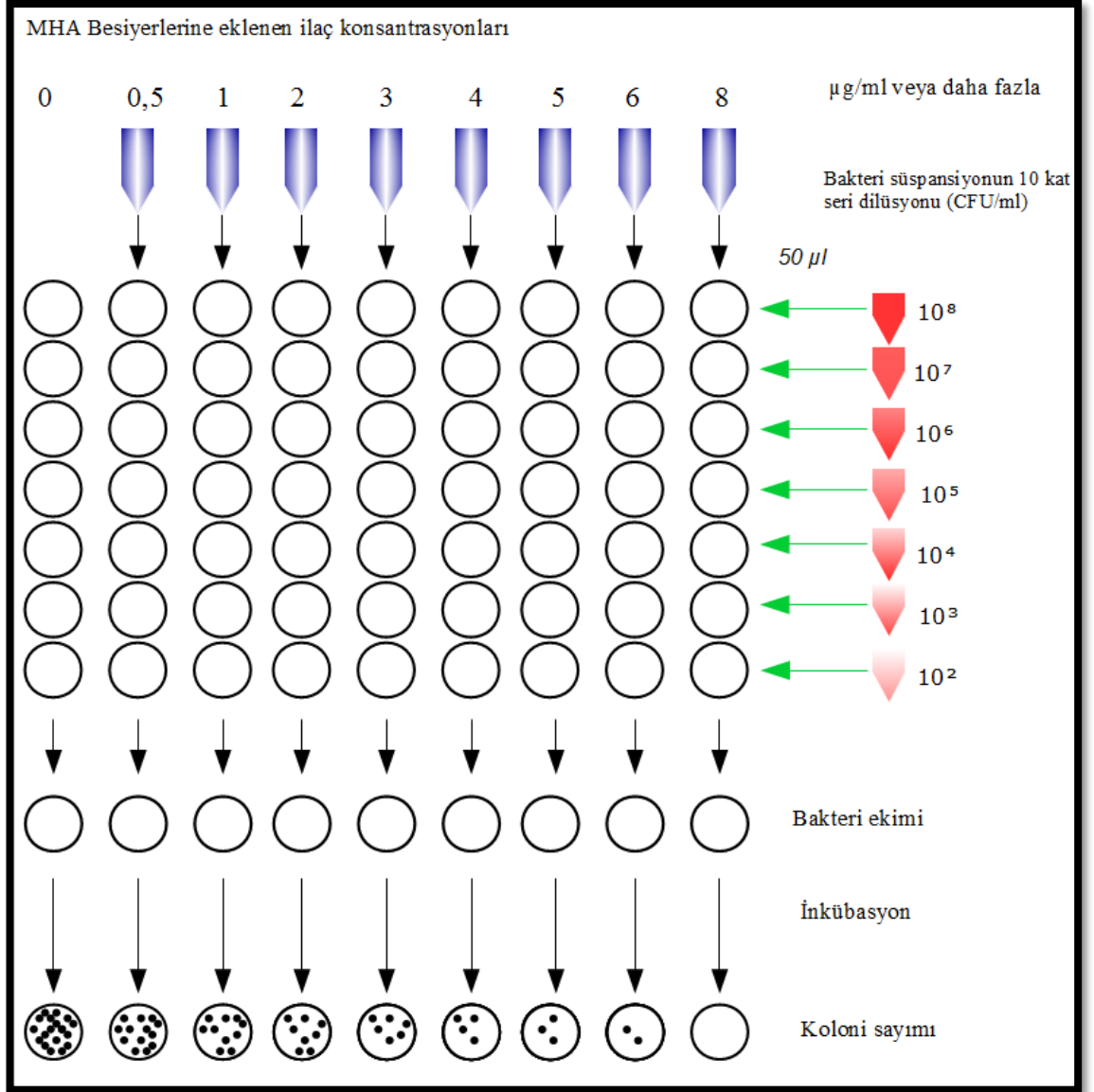
4. G-test şeritleri yerleştirildikten sonra en fazla 15 dakika içinde plaklar kapakları alta gelecek şekilde 35 °C inkübatöre kaldırılmış, 24-48 saat inkübe edilmiştir.

Plakların okunması ve sonuçların yorumlanması

1. 35 °C’de inkübe edilen plaklar 24 ve 48 saat sonunda değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrası aydınlık bir ortamda koyu renk bir zemin üzerinde, göz ile değerlendirilerek tam inhibisyon zonunun G-test şeridine temas ettiği konsantrasyon belirlenmiştir.
2. Eğer zon şeridin altına kadar iniyorsa MİK değeri en düşük konsantrasyonun da altında şeklinde kabul edilmiştir.
3. İnhibisyon zonunun iki değer arasında kalması halinde yüksek olan değer MİK olarak kabul edilmiştir.
4. İnhibisyon zonunun içinde üreyen koloniler karışık kültürü ya da dirençli varyantları atlamamak için özenle değerlendirilmiştir. Bu şekilde saptanan izolatlar heterodirenç için şüpheli kabul edilmiştir. İzole kolonilerin kontaminasyon olmadığı doğrulanmıştır.

3.4.2. İzolatlarda popülasyon profil analizi (PAP) çalışması ile heterodirencin araştırılması

Georgios’un (153) uygulamış olduğu yöntemle PAP çalışılmış, yapım aşamaları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

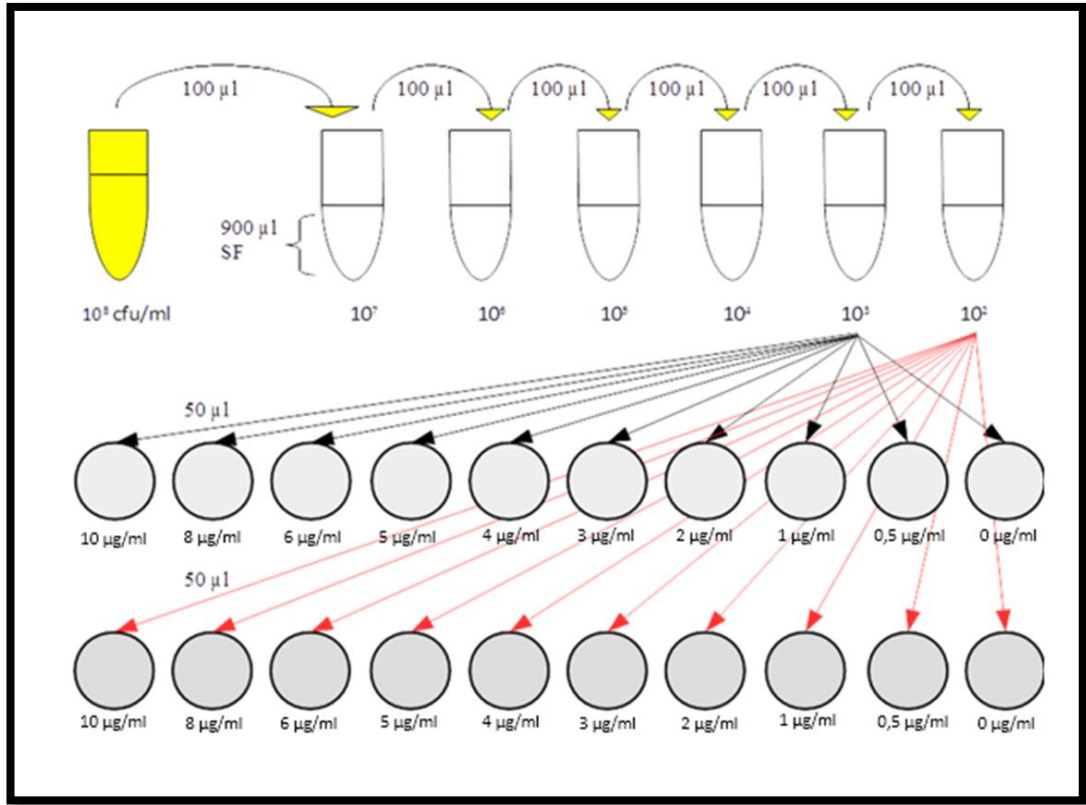


Şekil 3.5. Populasyon analiz profili (PAP) yapım aşamaları (Meletis, G (153)'den uyarlanmıştır.)

