

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ACINETOBACTER BAUMANNII* 'DE BİYOSİD DUYARLILIĞINDA ROL
OYNAYAN ADEB, ADEJ, QACE EFLUKS GENLERİNİN PYROSEKANS
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Shohre Afshar YAVARI

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Seyyal ROTA

ANKARA
Temmuz - 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ACINETOBACTER BAUMANNII* 'DE BİYOSİD DUYARLILIĞINDA ROL
OYNAYAN ADEB, ADEJ, QACE EFLUKS GENLERİNİN PYROSEKANS
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Shohre Afshar YAVARI

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Seyyal ROTA

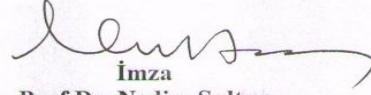
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-11/2003-1 proje numarası ile desteklenmiştir.

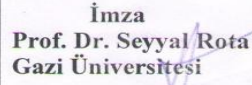
ANKARA
Temmuz - 2012

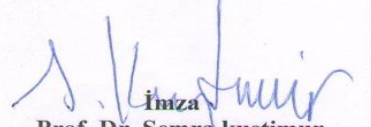
**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

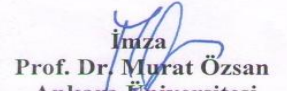
Tez Savunma Tarihi: 15/08/2012


**İmza
Prof. Dr. Nedim Sultan
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**


**İmza
Prof. Dr. Seyyal Rota
Gazi Üniversitesi**


**İmza
Prof. Dr. Semra Kuştimur
Gazi Üniversitesi**


**İmza
Doç. Dr. Işıl Fidan
Gazi Üniversitesi**


**İmza
Prof. Dr. Murat Özsan
Ankara Üniversitesi**

İÇİNDEKİLE

KABUL VE ONAY	Error! Bookmark not defined.
İÇİNDEKİLER... Error! Bookmark not defined.	Error! Bookmark not defined.
RESİMLER LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii

GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	4
1.1. <i>Acinetobacter</i> Kökenlerinin Genel Özellikleri	4
1.1.1. Tarihçe.....	4
1.1.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler	6
1.1.3. Epidemiyoloji.....	8
1.1.4. Patogenez ve Virülans	9
1.1.5. <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonları	10
1.1.5.1. Hastane Kaynaklı Enfeksiyonlar	10
1.1.5.2. Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar	11
1.1.6. Tanı	12
1.1.6.1. Klinik Örneklerden İzolasyon	12
1.1.7. Tiplendirme Yöntemleri.....	12
1.1.8. Antibiyotik Duyarlılığı	13
1.1.9. Kombinasyon Tedavileri.....	14
1.1.10. Dezenfektan ve Biyosid maddeler	14
1.1.11. Bakterilerde Dezenfektan ve Biyosid Maddelere Direnç	21
1.1.12. Dezenfektan Direcinin Önemi	30
1.1.13. Efluks Pompa İnhibitorleri	31

1.1.14. Pyrosekans	31
--------------------------	----

2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
2.1. Örnekler	33
2.2. Gereçler	34
2.2.1. Laboratuvar Araçları:	34
2.2.2. İdentifikasyon Panelinde İncelenen Özellikler	34
2.2.3. Besiyeri	35
2.2.4. Kimyasal Maddeler:	36
2.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	36
2.2.6. Antibiyotik MİK'lerinin Pompa İnhibitörleri PABN, NMP Varlığında ve Yokluğunda Belirlenmesi	37
2.2.6.1. MİK Sıvı Dilüsyon Yöntemi	37
2.2.7. Dezenfektan MBK'lerinin Pompa İnhibitörleri PABN, NMP varlığında ve yokluğunda belirlenmesi.....	39
2.2.7.1. MBK Sıvı Dilüsyon Yöntemi.....	39
2.2.8. Efluks Gen Bölgelerinin Varlığının Belirlenmesi.....	40
2.2.9. Genomik DNA Miktarının Hesaplanması	40
2.2.10. AdeB ve AdeJ ve QacE Gen Bölgelerinin Çoğatılması	42
2.2.11. Rotor Gen Hazırlanması	43
2.2.14. Pyrosekans Yöntemi	43
3. BULGULAR.....	45

3.1. Klorheksidin İçin MİK Değerleri.....	50
3.2. Benzalkonyum klorid İçin MİK Değerleri	50
3.3. Chlorohexidin İçin MBK Değerleri	50

3.4. Benzalkonyum klorid İçin MBK Değerleri.....	51
3.5. Pompa inhibitörleri NMP ve PAßN Varlığında Klorhekzidin ve Benzalkonyum klorid MİK ve MBK Değerleri	51
3.6. AdeB, AdeJ, QacE Efluks Genleri.....	61
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ.....	72
ÖZET	73
SUMMARY	75
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ.....	93
TEŞEKKÜR	94

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. <i>Acinetobacter</i> kökenlerinin morfolojik görünümü	7
Resim 2. Kanlı agar ve Mueller Hinton agardaki <i>A. baumannii</i> kolonilerinin görünümü.....	7
Resim 3. MIC sıvı dilüsyon yöntemi.....	39
Resim 4. NanoDrop Spektrofotometre cihazı.....	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Bakterilerde efluks pompası.....	25
Şekil 2. RND ailesinden üç elemanlı pompa sistemlerinin yapısı.....	27
Şekil 3. AdeABC pompa proteinlerini kodlayan yapısal ve düzenleyici genler	28
Şekil 4. Genomik DNA izolasyonunun saflık ve miktarını gösteren bilgisayar programı	42
Şekil 5. Pyrosekans analizlerinin sonuçları	62

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Tjernberg ve Ursing'in yaptığı numaralandırma şeması	5
Tablo 2.	Sakkarolitik ve asakkarolitik <i>Acinetobacter</i> türleri.....	6
Tablo 3.	Çalışılan <i>Acinetobacter</i> suşlarına ait veriler	46
Tablo 4.	Çalışılan <i>Acinetobacter</i> izolatlarının kliniklere göre dağılımı ...	47
Tablo 5.	<i>Acinetobacter</i> suşlarındaki antibiyotiklere direnç, orta direnç ve duyarlılık oranları	48
Tablo 6.	<i>A.baumannii</i> antibiyotik duyarlılık test sonuçları	49
Tablo 7.	<i>Acinetobacter</i> suşlarının MİK ve MBK değerleri	52
Tablo 8.	<i>Acinetobacter</i> suşlarının benzalkonyum klorid ve klorhekzidin MİK değerlerinin dağılımı.....	53
Tablo 9.	<i>Acinetobacter</i> suşlarının benzalkonyum klorid ve klorhekzidin MBK değerlerinin dağılımı	53
Tablo 10.	Klinik izolatların pompa inhibitörleri PAβN ve NMP varlığında yapılan sıvı mikrodilüsyon testlerinde klorhekzidin ve benzalkonyum klorid MİK sonuçları.	54
Tablo 11.	Klinik izolatların pompa inhibitörleri PAβN ve NMP varlığında yapılan sıvı mikrodilüsyon testlerinde klorhekzidin ve benzalkonyum klorid MBK sonuçları.....	54

Tablo 12. Klinik izolatlarında pompa inhibitörleri NMP ve PAβN'in klorhekzidin ve benzalkonyum klorid MİK'lerinde kaç katlık düşüşlere yol açtıkları	57
Tablo 13. Pompa inhibitorlerinin klorhekzidin ve benzalkoyum klorid MİK'lerinde ortalama kaç katlık düşüşe yol açtığı	61

GİRİŞ

Acinetobacter'ler Gram negatif nonfermantatif basiller içerisinde yer alan ve genel olarak virölansı düşük bakterilerdir. Konak savunma mekanizması normal olan bireylerde enfeksiyon oluşturmaları oldukça güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar ve bir çok hastanede nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralardadırlar. Gelişmiş ülkelerde son 20 yılda, çoklu antibiyotik direnci olan gram negatif basillerin neden olduğu hastane enfeksiyonları önemli bir problem haline gelmiştir.¹ Özellikle yoğun bakım ünitelerinde ve konak savunması bozulmuş hastalarda pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, endokardit, sepsis, menenjit ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonlar oluştururlar^{2,3}.

Hastane enfeksiyonlarından korunma önlemleri içerisinde hastane genelinde uygulanacak dezenfeksiyon ve sterilizasyon uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır.

Ancak hastane enfeksiyonu etkeni olan mikroorganizmalarda görülen dezenfektan direnci, dezenfeksiyon uygulamalarında karşılaşılan sorunlardan biridir. Bu yüzden dezenfektan maddelere olan direncin ve bu direncin kaynağının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Dezenfektan direnci daha çok hücre duvarı ve hücre zarındaki geçirgenlik değişikliklerinden ve artmış eflukstan kaynaklanmaktadır . Bakterilerde bulunan bazı efluks sistemleri geniş spektrumlu olup, yapısal olarak birbiri ile ilişkisiz olan birçok antibiyotik ve dezenfektan maddeyi hücre dışına atabilmektedir. Dezenfektan direncinde rol oynayan efluks pompaları "multidrug efflux (MDR)" sistemleri olarak bilinmektedir. Bu sistemden sorumlu genler genellikle plazmidler

tarafından kodlanmaktadır. Efluks genleri en önemli antiseptik ve dezenfektan direnç geni olarak bilinmektedir.⁴

Bakterilerdeki aktif ilaç pompa sistemleri (Efluks) beş protein süper ailesinin üyesidirler: ABC; MFS; MATE ; SMR; RND;^{5,6,7} Gram-negatif bakterilerin direnci açısından en önemli grup RND üst ailesidir. Yeni çalışmalarda, *A. baumannii*'nin çoklu ilaç direncinde *Resistance Nodulation Cell Division* (RND) süper ailesinin üyelerinden olan AdeABC ve AdeIJK pompa sisteminin çok önemli rolü olduğu üzerinde durulmaktadır.^{5,6}

Diğer taraftan Kuarterner Amonyum Bileşiklerine dirençli izolatların çoğu bir ya da daha çok efluks pompasına sahiptirler. Örneğin Qac genleri yüksek düzeyde dezenfektan ve antiseptik ajanlara direnç ile ilgilidir ve bu genleri sergileyen bakteriler duyarlı kontrol türlerinden dört-beş kat fazla minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerine sahiptirler. Qac genleri hem gram-pozitif bakterilerde (*qac A*, *qac B* ve *smr*, *qac G*, *qac H*) hem de gram-negatif bakterilerde (*emr E*, *qac E* ve *qac EΔ1*) tanımlanmıştır.^{8,9}

Efluks pompasına bağlı direnci önlemek için efluks pompasının etkilerini inhibe edebilen bileşiklerin geliştirilmesine gereksinim kaçınılmaz görünmektedir. Bugüne kadar farklı ailelere üye aktif pompa sistemlerini inhibe eden bir çok bileşik tanımlanmış olup bunlar arasında phenylalanyl-arginyl-B naphtylamide (PAβN) ve 1-(1 naphthylmethyl)-piperazine (NMP), *A. baumannii*'de RND efluks pompasını inhibe ederek antibiyotik MİK'lerini belirgin biçimde düşürdüğü ortaya konmuştur.

Bilindiği gibi konvansiyonel DNA sekanslama 30 yıl kadar önce tarif edilen dideoksi zincir sonlandırma teknolojisine dayanmaktadır. Yıllar içinde bu metodolojinin sınırlamalarını aşmak amacı ile araştırmacılar DNA sekanslamada alternatif prensip arayışlarına girmişlerdir. 2000'li yıllara doğru pyrosekans tekniği geliştirilmiş ve bütün dünyada akademik, klinik ve endüstriyel alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Halen bir PCR ürününü en hızlı sekans yapan teknik olan pyrosekans nükleik asitlerin detaylı karakterizasyonlarını belirlemede geniş kabul görmüş bir tekniktir. Kolaylıkla otomatize edilebilen bir teknoloji olup, işaretli primer, nükleotidler ve jel elektroforez gereksinimini ortadan kaldırmaktadır.

Bu çalışmada amacımız Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Biriminde hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole ettiğimiz *Acinetobacter* suşlarının Klorhekzidin ve Benzalkonyum klorid gibi dezenfektanlara karşı MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) ve MBK (Minimal Bakterisidal Konsantrasyon) değerlerini, pompa inhibitörleri ('*phenylalanyl-arginyl-β-naphtylamide*' (PAβN) ve '*1-(1-naphythylmethyl)-piperazine*' (NMP)) varlığında ve yokluğunda sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırmak ve pyrosekans yöntemi ile AdeB, AdeJ ve QacE efluks gen bölgelerinin varlığını ve dezenfektan direncinde bu pompa sisteminin etkinliğini araştırmayı hedefledik.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. *Acinetobacter* Kökenlerinin Genel Özellikleri

1.1.1. Tarihçe

Acinetobacter 'ler 1896 yılında, morfolojik özelliklerine ilk kez dikkat çeken iki bilim adamının adlarına ithafen 'Morax-Axenfeld basilleri' olarak adlandırılmışlardır.¹⁰ Bu bakteri günümüze kadar en az 15 farklı jenerik isimle anılmış, bunlardan en iyi bilinenleri *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*/ *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, B5W, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii*'dir.^{11,12} Beijerinck tarafından 1911' de ilk kez topraktan izole edilen bu bakteri, *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilmiştir. Brisou ve Pre'vot 1954'de benzer morfolojik özellikler gösteren bu mikroorganizmalar arasında bazılarının hareketsiz olduklarını göstermişler ve Yunanca hareketsiz anlamına gelen "Akinetos" sözcüğünden esinlenerek bu bakterilere 'Acinetobacter' adını vermişlerdir.^{10,13} 1968'de Baumann ve ark. *Acinetobacter*'lerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini ayrıntılı olarak ortaya koymuşlar.¹⁴ "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" de 1973 yılında *Acinetobacter calcoaceticus* adıyla tek tür olarak *Neisseriaceae* ailesi içinde yer almıştır. Taksonomik çalışmalar sonucu *Acinetobacter* cinsi günümüzde *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilgili diğer cinslerle birlikte *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır.¹¹ *Acinetobacter* cinsi içinde DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına göre en son 32 genomik tür tanımlanmıştır. 10 genomik türe özel isimler verilirken diğer genomik türler isimlendirilmemiştir. Tjernberg ve Ursing'in yaptığı numaralandırma şemasında grup 1, 2, 3, ve 13TU fenotipik olarak çok benzer oldukları ve geleneksel fenotipik yöntemlerle

ayrımları zor olduğundan *A.calcoeticus*-*A.baumannii* kompleksi olarak isimlendirilmiştir^{15,16,17} (Tablo 1).

Tablo 1. Tjernberg ve Ursing'in yaptığı numaralandırma şeması¹⁸

GRUP İSMİ	RESMİ TÜR İSMİ
Genomospecies 1	<i>Acinetobacter calcoeticus</i>
Genomospecies 2	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Genomospecies 4	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
Genomospecies 5	<i>Acinetobacter junii</i>
Genomospecies 7	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
Genomospecies 8/9	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
Genomospecies 12	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Phenon 1*	<i>Acinetobacter ursingii</i>
Phenon 2*	<i>Acinetobacter schindleri</i> <i>Acinetobacter venetianus</i>

*Phenon: Fenotipik olarak farklı

Son yayınlanan kitaplarda ise sakkarolitik ve asakkarolitik olarak iki tür *Acinetobacter*'den söz edilmektedir¹⁹ (Tablo 2).

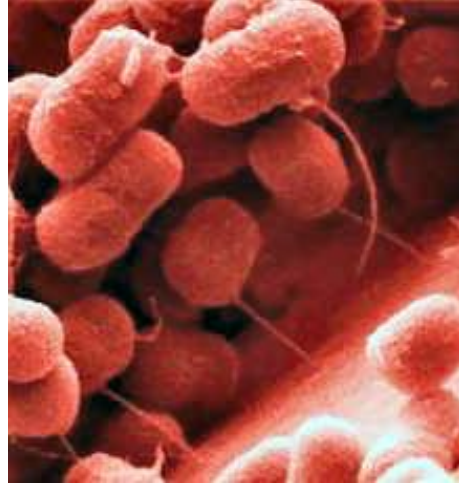
Tablo 2. Sakkarolitik ve asakkarolitik *Acinetobacter* türleri

Sakkarolitik <i>Acinetobacter</i> Türleri		Asakkarolitik <i>Acinetobacter</i> Türleri	
Hemolitik	Non-Hemolitik	Hemolitik	Non-Hemolitik
<i>A. alcaligenes</i>	<i>A. baumannii</i>	-	<i>A. calcoaceticus</i> subsp. <i>lwoffii</i>
<i>A. anitratus</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	-	<i>A. johnsonii</i>
<i>A. haemolyticus</i>	<i>A. anitratus</i>	-	<i>A. junii</i>
	<i>A. calcoaceticus</i> subsp. <i>Anitratus</i>	-	<i>A. lwoffii</i>

A. baumannii klinik örneklerden en sık izole edilen *Acinetobacter* türüdür. Diğer izole edilen türler ise *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, genomik tür 3 ve genomik tür 6' dır. *A. johnsonii*, *A. lwoffii* ve *A. radioresistens* insan derisinin doğal elemanı olan nonsakkarolitik *Acinetobacter* türleridir.²⁰

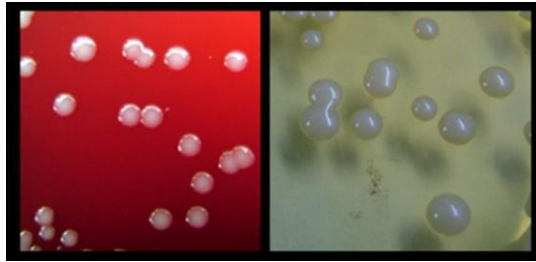
1.1.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler

Acinetobacter türleri non-fermentatif, hareketsiz, Gram negatif ve sıklıkla diplokok şeklinde görülen bakterilerdir. Ancak klinik örneklerin direkt preparatlarında ve pozitif kan kültür şişelerinden hazırlanan preparatlarda *Acinetobacter* türlerinin başlangıçta Gram pozitif kok olarak görünebileceği unutulmamalıdır. Üremenin logaritmik fazında 1-1,5 x 1,5-2,5 µm boyutlarında basil, üreme olmadığı zaman kok şeklinde, daha çok kokobasil, ikişerli, küme halinde veya kısa zincir olarak görülebilir^{21, 22} (Resim 1).



Resim 1. *Acinetobacter* kökenlerinin morfolojik görünümü

Genel üretim besiyerlerinde 35-37°C'de kolayca üretilebilirler. Kanlı agarda 24 saatlik inkübasyondan sonra 0.5-2 mm çapında düz ve opak koloniler oluştururlar.²³ (Resim 2) Birçoğu MacConkey agar ve Eozin Metilen Blue agar'da renksiz veya hafif pembemsi koloniler yaparlar.²⁰



Resim 2. Kanlı agar ve Mueller Hinton agardaki *A. baumannii* kolonilerinin görünümü.

Zor üreyen bir mikroorganizma değildir ve besinsel olarak fakir ortamlarda hatta antiseptiklerin varlığında bile yaşamaktadırlar. Glukozu oksitleyen, DNaz, oksidaz ve indol negatif, katalaz pozitif, nonfermantatif bakterilerdir. Birçok türü nitratları nitritlere indirgeyemez.^{23,}

Acinetobacter türlerinin identifikasyonu; sitokrom oksidaz aktivitesinin olmaması, hareketsizlik ve penisiline direnç temeline dayanılarak yapılabilir. *Acinetobacter baumannii* sakkarolitiktir ve karbonhidratlardan asit oluşturur.^{20, 23}

Rutin laboratuvar koşullarında biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre *Acinetobacter* tür ayrımı yapılmaktadır. Bu ayırmada glukoz oksidatif etki, hemoliz ve 44°C'de üreyebilme genellikle yeterli olmaktadır. Glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan izolatlar genellikle *A. baumannii*'dir. *A. baumannii* 44°C'de üreyebilme yeteneğiyle diğerlerinden kolayca ayırt edilebilir. Glukoz negatif kökenlerden hemoliz yapmayan *A. lwoffii*, hemoliz yapan *A. haemolyticus* olarak adlandırılır. *A. johnsonii* diğer türlerden 37°C'de üreyememesi nedeni ile ayırt edilebilir.²³

Klasik mikrobiyolojik yöntemler dışında otomatize sistemler ve moleküler yöntemlerle *Acinetobacter* tür ayrımı yapılabilmektedir.

