

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

***ACINETOBACTER*'LERDE DİRENÇ ve KLONAL İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ahmet ÇALIŞKAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Rıza DURMAZ**

MALATYA-2008

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**NOZOKOMİYAL ACINETOBACTER İZOLATLARINDA
DİRENÇ ve KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet ÇALIŞKAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Rıza DURMAZ

Teşekkür: Bu çalışma TUBİTAK tarafından desteklenen SBAG 106S211'nolu projenin bir bölümünü içermektedir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TABLOLAR DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR DİZİN.....	VI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Acinetobacter Cinsi.....	4
2.2. Nonfermenter, Hareketsiz Ve Oksidaz Negatif Bakteriler.....	6
2.2.1. CDC Grup No-1.....	6
2.2.2. CDC Grup No-2.....	6
2.2.3. CDC Grup EO-5.....	6
2.2.4. Acinetobacter.....	7
2.3. Acinetobacterler ve Diğer Nonfermenterlerin İzolasyon Ve İdentifikasyonuna Yaklaşım.....	9
2.4. Acinetobacter'lerin identifikasyonunda Kullanılan Testler.....	9
2.4.1. Mac Conkey Agarda Ürememe Özelliği.....	9
2.4.2. Glukoz Kullanımı.....	10
2.4.3. Pozitif Sitokrom Oksidaz Reaksiyonu.....	11
2.4.4. Hareket.....	11
2.4.5. Pigment Üretimi.....	12
2.4.6. Nitrat Redüksiyonu.....	13
2.4.7. Nitrat ve Nitritin Denitrifikasyonu.....	13
2.4.8. İndol Üretimi.....	13
2.4.9. Dekarboksilasyon.....	14
2.4.10. Acinetobacter ve Diğer Nonfermenter Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Ticari Kit Sistemleri.....	15
2.5. Acinetobacter'lerin Virülans Faktörleri.....	15

2.6. <i>Acinetobacter</i> 'lerin Sebep Olduğu İnfeksiyonlar.....	16
2.7. <i>Acinetobacter</i> 'lerde Antibiyotik Direnci.....	16
2.7.1. Antibiyotiklere Direncin Biyokimyasal ve Genetik Mekanizmaları.....	17
2.7.1.1 Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	17
2.7.1.2. Aminoglikozitlere Direnç Mekanizmaları.....	18
2.7.1.3. Kinolonlara Direnç Mekanizmaları.....	19
2.7.1.4. Diğer Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	19
2.8. <i>Acinetobacter</i> 'in Epidemiyolojisi.....	20
2.9. <i>Acinetobacter</i> 'lerin tiplendirmesinde kullanılan yöntemler.....	21
2.9.1. Fenotipik yöntemler.....	22
2.9.2. Genotiplendirme metotları.....	24
2.9.2.1. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis).....	24
2.9.2.2. Moleküler Tiplendirmede Kullanılan Diğer Yöntemler.....	27
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	32
3.1. Hastalar ve <i>Acinetobacter</i> İzolatları.....	32
3.2. Epidemiyolojik İlişki ve Risk Faktörlerine Ait Bilgilerin Toplanması	32
3.3. Bakterilerin Tanımlanması.....	34
3.4. Suşların Antibiyotik Duyarlılık Profilleri.....	34
3.5. Moleküler Tiplendirme.....	35
3.5.1. İzolatların hazırlanması	35
3.5.2. İzolatların Agaroz Gömülmesi	35
3.5.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması.....	36
3.5.4. Hücre Lizizinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkınması.....	36
3.5.5. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın RE ile Kesilmesi.....	36
3.5.6. <i>A. baumannii</i> DNA'sını İçeren Kalıpların Apa I RE ile kesimi.....	36
3.5.7. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi.....	37
3.5.8. Elektroforez.....	38
3.5.9. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi.....	38

4. BULGULAR.....	40
4.1. Epidemiyolojik Bilgiler.....	40
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	42
4.3. Moleküler Tiplendirme.....	44
4.4. Küme İçinde Yer Alan Suşların Epidemiyolojik İlişkileri.....	44
4.5. Aynı Hastalardan Farklı Zamanlarda İzole edilmiş Suşların PFGE	
Sonuçları.....	47
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇLAR.....	65
7. ÖZET.....	66
8. SUMMARY.....	67
9. KAYNAKLAR.....	68