1. PAP çalışmaya başlamadan önce gerekli hesaplamalar yapılarak 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 mg/L kolistin içeren MHA plakları hazırlanmıştır. İstenilen konsantrasyonu elde etmek için tüplerde hazırlanan antibiyotik çözeltilerinden, sterilizasyon sonrası 45 °C'ye kadar soğutulan 19 ml besiyerlerine, 1 ml eklenerek karıştırılmıştır.
2. Plaklar soğumaya bırakılmış, etüvde kapakları açılıp ters çevrilerek kurumaları sağlanmıştır.
3. Ardından ertesi gün çalışılmak üzere buzdolabına kaldırılmıştır.
4. Kanlı agara pasajı yapılan bakteri izolatlarından alınan koloniler, SF içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanmıştır.
5. Bakteri süspansiyonundan 10 kat seri sulandırım ile 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 yoğunlukta süspansiyonlar elde edilmiştir.
6. Daha önceki denemelerde koloni sayımı yapılabilecek bakteri dilüsyonlarının 10^3 ve 10^2 olduğuna karar verilmiş ve çalışmada sadece bu dilüsyonlar kullanılmıştır.
7. Hazırlanan 10^3 ve 10^2 bakteri süspansiyonları 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0 mg/L konsantrasyonlarda kolistin içeren plaklara 50 µl inoküle edilmiştir.
8. Plaklar 35 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.
9. 10- 0 mg/L konsantrasyonlarda kolistin içeren her plakta koloni sayımı yapıldı ve bu veriler tabloya yerleştirilmiştir.
10. Tabloya göre oluşturulan grafikte: y eksenine üreyen koloni sayılarının logaritmaları, x eksenine ise antibiyotik konsantrasyonları yazıldı ve her bir suş için bir eğri elde edildi. Çalışılan izolatlardan dirençli ve duyarlı izolatların eğrileri, dirençli ve duyarlı izolatlar için genelleme yapılarak bir grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Sırasıyla, (A): Kolistin içeren antibiyotik plakları hazırlanması (B): Ertesi gün çalışmak üzere plakların soğuduktan sonra +4 °C buzdolabına kaldırılması (C): Plakların dizilmesi ve steril otomatik pipet ile ekim işlemi (E): Plakların etüve kaldırılması.



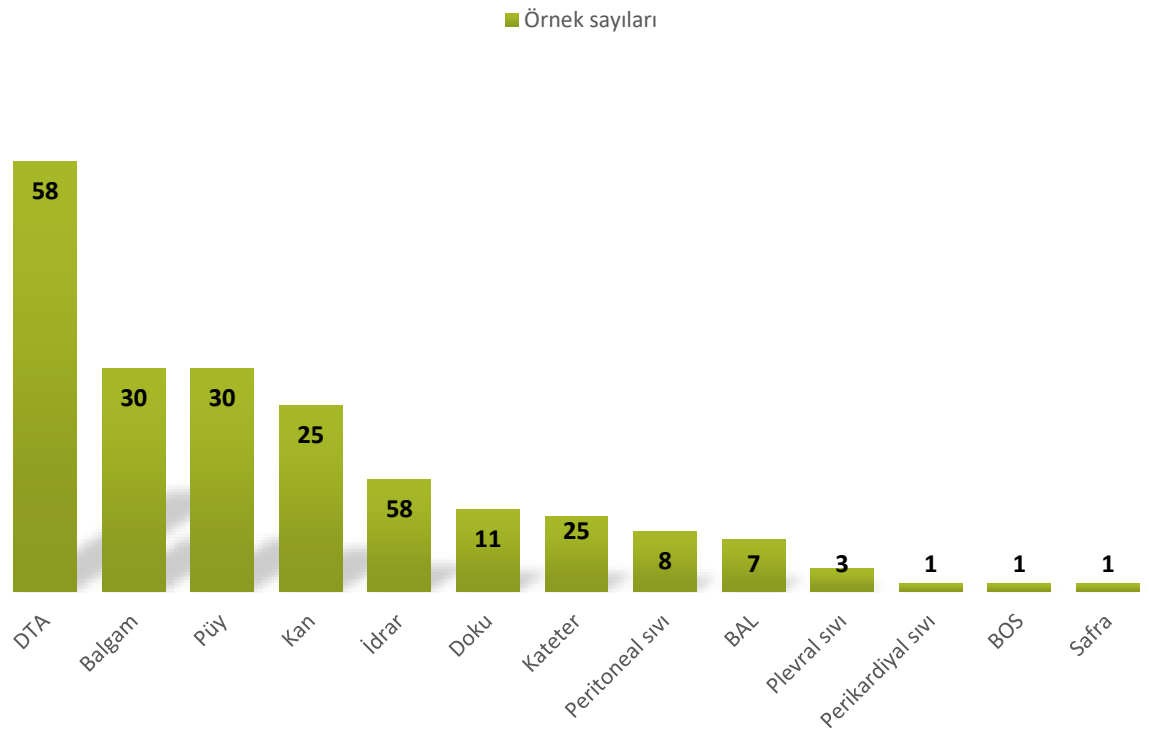
Şekil 3.7. Çalışmada uygulanan PAP basamakları.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya alınan *Acinetobacter baumannii* izolatları

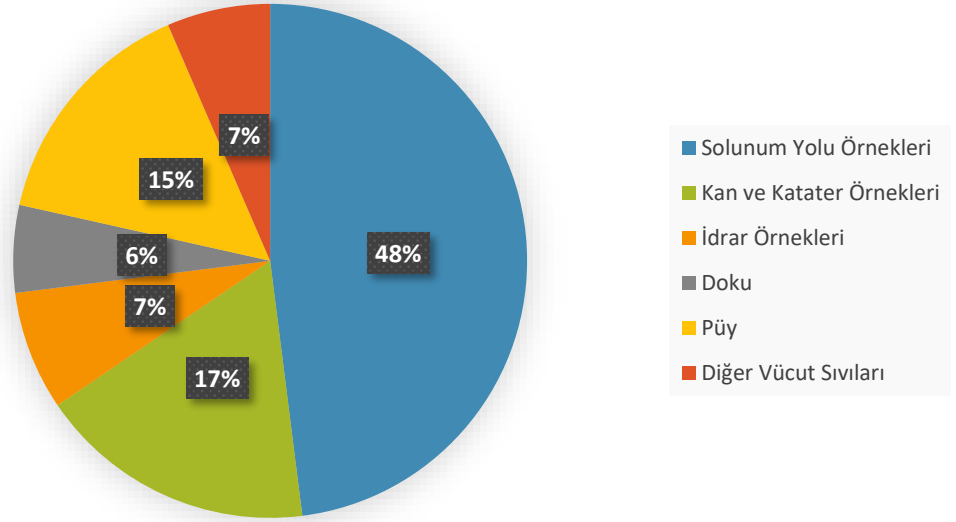
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen örneklerden ardışık olarak izole edilen 200 adet *Acinetobacter baumannii* kompleks izolatu çalışılmıştır. Her hastadan alınan sadece bir örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Solunum yolu örnekleri (BAL, DTA, balgam), idrar örnekleri (orta akım idrar, foley sonda ile idrar), kan ve kateter örnekleri ile diğer vücut sıvıları (BOS, safra, perikardiyal, peritoneal, plevral sıvılar) gruplandırılarak gösterilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen örneklerin çeşitleri ve sayıları Şekil 4.1'de, dağılımları ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *A. baumannii* izole edilen örnekler; çeşitleri ve sayıları.

Örneklerin Dağılımı



Şekil 4.2 A. *baumannii* izole edilen örneklerin dağılımı.

4.2. Kolistin duyarlılık sonuçları

200 adet *A. baumannii* izolatının kolistin duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Duyarlılık EUCAST (2017; v.7.1) uluslararası standartlarına göre değerlendirilmiştir (152). Buna göre, MİK değeri >2 olan izolatlar dirençli, ≤ 2 olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir. Değerlendirilen izolatlara ait sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilmiş direnç oranları Tablo 4.1’de, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1. *A. baumannii* izolatlarında dirençli izolat sayıları.