1.1.3. Epidemiyoloji

Diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında *Acinetobacter* türleri kuruluğa dayanıklı, farklı ısı ve pH derecelerinde yaşayabilme özellikleri olan ve cansız yüzeylerde günlerce canlılıklarını sürebilmektedirler. Doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilirler.^{18, 25}

Acinetobacter kökenlerinin sağlıklı insanların ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde bulunduğu gösterilmiştir.¹⁸ Yatan hastalarda özellikle salgınlar sırasında *Acinetobacter* kolonizasyon oranı çok artmaktadır.²⁶ *Acinetobacter* türleri hastane personelin derisinde sürekli taşınan en

yaygın gram negative bakterilerdir.²⁷ Bu mikroorganizmalar en fazla eller ile hastadan hastaya taşınır. Ek olarak kirli ekipmanlar ile de taşınmaktadır.²⁸

A. baumannii'nin özellikle yoğun bakım ünitesine (YBÜ) yatan hastaların %71' ini yatışı takiben birinci haftanın sonunda kolonize ettiği ve bu hastalarda *A. baumannii* ile ilişkili enfeksiyonların arttığı gösterilmiştir. Özellikle YBÜ' de değişik risk faktörleri bu duruma etkili olmaktadır.²⁹

Klinik örneklerden izole edilen tüm *Acinetobacter* kökenlerinin %80'den fazlasını *A.calcoaceticus-A.baumannii* kompleksi oluşturmaktadır.²⁰ Son 30 yılda pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu ve cerrahi alan enfeksiyonlarında görülme sıklığı artan tek gram negative bakterinin *A. baumannii* olduğu gösterilmiştir.³⁰ Üstelik son yirmi yılda *Acinetobacter* enfeksiyonları ılıman iklimlerde giderek yaygınlaşan ortak bir nozokomiyal sorun haline gelmiştir.³¹

Hastane kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra kolonizasyon nedeniyle de mikroorganizma klinik örneklerden de izole edilmektedir.^{23, 24}

1.1.4. Patogenezi ve Virülans

Acinetobacter türleri düşük virülanslı patojenler olarak değerlendirilmektedirler.³² Virülans potansiyelleri düşük olduğundan bağışıklık sistemi normal olanlarda enfeksiyon oluşturma olasılığı oldukça düşüktür. Asidik pH'da ve düşük ısıda üreyebilme özellikleri yanında bilinen sitotoksin üretimi yoktur. Bakterinin insan vücudunda üreyebilmesi için gerekli olan demiri sağlayabilme özelliği önemli virülans faktörlerindendir. Aerobaktin gibi siderofor ve demir tutucu dış membran

reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilmektedir. Bazı *Acinetobacter* türleri, siderofor sentezleyerek virülansını arttırmaktadır.^{11, 33}

Acinetobacter baumannii'nin biyofilm oluşturma, hastane ortamında ve aygıtların yüzeyinde uzun süre canlı kalabilme nedeniyle, önemli bir virülans faktörüdür. Biyofilm oluşturma özelliği bakteriyi bazı antimikrobiyal ajanlara karşı da korumaktadır.³⁴

Acinetobacter baumannii' de polisakkarit yapıda bir kapsül bulunmakta ve bu polisakkarit kapsül bakterinin fagositozdan korunmasında rol oynayarak, kompleman sisteminin aktivasyonunu önler ve bakterinin virülansına katkıda bulunur.¹³ Kapsülün hücre yüzeyi hidrofobisitesini arttırdığı ve tıbbi aletlere yapışmada rolü olduğu gösterilmiştir.¹⁰ Fimbria veya kapsüler polisakkarit ile insan epitel hücrelerine yapışma yeteneği, doku lipidlerini hasarlayan enzimlerin varlığı, konak hücre duvarına toksik lipopolisakkarit sentezi ve mikroorganizmanın hücre duvarında bulunan Lipit A varlığı, enfeksiyona yol açan bakterilerde virülansı arttıran faktörlerdir.¹¹

1.1.5. *Acinetobacter* Enfeksiyonları

1.1.5.1 Hastane Kaynaklı Enfeksiyonlar

Acinetobacter türleri arasında en sık ve en ciddi klinik tablolara neden olan *A. baumannii*' kan akımı enfeksiyonları, ventilatör ilişkili pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları gibi nozokomiyal enfeksiyonların etkeni olarak rapor edilmekte ve gittikçe artmaktadır.^{35,36,37,38}

Klinik olarak *Acinetobacter* enfeksiyonları cerrahi veya invaziv aletlerin kullanımıyla yakın ilişkili bulunmuştur. Sağlık hizmetiyle ilişkili *Acinetobacter* enfeksiyonları hakkındaki bilgilerin çoğu salgın araştırmalarına dayanmaktadır.³¹ *A.baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlar daha çok yoğun bakım ünitelerindeki zayıf düşmüş hastalarda görülmektedir. Bu yüzden konağa ait hazırlayıcı etmenlerin varlığı bu enfeksiyonların oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bunlar arasından malignite, yanık, savunma sisteminin baskılanmasına yol açan ciddi bir hastalığın varlığı, ağır cerrahi girişimler, yaranın varlığı ve konağın yaşını sayabiliriz. Uzun süre yoğun bakım biriminde kalma, mekanik ventilasyon ile uzamış solunum tedavisi, geniş spektrumlu antibiyotik kullanma, parenteral beslenme, trakeostomi, endotrakeal tüp, damar içi kateter ve idrar sondasının varlığı bu bakteriler ile oluşan enfeksiyonlar için risk etmenlerini oluşturmaktadır.^{35, 36}

1.1.5.2 Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar

Acinetobacter türleri esas olarak hastane kaynaklı enfeksiyonlarda etken olduğu gibi toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da nadir olarak görülmekte.^{35, 39} Toplumdan edinilmiş *Acinetobacter* enfeksiyonları, organizmanın faringeal taşıyıcılığı, hızlı ilerleyen pnömoni ve yüksek oranlarda ölüm vakaları ile karakterize edilmiş ve ayrıca risk faktörleri olarak sigara kullanma alışkanlıkları, kronik akciğer hastalığı, alkol, diabetes mellitus ve kanser bildirilmiştir.^{40, 41}

1.1.6.Tanı

1.1.6.1 Klinik Örneklerden İzolasyon

Acinetobacter'ler pnömoni, bakteriyemi, menenjit, üriner sistem enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları, peritonit gibi enfeksiyonlara sebep olduğu için endotrakeal aspirat (ETA), balgam, bronş lavaj, kan, katater kan kültürü, bos, idrar, yara ve plevra sıvısı gibi örneklerden izole edilebilir. Alınan örnekler Kanlı Agar ve Eosin-Metilen Blue agara (EMB) ekilir ve geleneksel yöntemlerle *Acinetobacter* olarak tanımlanır . Daha sonra tiplendirme yapılır.^{11, 42}

1.1.7. Tiplendirme Yöntemleri

Salgını tanımlamak ve kaynağı ortaya çıkarmak için çok çeşitli tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Serolojik reaksiyonlar, bakteriyofaj, bakteriyosin, protein profiller, antibiyotik duyarlılık paternleri, “multilocus” enzim elektroforez, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), “pulsed-field gel” elektroforez (PFGE) ve ribotiplendirme bu amaçla kullanılabilse de en uygun ve ideal metod bilinmemektedir. Geleneksel biyokimyasal metodlar türler arasında ayırım yapmak için yeterli olmamaktadır. Bu amaçla birçok karbon kaynağının asimilasyonu temeline dayanan hazır ticari kitler kullanılmaktadır. Ticari sistemlerden; API 20 NE (bioMerieux, Fransa) beş, Biolog GN2 Microplate (Biolog, Hayward ABD) 15 türü identifiye edebilmektedir.⁴³ Bu kitlerin en büyük dezavantajı bazı türlerin tablolarda yer almaması nedeniyle tüm türleri tanımlayamamasıdır.⁴⁴

1.1.8. Antibiyotik Duyarlılığı

Günümüzde birçok *Acinetobacter* yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir.^{20, 45, 46, 47, 48} *Acinetobacter* türleri beta-laktam, tetrasiklin, aminoglikozit, florokinolon ve kloramfenikol gibi farklı antibiyotik gruplarına karşı hızla direnç geliştirebilmektedirler. Karbapenemler *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde halen başarılı antibiyotikler olarak kalmalarına karşın imipenem direncinin ilk kez belirlendiği 1985 yılından beri bu bileşiklere direnç oranı tüm dünyada hızla artmaktadır.^{49, 50, 51}

Beta-laktamaz inhibitörleri arasında sulbaktam *Acinetobacter* kökenlerine karşı klavulanik asit ve tazobaktama göre daha yüksek aktivite göstermektedir.^{52,53,54} Bu farklılık sulbaktamın β -laktamaz inhibitörü etkisine ek olarak Penisilin Bağlayan Protein-2 (PBP-2) üzerinden intrinsek bakterisidal aktivite göstermesinden kaynaklanmaktadır.²⁰ Bu nedenle ampisilin/sulbaktamın *A. baumannii*'ye karşı amoksisilin/klavulanik asit ve piperasilin/tazobaktama göre daha etkili olduğu görülmektedir.^{52, 54}

Tigesiklin, karbapenem ve polimiksine dirençli kökenlerin de dahil olduğu *Acinetobacter* türlerine karşı in-vitro etkilidir. Ancak bazı çalışmalarda tigesikline karşı duyarlılık sonuçlarının azalmaya başladığı ve tedavi altında direnç geliştiği bildirilmiştir.⁵⁵ Kolistin, çoklu ilaç direnci gösteren mikroorganizmaların tedavisinde yeniden önem kazanan eski bir antibiyotiktir. Yapılan bir çalışmada *Acinetobacter* kökenlerinin %98'i in-vitro olarak kolistine duyarlı bulunmuştur ama Nefrotoksisite kullanımını sınırlayan en önemli yan etkidir. Rifampisin, hızlı direnç gelişimi nedeniyle tedavide tek başına kullanılmamalıdır ve kolistin ile kombinasyon şeklinde kullanılabilir.⁵⁶ Karbapenemler, sulbaktam, kolistin ve tigesiklin *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde en etkili antibiyotiklerdir.^{57,58}

Ancak bakterinin tedavi esnasında hızla direnç geliştirebilme olasılığı ve tedavide yeterince başarı sağlanamaması nedeniyle tedavinin tek bir antimikrobiyal ajan kullanılarak yapılması önerilmemektedir.^{18, 23, 59}

1.1.9. Kombinasyon Tedavileri

Geniş spektrum elde etmek, polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde, dirençli mikroorganizma oluşumunu azaltmak ve monoterapilere oranla daha güçlü bir bakterisidal veya bakteriyostatik etki elde etmek amacı ile antibiyotikler kombine kullanılabilmektedirler.⁶⁰ Kombinasyon tedavileri özellikle çoklu ilaç direnci gösteren kökenlerin oluşturduğu enfeksiyonlarda önem kazanmaktadır. İn-vitro çalışmalarda sulbaktamın aminoglikozit, rifampisin veya azitromisin ile kombinasyonlarının imipeneme duyarlı *Acinetobacter* kökenlerine karşı sinerjik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ancak sulbaktamın sefolosporinlerle veya diğer beta-laktamlarla kombinasyonu etkinlik artışı sağlamamıştır. Kinolonlar ile beta-laktam antibiyotikler veya imipenem ile azitromisin kombinasyonları da imipeneme duyarlı *Acinetobacter* kökenlerine karşı sinerjik bulunmuştur. Polimiksin ile imipenem, imipenem ile rifampisin ve polimiksin, imipenem, rifampisin üçlü kombinasyonlarının metallo-beta-laktamaz negatif imipeneme dirençli *Acinetobacter* türleri için sinerjik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.⁶¹ Buna rağmen her klinik izolat için duyarlılık testinin yapılması gereklidir. Hastane salgınlarında çoğul antibiyotik dirençli türler bildirilmektedir.^{35, 62}

1.1.10. Dezenfektan ve Biyosid Maddeler

Dezenfeksiyon; cansız nesneler üzerinde bulunan potansiyel patojenleri elimine eden fakat genellikle endosporları yok etmeyen bir işlemdir. Bu işlemde kullanılan maddelere dezenfektan denir. Germisid

veya biyosid terimi de dezenfektanla aynı anlama gelmekle birlikte, germisid ve biyosidler hem canlı dokuda hem de cansız nesnelerde kullanılabilirler.⁶³

Hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde antisepsi, dezenfeksiyon ve sterilizasyon işlemlerinin uygun bir biçimde planlanması ve sürdürülmesi büyük önem taşımaktadır. Antiseptik ve dezenfektanlar hastanelerde topikal ve sert yüzeylerin arındırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hastalarda kullanılan aletlerin, çevresel yüzeylerin, yoğun bakım ünitesi, ameliyathane gibi kritik bölgelerin temizliğinde kullanılan antiseptik ve dezenfektanların optimal etkinliğinin sağlanması için; uygun dilüsyonlarda hazırlanıp, uygun şartlarda saklanmaları ve uygun endikasyonlarda kullanılmaları kadar, etki spektrumlarının da bilinmesi gerekmektedir. Aynı zamanda direncin zamanla değişim gösterebileceği göz önüne alınarak bu etkinliğin belirli periyotlarla kontrolü yapılmalıdır.^{64, 65}

Dezenfektanlar ve antiseptiklerin etki seviyelerine göre sınıflandırılması:

1-Yüksek Seviyeli Dezenfektanlar: Genellikle bakteriyel endosporlar hariç mikroorganizmaların tümünü 20 dakika veya daha uzun bir sürede öldüren maddelerdir. Bazı dezenfektanlar 6-10 saatte bakteriyel endosporları da öldürebilir. Gluteraldehit, formaldehit, hidrojen peroksit, sodyum hipoklorit, perasetik asit yüksek seviyeli dezenfektanlardır.

2- Orta Seviyeli Dezenfektanlar: Bakteri endosporları hariç, tüberküloz basili ve diğer mikroorganizmalara 10 dakika veya bunun altında bir sürede etki eden maddelerdir. Etil ve izopropil alkoller, fenoller, iyodoforlar bu gruba girer.

3-Düşük Seviyeli Dezenfektanlar: Bunlar bakteri endosporları ve tüberküloz basiline etki etmezler. Vejetatif bakterilerin çoğunu, bazı mantarları ve 10 dakikanın altında bir sürede bazı virüsleri öldürebilirler. Bu grupta; fenoller, iyodoforlar, kuarterner amonyum bileşikleri, etil veya izopropil alkoller, sodyum hipoklorit bulunmaktadır.^{63, 66, 67}

Sıklıkla kullanılan dezenfektan ve antiseptiklerin sıvı veya buhar faz olarak sınıflandırılması⁶³

Sıvı fazlı kimyasal bileşikler: Alkoller, Aldehitler, Fenol ve Fenol bileşikleri, Halojenler, Iyodoforlar, Peroksijenler, Kuarterner Amonyum bileşikleri gibi

Buhar fazlı kimyasal bileşikler: Etilen, Propilen Oksit, Formaldehit, Metil Bromur gibi

Etki mekanizmalarına göre sınıflandırma:

Elektrofilik olanlar: Halojenler, Peroksijen bileşikleri, Formaldehit, Formol salan ajanlar, Cu, Hg, Ag.

Membrana etkili olanlar: Kuarterner Amonyum bileşikleri, Biguanidler, Fenoller, Alkoller, Parabenler, Zayıf Asitler gibi.

Halojenler ve peroksijenler gibi oksidan ajanlar bakteri hücrelerini hızla ölüme götürürler, gümüş, bakır ve civa gibi inorganik iyonlar ve formaldehit gibi organik biyositler ise enzimleri inaktive ederler ve hücre içi radikallerin salınımına neden olarak bakteri hücrelerini ölüme götürürler. Zayıf asitler, membranın pH dengesini bozarak metabolizmanın

bozulması yoluyla etkilidir. Kuarterner amonyum bileşikleri, biguanidler ve alkoller bakteri hücresi membranına etkilerler ve hücreyi hızla lizise götürürler.⁶⁷

Kuarterner Amonyum Bileşikleri

Kuarterner amonyum bileşikleri (KAB) Katyonik deterjan özelliği olan, yüzey gerilimi azaltarak etki gösteren dezenfektanlardır. Alkil dimetil benzyl amonyum klorür (Benzalkonyum klorid yada zefiran), alkil didesil dimetil amonyum klorür ve dialkil dimetil amonyum klorür de dahil olmak üzere, çeşitli KAB'lar, 1935 yılında germisidler olarak takdim edildiklerinden bu yana yaygın biçimde hastanelerde kullanılan başlıca kuarterner amonyum bileşikleridir.⁶⁸

Bu bileşikler, yüksek konsantrasyonlarda bazı mikroorganizmalara mikrobisit etkili olsada, genel olarak bakteriyostatik ve fungustatik özelliktedir. Gram-negatif bakterilere göre, gram-pozitif bakteriler üzerine daha fazla etkilidir.^{69,70} Bakterilere karşı yapı ve sitoplazma membran bütünlüğünü bozarak etkisini gösterir. Sferoplast ve protoplast lizisine neden olur. Bu amaçla mikroorganizmaya adsorbe ve penetre olan KAB sitoplazmik membran lipid veya proteinlerini etkileyerek önce membran yapısını bozar ve ardından hücre içi düşük molekül ağırlıklı maddelerin dışarı sızmasına yol açar. Protein ve nükleik asitleri degrade eder ve otolitik enzimler tarafından hücre lizisi oluşur.^{68,70} En iyi alkali çözeltilerde etki gösterirler, organik madde varlığında etkileri çok azalır. Sabunlar ve anyonik detarjanlar tarafından kolayca nütrenirler. Renksiz, kokusuz, boyamayan, aşındırıcı olmayan, ucuz, toksik etkileri çok az olan ve deterjan özelliği ile ideal bir dezenfektandır. Kuarterner'ler yıllar boyunca, temel olarak düşük toksisiteleri ve düşük maliyeti nedeniyle, tüm dezenfektan kategorileri içinde en fazla ilgi çeken dezenfektan olmuştur.

Hastane dezenfektanı olarak satılan KAB fungusidal, bakterisidal ve lipofilik (zarflı) virüslere karşı etkili olup hidrofilik (zarfsız) virüslere karşı etkisizdir. Sporosidal ve tuberkulosidal değildir. Kuarterner amonyum bileşikleri cildin operasyon öncesi dezenfeksiyonu, mukoz membranlara uygulama ve hasta cildine temas eden tansiyon manşonu ve steteskop gibi aletlerin yüzeylerinin dezenfeksiyonu için kullanılmaktadırlar. İyi bir temizlik ajanı olarak hastane ortamında, yer, duvar, mobilya, alet yüzeylerine ve tuvaletlere ve benzer kritik olmayan araçların dezenfeksiyonunda da kullanılabilirler.^{68, 69, 70}

Antimikrobiyal özelliklerine ilave olarak sert yüzey temizleyicisi ve koku giderici olarak da mükemmeldirler. Kuarterner amonyum bileşikleri iyi temizleyici olmalarına rağmen, yüksek su sertliğinde pamuklu ve gazlı bez kullanımında bunların emici özelliğinden dolayı mikrobisidal etkinlikleri azalmaktadır.^{68, 69, 70}

Benzalkonyum klorid $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2Cl$

Beyaz toz veya litik şekilleri mevcuttur. Benzalkonyum klorid (BC) el ve yüz dezenfektanı olarak kullanımının yanı sıra aletlerin dezenfeksiyonunda ve ilaçların içerisinde bakterilerin tutunumunun önlenmesi amacı ile düşük konsantrasyonlarda yer almaktadır. Kuarterner amonyum bileşikleri en yaygın kullanılan dezenfektanlardan ve Benzalkonyum klorid, ticari olarak kullanılan ilk kuarterner amonyum bileşiğidir.^{65, 71}

Klorhekzidin $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$

Klorhekzidin (CHX) 1946 yılında keşfedilmiş olup, 1954 yılında klinik kullanıma girmiştir. Antiseptik ve dezenfektan olarak vücutta

meydana gelen enfeksiyonların önlenmesinde ve ağız gargaralarının içerisinde ve boğaz enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Klorhekzidin antiseptik ürünler içerisinde özellikle el yıkamada en yaygın olarak kullanılan biyosiddir, fakat aynı zamanda dezenfektan ve koruyucu olarak da kullanılır. Bisfenoldur ve iki fenol halkası içerir. Geniş spektrumlu etkiye sahiptir ve çok yaygın olarak tıpta, diş hekimliğinde ve farmakoloji alanında kullanılmaktadır.⁷²

Klorhekzidin diasetat, diglukonat ve dihidroklorit olarak kullanılabilen olup, yara bakımında diglukonat formu en sık kullanılanıdır. Sporsuz bakterilere karşı hızla geliştirdiği geniş spektrumlu bakterisidal bir etkinliği vardır.