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Nonfermenter Gram negatif bakterilerin sınıflandırılması.....	5
Tablo 2. <i>Acinetobacter</i>, CDC grub bakterilerin biyokimyasal özellikleri	8
Tablo 3. <i>Acinetobacter</i>'lerde bulunan antibiyotik direnç mekanizmaları.....	20
Tablo 4. <i>Acinetobacter</i>'lerin kliniklere göre dağılımı.....	40
Tablo 5. <i>Acinetobacter</i> suşlarının izole edildiği klinik örnekler.....	41
Tablo 6. <i>Acinetobacter</i> suşlarının izole edildiği hastaların yaş gubuna göre dağılımı... 	41
Tablo 7. <i>Acinetobacter</i> suşlarının izole edildiği hastaların epidemiyolojik bilgileri.....	42
Tablo 8. Test edilen 135 <i>Acinetobacter</i> suşunun antibiyotik direnç yüzdeleri.....	43
Tablo 9. Aynı kümedeki izolatların antibiyotiklere duyarlılık profilleri.....	48
Tablo 10. <i>A.baumannii</i> izolatlarının 1998–2001 antibiyotik direnç yüzdeleri.....	56
Tablo 11. Farklı tarihlerde değişik coğrafik bölgelerdeki direnç yüzdeleri.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. PFGE <i>Acinetobacter</i> dendogram.....	50
---	----

KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
AP-PZR	: Arbitrarily primed PZR
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Disodyum Salt Dihidrat
HCL	: Hidroklorik asit
HST	: Hücre Süspansiyon Tamponu
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
MDR	: Multi Drug Resistant
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
RE	: Restriksiyon enzimi
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBE	: Tris, Borik asit, EDTA
TE	: Tris, EDTA
UV	: Ultra Viyole

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Acinetobacter türleri toprakta, suda ve çevrede bol miktarda bulunan aerobik, Gram negatif, hareketsiz, fermantasyon yapmayan bakterilerdir. *Acinetobacter* 'ler başta yoğun bakım üniteleri olmak üzere, hastanelerin çeşitli birimlerinde ciddi hastane infeksiyonlarından sorumlu önemli fırsatçı patojenlerdir. Endotrakeal tüp ya da trakeostomilerle ilişkili pnömoni, endokardit, menenjit, deri ve yara infeksiyonları, peritonit ve üriner yol infeksiyonları gibi çeşitli infeksiyonlara neden olabilmektedirler. Konjunktivit, osteomyelit ve sinovit gibi sporadik vakaları da bildirilmiştir (1–5).

Hastanede yatan hastaların kolonizasyon ve infeksiyonunda *Acinetobacter* türlerinin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Travma, mekanik ventilasyon ve cerrahi işlemler bu mikroorganizma için nozokomiyal infeksiyonlarla ilgili önemli risk faktörleridir (4,6).

A. baumannii hastane kaynaklı infeksiyonlardan en sık sorumlu tutulan türdür (5,7,8). *A. johnsonii*, *A. lwoffii* ve *A. radioresistens* gibi diğer türler insan derisinin doğal üyesidir ve aynı zamanda orofarinks ve vajinada kommensal olarak bulunabilir. Diğer *Acinetobacter* türlerine göre *A. lwoffii* menenjitlerle daha çok ilişkilendirilmektedir (9).

Fırsatçı patojen olarak çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* infeksiyonlarının sayısı küresel olarak son beş yılda artmıştır. Nozokomiyal gram negatif patojenler içerisinde kontrol ve tedavisi en güç olanlardan biri haline gelmiştir (10,11). *A.baumannii* ile infekte hastalar sıklıkla immün yetmezliklidirler ya da hastalık durumları ağır olup, mortaliteyle ilişkilidir (3,4). *A.baumannii* salgınlarının pek çoğu hasta yatakları, klimalar ve mekanik ventilasyon ekipmanları gibi çevresel kaynaklıdır (5). *Acinetobacter spp.* kuru cansız yüzeylerde 3 gün–5 ay arasında canlı kalabilir (7–9). Bu da salgınların oluşmasına katkı sağlamaktadır. Hospitalize hastalarda ve çeşitli salgınlarda cilt, boğaz, solunum sistemi ve sindirim sisteminde yüksek düzeyde kolonizasyon gösteren olgular yayınlanmıştır. Yoğun bakım ünitelerinde mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda bu cihazların kontaminasyonu nedeniyle solunum yollarında kolonizasyon çok yüksektir. Yine bu hastalarda cilt kontaminasyonu da siktir. Buradan sağlık personelinin ellerine

bulaşmakta ve yayılmaktadır. Ayrıca yoğun bakıma yatan hastalarda *Acinetobacter*'lerin orofaringeal ve sindirim yolu kolonizasyonu salgınlar için önemli bir rezervuardır (18–20).