	Toplam İzolat Sayısı	Dirençli İzolat	
		Sayı	%
Solunum yolu örnekleri	95	21	22
Kan + Kateter örnekleri	35	13	37,1
Püü	30	10	33,3
İdrar örnekleri	15	4	26,7
Diğer vücut sıvıları	14	7	50
Doku	11	3	27,3
Toplam	200	58	29

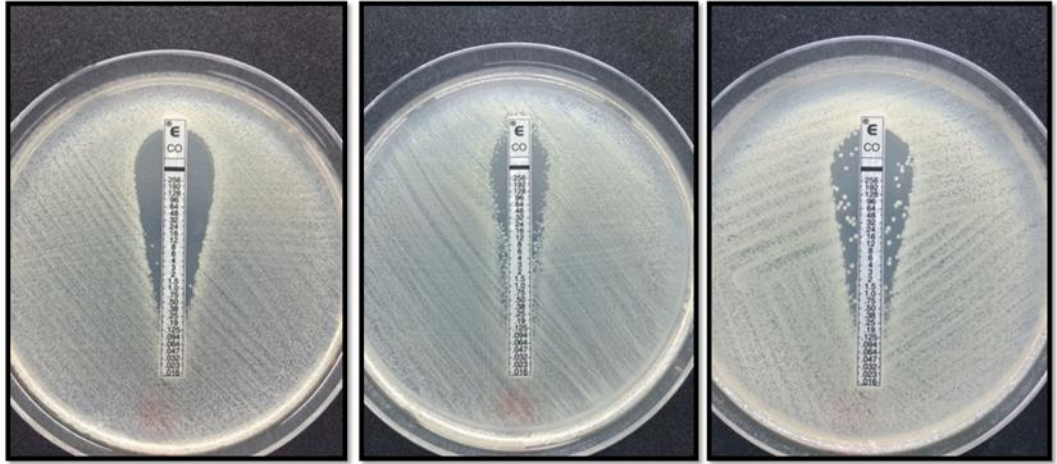
Tablo 4.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri (n=200).

	MİK ₅₀ (mg/L)	MİK ₉₀ (mg/L)	MİK Aralığı (mg/L)	Direnç (n/%)
Kolistin	0,5	≥ 32	0,01- ≥ 32	58 (29,0)

4.3. Heterodirenç taraması ve saptanmasına ilişkin bulgular

4.3.1 G-test (bioMérieux, Fransa) bulguları

G-testin uygulandığı 120 izolat içerisinde, inhibisyon zonunda üreme gözlenen ve heterodirenç için şüpheli olarak değerlendirilen izolat sayısı üç olarak bulundu. Şekil 4.3’de G-test sonucunda inhibisyon zonu içinde üreme gözlenen *A. baumannii* izolatlarının fotoğrafları gösterilmiştir.



Şekil 4.3. G-test yöntemi sonucunda zon içi üreme gözlenen izolatlar

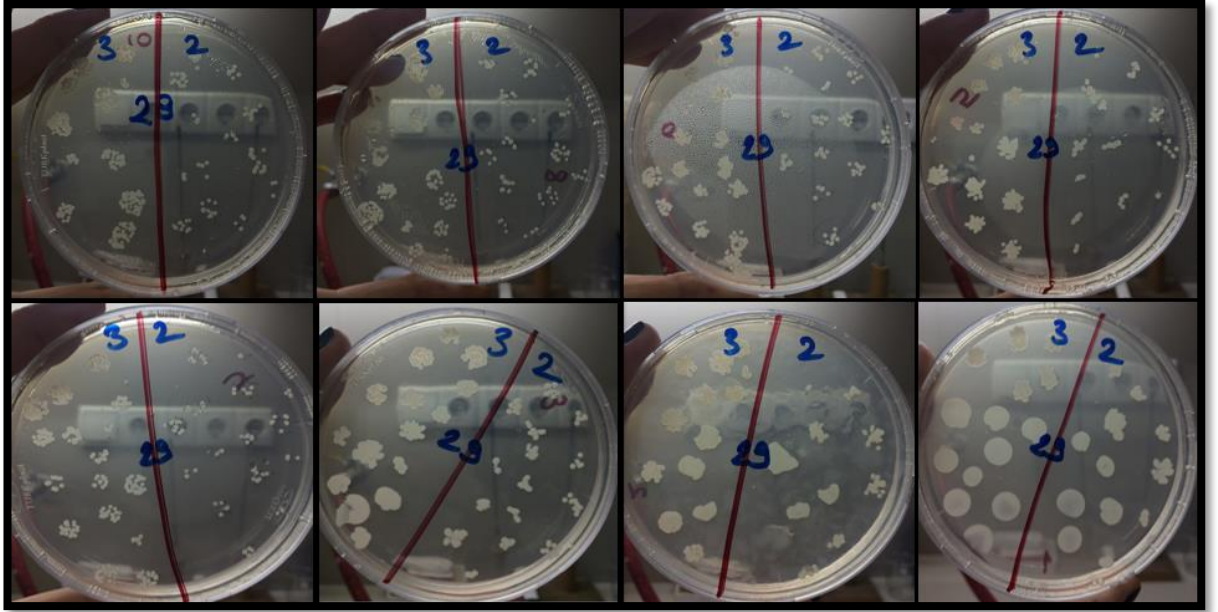
Çalışılan G-test MİK değerleri ile sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri arasındaki tutarsızlık dikkat çekmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre dirençli bulunan izolatlar G-test yöntemine göre duyarlı bulunmuştur. İzolatlardan 115’inin G-teste göre kolistine duyarlı beş izolatın dirençli olmasına karşın, bu sonuçlar mikrodilüsyon yönteminden çok farklı bulunmuştur. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle dirençli bulunan 58 izolatın içinden 31 izolat G-teste göre duyarlı bulunmuştur. G-test yöntemi ile çalışılan 120 izolatın MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 4.3 ’de gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Kolistin için G-test ve mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri (n=120).

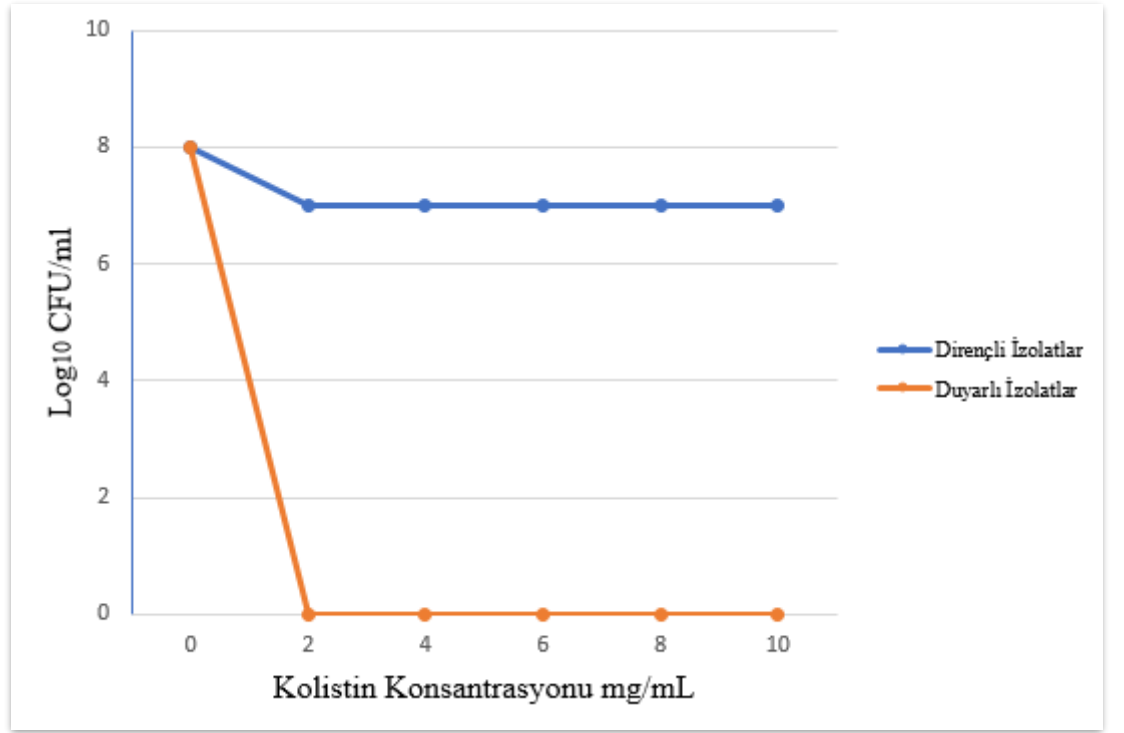
	MİK ₅₀ (mg/L)	MİK ₉₀ (mg/L)	MİK Aralığı (mg/L)	Direnç (n/%)
G-test	0,064	0,5	0,015– 64	5 (4,2)
Mikrodilüsyon	0,50	≥ 32	0,015- ≥32	31 (26,0)