Özellikle Gram pozitif koklar üzerine bakterisit etkili, klorlu fenol türevidir . Bakteri hücre duvarını ve dış membranını pasif difüzyon ile geçerek, bakteri sitoplazma zarı veya iç membranına etki eder. Sitoplazma zarına yapışarak oksidaz ve dehidrogenaz enzimlerini geri dönüşümsüz şekilde inaktive eder ve küçük moleküllerin dışarı çıkmasına yol açarak etkinliğini gösterir.⁷¹ Aynı zamanda konsantrasyona bağımlı olarak intraselüler organellerin koagülasyonuna da neden olur. Bakteri sayısını azaltması, yara iyileşmesini hızlandırması ve toksisitesinin olmaması kabul edilmekle birlikte, güvenilirliği ve etkinliği ile ilgili yeterli veri olmadığına ve açık yaralarda Klorhekzidin'in kullanılmasına yönelik daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç olduğuna inanılmaktadır.⁷³

Dezenfektanların etkinliğini ölçen testler:

Dezenfektan aktivite ölçüm testleri (in-vitro testleri)

- Minimal inhibitor konsantrasyonun belirlenmesi (MIC):

Bir mikroorganizmanın gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyon olarak kabul edilmektedir.

-Suspansiyon testleri: Belli bir zamanda dezenfektan konsantrasyonuna bağlı mikrop sayısındaki azalmayı logaritmik olarak incelemeyi sağlar.

- Kapasite testleri: Dezenfektan solusyonuna kirli bir alet daldırılır, böylece artan yük karşısında dezenfektan maddenin aktivitesini koruyup korunmama kapasitesi belirlenir. Alet ve ortam dezenfeksiyonunun in-vitro uygulamasıdır.

Amaca yönelik spesifik testler

Pratik testleri: Dezenfeksiyonun uygulandığı yüzeyin, aletlerin, derinin dezenfeksiyonunun yeterliliğini saptama testleridir.

Uygulama testleri: konsantrasyon ve uygulama süresi in-vitro testlerle belirlendikten sonra bu testler belirlenen konsantrasyon ve sürede gerçek uygulama alanlarında yapılırlar.^{74,75}

1.1.11.Bakterilerde Dezenfektan ve Biyosid Maddelere Direnç

Dirençli Gram-negatif basillerin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlar son yıllarda hastanelerin önemli problemi haline gelmiştir. Biyosidler ve dezenfektanlar, hastane enfeksiyonlarının önlenmesine yardım ederler ve enfeksiyon kontrol çalışmalarının önemli bir parçası olarak yer alırlar. Belirli bir amaç için kullanılacak dezenfektanın seçimi bu nedenle önemlidir. Amaca uygun olmayan ürün seçimi hem kullanımda sorun oluşturacak hem de maliyetin artmasına neden olacaktır. Kullanılan antiseptik ve dezenfektanlara Gram-negatif basillerin bir kısmı direnç göstermektedir.^{76,77} Bu nedenle hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde en önemli basamaklardan biri, dirençli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan nozokomiyal enfeksiyonları önlemek ve etkin antiseptik ve dezenfektan seçimidir. Mikroorganizmaların dezenfektanlara karşı duyarlılıkları yapısal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Doğal direnç, genellikle dezenfektan maddenin hücre içine alınımının azalmasıyla ilişkili iken; kazanılmış direnç kromozomal mutasyonlar ve plasmid ve transpozonlar aracılığıyla gelişmektedir.^{63, 64}

İntrensek ve kazanılmış direnç:

Antibiyotiklerde olduğu gibi, bakterilerdeki dezenfektan direnci de intrinsek ve kazanılmış mekanizmalar aracılığı ile olmaktadır.

İntrensek direnç kromozomlar tarafından kontrol edilen, bakterilerde doğal olarak var olan ve kalıtsal özellikte olmayan direnç tipidir. Gram-negatif bakteriler intrinsek olarak birçok dezenfektana Gram-pozitif bakterilere göre daha dirençlidir. Bu durum Gram-negatif bakterilerin intrinsek (doğal) özelliğidir. İntrensek direnç, genellikle dezenfektan maddenin hücre içine alınımının azalması ile ilişkilidir.⁴ Bakteri sporları, mikobakteriler ve değişik Gram-negatif bakteriler bu

mekanizma ile birçok dezenfektana direnç göstermektedirler. Gram-negatif bakterilerdeki dış membran tabakası bir fiziksel bariyer olarak rol oynar ve antimikrobiyal maddelerin hücreye girişini kısıtlar. Lipopolisakkarit (LPS) molekülleri hidrofobik maddelerin hücre içine girişini engeller. O yüzden Gram-negatif bakteriler Gram-pozitif bakterilere göre dezenfektanlara daha dirençlidirler. Örneğin *P. aeruginosa*'larda hücre duvarının yüksek magnezyum içeriği, lipopolisakkarit kompozisyonundaki farklılık ve küçük porin moleküllerinin varlığı dezenfektan maddenin hücreye difüzyonunu zorlaştırır. *B. cepacia*'nın LPS moleküllerinde yüksek miktarda fosfat-bağlı arabinoz bulunması, dış membran tabakasının polimiksin antibiyotiklere ve katyonik dezenfektanlara afinitesini azaltır. *Proteus* türlerindeki LPS molekülleri klorheksidine karşı intrinsek dirençten sorumlu tutulmaktadır.^{4,78}

Kazanılmış direnç ise sonradan kazanılan bir direnç tipidir. Burada bakteri popülasyonu antimikrobik madde ile ilk temas ettiğinde ilaç mikroorganizma üzerine etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antimikrobik maddeye karşı direnç gelişir. Kazanılmış direnç, kromozomlardaki mutasyon, plazmid ya da transpozonlar gibi genetik eleman kazanımıyla olmaktadır.⁶⁶

Bakteri kromozomunda kendiliğinden (spontan) oluşan mutasyonlar sonucunda kromozomal direnç ortaya çıkar. Spontan mutasyonlar bazı fiziksel ve kimyasal faktörlerle oluşabilir ve sonuçta bakteri hücresinde yapısal değişimler oluşur. Böylece hücrenin ilaca permeabilitesi azalabilir, hücre içinde ilacın hedefinde değişiklikler olur veya 12 kromozomlar tarafından kodlanan eflüks sistemleri ile direnç gelişimi ortaya çıkar. Çalışmalarda Gram-negatif bakterilerde intrinsek antibiyotik direncine neden olan kromozomal eflüks pompalarının biyosid direncine de katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir. Bunlar *P. aeruginosa*

ve *E. coli*'de gösterilmiştir. Spontan kromozomal mutasyon oranı 10^{-7} - 10^{-12} dir.⁷⁹

Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak replike olabilen ekstrakromozomal DNA parçacıklarıdır. Plazmid genleri, genellikle ilaçları parçalayan enzimlerin üretilmesinden sorumludurlar ve plazmidlere bağlı direnç sebepleri olurlar.^{80,81} Dezenfektanlara karşı plazmid aracılığı ile gelişen direnç mekanizmalarının tanımlandığı bakterilerden biri *Staphylococcus*'lardır. *S.aureus*'larda plazmid aracılığı ile gelişen direnç mekanizmalarının, en az üç farklı determinant (*qac* genleri) tarafından kodlandığı belirlenmiştir. Plazmid aracılı antiseptik ve dezenfektan direnci *Pseudomonas aeruginosa*'da tanımlanmakla birlikte daha sonra koagülaz negatif *Staphylococcus*'lar, *Pseudomonas* türleri ve Enterobacteriaceae üyelerinde de bildirilmiştir. *S. aureus*'larda dezenfektan direnci 4 farklı *qac* geni (*qac A, B, C, D*) tarafından kodlanmaktadır ve bu genler plazmid üzerinde bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda *QacA/B* genleri dirençli *S.aureus* suşlarında %94.6 olarak bildirilmiştir ve hastane kökenli suşlarda bu genlerin biyosid direnci ile ilişkisini saptamışlardır.^{82,83} Plazmid aracılı dezenfektan direnci *Pseudomonas* ve Enterobacteriaceae'da ise daha çok *Qac E* veya *Qac EA1* çoklu ilaç taşıyıcı genleri ile kodlanmaktadır. *Qac* genleri taşıyan plazmid konjugatif olarak aktarılabilir. *Qac E* ve *Qac EA1* genleri Gram-negatif bakterilerde integronlar bölümünde yerleşmiştir. İntegronlar yüksek düzeyde hareketli elementlerdir ve plazmid kromozom ve transpozonlar üzerinde bulunabilmektedir. İntegronlar tarafından kodlanan gen kasetlerinin antibiyotik ve dezenfektanlara karşı direnç kodladığı gösterilmiştir.^{84, 85}

Transpozonlar ise bir DNA molekülünden diğerine (kromozomdan plazmide, plazmidden kromozoma) geçebilen DNA dizileridir. Plazmidden farklı olarak bağımsız olarak replike olamazlar. Direnç genlerini taşıyan genetik materyal ve plazmidler bir bakteriden

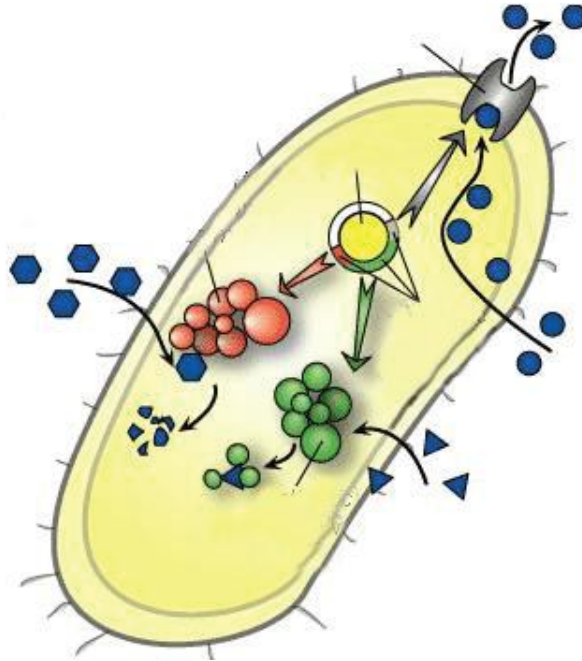
diğerine transdüksiyon, transformasyon, konjugasyon ve transpozisyon gibi mekanizmalarla aktarılırlar ve transpozonlara bağılı dirence sebep olurlar.^{80, 81}

Bakterilerde antibiyotik direncine yol açan mekanizmalar çok iyi tanımlanmıştır. Dört ana direnç mekanizması; hedef bölgenin değişmesi, antibiyotik inaktivasyonu, hücre dışına çıkarma (efluks) ve geçirgenliğin azalmasıdır. Dezenfektan direncinin major etkeni ise hücre duvarı ve hücre zarındaki geçirgenlik değişikliklerinden ve artmış eflukstan kaynaklanmaktadır. Dezenfektan maddenin inaktivasyonu ile oluşan direnç çok nadirdir.⁸ Antibiyotiklerden farklı olarak, dezenfektanlar birden çok hedefe yönelik etki gösterirler, bu nedenle dezenfektanlara karşı hedef bölgenin değişmesi ile oluşan direncin pratik uygulamadaki önemi henüz tam olarak belli değildir.⁸

Çoklu ilaç direnç mekanizmaları

Aktif pompa sistemleri, gerek Gram-negatif gerekse Gram-pozitif bakterilerde bulunabilen, antibiyotikler dahil toksik maddelerin hücre dışına atılmasını sağlayan transport proteinleridir (Şekil 1). Son yıllarda yapılan çalışmalar diğer bakterilerdekine benzer şekilde *A.baumannii*'nin çoklu ilaç direncinden esas olarak aktif ilaç pompa sistemlerinin sorumlu olduğuna dikkat çekmektedir. Aktif pompalar tek bir substrata özgül olabildikleri gibi yapısal olarak birbirinden farklı maddeleri de substrat olarak kullanabilirler. Bu durum çoklu antibiyotik direncine ve yanı sıra substrat profilinin genişliğine bağılı olarak bazı boyalara, deterjanlara, dezenfektanlara karşı dirence neden olmaktadır. Pompa sistemi proteinlerinin normalde bulunan operonun bir parçası olabileceğı ve düzenleyici bir genin kontrolü altında ortaya çıktığı da düşünceler arasında yer almaktadır.¹¹⁴

Bakterilerdeki pompa sistemleri transport proteinlerinden oluşur. Bakteri genlerinin %5-10'u transport yapar ve özellikle metabolik artık ya da gereksiz ve zararlı maddeleri dışarı pompalar. Pompa geni bir operonun parçasıdır, antibiyotiği ya da hedefini modifiye etmez. Bu gen kromozomal ve indüklenebilir veya plazmidik olabilir. Pompa sistemi, ekspresyon düzenleyici bir gen kontrolunda çalışır. Pompa substratı spesifik tek bir antibiyotik, farklı sınıflardan bir çok antibiyotik veya biyosidler (dezenfektan, antiseptik ve koruyucular) olabilir. Substratlardan herhangi biri ile karşılaşma sonucu pompa sistemi indüklenirse, düzenleyici (baskılayıcı) gende mutasyon ile pompa proteinlerinin aşırı üretimi başlayabilir. Sonuç bir ya da birden çok substrata direnç şeklindedir (MDR/*mar* fenotipi). Gelişen direnç düşük düzeylidir fakat bir mutasyon başka mutasyonları tetikleyebildiği için, genellikle düzenleyici gen mutasyonunun ardından hedef molekül değişikliği, permeabilite azalması gibi diğer bir mutasyon daha gelişir ve direnç düzeyi katlanarak artar.⁸⁶



Şekil 1. Bakterilerde efluks pompası

Bilindiği gibi bakterilerdeki aktif ilaç pompa sistemleri beş protein süper ailesinin üyesidirler:

ATP Binding Casette (ABC);

Major Facilitator Super Family (MFS); *Bacillus subtilis*'de Bmr, *E.coli*'de EmrB, *S.aureus*'da QacA ve QacB.

Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE); *S.aureus*'larda MepA gibi.

Small Multidrug Resistance (SMR); *Escherichia coli*'de EmrE, *S.aureus*'da QacC, QacD, Gram negative bakterilerde QacE gibi.

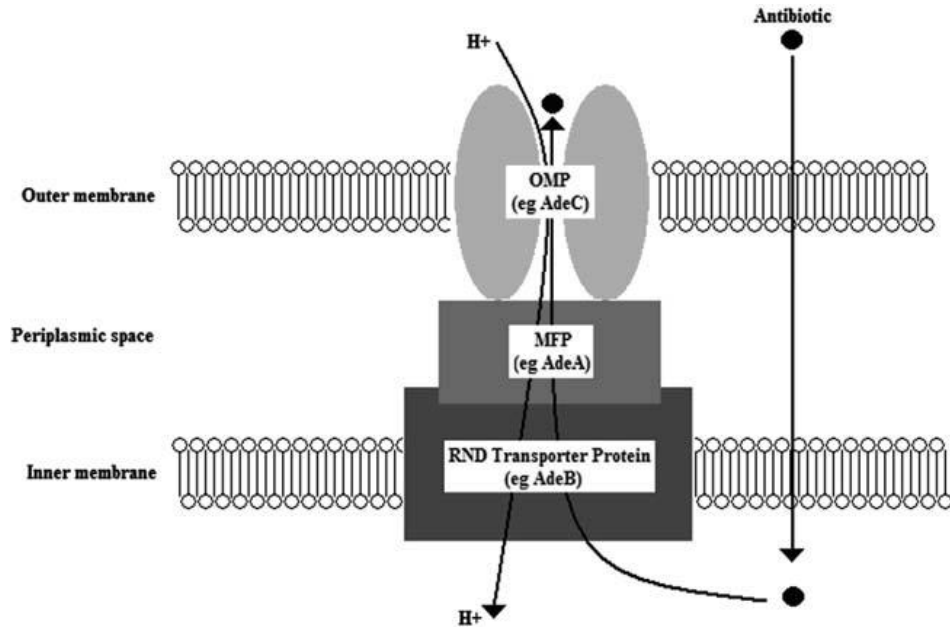
Resistance Nodulation Cell Division (RND); *Pseudomonas aeruginosa*'da MexD, *E.coli*'de AcrD.^{7, 78}

SMR ve RND st aileleri sadece prokaryot hücrelerde bulunmaktadır. Gram-negatif bakterilerin antibiyotik direnci açısından en önemli grup RND st ailesidir. Bu ailenin yeleri tipik olarak i (sitoplazmik) membran proteini, periplazmik aralıktaki membran füzyon proteini ve dış membran kanal proteini olmak üzere üç proteinden oluşmaktadır.

Yeni alışmalarda, *A. baumannii*'nin çoklu ilaç direncinde, *Resistance Nodulation Cell Division* (RND) süper ailesinin üyelerinden olan AdeABC pompa sisteminin çok önemli rolü olduğu üzerinde durulmaktadır.^{7,87,88}

2001 yılında tanımlanan bu pompa sistemlerine örnek olarak *E.coli*'nin Acr ve *Pseudomonas*'ların Mex sistemleri verilebilir. AdeABC

aktif ilaç pompasının substrat profili oldukça geniş olup bazı antibiyotikler ve çok sayıda toksik maddeyi kapsamaktadır. AdeABC, esas transport proteini AdeB, membran füzyon proteini AdeA ve dış membran proteini AdeC'den oluşan üç komponentli bir pompa sistemidir. Sitoplazmik membranda bulunan transport proteini AdeB, substratlarını iç membranın fosfolipit tabakasından veya sitoplazmadan yakalayarak AdeA ve AdeC yardımıyla hücre dışına pompalar. Bir periplazmik protein olan AdeA, AdeB ve AdeC arasındaki bağlantıyı sağlayan aksesuar bir proteindir (Şekil 2). Transportun ana sorumlusu AdeB, AdeC olmadan da başka dış membran proteinlerini kullanarak pompalama işlevini yerine getirebilmektedir.^{5,87,88}



Şekil 2. RND ailesinden üç elemanlı pompa sistemlerinin yapısı

AdeABC pompası, enerji kaynağı olarak '*proton motive force*'u kullanmaktadır. İlaç molekülü hücre dışına pompalanırken gereken enerji, hücreye dış ortamdan bir H⁺ iyonunun alınmasıyla sağlanmaktadır.⁸⁷ AdeABC aktif pompa proteinlerini kodlayan genler, kromozomda bulunurlar ve aynı operon üzerinde yerleşiktirler. Bu

operondaki yapısal genler *adeA*, *adeB*, *adeC*; düzenleyici genler ise *adeS* ve *adeR*'dir (Şekil 3). Bu pompaların ekspresyonu *adeR* ve *adeS* genleri kontrolündedir. Bunlardaki tek bir nokta mutasyonu efluks pompalarının ekspresyonunda artışa neden olur.^{7,87}



Şekil 3. AdeABC pompa proteinlerini kodlayan yapısal ve düzenleyici genler

adeR geninin ürünü AdeR proteini, 228 aminoasitten oluşan transkripsiyon düzenleyici bir protein; *adeS* geninin ürünü AdeS de bir sensör kinazdır.^{7,87}

AdeS, çevresel uyarılara (antibiyotik veya toksik bileşik varlığı) bağlı olarak internal histidini fosforile eder ve fosfatı AdeR düzenleyici proteininin aspartat rezidüsüne transfer eder.^{7,87}

AdeABC ve AbeM dışında son yıllarda varlığı gösterilen diğer bir ilaç pompa sistemi ve bakterinin daha çok doğal direncinde rolü olduğu ileri sürülen RND ailesinin bir üyesi olan AdeIJK pompasıdır.⁸⁹ AdeIJK pompasının substrat olarak kullandığı çeşitli antibiyotikler ve toksik maddeler vardır.⁸⁹ AdeDE ve AdeXYZ de, *A. baumannii*'de yeni tanımlanan diğer pompa sistemleridir.^{90,91} RND ailesi üyesi AdeDE'nin amikasin, seftazidim, kloramfenikol, siprofloksasin, eritromisin, meropenem, rifampin, tetrasiklin, etidyum bromidi substrat olarak kullandığı belirtilmektedir.