A.baumannii infeksiyonlarının artması infeksiyon kontrol uygulamalarındaki hatalara bağlıdır. Hastaların bir kısmının *A.baumannii* ile infekte ya da kolinize olduğu durumlarda; hastalar arasındaki çapraz geçişler kolonizasyon ve/veya salgın oluşumunu artırır (5). Salgınların önlenmesinde klasik epidemiyolojik bilgiler yanında, etken mikroorganizmanın kaynak ve bulaş yolları hakkında belirleyici bilgiler sağlayan suş tiplendirme yöntemlerinin de katkısı fazladır. Suş tiplendirilmesi mikroorganizmaların izole edildiği farklı kaynaklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Tiplendirme yöntemleri, epidemik suşlarda kaynağın ve yayılımın tanımlanması için önemlidir. Patojenler klinik epidemiyolojik verilerle desteklenen moleküler tiplendirme metodları kullanılarak tanımlanmış salgın ile ilişkilendirilir. Ardından bulaşın şekli (rezervuar ve vektör) ve alınan spesifik kontrol önlemlerini de içeren infeksiyonun epidemiyolojisi hakkında neden-sonuç ilişkisine dayanan bir hipotez üretilir. İnfeksiyon kontrol önlemlerinin ve tedavi rejiminin etkinliğini değerlendirmek için sürekli sürveyans şarttır (21-30).

Geçmişte farklı kaynaklardan izole edilmiş nozokomiyal patojenlerin arasındaki epidemiyolojik ilişkinin belirlenmesi biyotip, serotip, bakteriyofaj ya da bakteriyosin tipleri ve antimikrobiyal duyarlılık profilleri gibi fenotipik karakteristiklerinin karşılaştırılmasına dayandırılıyordu. Bu yaklaşım DNA temelli yeni teknolojilerde ya da moleküler analiz uygulamalarındaki gelişmelerle birlikte son 20 yıldır değişmeye başladı. DNA-temelli moleküler tiplendirmeler; *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) ve diğer restriksiyon bazlı metodlar, plazmid analizi ve polimeraz zincir reaksiyon (PZR) bazlı tiplendirme metodlarından oluşmaktadır (22,23,27).

Son yıllarda *Acinetobacter* türleri arasında aminoglikozidlere direncin artma eğiliminde olduğu düşünülmektedir. Yine nozokomiyal salgınlarda karbapenem dirençli *Acinetobacter* türlerini de içeren çoklu ilaca dirençli suşlarda bir artış görülmektedir (31,32). Pek çok suş açısından geniş antibiyotik direnç oranları (geniş spektrumlu β -

laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlar) nedeniyle tedavinin güçleşmiş olması, *Acinetobacter* infeksiyonlarında kontrolün önemini daha da artırmıştır (33,34).

Bu çalışmada; hastanemizin çeşitli servislerindeki yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter spp.* suşlarının antibiyotiklere direnç oranının saptanması, yıllar içinde gelişen direnç artışının izlenmesi, suşlar arasında klonal ilişkinin olup olmadığının PFGE yöntemi ile belirlenmesi, hastaların epidemiyolojik ve klinik verileri değerlendirilerek infeksiyon oluşumu ve yayılmasında etkili olabilecek faktörlerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter* Cinsi

Acinetobacter cinsi *Moraxellaceae* familyası içinde sınıflandırılmakta ve hareketsiz, oksidaz negatif, Gram negatif kokobasil bakterilerden oluşmaktadır (35). 1986' da Bouvet ve Grimont *Acinetobacter* genusunu DNA-DNA hibridizasyonu ve beslenme özelliklerine göre 12 farklı gruba ayıran yeni bir sınıflandırma yapmışlar (36). 1989'da Tjernberg ve Ursing (37) 13–15 arasında kodlanan 3 ilave DNA grubu tanımlamışlar. Bunu takiben Bouvet ve Jeanjean(38) proteolitik *Acinetobacter* türlerinden oluşan ve 13–17 arasında numaralandırılan 5 DNA grubu daha bildirmişlerdir. Ancak Tjernberg ve Ursing' in tanımladığı 2 DNA grubu Bouvet ve Jeanjean' in tanımladığı DNA gruplarından fenotipik olarak farklıydı. Bunun sonucunda farklı DNA grupları aynı sayıyla ifade edilmiş oldu. Şu anda *Acinetobacter* genusu içinde en azından 25 genomik tür tanımlanmıştır (1).