4.3.2. PAP deneyi bulgular

PAP deneyi G-test ve mikrodilüsyon ile kolistin duyarlılığı saptanan 120 izolatta yapılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemine göre 89'u duyarlı, 31'i dirençli bulunan izolatların hiçbirinde heterodirençli populasyon saptanmamıştır. Bu izolatlara G-testte zon içi üreme gözlenen 3 izolat da dahildir. Duyarlı olan izolatların tümü kolistin içermeyen MHA plağında (0 mg/L) üremiş, artan kolistin konsantrasyonlarına sahip plaklarda (2, 4, 5, 6, 8, 10 mg/L) üreme gözlenmemiştir. Şekil 4.4'de dirençli bir izolatın 0, 0,5, 1, 2, 5, 8, 10 mg/L'lik kolistin konsantrasyonuna sahip MHA'lardaki üremelerinin fotoğrafları görülmektedir. Dirençli izolatlarda artan konsantrasyonlarda kolistin içeren MHA plaklarında üreyen koloniler sayılmış ve elde edilen sayısal verilerin logaritmik değerleri hesaplanmıştır. Örneğin; kolistin içermeyen (0 mg/L) plaktaki üreme 10^8 olarak kabul edilmiştir ve 10^3 dilüsyona sahip 5 mg/L kolistin plağında 10 koloni üremesi gözlenen izolat için; "50 µl'de 10 koloni üremişse, 1000 µl'de kaç koloni üremesi olmuştur?" orantısı yapılmış ve 10^3 dilüsyonda 200 koloni üremesi kaydedilmiştir. 10^8 dilüsyon içinse bu değer 2×10^7 değerine eşdeğerdir. Elde edilen bu veriler bir grafiğe aktarılmıştır. Dirençli ve duyarlı izolatların PAP grafiği Şekil 4.5'de gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Dirençli bir izolatın ($MİK \geq 32$) artan kolistin konsantrasyonuna sahip MHA plaklarında 10^3 ve 10^2 dilüsyonlarda üremesi; ilk fotoğraf 10 mg/L kolistin içeren plaktaki üremeyi gösterirken, son fotoğraf kolistin içermeyen plaktaki üremeyi göstermektedir.



Şekil 4.5. Kolistine dirençli ve duyarlı izolatların PAP grafiği

5. TARTIŞMA

Acinetobacter baumannii, çok farklı enfeksiyonlara yol açabilen ve son yıllarda antibiyotiklere çoklu direnç göstermesi nedeniyle özellikle yatan hastalarda tedavide güçlük yaratan bir bakteridir. *Acinetobacter* spp. ventilatörle ilişkili pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, endokardit, sepsis ve menenjit gibi özellikle konak savunması bozulmuş hastalarda ciddi nozokomiyal enfeksiyonların nedenidir (20). Kolistin, *Acinetobacter* spp.'ye bağlı enfeksiyonlarda son yıllarda sıkça kullanılmaya başlanan bir antibiyotiktir. Bununla birlikte, bu antibiyotiğe karşı direnç ve heterodirenç gösteren izolatlar bildirilmeye başlanmıştır (117, 118).

Bu tez araştırmasında hastanemizdeki *A. baumannii* izolatlarının kolistine direnç oranlarının belirlenmesi, ayrıca heterodirençli izolatların saptanması hedeflenmiştir.

Çalışmada Haziran 2016- Ocak 2017 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 200 adet *A. baumannii* izolatı çalışılmıştır. Ardışık olarak toplanan izolatların her biri farklı hastaya aittir. Çalışmamıza dahil edilen izolatların çoğunluğu (n:50, %25) yoğun bakım ünitesinden gelen örneklerden ve en sık solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda örnek dağılımı değişiklik göstermektedir (119). Brezilya'da son beş yılda toplanan, VİTEK 2'ye göre kolistin dirençli olan 1346 gram negatif bakteri değerlendirmesi sonucunda bakterilerin %7,6'sını *A. baumannii*'nin oluşturduğu gözlenmiştir. Örnek dağılımında en sık solunum yolu örnekleri olduğu dikkati çekmiştir (120).

Kolistine direnci saptamak için çeşitli araştırmacılar farklı yöntemler uygulamıştır. G-test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemini karşılaştıran, 2008 yılında yapılan bir çalışmada 115 *A. baumannii* izolatından referans yöntem sıvı mikrodilüsyona göre 22'si kolistine dirençli, 93'ü kolistine duyarlı olarak bulunmuş; büyük hata %1,7 olarak bildirilmiştir. G-test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasında en büyük uyumsuzluk, MİK aralığı $\leq 0,06-0,25$ mg/L ve $64- \geq 1,024$ mg/L olan

izolatlarda gözlenmiştir. Bu sonucun polimiksinlerin agarda iyi difüze olmamasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (11, 17).

Mevcut gradiyent testlerin kolistin MİK değerlerinde düşük sonuç verdiği ve kalite kontrol suşları uygun aralıkta olsa bile kullanılmamaları gerektiği belirtilmektedir. Yarı otomatize testlere ilişkin araştırmalarda ise sık olarak çok büyük hata saptandığı ileri sürülmektedir. EUCAST önerisine göre kolistin için duyarlılık testlerinde doğru sonuç veren tek test dilüsyon testidir. Disk difüzyon testi kolistin için uygun değildir; dirençli ve duyarlıları ayırt etmemektedir (154).

Bu çalışmada, 120 izolatta kolistine duyarlılık hem mikrodilüsyon hem de G-test ile araştırılmış ve iki test arasında büyük bir fark bulunmuştur. G-test ile kolistin direnci %4,2 bulunurken mikrodilüsyon testinde bu oran %26,0'dır. EUCAST'ın son uyarılarından sonra bu çalışmada da kolistin için sadece mikrodilüsyon test sonuçları dikkate alınmıştır. Üretici firmadan kolistin G-testi sağlanamadığından sadece 120 izolatta bu karşılaştırma yapılmış olmakla birlikte kolistin duyarlılığı toplam 200 izolatta mikrodilüsyon ile araştırılmış ve kolistine direnç %29 olarak saptanmıştır.

Vourli ve ark.'nın (121) 2015 yılı boyunca izole ettiği 117 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarına kolistin duyarlılığı için yöntem değerlendirmesi yaptığı çalışmasında; kolistine direnç oranları, Phoenix 100'e göre %15,4, Vitek 2'ye göre %16,2, agar dilüsyona göre %35,9, sıvı mikrodilüsyona göre %25 olarak belirtilmiştir. Çalışma sonucunda otomatize sistem kullanan laboratuvarların mutlaka sıvı mikrodilüsyon ile doğrulama yapması gerekliliğini vurgulamıştır.

Kolistin direnci gösteren *A. baumannii* izolatları için dünyanın farklı yerlerinden bildirilen farklı sonuçlar bulunmaktadır. Dirençli ilk izolat 1999 yılında Çek Cumhuriyeti'nden bildirilmiştir (4).

Sadece kan örnekleri ile sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre çalışılan izolatların Tayvan'da %10,4'ü ve Güney Kore'de %100'ü sırasıyla dirençli bulunmuştur (122, 123).

Portekiz'de 2007 yılında yapılan bir çalışmada izolatların %9'u dirençli bulunurken, bu oranın günümüzde artış gösterdiği bilinmektedir (124). Ancak, bu

çalışmada önerilen standart mikrodilüsyon yöntemi yerine agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

ABD’de balgam, burun sürüntüsü, kan, idrar gibi çeşitli örneklerle yapılan çalışmada *A. baumannii* izolatların “pulsed field” jel elektroforezi (PFGE) ve multilokus sekans tiplendirmesi (MLST) ile gen profilleri belirlenmiş ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 20 tanesi (%100) dirençli olarak saptanmıştır. Lipid A’ya fosfoetanolin eklenmesinin kolistin direncine neden olduğunu belirtmişlerdir (125).

Irak ve Ürdün’de yoğun bakımda yatan hastaların kan ve balgam örneklerinden izole edilen izolatların, çalışılan sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre en az 11 antibiyotiğe yüksek direnç (MİK \geq 64) gösterdikleri, kolistine ise direncin Irak izolatlarında %13, Ürdün izolatlarında %1,7 olduğu bildirilmiştir (126).

Kuveyt’de sekiz farklı devlet hastanesinden altı ay süreyle izole edilen 250 adet *A. baumannii* izolatında G-test yöntemine göre %14 oranında direnç tespit edilmiştir. Çalışılan izolatların %89’unun çok ilaca dirençli olduğu belirtilmiştir. Kolistin dirençli izolatların yüksek sıklığı çok ilaca dirençli enfeksiyon tedavisinde endişe kaynağıdır (127). Bu çalışmada G-test yöntemi uygulandığından sonuçlara dikkatli yaklaşılması gerekmektedir.

Romanya’da Ocak 2012 – Aralık 2013 tarihleri arasında çoğunluğu yoğun bakımdan gönderilen örneklerden tanımlanan 313 *Acinetobacter baumannii* izolatında klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü (CLSI) kriterlerine göre agar dilüsyon yöntemiyle sadece 2 izolatta kolistine direnç belirtilmiştir. Mısır’da Ocak 2012 – Mart 2012 tarihleri arasında karbapeneme duyarlı 40 *A. baumannii* izolatının İngiliz Antimikrobiyal Kemoterapi Derneği (BSAC) kriterlerine göre agar dilüsyon yöntemiyle direnç oranı % 5 olarak bildirilmiştir (128, 129).