AdeXYZ pompasının substrat profili ve klinik önemi henüz tam olarak bilinmemektedir.^{90,91}

Dezenfektanlara karşı direnç

Antibiyotiklere direnç, bakterilerde çok ilgi görmüş ve fazla sayıda çalışma yapılmıştır. Dezenfektanlara karşı direnç mekanizmaları ise çok fazla dikkat çekmemiş ve antibiyotik direnci kadar fazla çalışma yapılmamıştır. Muhtemelen biyosid direncinin nadir ve klinik anlamının fazla olmadığına kabul edilmesi nedeni ile günümüze kadar fazla ilgi çekmemiştir. Ancak son yıllarda dezenfektan direncinin klinik önemi olan bir olay olduğu vurgulanmakta ve bu konuda yapılan çalışmaların sayısında gittikçe artış olduğu görülmektedir.⁸

Başka bir büyüyen tehlike de, antibiyotikler ve dezenfektanlar arasında çapraz direnç oluşumudur. Antibiyotik ve biyosidler arasında çapraz direnç önemli patojenlerde bildirilmiştir. Gram negatif bakteriler hastanelerde çapraz bulaşma yöntemi ile bakteriyemi, deri ve yara enfeksiyonları, pnömoni, menenjit ve üriner sistem enfeksiyonlarına neden olurlar.⁸

İntrinsik ve kazanılmış direnç bakteri suşlarında biyoside karşı duyarlılığının azalmasında önemli rolü vardır, ama çalışmalara göre efluks pompaları yine de major direnç mekanizması olarak sayılmaktadır.^{92,93}

Biyositlere karşı bakteriyel duyarlılığın belirlenmesinde antibiyotiklerdeki gibi Minimum İnhibisyon Konsantrasyonundan (MİK) faydalanılır. MİK testleri vejetatif bakterilere karşı dezenfektan maddelerin etkinliğini gösteren testlerdir. MİK ölçümü biyosid maddelere direnç

durumu hakkında bilgi verse de klinik uygulama farklılık göstermektedir. Çünkü biyositler MİK değerlerinin 1000 katı gibi yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaktadır.^{67,85} Sürekli kullanılan bir dezenfektan maddenin direnç oluşturma durumunun takip edilmesinde MİK testinin yapılması anlamlıdır.⁷⁴ Dezenfektan maddelere direnç ile ilgili yapılan çalışmalarda direnç durumu genellikle MİK değerlerdeki artma ile ifade edilmektedir. Biyositler antibiyotiklerden farklı olarak MİK ya da minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerinden daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılırlar, bu sebeple dışarı atılım sistemleriyle bakteri hücresinden başarı ile atılmazlar.⁹⁴ Buna rağmen mikroorganizmaların çevresel, fiziksel ve kimyasal şartlara adaptasyon gösterdiği için, yoğun olarak kullanılan dezenfektanlara karşı direnç ortaya çıkması şaşılabacak bir durum değildir.

1.1.12. Dezenfektan Direcinin Önemi

Dezenfektan direcinin tıbbi cihazların yetersiz dekontaminasyonuna neden olma riski vardır. Bu durum çapraz enfeksiyonların oluşmasına neden olabilir. Hastanelerde dezenfektanlara dirençli bakteri salgınları ile karşılaşılabilir. Bazı dezenfektan direnç tipleri transfer edilebilmekte olup bu durumun ileride sorun oluşturabileceği kanısı mevcuttur.⁴ Giderek büyüyen bir tehlike de antibiyotikler ve dezenfektanlar arasında çapraz direnç oluşumudur. Özellikle gıda alanında yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar ile antibiyotikler arasındaki çapraz direnç önemli halk sağlığı sorunlarına yol açabilir. Çapraz direnç iki antibakteriyel ajan hedefe ulaşmak için aynı yolu kullanıyorsa (ör.porinler gibi), benzer etki mekanizmasına sahip ise (ör.protein sentez inhibisyonu gibi) veya benzer direnç mekanizmalarına sahip ise (ör. Permeabilite azalması gibi) ortaya çıkabilir. Dezenfektan direncinin yaygın bir hal alıp antibiyotik direnci ile ilgili olabileceği ve ileride

tedavi edilemeyecek enfeksiyonların sayısının artabileceğini ifade edilen yayınlar mevcuttur.⁴

1.1.13. Efluks Pompa İnhibitorleri

Bugüne kadar farklı ailelere üye aktif pompa sistemlerini inhibe eden bir çok bileşik tanımlanmıştır. Bunlar arasında phenylalanyl-arginyl-B naphthylamide (PAβN) ($C_{25}H_{30}N_6O_2 \cdot 2HCl$) ; (MC-207,110) RND tipi pompa sistemlerini inhibe ettiği gösterilen ilk bileşiktir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, phenylalanyl-arginyl-B-naphthylamide'in, bir çok gram negatif bakteride olduğu gibi *A. baumannii*'de de RND tipi AdeABC pompasını inhibe ettiğini ortaya koymuştur.^{95,96} Yeni olarak bir başka bileşiğin 1-(1 naphthylmethyl)-piperazine de (NMP),($C_{15}H_{18}N_2$), *A. baumannii*'de AdeABC pompasını inhibe ederek antibiyotik MİK'lerini belirgin biçimde düşürdüğü ortaya konmuştur.⁹⁷

1.1.14. Pyrosekans

Pyrosekanslama metodu, en basit anlatımla DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitidir. Temel olarak dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı (ssDNA) üzerinde tamamlayıcı sarmalının (complementary DNA) sentezlenmesi şeklinde kendini gösterir. Dizileme primeriyle sabitlenen tek sarmallı kalıp DNA üzerine ardışık olarak akan A, C, G, T nükleotitlerinin kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olması durumunda ortamda bir ışık oluşur. Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotitin bağlanması sırasında oluştuğu tespit edilir. Sabitlenen ssDNA, DNA polimeraz, ATP sulfürlaz, lusiferaz, apiraz, APS ve lusiferin ile inkübe edilir. Nükleotid akışı sırasında tamamlayıcı nükleotidin gelmesi durumunda DNA polimeraz pirofosfat (PPi) açığa çıkmasını sağlar. ATP sulfürlaz enzimi bu PPi'yi kantitatif

olarak ATP'ye dönüştürür. ATP lusiferaz enzimi aracılığıyla lusiferinin oksilusiferin'e dönüşmesini sağlar. Oksilusiferin görülebilir bir ışık yaratır. Bu ışığın şiddeti ATP miktarıyla doğru orantılıdır ve bu sayede aynı dizi üzerindeki tek nükleotit tekrarları (homopolimer) tespit edilir. Ortaya çıkan bu ışık CCD kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar programı yardımıyla sekans datalarına (filogram) dönüşür. Nükleotid akışı sırasında eşleşmeyen nükleotidler ve ortamdaki ATP apiraz tarafından parçalanır ve reaksiyon yeni bir tür nükleotit akışıyla devam eder.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Örnekler

Bu çalışmada 2009 Ocak -2011 Temmuz tarihleri arasında Gazi hastanesi yoğun bakım ünitesinden Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimine gönderilen klinik örneklerden izole edilen 50 tane çoklu ilaç direnci gösteren *Acinetobacter* suşu kullanılmıştır. *Acinetobacter* suşları saklama ortamlarında (mikrobank) uygun koşullarda muhafaza edilmiştir. Bu kolleksiyondaki örneklerle ait epidemiyolojik veriler hastanemizdeki bilgi işlem sisteminden alınmıştır (Tablo 3). Bu suşların alındığı materyallere göre dağılımı: 16 adet endotrakeal aspirat (ETA), 7 adet balgam, 7 adet yara, 6 adet bronş lavaj, 5 adet kan, 4 adet katater kan kültürü, 3 adet beyin omurilik sıvısı (BOS), 1 adet plevra sıvısı, 1 adet idrar şeklindedir. *Acinetobacter* suşları farklı hastalardan izole edilmiş ve aynı hastaya ait birbirine yakın periyotta alınan örneklerden izole edilmiş *A.baumannii* izolatları çalışma dışı bırakılmıştır.

A.baumannii olarak stoklanan ve bu çalışmaya alınan tüm bakteri suşları çalışma öncesi kanlı ve EMB agarda pasajlanarak koloni morfolojisi, mikroskopik görünümü, oksidaz testleri tekrarlanarak *Acinetobacter* oldukları doğrulanmıştır. *Acinetobacter* olduğu düşünülen mikroorganizmalar, otomatize tanı sistemleri (API 20 NE; bioMerieux, Fransa) ve MicroScan 5 WalkAway identifikasyon sistemi (Siemens, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlanmış ve kesin tanıları doğrulanmıştır. Tanıları doğrulanan 50 tane *A.baumannii* suşu bu çalışmaya dahil edilmiştir.

2.2. Gereçler

2.2.1. Laboratuvar Araçları:

Otoklav

Pastör fırını

Sıcak su banyosu

Çalkalayıcı (vortex)

Buzdolabı 20°C derin dondurucu (Ariston, Almanya)

-86°C derin dondurucu (Sanyo, Japonya)

pH metre

Otomatik pipet seti (Labmate, Türkiye)

Cam tüpler

Cam petri plakları (9-10 cm)

Santrifüj (Heraeus, Almanya)

Lamiar kabin (Metisafe, Türkiye)

Ekstraksiyon cihazı (M48-Qiagen) ve (Ez1 advanced-Qiagen)

Real Time PCR cihazı (Rotor-Gene, Q-Qiagen)

Pyrosequence cihazı (PyroMark Q24).

McFarland bulanıklılık ayarı turbidite ölçen cihazı (Dade Behring

MicroScan TurbidityMater).

2.2.2. API 20 NE (bioMerieux, Fransa) İdentifikasyon Panelinde incelenen Özellikler

1. Nitrattan nitrite indirgenme
2. Nitrattan nitrojene indirgenme

3. İndol üretimi
4. Glukoz fermantasyonu
5. Arjinin dihidrolaz aktivitesi
6. Üre hidrolize
7. Eskülin hidrolizi
8. Jelatin hidrolizi
9. Glikoz asimilasyonu
10. Arabinoz asimilasyonu
11. Mannoz asimilasyonu 48
12. Mannitol asimilasyonu
13. N-Asetil glikoz asimilasyonu
14. Maltoz asimilasyonu
15. Potasyum glukonat asimilasyonu
16. Kaprik asit asimilasyonu
17. Adipik asit asimilasyonu
18. Malik asit asimilasyonu
19. Trisodyum sitrat asimilasyonu
20. Fenil asetik asit asimilasyonu
21. Sitokrom oksidaz aktivitesi

2.2.3. Besiyeri

Kanlı Agar (HIMEDIA, İTALYA)

Eozin Methylen Blue Agar (HIMEDIA, İTALYA)

Muller – Hinton Broth ve Agar (HIMEDIA, İTALYA)

Tryptic Soy Agar (HIMEDIA, İTALYA)

2.2.4. Kimyasal Maddeler:

Benzalkonyum klorid (Sigma –Almanya)

Klorhekzidin (Sigma – Almanya)

1-(1-naphythylmethyl)-piperazine (NMP) (Sigma-Aldrich)

Phenylalanyl-arginyl-B-naphtylamide (MC-207,110 /PABN) (Sigma)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)

Etil alkol (Merck)

NaOH (Merck)

CaCl₂·6H₂O

2.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışılacak olan klinik izolatlarda antibiyotik duyarlılığı Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 5 ml'lik tüp içindeki Mueller-Hinton Broth veya Tryptone Soy Broth'a, agardan alınan 3-4 bakteri kolonisi süspanse edildi. Bakteri süspansiyonları 0.5 Mc Farland eşeline göre ayarlandı ve steril eküvyon çubuğu ile besiyerine yayıldı. Antibiyotik diskleri (Bioanalyse Tıbbi Malzemeler San. Ve Tic. Ltd. Şti Ankara/Türkiye) birbirine uzaklıkları merkezden merkeze en az 24 mm olacak şekilde yerleştirildi. 35°C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ölçülen inhibisyon zon çapları CLSI'nın (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerdiği değerler doğrultusunda duyarlı (++) , orta duyarlı (+) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25920 ve *P.aeruginosa* ATCC 2785 kullanıldı.

Bu çalışmada Tigesiklin (15µg), Piperasilin+Tazobaktam (100/10µg), Sulbaktam+Ampisilin (10/10µg), Amoksisilin+Klavuloat (10/20µg), Sefotaksim (30 µg), Seftazidim (30µg), Sefepim (30 µg), Sulbaktam+Sefoperazon (10/10 µg), Siprofloksasin (5 µg), Tobramisin (10

µg), Amikasin (30 µg), Netilmisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), antibiyotik diskleri (BIOANALYSE Tıbbi Malzemeler San. ve Tic. Ltd. Şti Ankara/Türkiye) kullanılarak antibiyotik duyarlılık testleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.6. Dezenfektan MİK'lerinin Pompa İnhibitörleri PABN, NMP Varlığında Ve Yokluğunda Belirlenmesi

2.2.6.1 MİK Sıvı Dilüsyon Yöntemi

A.baumannii olarak tanımlanan izolatların Benzalkonyum klorid ve klorheksidin biyosidlerine duyarlılıklarının belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle, suşların minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri Clinical ve Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına uygun olarak belirlendi.⁹⁸ Mikrodilüsyon yönteminde, Mueller Hinton Buyyon (MHB, Difco) besiyeri kullanıldı. Mueller-Hinton sıvı besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hassas terazide tartıldı distile su içinde çözüldü ve otoklav ile steril edildi. Katyon ayarlaması için kalsiyum stok çözeltisi hazırlandı. Kalsiyum stok çözeltisini hazırlamak için, 3.68 g CaCl₂ 6H₂O 100 mL saf suda çözüldü. Bu çözelti mL'de 10mg Ca⁺⁺ içerir. Soğutulmuş Mueller-Hinton sıvı besiyerine litre başına 0.1 mL Ca⁺⁺ stok çözeltisinden eklendi böylece katyon ayarlı Mueller- Hinton sıvı besiyeri (CAMHB) hazırlandı.

Eflüks pompa inhibitörü içeren Mueller-Hinton sıvı besiyerinin hazırlanması için iki ayrı erlende 500 mL besiyeri hazırlanarak otoklav da steril edildi. Soğutulduktan sonra katyon ayarı yapıldı .Birine daha önceden distile suda çözülmüş PAβN (100mg/100µL) yavaşça eklenmiştir, diğer 500 mL besiyerine dimetil sülfoksitte (DMSO) çözülmüş NMP

(100mg/100 µL) eklenmiştir. Böylece her izolat için test antiseptiklerin MİK'leri, 3 besiyerinde ayrı ayrı olarak belirlenmiştir. Bu besiyerleri, 1) Katyonu ayarlanmış Muller-Hinton (MH) sıvı besiyeri, 2) PAßN içeren katyonu ayarlanmış Mueller-Hinton sıvı besiyeri, ve 3) NMP içeren katyonu ayarlanmış Muller-Hinton sıvı besiyerleridir.

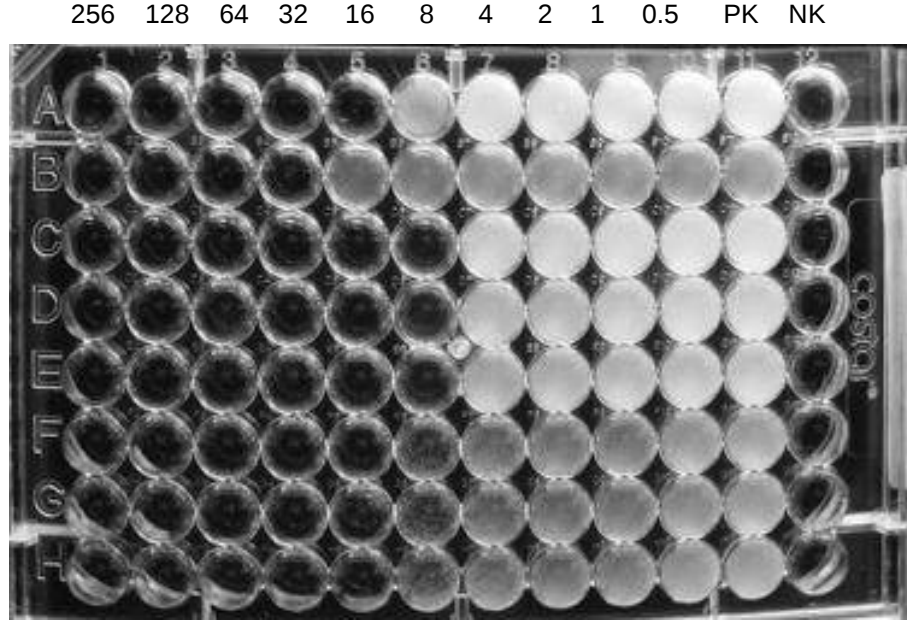
Toz hammadde olarak sağlanan Benzalkonyum klorid <0.5- >128 µg/ml arasındaki konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle 512 µg/ml stok konsantrasyonları hazırlanmıştır. Benzalkonyum klorid 0.512 mg tartılmış ve 10 ml distile suda çözülmüştür (1/10). Daha sonra tekrar 1/100 sulandırılarak 512 µg/mL'lik stok solüsyonları elde edilmiştir. Stok solüsyonlar kullanılıncaya kadar +4° C'de saklanmıştır.

Mc Farland 0.5 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu 1/100 oranında sulandırılarak 5×10^5 CFU/ml yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edildi. Önceden <0.5- >128 µg/ml seri sulandırım yapılmış dezenfektan solüsyonu içeren 96 kuyucuklu U-tabanlı plaklara 100'er µl bakteri süspansiyonu eklendi. Mikropleytlar 35°C'de 16-20 saat inkübe edildi. Gözle üreme saptanmayan en düşük biyosid konsantrasyonu MİK olarak belirlendi.

Test edilen diğer biyosid olan klorhekzidin <1->256 µg/ml arasındaki konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle 1024 µg/ml stok konsantrasyonları hazırlandı. Stoktan 966µl alınarak 34 µl distile suda çözüldü. Daha sonra 1/1000 sulandırılarak 1024 µg/ml konsantrasyonlar elde edilmiştir. Stok solüsyonlar kullanılıncaya kadar +4° C'de saklanmıştır.

Mc Farland 0.5 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu 1/100 oranında sulandırılarak 5×10^5 CFU/ml yoğunlukta bakteri süspansiyonu

elde edildi. Önceden <1->256 µg/ml seri sulandırım yapılmış dezenfektan solüsyonu içeren kuyucuklara 100'şer µl bakteri süspansiyonu eklendi. Mikropleytlar 35°C'de 16-20 saat inkübe edildi (Resim 3).



Resim 3. MIC sıvı dilüsyon yöntemi

2.2.7. Dezenfektan MBK'lerinin Pompa İnhibitörleri PABN, NMP Varlığında Ve Yokluğunda Belirlenmesi

2.2.7.1. MBK Sıvı Dilüsyon Yöntemi

MBK değerlerinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresinin sonunda MİK tüpünden, bulanıklık ve üreme görülmeyen 2-3 kuyucukdan 10'ar µl örnek alınarak petri kutularındaki antiseptiksiz Tryptic Soy Agar (TSA,Difco) besiyerlerinin yüzeyine ekim yapılarak 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun sonucunda oluşan koloniler sayılmış,

başlangıç inokulumunun %99.9'unu öldüren en düşük antiseptik konsantrasyonu MBC değeri olarak belirlenmiştir.

2.2.8. Efluks Gen Bölgelerinin Varlığının Belirlenmesi

Bakterilerden DNA ekstraksiyonu DNeasy Tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA) kitleri ve onların protokoluna uygun olarak yapıldı. Önce 2×10^9 bakteri suspansiyonu mikrosantrifüj tüplerine alındı ve 7500 rpm'de 10 dakika çevrildi. Yukarıda kalan sıvı kısmı atıldı, çökelek kısmına 180 µl ATL buffer ve 20 µl Proteinaz K eklendi ve vorteks yapıldı. Parçalanması için 56°C 'de bekletildi ve arada vortex yapıldı. Parçalandıktan sonra 15 saniye vorteks yapıldı, 200 µl buffer AL eklendi ve vortex yapıldıktan sonra 200 µl %96-100 ethanol ilave edildi ve vorteks yapıldı . Bu karışım DNeasy Mini Spin Column'lara aktarıldı ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi .Mini Spin Colum'lar yeni toplama tüplere yerleştirildi ve üzerine 500 µl AW1 buffer eklendi ve 8000 rpm 'de tekrar santrifüj yapıldı .Bu işlemi tekrarlayıp bu sefer 500 µl AW2 buffer koyarak 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı. Mini spin column'lar santrifüj tüplerine aktarıldı ve son olarak 200 µl AE buffer eklenerek 1dakika oda ısısında beklendikten sonar 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Elde edilen DNA ekstraksiyon materyalının miktarı Nano Drop 1000 cihazı ile ölçüldü ve çoğaltma çalışmaları yapılana kadar -86C°'de saklandı.

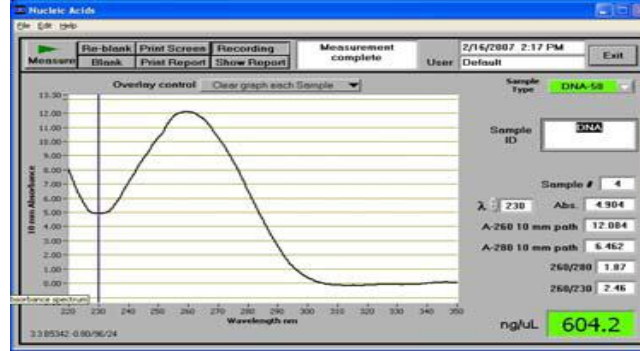
2.2.9. Genomik DNA Miktarının Hesaplanması

Genomik DNA izolasyonunun miktar ve saflık kontrollerinin yapılmasında NanoDrop Spektrofotometre (ND 1000)'den yararlanılmıştır.



Resim 4. NanoDrop Spektrofotometre cihazı

Polimeraz Zincir Reaksiyonuna başlamadan önce izolasyonu yapılan DNA'ların miktarlarının spektrofotometre ile ölçülmeleri önemlidir. Genomic DNA miktarının spektrofotometre ile ölçülmesi, DNA solusyonunun 260/280 nm'deki okuma değerine göre ışığı soğurma (OD) miktarının hesaplanmasına dayanmaktadır. DNA ve RNA örneklerinin saflık dereceleri spektrofotometredeki 260nm ve 280nm değerlerinin oranlanması ile (OD_{260}/OD_{280}) belirlenmektedir. 260 nm dalga boyunda yapılan okuma, örnekteki nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanmasını sağlamaktadır. Örnekte okunan 1 OD absorbans değeri yaklaşık olarak 50µg/ml çift sarmallı DNA ve 40 µg/ml RNA 'nin varlığına işaret etmektedir. Spektrofotometre küvetinde bulunan sıvının 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri birbirine oranlandığında bulunacak OD_{260}/OD_{280} (DNA/protein) oranının 1.8-2.00 değerleri arasında olması arzulanır. Bu oranın 1.8'den düşük olması ortamda protein ya da fenol artıklarının varlığına işaret etmektedir. Dolayısıyla bu maddelerin ortamda varlığı PCR uygulamasının verimini düşürmektedir. DNA izolasyonları sonucu elde edilen DNA'lardan kısa bir vortex'den sonra 2µl alındı . DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrede (Nanodrop) belirlendi (Resim 4).



Şekil 4. Genomik DNA izolasyonunun saflık ve miktarını gösteren bilgisayar programı

2.2.10. AdeB Ve AdeJ Ve QacE Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

Pyrosekansa uygun PCR yapılarak, AdeB ve AdeJ ve QacE gen bölgeleri uygun primerlerle çoğatıldı. Bunun için Qiagen'in Pyromax PCR kiti kullanıldı ve protokola uyarak her gen bölgesi için su, master mix, forward ve reverse primerlerle bir karışım hazırlandı. Reaksiyon miksları hazırlandıktan sonra 20µl PCR tüplerine dağıtıldı. Her bir PCR tüpüne ilgili DNA örneğinden 5µl eklendi ve toplam hacim 25µl' eye ulaştı. Bu şekilde her bir gen bölgesi için üç PCR reaksiyonu hazırlandı. Gen bölgelerinin çoğaltılması için yeterli sıcaklığı sağlamak için Rotor Gene cihazı kullanıldı.

Tasarlanan Primerlerin Dizisi:

Primerler, Qiagen' in 'Pyromark Assay Design Software 2.0' programı ile tasarlanmıştır.

ADEB:TCATGACTCAGTCAGCTACATCAGATGCACTGACA
TGAGCGTACTCGATCGTAGTGCATG

ADEJ:ACGACTAGTAGAGCACTCACTACAGCGATAGAGT
CACGCAGAGAGATGCTAGCATGCGCT

QACE:CGATCGATGTGAGACGTCAGAGACTATATAGCAC
TGCATAGCACACTGTATGATAGATCG

2.2.11. Rotor Gen Hazırlanması

Aktivasyon basamağı 95C° - 15 dakika

3 aşamalı döngü :

Denaturasyon 94C° - 30 saniye

Annealing 60C° - 30 saniye

Extension 72C° - 30 saniye

Döngü sayısı: 45

Final extension (uzama) 72C° - 30 saniye

2.2.12. Pyrosekans Yöntemi

Pyrosekans için bir miks hazırlandı . Streptavidin Sepharose bilyerler, binding buffer ve ultrapure su protokola uygun miktarlarda karıştırıldı. 24 kuyucuklu PCR plate kullanarak her bir kuyucuğa 70µl miks koyuldu ve üzerine her kuyucuğa 10µl ilgili PCR ürünü eklendi. Daha sonar PCR plate'lerinin veya striplerin kapağı sızdırma olmayacak şekilde kapatıldı. Bir kaç kere ters-yüz ettikten sonra çalkalayıcıya 37°C'ye 5-10 dakika bırakılır .Q24 plate'in her bir kuyucuğuna 0.8µl sekans primeri ve 24.2 µl annealing buffer ilave edildi. PCR plate

veya stripleri ve Q24 plate vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirildi ve filter prob unitesi tüplerin içine daldırılıp 15 saniye kadar tutularak bilyeleri yakalandı . El nitesini sırayla %70 etanol,daha sonra denaturasyon solüsyonuna ve washing buffer'e daldırıldı. El unitesinin problemleri Q24 plate kuyucuklarına daldırıp hafifce sallayarak bilyeleri sekans primerlerini içeren buffer'e konuldu. Q24 plate'i önceden 80°C 'ye getirilmiş plate holder üzerine konuldu . Pre Run information Report'da yazan miktarlardaki nükleotitler, enzim ve substrat kartuşa eklendi ve bloka yerleştirildi.

3. BULGULAR

Bu alışmada 2009 Ocak -2011 Temmuz tarihleri arasında hastanemizin yoğun bakımından Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimine rutin amaçla gönderilen klinik örneklerden izole edilen 50 tane çoklu ilaç direnci gösteren *Acinetobacter* suşu seçilmiştir. Bu suşlar test edilen 5 farklı sınıftan (Sefalosporin'ler, Aminoglikozid'ler, Karbapenem'ler, Beta laktamaz'lar, Kinolon'lar,) olan antibiyotiklerin en az 3' ne dirençli bulunmuştur. Bunlara ait epidemiyolojik veriler Tablo 3'de verilmiştir. *A.baumannii* reyen 50 hasta değerlendirildiğinde hastaların ortalama yaşları erişkinlerde 60.72 yıl (15-86) , çocuklarda 2.84 yıl (1-14) idi. Elli hastanın 24' (%48) erkek, 26'sı (%52) kadındı.

Tablo 3. Çalışılan *Acinetobacter* suşlarına ait veriler

İzolat No	Yaş	Sex	Yoğun bakım	Örnek
1	2	K	Pediyatri	ETA
2	66	E	Kalp Damar Cerrahi	ETA
3	2	E	Pediyatri	Kateter içi kan
4	78	E	Anestezi ve Reanimasyon	Yara
5	77	E	Kardiy Koroner	Kateter içi kan
6	2	K	Pediyatri	ETA
7	68	K	Goğus	Balgam
8	26	K	Anestezi ve Reanimasyon	Y
9	69	K	Goğus	ETA
10	15	K	Pediyatri	Balgam
11	45	K	Pediyatri	Yara
12	62	E	Goğus	ETA
13	55	K	Beyin Cerrahi	Yara
14	72	K	Goğus	Bronş lavaj
15	20	E	Pediyatri	ETA
16	1	E	Pediyatri	Kan
17	79	K	Kardiy Kronel	ETA
18	15	E	Beyin Cerrahi	Plevral sıvı
19	71	E	Genel Cerrahi	Bronş lavaj
20	69	K	Genel Cerrahi	Yara
21	5	E	Pediyatri	ETA
22	1	K	Pediyatri	ETA
23	2	K	Pediyatri	Kan
24	32	E	Kalp Damar Cerrahi	Bronş
25	68	K	Beyin Cerrahi	Bos
26	34	E	Beyin Cerrahi	Bos
27	23	E	Genel Cerrahi	Plevral sıvı
28	72	E	Goğus	Balgam
29	2	E	Pediyatri	ETA
30	65	E	Goğus	Balgam
31	2	K	Pediyatri	ETA
32	2	K	Pediyatri	İdrar
33	86	K	Pediyatri	Bronş lavaj
34	1	K	Goğus	ETA
35	74	E	Goğus	ETA
36	79	E	Goğus	ETA
37	69	E	Goğus	ETA
38	75	K	Goğus	Balgam
39	78	K	Goğus	Kan
40	83	K	Genel cerrahi	Yara
41	86	E	Goğus	Balgam
42	44	E	Genel cerrahi	Bos
43	66	K	Goğus	Bronş Lavaj
44	49	E	Genel cerrahi	Yara
45	83	K	Goğus	Kan
46	70	E	Anestezi ve Reanimasyon	Kan
47	3	K	Pediyatri	Kan
48	12	K	Goğus	Bronş Lavaj
49	60	E	Goğus	Kateter içi kan
50	64	K	Kalp Damar Cerrahi	Yara

Acinetobacter suşları en sık olarak göğüs hastalıkları yoğun bakımdan (%34) ve pediatri (%30) servislerinden gelen örneklerden izole edilmişlerdir. Üçüncü sıklıkta ise genel cerrahi yoğun bakımdan (%12) izole edilen suşlardır. Diğer servislerden izole edilen *Acinetobacter* suşlarının oranları ve yüzdeleri Tablo 4’de verilmiştir. İzolatları %32 oranı ile en çok ETA, ikinci sıklıkta ise balgam ve yara örnekleri %14 oluşturmaktadır.

Tablo 4. Çalışılan *Acinetobacter* izolatlarının kliniklere göre dağılımı

Yoğun Bakım	N	(%)
Goğus	17	34
Pediatric	15	30
Genel Cerrahi	6	12
Kalp Damar Cerrahi	5	10
Beyin Cerrahi	4	8
Anestezi ve Reaminasyon	3	6
Toplam	50	100

İzole edilen *A.baumannii* kökenlerinde üçüncü kuşak Sefalosporin’lere, Siprofloksasin, Meropenem’e %90’nın üzerinde direnç saptanmıştır. Tigesiklin laboratuvar şartlarında en etkili antibiyotik olarak saptanmıştır. Aminoglikozid’lerden olan Tobramisin ve Netilmisin ikinci ve üçüncü en etkili antibiyotik olarak bulunmuştur. *A.baumannii* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 5 ve 6’da verilmiştir.

Tablo 7’de Klorhekzidin ve Benzalkonyum klorid MİK ve MBK değerleri gösterilmiştir.

Tablo 5. *Acinetobacter* suşlarındaki antibiyotiklere direnç, orta direnç ve duyarlılık oranları

Antibiyotik	Dirençli suş(%)	Orta dirençli suş (%)	Duyarlı suş (%)
Tigesiklin (TGC)	0	8	92
Piperasilin+Tazobaktam (TZP)	98	-	2
Sulbaktam+Ampisilin (SAM)	78	18	2
Amoksisilin+Klavulanat (AMC)	100	-	0
Sefotaksim (CTX)	98	-	2
Seftazidim (CAZ)	86	6	8
Sefepim (FEB)	92	6	2
Sulbaktam+Sefoperazon (SCF)	62	18	20
Siprofloksasin (CIP)	94	-	6
Tobramisin (TOB)	52	-	50
Amikasin (AK)	72	6	22
Netilmisin (NET)	54	-	46
Gentamisin (CN)	62	6	32
Imipenem (IMP)	82	8	10
Meropenem (MEM)	94	2	4

Tablo 6. A.baumannii antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Hasta No	TGC	TZP	SAM	AMC	CTX	CAZ	FEB	SCF	CIP	TOB	AK	NET	CN	IMP	MEM
1	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	++	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R	R	R	R
3	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4	++	R	R	R	R	R	R	++	R	++	R	++	+	++	R
5	++	R	R	R	R	R	R	++	R	++	++	++	++	R	R
6	++	R	R	R	R	R	R	++	R	R	R	R	R	++	R
7	++	R	+	R	R	R	R	++	R	++	++	++	++	R	R
8	++	R	+	R	R	R	R	++	R	++	+	++	+	++	R
9	++	R	R	R	R	++	R	+	R	++	R	++	++	R	R
10	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
11	++	++	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R	R	R	R
12	++	R	R	R	R	R	R	++	R	++	R	++	++	R	R
13	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
14	++	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	++	R	R	R
15	++	R	+	R	++	++	++	+	R	++	R	++	++	R	R
16	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
17	++	R	R	R	R	R	R	+	R	++	R	++	R	R	R
18	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
19	++	R	R	R	R	R	R	+	R	++	++	++	++	R	R
20	+	R	R	R	R	+	R	R	R	++	R	++	++	R	R
21	++	R	+	R	R	+	R	+	R	++	R	++	++	R	R
22	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R	R	R
23	++	R	++	R	R	++	R	++	R	++	R	++	++	R	R
24	+	R	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R
25	++	R	R	R	R	R	+	R	R	R	R	R	R	R	R
26	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	++	++	R	R	R
27	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
28	++	R	R	R	R	R	R	+	R	++	++	++	++	R	R
29	++	R	R	R	R	R	R	+	R	R	R	R	R	R	R
30	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
31	++	R	R	R	R	R	R	++	++	++	R	++	++	+	R
32	++	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	++	+	R	R
33	++	R	R	R	R	R	R	++	R	++	R	R	R	++	++
34	++	R	R	R	R	R	R	R	R	++	+	++	++	+	R
35	++	R	R	R	R	R	R	+	R	++	R	++	R	R	R
36	++	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R	++	R	R
37	++	R	R	R	R	R	R	+	++	R	R	++	R	R	R
38	++	R	+	R	R	R	R	R	R	R	++	R	++	R	R
39	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	+	R
40	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
41	++	R	+	R	R	++	+	R	R	++	R	R	++	R	R
42	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R	R	R
43	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	++	++	R	R	R
44	++	R	R	R	R	+	+	++	R	++	+	++	R	R	R
45	++	R	R	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R	R	R
46	++	R	+	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R	+	+
47	++	R	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
48	+	R	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
49	+	R	R	R	R	R	R	R	++	R	R	R	R	++	++
50	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Duyarlı (++) , Orta duyarlı (+) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi.

TGC (Tigesiklin), TZP (Piperasilin+Tazobaktam), SAM (Sulbaktam+Ampisilin), AMC (Amoksisilin+Klavulanat), CTX (Sefotaksim), CAZ (Seftazidim), FEB (Sefepim), SCF (Sulbaktam+Sefoperazon), CIP (Siprofloksasin), TOB (Tobramisin), AK (Amikasin), NET (Netilmisin), GN (Gentamisin), IMP (Imipenem), MEM (Meropenem)

3.1. Klorhekzidin İçin MİK Değerleri

Klorhekzidin için MİK değerleri 50 adet hastane suşunun 3 tanesinde (%6) 16µg/ml, 23tanesinde (%46) 32µg/ml, 21tanesinde (%42) 64 µg/ml ve 3 tanesinde (%6) 128 µg/ml olarak belirlendi.Sonuçlar Tablo 8'de gösterilmiştir.

3.2. Benzalkonyum klorid İçin MİK Değerleri

Benzalkonyum klorid için MİK değerleri 50 adet hastane suşunun 4 tanesinde (%8) 8µg/ml, 32 tanesinde (%64)16µg/ml, 13 tanesinde (%26) 32 µg/ml ve 1 tanesinde (%2) 64 µg/ml olarak belirlendi. Tablo 8'de gösterilmiştir.

3.3. Klorhekzidin İçin MBK Değerleri

Klorhekzidin için MBK Değerleri 50 adet hastane suşunun 1 tanesinde (%2) 16µg/ml, 14 tanesinde (%28) 32µg/ml, 21 tanesinde (%42) 64 µg/ml, 13 tanesinde (%26) 128 µg/ml ve 1 tanesinde (%2) 256µg/ml olarak belirlendi. Tablo 9'da gösterilmiştir.

3.4. Benzalkonyum klorid İçin MBK Değerleri

Benzalkonyum klorid için MBK Değerleri 50 adet hastane suşunun 3 tanesinde (%6) 8µg/ml, 16 tanesinde (%32)16µg/ml, 27 tanesinde (%54) 32 µg/ml ve 3 tanesinde (%6) 64 µg/ml ve 1 tanesinde (%2) 128 µg/ml olarak belirlendi. Tablo 9'de gösterilmiştir.