Yunanistan’da 2012-2014 yılları arasında toplanan 1228 *A. baumannii* izolatının, 300 tanesi çevresel örneklerden (musluk, kapı kolu, hasta yatakları ve dolap kapakları) geri kalanları ise klinik örneklerden izole edilmiştir. G-test ile 86 tanesinde kolistin ve karbapenem direncinin birlikte olduğu, geriye kalan izolatların ise duyarlı olduğu bildirilmiştir. Karbapenem direnci Bla_{OXA-23} benzeri enzim varlığı ile

ilişkilendirilmiş, kolistin direncinin ise *pmrA* ve *pmrC* gen bölgelerindeki aminoasit değişimi sonucunda olabileceği bildirilmiştir (130).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, ventilatör kaynaklı pnömoni hastalarından izole edilen 40 *A. baumannii* izolatu tanımlanmış ve izolatlar arası klonal ilişki PFGE yöntemi ile incelenmiştir. Karbapeneme dirençli olan 40 izolata G-test (Liofilchem, İtalya) yöntemiyle kolistin duyarlılığı incelenmiş ve içlerinden sadece bir izolatta kolistin direnci tespit edilmiştir (131).

Sicilya’da Ekim 2008 – Mayıs 2011 tarihleri arasında iki hastanenin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen; karbapeneme dirençli 26 izolat arasında kolistine yüksek düzeyde (MİK>32mg/L) direnç gösteren 15 izolat agar dilüsyon yöntemiyle saptanmıştır. Tedavide kullanılan karbapenem ve kolistin direnç için tetikleyici faktör olabileceği belirtilmiştir (132).

SENTRY’ye göre 2006-2009 yılları arasında dünya çapında toplanan izolatlarda *A. baumannii*’de kolistin direnci %1 olarak bildirilmiştir (11). 2008 yılında Batı Pasifik’den izole edilen *A. baumannii* izolatları diğer antibiyotiklere yüksek düzeyde dirençli bulunurken, sadece bir izolat kolistine yüksek düzeyde direnç göstermiştir (9).

Klinik izolatların sıklığı ve antibiyotik direnç paternlerini belirlemek amacıyla 2012-2014 yılları arasında Fas’da ardışık olarak yoğun bakım ünitesinden toplanan 441 *A. baumannii* izolatının %45’ini solunum yolu örnekleri oluştururken, takiben %15’i kan örneklerinden izole edilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle belirlenen kolistine direnç oranı ise %2 olarak belirtilmektedir (133).

Çin’de 2008 yılında yayınlanan bir çalışmada 112 *A. baumannii* klinik izolatının tamamı yöntem belirtilmeden kolistine duyarlı bulunurken, %80 oranında çok ilaca dirençli oldukları tespit edilmiştir (134).

İran’da yapılan bir çalışmada G-test yöntemi ile kolistin direnci saptanmış ve %11,6 oranında direnç raporlanmıştır (135). Kuzey, Güney ve Merkez İran Üniversite Hastanelerinde yoğun bakım ünitelerinden elde edilen *A. baumannii* izolatlarında kolistin direncinin G-test yöntemine göre %15’e ulaştığı raporlanmıştır (136).

Son verilere göre, Kore Hastanelerinden izole edilen 214 adet *A. baumannii* izolatu *rpoB* gen analizine göre tanımlanmış; CLSI kriterlerine göre kolistine direncin yüksek ve sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre %30,6 oranında olduğu tespit edilmiştir (137).

Arroyo ve ark.nın 2005 yılında 115 izolatu dahil ettiği bir çalışmasında sıvı mikrodilüsyon ile %20 oranında direnç bulurken, 2009 yılında farklı bir çalışmasında bu oran %40,6'ya çıkmıştır (17).

Kuzey Amerika'da Latin Amerika'ya (%2) göre daha fazla kolistin direnci görüldüğü bildirilmiştir. Kuzey Amerika'da 2009-2011 yılları arasında %3.5 olan direnç 2012 yılında %5.3 değerine ulaşmıştır (138-140).

Avrupa'da 2009-2012 yıllarında %0,7 ile %4 arasında değişen direnç oranları bildirilmiştir (138-140). Buna karşın Yunanistan ve İtalya'da %80'e varan direnç gözlenmektedir (155). Yunanistan'da hem kolistin dirençli hem de OXA-23 veya OXA24/40 karbapenemaz üreten *A. baumannii* suşlarının artış gösterdiği, 2001 yılında direnç oranı %1'iken 2014'de %22'lere ulaştığı bildirilmektedir.

Türkiye'de yapılan çalışmalardan bazıları disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemine göre *A. baumannii* izolatlarının kolistine duyarlı olduğunu gösterse de (141, 142) Hacettepe Üniversitesi Hastanelerinden izole edilen 124 *Acinetobacter* spp. içerisinde 72'si *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanan çok ilaca dirençli izolatların %27,5'i CLSI kriterlerine göre çalışılan sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kolistine dirençli olarak raporlanmıştır (143).

Ülkemizdeki çalışmalarda belirtilen oranların da yurt dışında yapılan çalışmalarda olduğu gibi oldukça farklılık gösterdiği belirtilmektedir. Farklı çalışmalarda farklı yöntemlerin kullanılması sonuçları doğrudan etkilemekte ve çok farklı oranların ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Dikkati çeken nokta, standart yöntem olarak kabul edilen sıvı mikrodilüsyon ile yapılan test sonuçlarında kolistine direncin daha yüksek oluşudur. Bu gözlem de EUCAST'ın diğer yöntemler kullanıldığında hatalı olarak "duyarlı" sonuçlar çıktığı uyarısını desteklemektedir (154).

Bizim çalışmamızda saptanan direnç oranının yüksek olmasının nedenlerinden biri Ağustos 2016 - Ocak 2017 tarihleri arasında çoğunluğu yatan hastadan izole edilen 200 suşun genetik yakınlığı olabileceği düşünülmektedir. İzole edilen suşların genetik yakınlığının araştırılması amacıyla uygulanabilecek moleküler yöntemlerin bu konuda yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Acinetobacter izolatlarında rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile belirlenemeyen, ancak G-test ile tespit edilip PAP ile doğrulanan heterodirenç, *A. baumannii*'de gelişen kolistin ve karbapenem direncinden sorumlu tutulmaktadır. Daha önceleri *S. aureus* ve *P. aeruginosa* için tanımlanan bu direnç şekli, ana bakteri topluluğuyla benzer genetik özellik gösteren alt bakteri topluluğunun daha dirençli olması nedeniyle tedaviye klinik olarak cevapsızlık şeklinde ortaya çıkmaktadır. Özellikle çok ilaca dirençli *A. baumannii*'ye bağlı enfeksiyonlarda kolistin tek tedavi seçeneği olarak kullanılması bu tehlikeyi arttırmaktadır (143).

Li ve ark. (5) ilk kez 2006 yılında kolistine duyarlı *A. baumannii* izolatları içinde kolistine heterojen dirençli olan suşlar olduğunu, bütün izolatların duyarlı olmasına karşın; 3-10 mg/L kolistin varlığında üreyebildiklerini belirtmiştir. Heterodirencin, otomatize sistemler veya disk difüzyon gibi yöntemlerle tanımlanamayacağını, sadece mikrodilüsyon ile belirlenen MİK değeri ile de belirlenemeyeceğini ifade etmişlerdir. Heterodirenç oranını %93,8 olduğunu ve saptanan heterodirencin kolistin uygun kullanımına bağlı olabileceğini ve tedavi başarısını olumsuz yönde etkileyebileceğini belirtmişlerdir. *A. baumannii*'de gözlenen heterodirenç oranının direnç oranından fazla olduğunu belirtse de henüz yapılan çalışmalar bunu doğrular nitelikte değildir.

Yau ve ark.'nın (9) yaptığı bir araştırmada çeşitli ülkelerdeki (Avustralya, Tayland, Endonezya, Filipinler, Çin, Tayvan, Singapur, Doğu Afrika, Doğu Kore) klinik merkezlerden 1998-2006 yılları arasında toplanan 30 izolatta sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre bir izolat (MİK 128mg/L) hariç geriye kalan izolatların MİK değeri 0,5-2 mg/L arasında bulunmuştur. 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 ve 10 mg/L kolistin aralığında PAP çalışılarak kolistine heterodirenç araştırılmış, duyarlı olan 7 izolat içinde >2 mg/L kolistin varlığında üreme gösteren alt popülasyonların olduğu heterodirenç oranının %23 olduğu açıklanmıştır.