Tablo 7. *Acinetobacter* suşlarının MİK ve MBK değerleri

İzolat No	Klorheksidin MİK µg/ml	Klorheksidin MBK µg/ml	Benzalkonyum klorid MİK µg/ml	Benzalkonyum klorid MBK µg/ml
1	64	64	16	16
2	64	64	16	16
3	32	64	16	16
4	64	128	16	32
5	32	128	8	8
6	32	128	16	32
7	32	64	16	32
8	64	128	16	32
9	16	16	8	16
10	32	32	16	32
11	32	128	16	16
12	32	32	16	16
13	32	64	16	32
14	32	32	16	32
15	16	32	16	16
16	32	64	16	16
17	32	32	32	32
18	32	32	8	8
19	64	64	32	32
20	32	32	16	16
21	32	32	16	16
22	64	64	32	32`
23	32	64	32	64
24	128	256	32	32
25	32	32	16	32
26	32	32	16	32
27	32	64	16	32
28	32	32	16	32
29	32	32	16	32
30	32	64	16	32
31	32	64	16	128
32	32	32	16	32
33	64	64	32	32
34	64	128	16	16
35	64	64	16	16
36	128	128	32	32
37	64	64	32	32
38	64	128	16	16
39	64	64	16	16
40	64	64	64	64
41	16	32	16	16
42	64	128	16	16
43	64	64	32	32
44	64	128	32	32
45	64	64	32	32
46	128	128	32	32
47	64	64	8	8
48	64	128	32	32
49	64	64	16	32
50	64	128	16	64

Tablo 8. *Acinetobacter* suşlarının benzalkonyum klorid ve klorheksidin MİK değerlerinin dağılımı

MİK değerleri (µg/ml)	Benzalkonyum klorid (%)	Klorheksidin (%)
256 (µg/ml)	-	-
128 (µg/ml)	-	3 (%6)
64 (µg/ml)	1 (%2)	21 (%42)
32 (µg/ml)	13 (%26)	23 (%46)
16 (µg/ml)	32 (%64)	3 (%6)
8 (µg/ml)	4 (%8)	-
Toplam	50 (%100)	50 (%100)

Tablo 9. *Acinetobacter* suşlarının benzalkonyum klorid ve klorheksidin MBK değerlerinin dağılımı

MBK değerleri (µg/ml)	Benzalkonyum klorid (%)	Klorheksidin (%)
256 (µg/ml)	-	1 (%2)
128 (µg/ml)	1 (%2)	13 (%26)
64 (µg/ml)	3 (%6)	21 (%42)
32 (µg/ml)	27 (%54)	14 (%28)
16 (µg/ml)	16 (%32)	1 (%2)
8 (µg/ml)	3 (%6)	-
Toplam	50 (%100)	50 (%100)

3.5. Pompa İnhibitörleri NMP Ve PAβN Varlığında Klorheksidin ve Benzalkonyum klorid MİK ve MBK Değerleri

Bizim çalışmamızda 50 *A.baumannii* klinik izolatın 32'sinde klorheksidin ve benzalkoniyum klorid MİK ve MBK değerleri NMP ve PAβN'nin (25 mg/L) varlığında test edildi. Bu izolatların 28 'inde (%87.5) aktif pompa inhibitörleri olan NMP varlığında klorheksidin'e karşı ve 28'inde (%87.5) benzalkonyum klorid'e karşı duyarlı bir direnç fenotipi göstermişlerdir.

Aynı çalışmada klinik izolatlarının 26'sında (%82) aktif pompa inhibitörleri olan PAβN varlığında, Klorheksidin'e karşı ve 29'unda (%90.7) Benzalkonyum klorid'e karşı duyarlı bir direnç fenotipi

görülmüştür. İzolatların %12.5'unda (n:4), pompa inhibitörü NMP'nin varlığında ve izolatların %18'i (n:6) ve %9.3'ünde (n:3) pompa inhibitörü PAβN'nin sırayla klorhekzidin ve benzalkonyum klorid MİK ve MBK'leri üzerinde herhangi bir etkisi saptanmamıştır.

Bu izolatların klorhekzidin MİK ve MBK'lerinde NMP varlığında, 2 ile 16 kat (ortalama 4.06), PAβN varlığında ise 2 ile 8 kat (ortalama 2.81), benzalkonyum klorid MİK'lerinde NMP varlığında, 2 ile 8 kat (ortalama 3.62); PAβN varlığında ise 2 ile 8 kat (ortalama 2.93) arasında düşüşlere neden olmuştur (Tablo 10,11,12).

Tablo 10. Klinik izolatların pompa inhibitörleri PAβN ve NMP varlığında yapılan sıvı mikrodilüsyon testlerinde klorhekzidin ve benzalkonyum klorid MİK sonuçları

İzolat No	İnhibitör	Klorhekzidin MİK µg/ml	Benzalkonyum klorid MİK µg/ml
1	İnhibitörsüz	64	16
	+NMP	8	4
	+PABN	32	4
2	İnhibitörsüz	64	16
	+NMP	32	16
	+PABN	64	8
3	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	4	2
	+PABN	4	2
4	İnhibitörsüz	64	16
	+NMP	32	8
	+PABN	64	8
5	İnhibitörsüz	32	8
	+NMP	4	4
	+PABN	8	8
6	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	32	4
	+PABN	32	8
7	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	8	8
	+PABN	8	4
8	İnhibitörsüz	64	16
	+NMP	16	4
	+PABN	32	8
9	İnhibitörsüz	16	8
	+NMP	8	8
	+PABN	16	4
10	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	16	4
	+PABN	16	4

13	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	8	4
	+PABN	8	4
14	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	8	4
	+PABN	8	4
15	İnhibitörsüz	16	16
	+NMP	4	4
	+PABN	8	8
16	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	8	4
	+PABN	16	4
17	İnhibitörsüz	32	32
	+NMP	32	8
	+PABN	32	8
19	İnhibitörsüz	64	32
	+NMP	64	8
	+PABN	16	8
20	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	2	4
	+PABN	4	4
21	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	16	16
	+PABN	16	8
22	İnhibitörsüz	64	32
	+NMP	8	4
	+PABN	16	16
23	İnhibitörsüz	32	32
	+NMP	16	8
	+PABN	16	8
24	İnhibitörsüz	128	32
	+NMP	32	4
	+PABN	16	4
25	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	32	16
	+PABN	32	16
26	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	8	4
	+PABN	16	8
27	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	8	8
	+PABN	8	8
28	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	8	4
	+PABN	16	4
29	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	4	4
	+PABN	8	16
36	İnhibitörsüz	128	32
	+NMP	32	8
	+PABN	64	16
37	İnhibitörsüz	64	32
	+NMP	16	8

	+PABN	16	16
38	Inhibitörsüz	64	16
	+NMP	16	4
	+PABN	32	8
39	Inhibitörsüz	64	16
	+NMP	32	8
	+PABN	32	8
40	Inhibitörsüz	64	64
	+NMP	16	8
	+PABN	16	16
43	Inhibitörsüz	64	32
	+NMP	16	16
	+PABN	32	16

Tablo 11. Klinik izolatların pompa inhibitörleri PAßN ve NMP varlığında yapılan sıvı mikrodilüsyon testlerinde klorhekzidin ve benzalkonyum klorid MBK sonuçları

İzolat No	İnhibitör	Klorhekzidin MBK µg/ml	Benzalkonyum klorid MBK µg/ml
1	İnhibitörsüz	64	16
	+NMP	8	4
	+PABN	32	4
2	İnhibitörsüz	64	16
	+NMP	32	16
	+PABN	64	8
3	İnhibitörsüz	64	16
	+NMP	8	2
	+PABN	8	2
4	İnhibitörsüz	128	32
	+NMP	64	16
	+PABN	128	16
5	İnhibitörsüz	128	8
	+NMP	16	4
	+PABN	32	8
6	İnhibitörsüz	128	32
	+NMP	128	8
	+PABN	128	16
7	İnhibitörsüz	64	32
	+NMP	16	16
	+PABN	16	8
8	İnhibitörsüz	128	32
	+NMP	32	8
	+PABN	64	16
9	İnhibitörsüz	16	16
	+NMP	8	16
	+PABN	16	8
10	İnhibitörsüz	32	32
	+NMP	16	8
	+PABN	16	8
13	İnhibitörsüz	64	32
	+NMP	16	8
	+PABN	16	8
14	İnhibitörsüz	32	32
	+NMP	8	8
	+PABN	8	8
15	İnhibitörsüz	32	16
	+NMP	8	4
	+PABN	16	8
16	İnhibitörsüz	64	16
	+NMP	16	4
	+PABN	32	4
17	İnhibitörsüz	32	32
	+NMP	32	8
	+PABN	32	8
19	İnhibitörsüz	64	32
	+NMP	64	8

	+PABN	16	8
20	Inhibitörsüz	32	16
	+NMP	2	4
	+PABN	4	4
21	Inhibitörsüz	32	16
	+NMP	16	16
	+PABN	16	8
22	Inhibitörsüz	64	32
	+NMP	8	4
	+PABN	16	16
23	Inhibitörsüz	64	64
	+NMP	32	16
	+PABN	32	16
24	Inhibitörsüz	256	32
	+NMP	64	4
	+PABN	32	4
25	Inhibitörsüz	32	32
	+NMP	32	32
	+PABN	32	32
26	Inhibitörsüz	32	32
	+NMP	8	8
	+PABN	16	16
27	Inhibitörsüz	64	32
	+NMP	16	16
	+PABN	16	16
28	Inhibitörsüz	32	32
	+NMP	8	8
	+PABN	16	8
29	Inhibitörsüz	32	32
	+NMP	4	8
	+PABN	8	32
36	Inhibitörsüz	128	32
	+NMP	32	8
	+PABN	64	16
37	Inhibitörsüz	64	32
	+NMP	16	8
	+PABN	16	16
38	Inhibitörsüz	128	16
	+NMP	32	4
	+PABN	64	8
39	Inhibitörsüz	64	16
	+NMP	32	8
	+PABN	32	8
40	Inhibitörsüz	64	64
	+NMP	16	8
	+PABN	16	16
43	Inhibitörsüz	64	32
	+NMP	16	16
	+PABN	32	16

Tablo 12. Klinik izolatlarında pompa inhibitörleri NMP ve PAßN'in klorhekzidin ve benzalkonyum klorid MİK ve MBK'lerinde kaç katlık düşüşlere yol açtıkları

İzolat No	İnhibitör	Klorhekzidin	Benzalkonyum klorid
1	+NMP	8	4
	+PABN	2	4
2	+NMP	2	0
	+PABN	0	2
3	+NMP	8	8
	+PABN	8	8
4	+NMP	2	2
	+PABN	0	2
5	+NMP	8	2
	+PABN	4	0
6	+NMP	0	4
	+PABN	0	2
7	+NMP	4	2
	+PABN	4	4
8	+NMP	4	4
	+PABN	2	2
9	+NMP	2	0
	+PABN	0	2
10	+NMP	2	4
	+PABN	2	4
13	+NMP	4	4
	+PABN	4	4
14	+NMP	4	4
	+PABN	4	4
15	+NMP	4	4
	+PABN	2	2
16	+NMP	4	4
	+PABN	2	4
17	+NMP	0	4
	+PABN	0	4
19	+NMP	0	4
	+PABN	4	4
20	+NMP	16	4
	+PABN	8	4
21	+NMP	2	0
	+PABN	2	2
22	+NMP	8	8
	+PABN	4	2
23	+NMP	2	4
	+PABN	2	4
24	+NMP	4	8
	+PABN	8	8
25	+NMP	0	0
	+PABN	0	0
26	+NMP	4	4
	+PABN	2	2
27	+NMP	4	2
	+PABN	4	2

28	+NMP	4	4
	+PABN	2	4
29	+NMP	8	4
	+PABN	4	0
36	+NMP	4	4
	+PABN	2	2
37	+NMP	4	4
	+PABN	4	2
38	+NMP	4	4
	+PABN	2	2
39	+NMP	2	2
	+PABN	2	2
40	+NMP	4	8
	+PABN	4	4
43	+NMP	4	2
	+PABN	2	2
Pompa inhibitörlerinin dezenfektan MİK'lerinde ortalama kaç katlık düşüşe yol açtığı		+NMP 4.06 +PABN 2.81	3.62 2.93

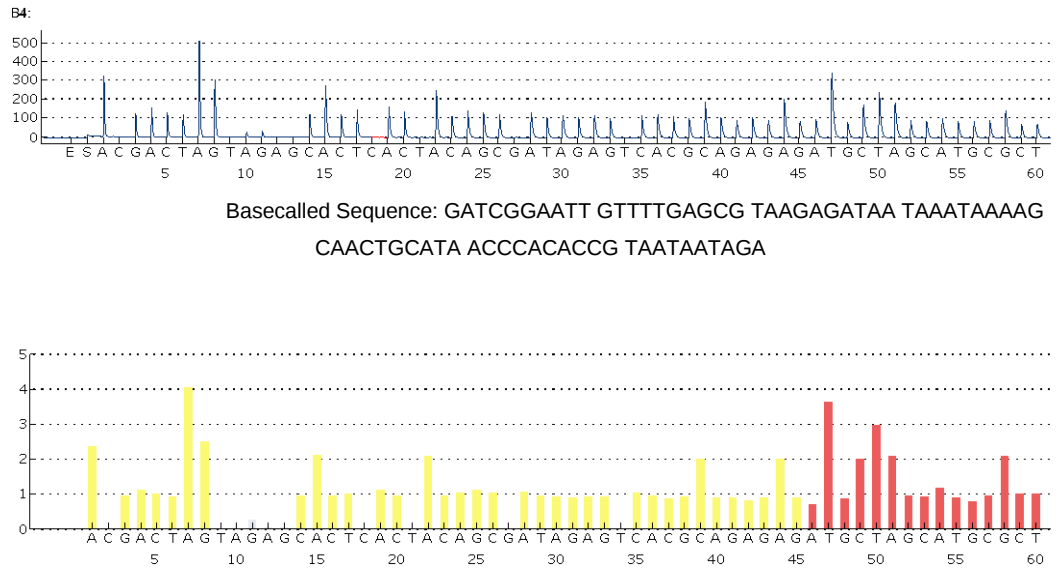
Tablo 13 : Pompa inhibitörlerinin klorhekzidin ve benzalkonyum klorid MİKve MBK’lerinde ortalama kaç katlık düşüşe yol açtığı

Biyosid + pompa inhibitörü	İzolat sayısı	(%)	Ortalama kaç katlık düşüşe yol açtığı
Klorhekzidin + NMP	4	12.5	0
	7	21.8	2
	15	46.8	4
	5	15.6	8
	1	3.1	16
Klorhekzidin + PAβN	6	18.9	0
	13	40.6	2
	10	31.2	4
	3	9.3	8
	0	0	16
Benzalkonyum klorid + NMP	4	12.5	0
	6	18.7	2
	18	56.2	4
	4	12.5	8
	0	0	16
Benzalkonyum klorid + PAβN	3	9.3	0
	15	46.8	2
	12	37.5	4
	2	6.25	8
	0	0	16

3.6. AdeB, AdeJ, QacE Efluks Genleri

Çalışmamızda Pyrosekans yöntemi ile çoklu ilaç direnci gösteren *Acinetobacter baumannii* 'lerin AdeB, AdeJ, QacE genlerini araştırdık ve bu genlerin pozitifliğini %100 tespit ettik. Ayrıca bu genlerin

hiç birinde mutasyon görülmedi. Pyroskans nükleotid sekansları ve grafiği Şekil 5'de gösterilmiştir. Tüm bakteriler yoğun bakım ünitesine ait olduğu için ve çoklu ilaç direnci gösterdikleri için bu genlerin hepsinde bulunması şaşırtıcı değildir. Bu proteinlerin yapısal düzeyde ekspresyonu, bakterinin doğal direncine önemli katkıda bulunurken; yüksek düzeyde ekspresyonu klinikte sorun teşkil eden çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.¹¹⁴



Şekil 5. Pyroskans analizlerinin sonuçları

4. TARTIŞMA

Günümüzde hastane enfeksiyonları giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Farklı çalışmalarda, hastane enfeksiyonlarının oranı yaklaşık %5-10 aralığında verilmektedir. YBÜ 'lerinde diğer servislere göre daha sık hastane enfeksiyonuna rastlanılmaktadır.²¹ Aksaray ve arkadaşlarının yaptığı çok merkezli bir çalışmada, YBÜ'lerinde hastane enfeksiyonu oluşturmuş mikroorganizmalar içerisinde *Acinetobacter*'ler %21.6 ile ikinci sıklıkta etken olarak bulunmuştur.⁹⁹ Esen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %10.7 ile 4. Sırada,¹⁰⁰ Dizbay ve arkadaşlarının 2005-2006 yılları arasında yaptığı çalışmada ise *Acinetobacter* suşları birinci sırada etken bulunmuştur.¹⁰¹ Gazi Hastanesi Enfeksiyon Kontrol Komitesi Hastane İnfeksiyonları Sürveyansları sonuçlarında *Acinetobacter* 2009'da %22.2, 2010'da %23.7 ve 2011'de %20.8 olarak birinci sırada bulunmuştur.

Nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonları 1970'li yıllarda gentamisin, minosiklin, nalidiksik asit, ampisilin ve karbesilin ile tek başına veya kombine kullanılarak kolayca tedavi edilebilmekteyken, 1971–1974 yılları arasında gittikçe direnç artışı görülmeye başlamıştır. Bugün *Acinetobacter* kökenleri sıklıkla, aminopenisilinler, üreidopenisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefamisinler, aminoglikozidler gibi antibiyotiklerin büyük kısmına yüksek oranda direnç göstermektedir. Geniş spektrumlu sefalosporinler, imipenem, tobramisin, amikasin ve florokinolonlara karşı duyarlılık halen değişik oranlarda devam etmekle birlikte, son on yılda bu antibiyotiklerin *Acinetobacter* spp. için MİK değerlerinde artış görülmektedir. *Acinetobacter* suşlarında karbapenemlere direnç geliştirme potansiyeli de endişe kaynağıdır. Dünyanın pek çok yerinde epidemiyolojik çalışmalar karbapenemlere dirençli *A.baumannii* suşlarını bildirirken, Dauner ve ark. yaptıkları çalışmada, 129 *A.baumannii* suşunda, imipenem ve meropeneme

duyarlılığı sırasıyla %97.7 ve %95.3 olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada amikasin %93.6 ve tobramisine %92.3 duyarlılık saptanırken, gentamisin duyarlılığı %40.5'dur.¹⁰² Gülhan ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, 2004 ve 2006 yıllarındaki antibiyotik direnç değişimleri göz önüne alındığında meropenem ve imipenem en etkili antibiyotikler olarak bulunmuş ve bunu amikasin izlemiştir.¹⁰³ Özdemir ve ark. imipenem duyarlılığını %30, amikasin %24, gentamisin %18 ve siprofloksasin duyarlılıklarını %14 olarak tespit etmişlerdir.³⁵ Ersavaş 2009'da imipenem duyarlılığını %56, amikasin %24, gentamisin %8 ve siprofloksasin duyarlılıklarını %0 olarak belirlemişken,¹⁰⁴ bizim çalışmamızda imipenem, amikasin, gentamisin ve siprofloksasin duyarlılıkları sırayla %12, %24, %34 ve %8 bulunmuştur. Sefoperazone/sulbaktam, özellikle *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen bir ilaç olmasına rağmen yıllar içinde bu ilaca direnç gelişmiştir. Sefoperazone/sulbaktam duyarlılığını Özdemir ve ark. %40³⁵, Sarıgözel 2008 'de Kayseri'de %31¹⁰⁵, Ersavaş 2009 'da Isparta'da %28¹⁰⁴ olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda Sefoperazone/sulbaktam duyarlılığı %22 dir. Bu durum hastanemizde izole edilen *Acinetobacter* suşlarındaki direnç problemini ortaya koymaktadır. Antimikrobik ajanların aşırı ve kontrolsüz kullanımı direncin çok daha kolay ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Tigesiklin'nin etkinliği, 1997 yılından beri yapılan çok sayıda çalışmada araştırılmıştır. Geniş spektrumlu bu antibiyotiğin, çoklu ilaç direnci olan *Acinetobacter* suşlarında etkili olduğu gözlenmiştir.¹⁰⁶ Tigesiklin, Türkiye'de 2008 yılında klinik kullanıma girmiştir ve tetrasikline benzerlik gösteren geniş spektrumlu bir antibiyotik olup, 30S ribosomal alt birime bağlanarak protein sentezini engeller. Tigesiklin ile yapılan çok sayıdaki çalışmada farklı sonuçlar bildirilmektedir. Pachón-Ibáñez ve ark. imipeneme dirençli *A.baumannii* suşlarından %92'sini tigesikline duyarlı olarak bildirmişken,¹⁰⁷ Navon-Venezia ve ark. çoklu dirençli *A.baumannii* suşlarında yaptıkları benzer bir çalışmada suşların sadece %22'sini tigesikline duyarlı olarak bulmuşlardır.¹⁰⁸ Türkiye'deki bazı çalışmalarda *Acinetobacter*'lerin tigesiklin

duyarlılığı %99-%100 bulunmuşken^{35,105}, bizim çalışmamızda *Acinetobacter* suşlarının %92 'si tigesikline duyarlı ve %8 'i orta dirençlidir ve bu antibiyotik laboratuvar şartlarında en etkili antibiyotik olarak saptanmıştır. Aminoglikosidlerden olan tobramisin (%50) ve netilmisin (%48) ikinci ve üçüncü en etkili antibiyotik olarak bulunmuştur. Sarıgül çalışmasında da tobramisin (%41) en etkili ikinci antibiyotik olarak bildirilmiştir.¹⁰⁵

Önceki yıllarda diğer hastanelerde yapılmış çalışmaların verileri ile karşılaştırıldığında hastanemizin *Acinetobacter* suşlarının netilmisin ve tigesiklin gibi antibiyotiklere duyarlılığının yüksek olduğu, imipeneme daha az duyarlı olduğu görülmüştür. İmipeneme duyarlılığın düşük olmasının bu antibiyotiğin son yıllarda hastanemizde çok fazla kullanılıyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde, Gazi hastanesinde dahil olmak üzere yaygın şekilde dezenfektan maddeler kullanılmaktadır. Hastane enfeksiyonları etkeni olabilen *Acinetobacter baumannii* 'ların çok sayıda antibiyotik maddeye olduğu gibi dezenfektan maddelere de dirençli olabildikleri bilinmektedir. Hastane ortamından ve yatan hastalardan izole edilen bakteri suşları dezenfektanlara daha az duyarlıdır. Bu durumun temelinde seleksiyon ve mutasyonlar önemli rol oynamaktadır.⁶⁶

Hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde antisepsi, dezenfeksiyon ve sterilizasyon işlemlerinin uygun bir biçimde planlanması ve sürdürülmesi büyük önem taşımaktadır.