Li ve ark. (5) kolistin heterodirencinin daha önce alınan kolistin tedavisine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Hawley ve ark. (144), heterodirencin kolistin tedavisi almayan hastalardan izole edilen *A. baumannii* izolatlarında da görülebileceğini, buna karşın önceden kolistin tedavisi almış hastalardan izole edilen suşlarda daha fazla heterojen kolistin direnci görülebileceğini ifade etmişlerdir.

Tan ve ark. (145) özellikle tek başına intravenöz kolistin alan bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda heterodirençli suşların tedavi sırasında sorun yaratabileceğini, bu nedenle dikkatli olunması gerektiğini belirtmektedir.

Moosavian ve ark.'nın (146) beyin cerrahisi sonrası menenjit olan hastanın BOS örneğinden izole ettikleri *A. baumannii* izolatı kolistine duyarlıyken, kolistin tedavisi aldıktan beş gün sonra ikinci izolasyonda bakterinin kolistine yüksek düzeyde direnç gösterdiği belirtilmiştir. İlk izole edilen *A. baumannii* suşunda G-test inhibisyon zonu içerisinde üreyen kolonilerin olduğu belirtilmektedir. Heterodirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının uygunsuz kolistin tedavisi ile çok yüksek düzeyde direnç göstereceği ve kolistin ile önceden karşılaşmanın heterodirenç gelişimi için bir risk faktörü olabileceği belirtilmiştir.

Herrera ve ark. (6) agar dilüsyon yöntemiyle çalıştıkları 75 *A. baumannii* izolatının tamamının kolistine duyarlı olduklarını ($MİK \leq 2$ mg/L) ve 0,5, 1, 2 mg/L kolistin içeren plaklarda 14 izolatta üreyen alt popülasyonların olduğunu belirtmektedirler.

Bizim çalışmamızda, kolistine heterodirenç, *A. baumannii*'nin duyarlı ve dirençli izolatlarında en yüksek 10mg/L'de araştırılmış ve bulunmamıştır. Bu konsantrasyonun üzerindeki konsantrasyonlarda da heterodirenç saptama olasılığı bulunmakla birlikte amacımız tedavide sorun yaratacak heterodirencin belirlenmesi olduğundan bu yüksek konsantrasyon değerleri çalışılmamıştır. Bu konuda yapılan kısıtlı sayıda çalışmalarda çok yüksek oranlarda heterodirenç bildirenler varsa da heterodirencin tanımlanmasındaki standartların eksikliği, homojen suşların heterojen dirençli olarak yanlış tanımlanmasına ve böylece klinik öneminin yanlış değerlendirilmesine neden olabilir (114).

Rutin mikrobiyolojik yöntemler ile kolistine duyarlı bulunan *A. baumannii* izolatlarının, dirençli alt popülasyonlar içerip içermediğinin belirlenmesi tedavi başarısı açısından önemlidir. Dirençli alt popülasyonu saptamak $\leq 10^{-5}$ - 10^{-6} olasılıkta bir olduğu için kullanılan rutin duyarlılık yöntemleriyle saptanamayacağı belirtilmektedir. Bu dirençli alt popülasyonların tespit edilmesinde günümüzde kabul edilen altın standart yöntem PAP yöntemidir (5). PAP uygulanması rutin laboratuvar şartlarında pratik olmayacağından heterodirençli izolatların değerlendirilmesinde G-test gibi tarama yöntemleri kullanılmış fakat bu yöntemlerle yapılan farklı çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmesi nedeniyle yöntemler rutin kullanım için henüz standardize edilmemiş; hangi yöntemin güvenle kullanılabilceğine dair bir sonuca varılamamıştır.

Çalışmamızda heterodirenç oranının saptanması amacıyla öncelikle G-test kullanılmıştır. G-test güvenilirliği açısından yaşanan sorunlar nedeniyle zon içi üreme görülmeyen duyarlı izolatlara da PAP yöntemi çalışılmış ve 120 izolat arasında heterojen kolistin direnç fenotipi gösteren izolat bulunmamıştır.

Ülkemizde heterojen kolistin direnç fenotipi gösteren *A. baumannii* çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamız kolistin heterodirenç oranını araştıran ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

Sonuç olarak enfeksiyon tedavisinde kolistin son çare antibiyotiklerden olduğu ve *A. baumannii* izolatlarında kolistin direncinin giderek artmasının önemszenmesi gereken bir nokta olduğunu düşünmekteyiz. Bu izolatların tespit edilmesi tedavi başarısı açısından çok önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ağustos 2016 – Ocak 2017 tarihleri arasında hastanemiz Merkez Laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 200 adet *A. baumannii* kompleks izolatlarının 58 tanesinde kolistine direnç saptanmıştır.

İzole edilen *A. baumannii* izolatları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle EUCAST (2017; v.7.1) rehberinin sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir.

Heterodirenç saptanması amacıyla kullandığımız G-test (BioMerieux, Fransa) yönteminin, sıvı mikrodilüsyon ile çok farklı MİK değeri sonucu verdiği gözlemlenmiştir.

G-test yöntemiyle zon içi üreme saptanan üç izolatın PAP grafiği yorumlanması sonucunda heterojen direnç içermediği, mutant koloni varyantları olabileceği düşünülmüştür. PAP 0-10 mg/L kolistin aralığında değil de 32 mg/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda çalışıldığı takdirde heterodirenç saptama olasılığı bulunmaktadır.

PAP yöntemiyle çalışılan 120 izolatta heterojen kolistin direncine rastlanmamıştır.

Heterodirenç saptamak için kullanılan yöntemlerde standardizasyonun eksikliği ve ulaşabildiğimiz kısıtlı yayın bu çalışmanın kısıtlamalarındandır.

Uygulanan kolistin tedavisi heterodirenç gelişimine neden olabileceğinden, morbidite ve mortaliteyi arttıran izolatların ülkemizdeki sıklığını saptayacak ve bu izolatların oluşumunun genetik temellerini aydınlatacak moleküler epidemiyolojik çalışmaların devamına gereksinim vardır.

Hastanemizdeki kolistin dirençli *A. baumannii* izolatlarının kolistin MİK değerlerini yakından izlemek, epidemiyolojik araştırma amacıyla heterojen dirençli *A. baumannii* açısından çeşitli tarama yöntemleri ile altın standart yöntemle çalışmak ve moleküler özelliklerini öğrenmek için stoklamak önemlidir.

Merkezimizde kolistin duyarlılık sonucu veren otomatize cihaz ve G-test gibi yöntemlere güvenilmemesi gerektiğini, kolistin için mutlaka sıvı mikrodilüsyon yönteminin uygulanması gerektiğini düşünüyoruz.

PAP yönteminin emek, zaman alıcı, sarf malzeme ve ek personel gerektiren bir yöntem olması nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımı uygun değildir. Yeni bir altın standart yöntem geliştirilene kadar PAP ile bu izolatların araştırılması ve ülkemizdeki yaygınlığının saptanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(1):1-12.
2. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J of Antimicrob Agents*. 2010;35(3):219-26.
3. Hancock REW, Chapple DS. Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents and Chemother*. 1999;43(6):1317-23.
4. Hejnar P, Kolár M, Hájek V. Characteristics of *Acinetobacter* strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of beta-lactamases) isolated from haemocultures from patients at the Teaching Hospital in Olomouc. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*. 1999;142:73-7.
5. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):2946-50.
6. Herrera ME, Mobilia LN, Posse GR. Comparative evaluation of the sensitivity of *Acinetobacter* to colistin, using the prediffusion and minimum inhibitory concentration methods: detection of heteroresistant isolates. *Revista Argentina de Microbiologia*. 2011;43(2):115-9.
7. Rodriguez CH, De Ambrosio A, Bajuk M, Spinozzi M, Nastro M, Bombicino K, et al. In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2010;4(3):164-7.
8. Rodriguez CH, Bombicino K, Granados G, Nastro M, Vay C, Famiglietti A. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;65(2):188-91.
9. Yau W, Owen RJ, Poudyal A, Bell JM, Turnidge JD, Yu HH, et al. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from

the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Infect.* 2009;58(2):138-44.

10. Li J, Rayner CR, Nation RL, Deans R, Boots R, Widdecombe N, et al. Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate and Colistin in a Critically Ill Patient Receiving Continuous Venovenous Hemodiafiltration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005;49(11):4814-5.

11. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):2070-4.

12. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001;39(1):183-90.