Kuarterner amonyum bileşikleri cildin operasyon öncesi dezenfeksiyonu, mukoz membranlara uygulama ve kritik olmayan yüzeylerin dezenfeksiyonu gibi çeşitli klinik amaçlar için

kullanılmaktadırlar. Klorhekzidin antiseptik ürünler içerisinde özellikle el yıkamada en yaygın olarak kullanılan biyosiddir, fakat aynı zamanda dezenfektan ve koruyucu olarak da kullanılır. Yapılan bir çalışmada, kuarternler amonyum bileşiklerinin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri *Pseudomonas*'ta oldukça yüksek, *Klebsiella* ve *Acinetobacter*'de yüksek olarak bulunmuştur.¹⁰⁹ Diğer bir çalışmada hastaneden izole edilen 69 adet MRSA suşunun Benzalkonyum Klorür için MİK değerleri 2µg/ml (%50), 4µg/ml (%40), 8µg/ml (%10) ve Klorhekzidin için MİK değerleri 2µg/ml (%59.5), 4µg/ml (%36), 8µg/ml (4.5%) bulunmuştur.¹¹⁰

Öztürk *S.aureus*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* bakterilerinin Benzalkonyum klorid MİK değerlerini sırayla 0.5, 32, 250 µg/ml ve klorhekzidin MİK değerlerini sırayla 0.5-1, 1, 5-60 µg/ml bulmuştur. *S.aureus*'un değişik biyosidler için MİK değerlerinin *E. coli* ve *P. aeruginosa*'dan 10-500 kat daha düşük olduğunu göstermiştir.¹¹¹

Govindan Rajamohan ve ark. 2010'da yaptıkları çalışmada *Acinetobacter*'lerin benzalkonyum klorid MİK değerlerini 15-120 µg/ml arasında ve klorhekzidin MİK değerlerini 16-100 µg/ml arasında belirlemişlerdir.¹¹²

Bizim çalışmamızda *A.baumannii* suşlarının benzalkonyum klorid için MİK değerleri 8-64µg/ml arasında değişirken, klorhekzidin için MİK değerleri 16-128µg/ml arasındadır. Böylece MİK değerleri birbirine yakın bulunmuştur.

Mikroorganizmaların dezenfektanlara karşı duyarlılıkları yapısal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir, direncin zamanla değişim gösterebileceği göz önüne alınarak bu etkinliğin belirli periyotlarla kontrolü yapılmalıdır.⁶⁵

Değişik dezenfektanlara karşı artmış MİK değerlerinin bakterisidal etkide bir değişikliğe yol açmadığını ve bu nedenle çok önemli olmadığını belirten yayınlar varsa da dezenfektan direncinin antibiyotiklere dirençli suşların seleksiyonuna neden olduğunu, bakteriler arasında antibiyotiklere ve dezenfektanlara direnç genlerinin de içinde bulunduğu genetik materyalin alışverişinin olduğunu belirten yayınlar da vardır.⁶⁶ Hatta Russell dezenfektan direncinin koresistans, krosresistans veya koseleksiyonla antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına neden olabileceğini düşünmektedir.⁷⁶ Dezenfektanlar sağlık kuruluşlarında, veterinerlikte, gıda sanayinde, kozmetik sanayinde, temizlik ürünleri olarak evlerde ve tüm dünyada yaygın kullanılmaktadır. Bu nedenle dezenfektanlarla antibiyotikler arasında çapraz direnç olup olmadığı ve dezenfektanlarla antibiyotikler arasındaki diğer ilişkiler net olarak aydınlatılmalıdır. Yoksa günümüzde akademik bir sorun olan dezenfektan direnci daha sonraki yıllarda karşımıza bir halk sağlığı sorunu olarak çıkabilir .^{66,76,93}

Son yıllarda *A. baumannii*'nin ilaç direncinde, aktif pompa sistemlerinin de etkin rol oynadığını ileri süren çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Yeni bazı çalışmalar *A. baumannii*'nin çoklu ilaç direncinde, RND protein ailesine üye AdeABC, AdeIJK pompa sistemlerinin etkin rol oynadığına dikkat çekmektedir.^{87,89} Bu pompalar benzerleri gibi oldukça geniş bir substrat profiline sahip olup farklı sınıftan bir çok antibiyotiği, toksik bileşiği, boyaları aktif olarak hücre dışına pompalayabilmektedir. Üç komponentli AdeABC ve AdeIJK pompa sisteminin esas transport proteini, membran yerleşimli AdeB ve AdeJ'dir.⁸⁷ Bu proteinlerin yapısal düzeyde ekspresyonu, bakterinin doğal direncine önemli katkıda bulunurken, yüksek düzeyde ekspresyonu klinikte sorun teşkil eden çoklu ilaç direnci ve dezenfektan direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. AdeB ve AdeJ'nin ekspresyon düzeyi kompleks mekanizmalarla düzenlenmekte ve çevrede antimikrobiyal ilaç ya da toksik bileşik varlığı, ekspresyon düzeyini arttırmaktadır.^{113,114}

Diğer taraftan Kuarterner Amonyum Bileşiklerine dirençli izolatların çoğu bir ya da daha çok efluks pompasına sahiptirler. Örneğin Qac genleri yüksek düzeyde dezenfektan ve antiseptik ajanlara direnç ile ilgilidir ve bu genleri sergileyen bakteriler duyarlı kontrol türlerinden dört-beş kat fazla minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerine sahiptirler. Hem gram-pozitif bakterilerde (*qac A*, *qac B* ve *smr*, *qac G*, *qac H*) hem de gram-negatif bakterilerde (*emr E*, *qac E* ve *qac EΔ1*) tanımlanmıştır.^{8, 9}

Bakterilerdeki pompa sistemleri, substratları olan ilaçlardan herhangi birinin kullanımı ile indüklenebilir ve tüm substratlara karşı direncin gelişmesine neden olur. Spesifik pompa inhibitörleri pompaların aktivitelerini baskılar. Böylelikle bakteriyel direncin üstesinden gelmek ve varolan antibiyotiklerin ve dezenfektanların aktivitesini artırmak için temel yaklaşım, direnç inhibitörlerinin kullanılmasıdır. Bu yaklaşımda antibiyotik veya dezenfektan, direnci nötralize eden bir inhibitörle beraber kullanılır.^{115, 116} İn vitro sinerji testlerinde [MC-207,110 (phenyla-lanyl-arginyl-β-naphthylamide)], CCCP veya 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) gibi inhibitörlerin eklenmesiyle antibiyotiklerin minimum inhibisyon değerlerinde (MİK) dört kat veya daha fazla azalma olması anlamlı olarak değerlendirilmektedir.¹¹⁷

Son zamanlarda, efluks pompasına bağlı direnci önlemek için efluks pompası inhibitörlerinin araştırılması ve geliştirilmesi üzerine ilgi gittikçe artmaktadır. RND tipi efluks inhibitörü olan PAβN'in *E. coli*'nin AcrAB efluks pompası ile birlikte *P. aeruginosa*'nın MexAB-OprM, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN efluks pompalarını inhibe ettiği gösterilmiştir. PAβN ile *P. aeruginosa*'da efluks pompasına bağlı direncin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir.¹¹⁸ Yeni olarak bir başka bileşiğin 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine de (NMP), *A. baumannii*'de AdeABC pompasını inhibe ederek antimikrobiyal MİK'lerini belirgin biçimde düşürdüğü ortaya konmuştur.⁹⁷

Bizim çalışmamızda 50 *A.baumannii* klinik izolatın 32'sinde klorhekzidin ve benzalkonium klorid MİK ve MBK değerleri NMP ve PAßN'nin (25 mg/L) varlığında test edildi. Klinik izolatlarının NMP varlığında, Klorhekzidin MİK ve MBK değerlerinde ortalama %4.06 (0-16 kat) ve PAßN varlığında ortalama %2.81 (0-8 kat) azalma saptandı. Bu izolatların NMP varlığında Benzalkonium klorid MİK ve MBK değerlerinde ortalama %3.62 (0-8 kat) ve PAßN varlığında %2.93 (0-8 kat) azalma saptandı(Tablo 11,12) . Sonuçlar daha önceki yapılan çalışma¹¹² ile uyumlu bulunmuş olup, MİK ve MBK 'larında azalma olmayan suşların varlığında muhtemelen başka pompa proteinlerinin varlığının bulunabileceği düşünülmektedir.

Rajamohan ve ark. 2010 'da AdeB, AdeJ ve QacE efluks genlerinin bulunduğu, grup II ve III *Acinetobacter* suşlarında CCCP ve PAßN efluks inhibitorlerinin Klorhekzidin MİK 'lerinde 5 kat ve Benzalkonium klorid MİK 'lerinde 3 kat azalmaya sebep olduğunu ortaya çıkarmışlardır.¹¹²

Bizim çalışmamızda, 32 dirençli *A. baumannii* klinik izolatı 25 mg/L PAßN konsantrasyonunda test edildiğinde, klorhekzidin MİK ve MBK 'ları suşların %9.3'ünde 8 kat azalmaya, %31.2'sinde 4 kat azalmaya ve %40.6'sında 2 kat azalmaya, %18.9'unda ise herhangi bir azalmaya neden olmamıştır. Benzalkonium klorid MİK ve MBK'ları suşların %6.25'inde 8 kat azalmaya, %37.5'ünde 4 kat azalmaya, %46.8'inde 2 kat azalmaya, %9.3'ünde ise herhangi bir azalmaya neden olmadığı saptanmıştır(Tablo 13).

Çalışmamızda, 32 dirençli *A. baumannii* klinik izolatı 25 mg/L NMP konsantrasyonunda test edildiğinde, klorhekzidin MİK ve MBK'ları suşların %3.1'inde 16 kat azalmaya, %15.6'sında 8 kat

azalmaya, %46.8'inde 4 kat azalmaya, %21.8'inde 2 kat azalmaya ve %12.5'unda ise herhangi bir azalmaya neden olmamıştır. Benzalkonium klorid MİK'leri suşların %12.5'unda 8 kat azalmaya, %56.2'sinde 4 kat azalmaya, %18.7'sinde 2 kat azalmaya, %12.5'ünde ise herhangi bir azalmaya neden olmadığı saptanmıştır(Tablo 13). Bu bulgular efluks pompalarının biyosidlerde yüksek MİK 'lerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. MDR efluks pompalarının farmakolojik inhibisyonu *Acinetobacter* türlerindeki dezenfektan direncini tersine çevirmek için çekici bir amaç olabilir.¹¹

MİK'lerinde azalma olmayan suşlardaki direncin, efluks pompa sistemi dışındaki direnç mekanizmalarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Govindan Rajamohan ve ark. *Acinetobacter* suşlarında RT-PCR metodu ile AdeB, AdeJ ve QacE efluks genlerini incelemiş ve bu genlerin ekspresyonunu sırayla %55.8, %100 ve %40.6 olarak bildirmişlerdir. Bu genlerin *Acinetobacter* 'lerde biyosid MİK değerlerinin yükselmesinde etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir.¹¹²

Bizim çalışmamızda da bu genler pyrosekans yöntemiyle araştırılmıştır. Pyrosekans Real Time, sekans tabanlı bir teknolojidir. Üstelik kolay ve güvenilir bir yöntemdir. Separasyon, jel, label ya da prob gerektirmez. Pyrosekanslama, DNA sentezi esnasında açığa çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayanan bir gerçek zamanlı kantitatif dizi analizi tekniğidir.¹¹⁹

Sonuçlar, yazılım tarafından kolaylıkla Excel ve/veya Text formatına dönüştürülebilir. Pyrogram grafikleri de tek tek veya grup olarak kolaylıkla kaydedilebilir ve yazdırılabilir.

Pyrosekanslama yöntemi ile 2 gün kadar kısa bir sürede 50 *Acinetobacter* suşunda 3 gen bölgesinin belirlenmesi ve bu genlerde mutasyon olup olmadığı ortaya konmuştur. Bu süre DNA dizi analizi yöntemlerine kıyasla oldukça kısadır. Bu durum rutin laboratuvarlarda uygulama kolaylığı sağlamaktadır. Ayrıca Pyrosekanslama yönteminin test birim fiyatı DNA dizi analizi yöntemlerinin test birim fiyatına yakın olup, ters hibridizasyon testlerine kıyasla ucuzdur.

Çalışmamızda Pyrosekans yöntemi ile AdeB, AdeJ, QacE gen varlığı %100 tespit ettiğimiz *Acinetobacter baumannii* 'lerin %48'inde Klorhekzidin MİK değerleri 64 µg/ml ve üzerinde, Benzalkonyum klorid MİK değerleri ise %28'inde 32 µg/ml ve üzerinde bulunmuştur. Tüm bakterilerin yoğun bakım ünitesinden izole edilmesi ve çoklu ilaç direnci göstermeleri nedeniyle tüm suşlarda bu genlerin bulunması ve MİK değerlerinin yüksek çıkması şaşırtıcı değildir. Bu sonuçlara bağlı olarak, *A.baumannii* izolatlarının dezenfektan direncinde, RND tipi bir aktif pompanın önemli katkısı olduğu kanısına varılmıştır. Bu nedenle kesin sonuç almak için bu genlerin transkripsiyon düzeylerinin RT-PCR yöntemi ile saptanması gerekmektedir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak değişik fizik ve kimyasal çevre şartlarına uyum sağlayabilen mikroorganizmalar yaygın kullanımları olan dezenfektan maddelere dirençli hale gelebilir. Dezenfektan maddelere karşı artmış MİK değerlerini belirleme dezenfektan maddenin bakterisidal etkisinde fazla bir değişiklik meydana getirmedeğinden klinik olarak önemli değildir ama dezenfektan ve antibiyotik direnci arasında çapraz reaksiyonlar olabilirliği şüphesi ile bu konu üzerinde durulmaktadır.

Özellikle dışarı atılım yoluyla direnç gelişimi oldukça önemlidir. Çeşitli efluks genleri Gram pozitif ve Gram negative bakterilerde antiseptik ve dezenfektan direnç geni olarak bilinmektedir. Bu sebeple bakterilerin direnç geni taşıyıp taşımadığını ve sahip olunan genlerin fenotipik yansımasının olup olmadığını bilmek bu bakteri kaynaklı hastane enfeksiyonlarının önleminde önemlidir. Eğer biyosit direnci giderek artan şekilde yaygınlaşır ve antibiyotik direnci de buna bağlantılı bir şekilde eşlik ederse tedavi edilmeyen enfeksiyonların artışı izlenebilir. Biyosit direnci transfer edilebilir özellikte olduğundan, yetersiz dekontaminasyon sonucu çapraz enfeksiyonların oluşumuna sebep olabileceğinden dolayı riskli bir durumdur. Ayrıca biyosit direnci antibiyotik direnciyle ilgili olabilir bu sebeple de önemlidir. Dolayısıyla biyosit direncinin belirlenmesi önemlidir. Aynı zamanda dirence neden olan mekanizmaları önleyecek ek tedavi seçeneklerinin uygulaması da özellikle hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde önemli bir yaklaşım olacaktır.

ÖZET

***Acinetobacter baumannii* 'de biyosid duyarlılığında rol oynayan AdeB, AdeJ, QacE efluks genlerinin pyrosekans yöntemi ile araştırılması**

Biyosit ve dezenfektanlar genellikle hastane ve laboratuvar ortamlarında yaygın olarak kullanılmakta olduğu için dirençli patojenlerin seçilerek ortaya çıkmasına neden olabilirler. Nitekim laboratuvar koşullarında, antibiyotiklere direnci artmış *Acinetobacter baumannii* gibi bakterilerin çoğalmasına neden olan dezenfektanlar gösterilmiştir.²⁹

Son yıllarda yapılan çalışmalar bu mikroorganizmanın direncinde, aktif ilaç pompa sistemlerinin etkin rol oynadığına dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada 2009-2011 yılları arasında hastanemizde izole edilen 50 *A. baumannii* izolatının AdeB, AdeJ ve QacE efluks gen bölgelerinin varlığını ve dezenfektan direncinde bu pompa sisteminin etkinliğini araştırmayı hedefledik.

Bu amaçla, izolatlarda 2 dezenfektan maddenin (Klorhekzidin ve Benzalkonyum klorid) minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK), pompa inhibitörleri '*phenylalanyl-arginyl-β-naphthylamide*' (PAβN) ve '*1-(1-naphythylmethyl)-piperazine*' (NMP) varlığında ve yokluğunda sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmış ve pompa inhibitörleri varlığında antibiyotik MİK'lerindeki değişimler kaydedilmiştir. Öte yandan, AdeABC, AdeIJK çoklu ilaç direnç pompasının esas transport proteini olan AdeB ve AdeJ'yi kodlayan *adeB* ve *adeJ* geni ve dezenfektan direncinde etkisi olan *qacE* geni pyrosekans yöntemi ile araştırılmıştır.

İzolatların PAβN ve NMP varlığında, klorheksidin MİK'lerinde sırayla yaklaşık %40 (4-8 kat) ve %78 (4-16 kat) düşüş gözlenmiştir. İzolatların PAβN ve NMP varlığında, Benzalkonium klorid MİK'lerinde ise sırayla yaklaşık %43 (4-8 kat) ve %68 (4-8 kat) düşüş gözlenmiştir. Bu bulgular izolatlarımızın önemli bir bölümünün dezenfektan direncinde, RND tipi bir aktif ilaç pompasının etkin rol oynadığını göstermektedir.

İzolatlarımızın *adeB*, *adeJ* ve *QacE* varlığının saptandığı pyrosekans çalışma sonuçlarında, bu genlerin her 3'üde tüm izolatlarda bulundu ve bu genlerde herhangi bir mutasyon saptanmadı.

Bu sonuçlara bağlı olarak, *A.baumannii* izolatlarımızın dezenfektan direncinde, RND tipi bir aktif pompanın önemli katkısı olduğuna ve pompa inhibitorlerinin varlığında dezenfektan etkinliğinin artacağı ve bunun da ek tedavi seçeneklerine olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, biyosid, aktif pompa, NMP, PAβN,Pyrosekans

SUMMARY

Role of *Acinetobacter baumannii* AdeB, AdeJ, QacE efflux genes in mediating decreased susceptibility to biocides by pyrosequencing method

Biocides and disinfectants are commonly used in hospital and laboratory settings. The frequent use of disinfectants may contribute to the emergence of disinfectant-resistant microorganisms. In the laboratorial conditions various disinfectants and biocides have been shown to result in overgrowth bacteria having increased antibiotic resistance, including *Acinetobacter baumannii* or that of already-resistant to antibiotics.²⁹

Recent studies have shown that active drug efflux pumps are important mechanisms of resistance in this microorganism. In this study we aimed to investigate the AdeB, AdeJ ve QacE efflux genes regions and impact of this efflux mediated resistance in the disinfectants resistance of 50 *A. baumannii* strains isolated in our hospital during 2009-2011.

For this purpose minimum inhibitory concentrations (MICs) of 2 disinfectants (chlorhexzidin ve Benzalkonium chlorid) were investigated by broth microdilution test in the presence and absence of two efflux pump inhibitors, phenylalanyl-arginyl- β -naphtylamide (PA β N) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) and changes in the disinfectants MICs in the presence of pump inhibitors were recorded. Additionally, *adeB* and *adeJ* genes which encode the main transporter proteins of AdeABC and AdeIJK pumps system and *qacE* resistance gene were investigated in the isolates by pyrosequencing method.

In %40 and %78 of the isolates, MICs of Chlorhexidin decreased by in order 4-8 folds and 4-16 folds in the presence of PA β N and NMP pump inhibitors. In %43 and %68 of the isolates, MICs of Benzalkonium chloride decreased by 4-8 folds in the presence of PA β N and NMP pump inhibitors.

These results showed that an RND type drug efflux pump seems very likely to contribute the disinfectants resistance in majority of the isolates.

In the second part of our study, we investigated *adeB*, *adeJ* and *qacE* efflux genes in the isolates by Pyrosequencing method. Results obtained from studies have shown that *these genes found in all* isolates. There was no mutation in these genes.

As a result, we conclude that there is a significant contribution of an RND type efflux pumps in our *A. baumannii* isolates and efflux inhibitors increase the effectiveness of the disinfectant. So additional treatment options that will make possible.

Key Words: *Acinetobacter baumannii*, biocides, efflux pump, NMP, PA β N, Pyrosequence

KAYNAKLAR

- 1- Chastre J. Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2003; 24 (1): 69-77.
- 2- Özdem B, Gürel F, Çelikkalek N, Balıkcı H, Açıkgöz Z C, Çeşitli klinik örneklerden 2007-2010 yıllarında izole edilen *Acinetobacter* türlerinin antibiyotik direnç profilleri. Mikrobiyol Bül 2011; 45(3): 526-534.
- 3- Çetin ES, Kaya S, Pakbaş İ, Demirci M. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. İnönü Üni Tıp Fak Derg 2007; 14(2): 69-73.
- 4- 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi - 2005 Dezenfektanlara direnç gelişim mekanizmaları? Dezenfeksiyon işlemini ne kadar tehdit etmektedir? Çağlar K.702-714.
- 5- Schneiders T, Findlay J, Amyes S. Efflux Pumps in *Acinetobacter baumannii*. *Acinetobacter Biology and Pathogenesis*, Infectious Agents and Pathogenesis 2008; 105-127.
- 6- Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2005; 56(1): 20-51.
- 7- Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 3298-3304.
- 8- 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi – 2007 Bakteriler ve Dezenfektanlara Direnç. Doğuk Kartal E. 63-69.

- 9- Chuanchuen R, Khemtong S, Padungtod P. Occurrence of Qac E /Qac E Δ 1) genes their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. Southeast Asian J Trop Med Health 2007; 38 (5): 855-862.
- 10- Bergogne-Berezin E. Importance of *Acinetobacter* spp. Ed: Bergogne-Berezin E. *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis. Springer, Paris, France, 2008.
- 11- Bergogne-Berezin E, Towner K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens, microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-165.
- 12- Gospodarek E, Krasnicki K, Ziolkowski G, Kasprzak H, Beuth W. Cerebrospinal meningitis with the presence of *Acinetobacter* spp. Med Sci Monit 2000; 6(1): 50-547.
- 13- Winn J, Stephen A, William J, Elmer K, Gary P, Schreckenberger P. Gail Woods Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Washington. 6. baskı, Lippincott Williams & Wilkins 2006; 353-355.
- 14- Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol 1968; 95:1520-1541.
- 15- Wang JT, McDonald LC, Chang SC, Ho M. Community acquired *Acinetobacter baumannii* bacteremia in adult patients in Taiwan. Journal of Clinical Microbiology Apr 2002; 1526–1529.
- 16- Prashanth K, Badrinath S. Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. Indian J Med Res 2005; 122 : 408-418.

- 17- Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard J.M, Olsen J.E, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. J Med Microbiol 2000; 49: 929-936.
- 18- Allen D M, Hartman B J. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia (PA): 2006; 2632–2636.
- 19- Forbes B A, Sahm D F, Weissfeld A S. *Acinetobacter*, *Chryseomonas*, *Flaviomonas* and *Stenotrophomonas*. Diagnostic Microbiology-Bailey and Scott's. 11 th ed. 2002; 378-383.
- 20- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6 th ed. Lippincott Philadelphia: 2006.
- 21- Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2008. 2195-2201.
- 22- Towner KJ. *Acinetobacter*. In: Collier L, Balows A, Susman M, eds. Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9 th ed. London: 1998.1229-1239.
- 23- Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gramnegative rods, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC (eds): Manual of Clinical Microbiology. 9 th Ed. Washington(DC) : ASM Press; 2007.

- 24- Speller DCE, Humphreys H. Hospital-acquired infection. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. 9th ed. London: Arnold; 1998. 187–229.
- 25- Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148- 65.
- 26- Lim S.M, R. Webb S. A. Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. Organisms and mechanisms of antibiotic resistance, Anaesthesia 2005; 60: 887–902.
- 27- Looveren VM, Goossens H, the ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 684–704.
- 28- Baines PB, Meyer J, Cal MA. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: the use of oral non-absorbable antimicrobials may prolong the antibiotic era. Current Anaesth and Crit Care 2001; 12: 41–7.
- 29- Dy ME, Nord JA, LaBombardi VJ, Kislak JW. The emergence of resistant strains of *Acinetobacter baumannii*: clinical and infection control implications. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20: 565-67.
- 30- Gaynes R, Edwards J.R, Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram- Negative Bacilli. Clinical Infectious Diseases 2005; 41: 848–54.
- 31- Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* Infection. N Engl J Med 2008; 358 (12):1271-1281.

- 32- Smego RA Jr. Endemic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* bacteremia. Clinical significance, treatment, and prognosis. Arch InternMed 1985; 145(12): 2174-9.
- 33- Echenique J, Arienti H, Tolmasky ME, Read R R, Staneloni RJ, Crosa J H and et al. Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol 1992; 174(23): 7670-9.
- 34- Can F, Kurt-Azap Ö, Demirbilek M, Karabay G, Ergin F, Arslan H. Kan Kùltürlerinden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Biyofilm Oluşumu. İnfeksiyon Dergisi 2006; 20(3):159-163.
- 35- Özdemir M, Erayman İ, Gündem N S, Baykan M, Baysal B. Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. Ankem Derg 2009; 23(3):127-132.
- 36- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernandez-Hinojosa E, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilatör-associated pneumonia: epidemical and clinical findings. Intensive Care Med 2005; 31(5):649-655.
- 37- Baysal B. Bakteriyel infeksiyonların patogenezi. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (Editörler) Temel ve klinik mikrobiyoloji'de. 1. baskı. Ankara. Güneş Kitapevi; 1999. 109–12.
- 38- Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH. Nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonları. Flora 1999; 4:170–6.

- 39- Longo B, Pantosti A, Luzzi I: Molecular findings and antibiotic-resistance in an outbreak of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. Ann Ist Super Sanità 2007; 43(1):83-8.
- 40- Chen MZ, Hsueh PR, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Luh KT. Severe community acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. Chest 2001; 120:1072-1077.
- 41- 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; 129:102-109.
- 42- Aktaş F. Gram negatif Bakterilerin Hastane İnfeksiyonlarındaki Rolü ve Epidemiyolojisi. Önemli ve sorunlu Gram-Negatif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.
- 43- Hanlon GW. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. Lett Appl Microbiol 2005; 41(5):375-378.
- 44- Bahar İH, Esen N. Acinetobacter türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008; 2195-2201.
- 45- Clark NM, Patterson J, Lynch JP. Antimicrobial resistance among gram-negative organisms in the intensive care unit. Lippincott Williams & Wilkins 2003 ; 9:413-423.
- 46- Bou G, Cervero G, Dominguez M.A, Quereda C, Martinez-Beltra J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not

due solely to the presence of β -lactamases. J of Clinical Microbiology Sept 2000 ; 3299-3305.

- 47- Bou G, Cervero G, Dominguez M.A, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 635-643.
- 48- Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M, Villari P. Molecular Epidemiology of Sequential Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit Shows the Emergence of Carbapenem Resistance. J Of Clinical Microbiology 2004; 946-953.
- 49- Cisneros J. M, Rodriguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2002; 8: 687-693.
- 50- Fillaux J, Dubouix A, Conil JM, Laguerre J, Marty N. Retrospective Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated During a 4-Year Period in a University Hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27:647-653.
- 51- Del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, et al. Hospital outbreak caused by a carbapenem resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 540-546.
- 52- Ferrara A.M. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. International J of Antimicrobial Agents 27 2006; 183–195.

- 53- Alp E, Ese D, Yıldız O, Andreas Voss A, Melchers W, Doganay M. Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream infection isolates in a Turkish university hospital. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2006; 38: 335-340.
- 54- Higgins P.G, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. In Vitro Activities of the β - Lactamase Inhibitors Clavulanic Acid, Sulbactam, and Tazobactam Alone or in Combination with β -Lactams against Epidemiologically Characterized Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 1586-1592.
- 55- Peleg AY, Potoski BA, Rea R, Adams J, Sethi J,Capitano B, et al: *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report, *J Antimicrob Chemother* 2007;59(1):128-31.
- 56- Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, Nejmi H, Benslama A, Elmdaghri N, et al. Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect* 2006;53(4):274-8.
- 57- Levin AS. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 144- 153.
- 58- Sader HS, Jones RN, Dowzicky MJ, Fritsche TR. Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 203- 208.

- 59- Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non- traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug- resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 224- 8.
- 60- Yıldız O. Antibiyotiklerin Kombine Kullanımı. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi ; 2008.127-137.
- 61- Arda B. Çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* olgusu. Ankem Derg 2010;24(Ek 2):78-81.
- 62- Yılmaz N, köse Ş, Ağuş N, Ece G, Akkoçlu, Kıraklı C. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar,antibiyotik duyarlılıkları ve nozokomial bakteriyemi etkenleri . Ankem Derg 2010;24(1):12-19.
- 63- Özyurt M. Dezenfeksiyon ve Sterilizasyon Yöntemleri. Klimik Dergisi 2000; 13: 41-48.
- 64- Rutala AW, Weber DJ. Disinfection, Sterilization, and Control of Hospital Waste. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds.Principles and Practice of Infectious Diseases. 6 th ed . Philadelphia: Elsevier; 2005. 3331-3347.
- 65- İnan A, Şenbayrak Akçay S, Özyürek Ç S, Tekin S, Erdoğan P, Erdem ve ark. Hastane kökenli patojenlere karşı çeşitli dezenfektan ve antiseptiklerin etkinliği. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2009; 39 (3-4):97-102.
- 66- Özdemir D. Dezenfektanlara direnç . Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 4 (3): 39-44.

- 67- Chapman J S. Biocide resistance mechanisms, international biodeterioration & biodegradation 2003; 51:133-138.
- 68- 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi – 2005 Aldehid, Peroksijen ve Perasetik Asit ile Klor Verici Ajan İcermeyen ve Alet Dezenfektanı Olarak Önerilen Diğer Dezenfektanlar, Genel Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Etkinlikleri. Özyurt M.180-199.
- 69- 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi - 2009 Dezenfektanlar: Sınıflama ve amaca uygun kullanım alanları.Abbasoğlu U.109-120.
- 70- Hegstad K, Langsrud S,Tore Lunestad B, Scheie, Marianne Sunde A A, Yazdankhah S P. Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health?Microbial Drug Resistance 2010; 16(2): 91-104.
- 71- McDonnell G, Russell A D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. Clinical Microbiology reviews 1999; 12(1), 147-179.
- 72- Russell A D, Day M J. Antibacterial activity of chlorohexidin. J hospital infection 1993; 25:229-238.
- 73- Baykam N. Yara Bakımı: Yarada Antimikrobiyal Tedavi. Hastane infeksiyonları Dergisi 2007; 11: 27-32.
- 74- 4.Ulusal Sterilizasyon dezenfeksiyon kongresi kitabı - 2005, Dezenfektan direncini belirleyen testlere global bir bakış.Hangi testler

hangi sıra ile yapılmalıdır? En ucuz ve en keskin sonuç nasıl elde edilir ? Abbasoğlu U.715-726.

- 75- Sultan N. Dezenfektanların mikroorganizma üzerinde etkinliğinin ölçümü ve pratiksel önemi,sterilizasyon ve dezenfeksiyon hastane infeksiyonları. (Günaydın M,Saniç A, Gürler B, Leblebicioğlu H),Samsun Infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji derneği; Simad yayını ; 2002 .No 1.
- 76- Russell AD, Suller TE, Maillard JY. Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance? J Med Microbiol 1999; 48:613-5.
- 77- Yasuda T, Yashimura Y, Takada H, et al. Comparison of bactericidal effects of commonly used antiseptics against pathogens causing nosocomial infections. Dermatology 1997; 195(Suppl 2):19-28.
- 78- Poole K. Mechanism of bacterial biocide and antibiotic resistance. J Appl Microbiol 2002; 92: 55-64.
- 79- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg AE. Medical Microbiology. East Norwalk, CT: Appleton & Lance 1995: 137-167.
- 80- Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klimik Dergisi 2001; 14 (2) :41-46.
- 81- Öztürk R. Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar. Sempozyum Dizisi Kasım 2002; 83-100.

- 82- Smith K, Gemmell C G, Hunter I S. The association between biocide tolerances and the presence or absence of qac genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. J of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 61: 78–84.
- 83- [Liu Q, Liu M, Wu Q, Li C, Zhou T, Ni Y](#). Sensitivities to biocides and distribution of biocide resistance genes in quaternary ammonium compound tolerant *Staphylococcus aureus* isolated in a teaching hospital. Scandinavian J of Infectious Diseases, 2009; 41: 403-409.
- 84- Fluit A C, Schmitz F J. Resistance integrons and super integrons . European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2004; 10: 272–288.
- 85- Chapman J S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance and co-resistance, international biodeterioration & biodegradation 2003;51: 271-276.
- 86- Bal Ç. Toplum kökenli infeksiyonlarda Gram negative çomak direnci. Ankem Derg 2006; 20(Ek 2):278-281.
- 87- Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* –the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Folia Histochemica et Cytobiologica 2008; 46 (3): 257-267.
- 88- Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 59 (6): 1210-1215.

- 89- Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T, Courvalin P. Ade IJK a resistance nodulation cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*, Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 557-562.
- 90- Chau S-L, Chu Y-W, and Elizabeth TS. Houang Novel Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux System AdeDE in *Acinetobacter* Genomic DNA Group 3. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(10): 4054–4055.
- 91- Tseng T, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies D, Goffeau HA, Saier M. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. J Microbiol Biotechnol 1999; 107–125.
- 92- Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 382–402.
- 93- Russell A D. Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situation. The Lancet Infectious Diseases 2003; 3:794-803.
- 94- Russell A D. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. J Antimicrobial Chemotherapy 2002; 49:597-599.
- 95- Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic. A vision for applied use. Biochem Pharmacol 2006; 71: 910–918.

- 96- Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 697–8.
- 97- Winfried VK, Steinke P, Schumacher A, Schuster S et al. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 339–343.
- 98- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Seventh Edition: Approved Standard M7-A7. CLSI, Wayne, PA, USA, 2006.
- 99- Aksaray S.,Dokuzoğuz B.,Güvener E. ET al. Surveillance study of antimicrobial resistance among Gram negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. Journal of antimicrobial chemotherapy 2000;45:695-699.
- 100- Esen Ş, Leblebicioğlu H: Prevalence of nosocomia infections at intensive care units in Turkey: a multicentre 1-day point prevalence study, Scand J Infect Dis 2004; 36(2):144-8.
- 101- Dizbay M, Altunçekiç A, Kanat Özcan D, et al. Anestezi-Reanimasyon ve Nöroloji Yoğun Bakım Ünitelerinde Gelişen Nozokomiyal Enfeksiyonlar: İki Yılın Değerlendirilmesi. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2007;4:252-257.
- 102- Dauner DG, May JR, Steele JC: Assessing antibiotic therapy for *Acinetobacter baumannii* infections in an academic medical center, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27(11):1021-4.

- 103- Gülhan B, Özekinci T, Atmaca S ve ark: 2004-2006 yıllarında izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnci. Ankem Derg 2007; 21(1):32-6.
- 104- Ersavaş H. Çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının çoğul ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına in vitro etkileri. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2009.
- 105- Sarıgüzel F M. *Acinetobacter baumannii* bakteriyemisi: Epidemiyoloji ve kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları. Kayseri: Erciyes Üniversitesi ; 2008.
- 106- Zer Y, Akın ÖFE, Namıduru M: *Acinetobacter baumannii* suşlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması. Enfeksiyon Derg 2007; 21(4):193-6.
- 107- Pachón-Ibáñez ME, Jiménez-Mejías ME, Pichardo C, Llanos AC, Pachón J: Activity of tigecycline (GAR-936) against *Acinetobacter baumannii* strains, including those resistant to imipenem. Antimicrob Agent Chemother 2004; 48(11):4479-81.
- 108- Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y: High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 59(4):772-4.
- 109- Walker EM, Lowes JA. An investigation in to in vitro methods for the detection of chlorhexidine resistance. J Hosp Infect 1985; 6:389-97.
- 110- Aykan B. Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında qac A/B dezenfektan direnç genlerinin araştırılması. Ankara: Gazi Üniversitesi ;2006.
- 111- Öztürk R. Antiseptik ve dezenfektan maddelere karşı direnç sorunu. 2. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Hastane Enfeksiyonları 2002;1-20.

- 112- Rajamohan G, Srinivasan V B, Gebreyes W A. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 228–232.
- 113- Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, Seifert H, Kern WV: Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii* comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 970-974.
- 114- Dal T. *Acinetobacter baumannii* 'nin klinik izolatlarının çoklu ilaç direncinde AdeABC aktif pompasının rolü. İstanbul : Marmara Üniversitesi ; 2009.
- 115- Wright GD. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. Chem. Biol. 2000; 7: 127-132.
- 116- Miller LA, Ratman K, Payne DJ. Beta-lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. Curr Opin Pharmacol 2001; 1: 451-458.
- 117- Aktaş Z. Direnç mekanizmaları ve direnç belirleme yöntemleri. Ankem Derg 2012; 26(Ek 2):278-282.
- 118- Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Novel agents for combination therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001; 45:105-16.
- 119- Rota S. Pyrosequencing (Pyrosekanslama) ve prensipleri. Klinik Mikrobiyolojide Pyrosekans Uygulama Kursu Kitabı. Ankara. 2010;79–90.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Shohre

Soyadı : Afshar Yavari

Doğum yeri ve Tarihi : Iran – Tabriz 24.04.1966

Eğitimi:

2007-2012 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Programı, Ankara

1990-1992 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı, Ankara

1986-1990 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biology Bölümü Ankara

1980-1984 Laya Lisesi, Orumiyeh – Iran

Yabancı Dil : İngilizce

Çalıştığı kuruluş

1992-2007 Öğretim üyesi, Orumiyeh Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Orumiyeh- Iran

TEŞEKKÜR

Mikrobiyoloji Anabilim dalımızın değerli ve seçkin öğretim elemanlarına ve çalışanlarına başta danışmanım ve tez yöneticim olan Prof.Dr.Seyyal Rota olmak üzere, bu süreyi beraber geçirdiğim bütün asistan, doktora ve çalışma arkadaşlarıma, bana desteklerini esirgemeyen sevgili ablalarım Shole ve Roya Afshar Yavari ve değerli eşleri Sayın Prof.Dr. Farrokh Ghavam ve Muh. Hossein Shariat'e, gösterdiği sabır dolu dayanışma için hayat arkadaşım sevgili eşim Dt. Farhad Gharehbaghi'e ve canım kızlarım Sadaf ve Marjan'a sonsuz teşekkürler ederim.

Shohre AFSHAR YAVARI