13. Gomez-Garces JL, Aracil B, Gil Y, Burillo A. Susceptibility of 228 non-fermenting gram-negative rods to tigecycline and six other antimicrobial drugs. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy).* 2009;21(3):267-71.

14. Mezzatesta ML, Trovato G, Gona F, Nicolosi VM, Nicolosi D, Carattoli A, et al. In vitro activity of tigecycline and comparators against carbapenem-susceptible and resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2008;7(1):4.

15. García-Peñuela E, Aznar E, Alarcón T, López-Brea M. Susceptibility pattern of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Madrid vs. Hong Kong. *Rev Esp Quimioter.* 2006;19(1):45-50.

16. Dobrewski R, Savov E, Bernards AT, van den Barselaar M, Nordmann P, van den Broek PJ, et al. Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital. *Clinical Microbiology and Infection.* 2006;12(11):1135-7.

17. Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J, et al. Reliability of the E-Test Method for Detection of Colistin Resistance in

Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(2):903-5.

18. Brisou J, Prevot AR. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. Annales de l'Institut Pasteur. 1954;86(6):722-8.

19. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. Study of the *Moraxella* group. I. Genus *Moraxella* and the *Neisseria catarrhalis* group. Journal of Bacteriology. 1968;95(1):58-73.

20. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clinical Microbiology Reviews. 2008;21(3):538-82.

21. Chuang Y-C, Sheng W-H, Li S-Y, Lin Y-C, Wang J-T, Chen Y-C, et al. Influence of Genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with acinetobacter bacteremia. Clinical Infectious Diseases. 2011;52(3):352-60.

22. Montefour K, Frieden J, Hurst S, Helmich C, Headley D, Martin M, et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. Critical Care Nurse. 2008;28(1):15-25; quiz 6.

23. Luna CM, Aruj PK. Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. Respirology (Carlton, Vic). 2007;12(6):787-91.

24. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. Chest. 2006;129(1):102-9.

25. Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. J Clin Microbiol. 2002;40(2):685-6.

26. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis. 2004;39(3):309-17.

27. Briggs S, Ellis-Pegler R, Raymond N, Thomas M, Wilkinson L. Gram-negative bacillary meningitis after cranial surgery or trauma in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2004;36(3):165-73.
28. Trottier V, Segura PG, Namias N, King D, Pizano LR, Schulman CI. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *Journal of Burn Care & Research*. 2007;28(2):248-54.
29. Johnson EN, Burns TC, Hayda RA, Hospenthal DR, Murray CK. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin Infect Dis*. 2007;45(4):409-15.
30. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005;41(6):848-54.
31. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & Development*. 2007;21(5):601-14.
32. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC microbiology*. 2008;8:216.
33. Rumbo C, Tomas M, Fernandez Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infection and Immunity*. 2014;82(11):4666-80.
34. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachon J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013;208(10):1561-70.
35. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and immunity*. 2010;78(9):3993-4000.

36. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al. Inactivation of Phospholipase D Diminishes *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2010;78(5):1952-62.
37. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. Role of Acinetobactin-Mediated Iron Acquisition Functions in the Interaction of *Acinetobacter baumannii* Strain ATCC 19606(T) with Human Lung Epithelial Cells, *Galleria mellonella* Caterpillars, and Mice. *Infection and Immunity*. 2012;80(3):1015-24.
38. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*. 2011;3(2):55-65.
39. Davenport EK, Call DR, Beyenal H. Differential protection from tobramycin by extracellular polymeric substances from *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4755-61.
40. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future microbiology*. 2009;4(3):273-8.
41. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 2003;149(Pt 12):3473-84.
42. Dorsey CW, Beglin MS, Actis LA. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4188-93.
43. Zimble DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP, Connerly PL, et al. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2009;22(1):23-32.
44. Mihara K, Tanabe T, Yamakawa Y, Funahashi T, Nakao H, Narimatsu S, et al. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter*

baumannii ATCC 19606T. Microbiology (Reading, England). 2004;150(Pt 8):2587-97.

45. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. J Infect. 2003;46(4):207-14.

46. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genetics. 2006;2(1):e7.

47. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol. 2003;41(8):3542-7.

48. Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(2):428-32.

49. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(10):2265-9.

50. Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, et al. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(11):3837-43.

51. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiology Letters. 2006;258(1):72-7.

52. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. Overexpression of the naturally occurring *bla*OXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(9):4045-7.

53. Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(5):2121-6.

54. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):35-40.
55. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046-54.
56. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(6):1255-9.
57. Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin RA, Anais L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May. 2013;18(31).
58. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(6):1260-2.
59. Khan AU, Nordmann P. Spread of carbapenemase NDM-1 producers: the situation in India and what may be proposed. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2012;44(7):531-5.
60. Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R, et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(6):529-33.
61. Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(12):1699-701.
62. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology*. 2017;17(1):101.

63. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouveleki LS, Sofianou D, Legakis NJ, et al. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):981-3.
64. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4485-91.
65. Kouyama Y, Harada S, Ishii Y, Saga T, Yoshizumi A, Tateda K, et al. Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing non-baumannii *Acinetobacter* species. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2012;18(4):522-8.
66. Urban C, Go E, Mariano N, Rahal JJ. Interaction of sulbactam, clavulanic acid and tazobactam with penicillin-binding proteins of imipenem-resistant and -susceptible *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;125(2-3):193-7.
67. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(3):565-74.
68. Krizova L, Poirel L, Nordmann P, Nemecek A. TEM-1 beta-lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(12):2786-91.
69. Pongpech P, Amornopparattanakul S, Panapakdee S, Fungwithaya S, Nannha P, Dhiraputra C, et al. Antibacterial activity of carbapenem-based combinations againsts multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2010;93(2):161-71.

70. Chu H, Zhao L, Wang M, Liu Y, Gui T, Zhang J. Sulbactam-based therapy for *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. The Brazilian Journal of Infectious Diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2013;17(4):389-94.
71. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nature Reviews Microbiology. 2007;5(12):939-51.
72. Giannouli M, Di Popolo A, Durante-Mangoni E, Bernardo M, Cuccurullo S, Amato G, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from Italy. Int J Antimicrob Agents. 2012;39(1):58-63.
73. Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo-beta-lactamase (*blaIMP-4*) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(4):1382-90.
74. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiological Reviews. 1993;57(1):138-63.
75. Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1132-8.
76. Landman D, Kelly P, Backer M, Babu E, Shah N, Bratu S, et al. Antimicrobial activity of a novel aminoglycoside, ACHN-490, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from New York City. J Antimicrob Chemother. 2011;66(2):332-4.
77. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis. 2007;45(1):88-94.

78. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resistance Updates*. 2012;15(3):133-48.
79. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3960-2.
80. Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2397-400.
81. Brigante G, Migliavacca R, Bramati S, Motta E, Nucleo E, Manenti M, et al. Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 5):653-61.
82. Karah N, Haldorsen B, Hermansen NO, Tveten Y, Ragnhildstveit E, Skutlaberg DH, et al. Emergence of OXA-carbapenemase- and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 4):515-21.
83. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, et al. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13:251.
84. Cho YJ, Moon DC, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Lee JC. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter spp.* and spread of armA in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(2):185-90.
85. Zhou H, Du X-X, Yang Q, Zhou J-Y, Yu Y-S, Li L-J. Study on carbapenemase and 16S rRNA methylase of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2009;30(3):269-72.

86. Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL. Identification of 16S rRNA Methylase-Producing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains in North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(11):4209-10.
87. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;45(6):568-85.
88. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Perichon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4389-93.
89. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(12):3375-80.
90. Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte M, Woodford N, Nemec A, Dijkshoorn L, et al. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Research in Microbiology*. 2005;156(3):348-55.
91. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter spp*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):947-53.
92. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;25(1):11-25.
93. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8.
94. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Euro surveillance*. 2016;21(9):30155.
95. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, 3rd, et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy*. 2010;30(12):1279-91.

96. Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K. In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(3):781-5.
97. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005;40(9):1333-41.
98. Choi M-J, Ko KS. Mutant prevention concentrations of colistin for *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2014;69(1):275-7.
99. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, et al. Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009;53(9):3628-34.
100. Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock REW. The pmrCAB Operon Mediates Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Clinical Isolates through Phosphoethanolamine Modification of Lipid A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2011;55(8):3743-51.
101. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin-Resistant Variants of *Acinetobacter baumannii* Mediated by the pmrAB Two-Component Regulatory System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2011;55(7):3370-9.
102. Kim Y, Bae IK, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K. In vivo emergence of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2014;79(3):362-6.
103. Lesho E, Yoon E-J, McGann P, Snesrud E, Kwak Y, Milillo M, et al. Emergence of Colistin-Resistance in Extremely Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Containing a Novel pmrCAB Operon During Colistin Therapy of Wound Infections. *The Journal of Infectious Diseases.* 2013;208(7):1142-51.

104. Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011;37(6):525-30.
105. Pournaras S, Poulou A, Dafopoulou K, Chabane YN, Kristo I, Makris D, et al. Growth Retardation, Reduced Invasiveness, and Impaired Colistin-Mediated Cell Death Associated with Colistin Resistance Development in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(2):828-32.
106. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017;30(2):557-96.
107. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(12):4971-7.
108. Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion Sequence ISAbal1 Is Involved in Colistin Resistance and Loss of Lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(6):3022-4.
109. Alexander HE, Leidy G. Mode Of Action Of Streptomycin On Type b *Hemophilus influenzae*. 1947;85(6):607-21.
110. Sutherland R, Rolinson GN. Characteristics Of Methicillin-Resistant Staphylococci. *Journal of Bacteriology*. 1964;87(4):887-99.
111. Kayser FH, Benner EJ, Hoepflich PD. Acquired and native resistance of *Staphylococcus aureus* to cephalexin and other β -lactam antibiotics. *Applied Microbiology*. 1970;20(1):1-5.
112. Markova N, Haydoushka I, Michailova L, Ivanova R, Valcheva V, Jourdanova M, et al. Cell wall deficiency and its effect on methicillin heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008;31(3):255-60.

113. Ryffel C, Strässle A, Kayser FH, Berger-Bächli B. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994;38(4):724-8.
114. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(1):191-207.
115. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(12):4971-7.
116. Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):3022-4.
117. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1607-15.
118. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Retention of virulence following adaptation to colistin in *Acinetobacter baumannii* reflects the mechanism of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(8):2209-16.
119. Dash M, Padhi S, Pattnaik S, Mohanty I, Misra P. Frequency, risk factors, and antibiogram of *Acinetobacter* species isolated from various clinical samples in a tertiary care hospital in Odisha, India. *Avicenna Journal of Medicine*. 2013;3(4):97-102.
120. Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TS, Almeida JN, Jr., Duarte AJ. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of Sao Paulo, Brazil, over five years. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2017;21(1):98-101.
121. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(9):2528-30.

122. Chang KC, Lin MF, Lin NT, Wu WJ, Kuo HY, Lin TY, et al. Clonal spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in eastern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*. 2012;45(1):37-42.
123. Lee SY, Shin JH, Park KH, Kim JH, Shin MG, Suh SP, et al. Identification, genotypic relation, and clinical features of colistin-resistant isolates of *Acinetobacter* genomic species 13BJ/14TU from bloodstreams of patients in a university hospital. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):931-9.
124. Quinteira S, Grosso F, Ramos H, Peixe L. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3465-6.
125. Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, Rivera JI, Syed A, Shields RK, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis*. 2015;60(9):1295-303.
126. Modarresi F, Azizi O, Shakibaie MR, Motamedifar M, Valibeigi B, Mansouri S. Effect of iron on expression of efflux pump (adeABC) and quorum sensing (*luxI*, *luxR*) genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *APMIS*. 2015;123(11):959-68.
127. Al-Sweih NA, Al-Hubail MA, Rotimi VO. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*. 2011;23(1):13-6.
128. Moisoiu A, Ionita M, Sarbu L, Stoica C, Grigoriu L. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens in the "Marius Nasta" Pneumology Institute, Bucharest. *Pneumologia (Bucharest, Romania)*. 2014;63(2):109-11.
129. Al-Agamy MH, Khalaf NG, Tawfick MM, Shibl AM, El Kholy A. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. *Int J Infect Dis*. 2014;22:49-54.

130. Oikonomou O, Sarrou S, Papagiannitsis CC, Georgiadou S, Mantzaris K, Zakyntinos E, et al. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15:559.
131. Cikman A, Gulhan B, Aydin M, Ceylan MR, Parlak M, Karakecili F, et al. In vitro Activity of Colistin in Combination with Tigecycline against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Patients with Ventilator-Associated Pneumonia. *International Journal of Medical Sciences*. 2015;12(9):695-700.
132. Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Quattrocchi A, Bellocchi P, Poulou A, et al. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. *The Journal of Hospital Infection*. 2014;86(4):260-6.
133. Uwingabiye J, Frikh M, Lemnouer A, Bssaibis F, Belefquih B, Maleb A, et al. *Acinetobacter* infections prevalence and frequency of the antibiotics resistance: comparative study of intensive care units versus other hospital units. *The Pan African Medical Journal*. 2016;23:191.
134. Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeABC, adeDE and adeIJK, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(1):27-32.
135. Vakili B, Fazeli H, Shoaie P, Yaran M, Ataei B, Khorvash F, et al. Detection of colistin sensitivity in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2014;19(Suppl 1):S67-S70.
136. Bahador A, Taheri M, Pourakbari B, Hashemizadeh Z, Rostami H, Mansoori N, et al. Emergence of rifampicin, tigecycline, and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran; spreading of MDR strains of novel International Clone variants. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(5):397-406.

137. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(5):1163-7.
138. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2013. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 43(4):328-34.
139. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals 2011. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 78(4):443-8.
140. Queenan AM, Pillar CM, Deane J, Sahm DF, Lynch AS, Flamm RK, et al. Multidrug resistance among *Acinetobacter spp.* in the USA and activity profile of key agents: results from CAPITAL Surveillance 2010. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 73(3):267-70.
141. Dizbay M, Altuncekcic A, Sezer BE, Ozdemir K, Arman D. Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(1):29-32.
142. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(3):224-8.
143. Eser OK, Ergin A, Hascelik G. Antimicrobial resistance and existence of metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species isolated from adult patients. *Mikrobiyoloji Bulteni.* 2009;43(3):383-90.
144. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(1):351-2.

145. Tan CH, Li J, Nation RL. Activity of colistin against heteroresistant *Acinetobacter baumannii* and emergence of resistance in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3413-5.
146. Moosavian M, Shoja S, Nashibi R, Ebrahimi N, Tabatabaiefar MA, Rostami S, et al. Post Neurosurgical Meningitis due to Colistin Heteroresistant *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(10):e12287.
147. Murray, Rosenthal, Pfaller. *Acinetobacter*. Us, D. A., Başustaoğlu, A. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Altıncı Baskı. Pelikan Yayınevi; 2016
148. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents in Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. (eds) *Manual of Clinical Microbiology* tenth edition, Washington DC. ASM Press, 2011: 1082-1114.
149. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005;40(9):1333-41.
150. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Medical Research and Opinion.* 2015;31(4):707-21.
151. Jeannot K, Bolard A, Plesiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(5):526-35.
152. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Ref: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org> (11/12/2017)
153. Meletis Georgios (2012). Heteroresistance, *Infection Control - Updates*, Dr. Christopher Sudhakar (Ed.), ISBN: 978-953-51-0055-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/infection-controlupdates/heteroresistance> (11/12/2017)
154. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/ (11/12/2017)

155. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm, Sweden: ECDC; 2015.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler:

Ecem Çağlan

Ankara 30/09/1992

Türkiye Cumhuriyeti

Mahmut Esat Bozkurt Caddesi 49/5 Uğurlu Apt. Çankaya/ANKARA

II- Eğitimi:

2016-2018 Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Uygulamaları Anabilim Dalı İlaçta Ar-Ge Tezsiz Yüksek Lisans Programı

2015-2017 Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

2015-2016 Hacettepe Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesi Pedagojik Formasyon Eğitimi

2013-2014 Roma - Tor Vergata Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü, İtalya

2010-2015 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

2006-2010 Ankara Kocatepe Mimar Kemal Lisesi

1998-2006 Ankara Tevfik İleri İlköğretim Okulu

III- Mesleki Deneyimi:

2017- ... Bilim İlaç Tıbbi Tanıtım Sorumlusu

2013-2015 Decathlon Kentpark Mağazası Satış Danışmanı

IV- Bilimsel Faaliyetleri Yayınları:

1. Ulusal İnsan Sağlığı ve Mikrobiyota Kongresi, 2016

9. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 2016

37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 2016

Febril Nötropeni Toplantısı, 2016

İnfeksiyon Dünyası ve Çalıştayı, 2016

1. Ulusal Viroloji Günleri ve Kursu, 2016

“Dondurulmuř Mikroplaklarda Kolistin, Tigesiklin ve Meropenem *in-vitro* Etkinliklerinin Deęerlendirilmesi” adlı çalışma ile 2016 Kasım ayında gerçekleştirilen

37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi’ne katılım bursu kazanarak sözlü sunum yapmıştır.