Acinetobacter'lerin de içinde yer aldığı nonfermenter Gram negatif basiller en azından 15 familya içinde sınıflandırılır. Bunlar; *Alcaligenaceae* (*Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordotella*, *Oligella*), *Alteromonadaceae* (*Alishewanella*, *Shewanella*), *Brucellaceae* (*Ochrobactrum*), *Burkholderiaceae* (*Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Ralstonia*), *Caulobacteraceae* (*Brevundimonas*), *Comamonadaceae* (*Comamonas*, *Acidovorax*, *Delftia*), *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium*, *Bergeyella*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, *Myroides*, *Weeksella*), *Methylobacteriaceae* (*Methylobacterium*, *Roseomonas*), *Moraxellaceae* (*Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*), *Oceanospirillaceae* (*Balneatrix*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*), *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Agrobacterium*), *Sphingobacteriaceae* (*Sphingobacterium*, *Pedobacter*), *Sphinmonadaceae* (*Sphingomonas*), ve *Xanthomonadaceae* (*Stenotrophomonas*) (35). Bunlara ilave olarak henüz bir familya içerisinde gösterilmemiş ve taksonomik pozisyonları hala belirsiz olan bir grup klinik açıdan önemli nonfermenter daha vardır. Bir başka yaklaşıma göre de nonfermenterler hareketli ya da hareketsiz oluşları ve hareketliyse flagellanın tipine göre de gruplandırılabilir. Bu yaklaşıma göre tıbbi olarak önemli nonfermenterler tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Nonfermenter Gram negatif bakterilerin sınıflandırılması

Hareketli Polar Flagella	
Family Pseudomonadaceae (rRNA group I) Genus Pseudomonas	Genus Kerstersia Genus Oligella (<i>O. ureolytica</i>)
Family Burkholderiaceae (rRNA group II) Genus Burkholderia Genus Cupriavidus Genus Lautropia Genus Pandoraea Genus Ralstonia	Family Rhizobiaceae Genus Rhizobium
Family Comamonadaceae (rRNA group III) Genus Comamonas Genus Acidovorax Genus Delftia	Family Brucellaceae Genus Ochrobactrum
Family Caulobacteraceae (rRNA Group IV) Genus Brevundimonas	Family Halomonadaceae Genus Halomonas
Family Xanthomonadaceae (rRNA Group V) Genus Stenotrophomonas	Hareketsiz Oksidaz Pozitif
Family Sphingomonadaceae Genus Sphingomonas	Family Flavobacteriaceae Genus Flavobacterium Genus Bergeyella Genus Chryseobacterium Genus Empedobacter Genus Myroides Genus Weeksella
Family Oceanospirillaceae Genus Balneatrix	Family Sphingobacteriaceae Genus Sphingobacterium Genus Pedobacter
Family Alteromonadaceae Genus Alishewanella Genus Shewanella	Family Moraxellaceae Genus Moraxella Genus Psychrobacter
Family Oxalobacteraceae Genus Herbaspirillum Genus Massilia	Family Neisseriaceae Genus Neisseria
Family Methylobacteriaceae Genus Methylobacterium Genus Roseomonas	Family Alcaligenaceae Genus Oligella (<i>O. urethralis</i>) Family Rhodobacteraceae Genus Paracoccus (EO-2)
Toksonomik Pozisyonu Bilinmeyen CDC Groups Ic, 0-1, 0-2, 0-3, Vb-3	Toksonomik Pozisyonu Bilinmeyen CDC groups EO-3, EO-4, EF-4b CDC group s Ilc, Ile, lig, Ilh, Ili, Gibaldi rod group 1
Hareketli Peritrichous Flagella	Hareketsiz, Oksidaz-Negatif
Family Alcaligenaceae Genus Achromobacter Genus Alcaligenes Genus Bordetella (<i>B. avium</i> , <i>B. bronchiseptica</i> , <i>B. hinzii</i> , <i>B. trematum</i>)	Family Moraxellaceae Genus Acinetobacter
	Family Alcaligenaceae Genus Bordetella (<i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>B. trematum</i>) Toksonomik Pozisyonu Bilinmeyen CDC group NO-1 CDC group EO-5

2.2. Nonfermenter, Hareketsiz Ve Oksidaz Negatif Bakteriler

2.2.1. CDC Grup No–1

CDC Grup No–1 olarak gösterilen nazlı üreyen, nonoksidatif, Gram negatif basil görünümünde isimlendirilmemiş bir tür primer olarak köpek ya da kedi ısırığından kaynaklanan insan yaralarından izole edilmiştir(39). Bu organizma hareketsiz, oksidaz negatif ve asakkarolitiktir. Koyun kanlı agarda küçük koloniler oluşturan bu organizmalar orta büyüklükte Gram negatif kokoid basil görünümündedir. Fenotipik olarak *Acinetobacter* türlerine benzer, fakat pozitif nitrat redüksiyon testi ile *Acinetobacter*’lerden kolaylıkla ayrılabilir. Bu grubun *Acinetobacter* türlerinden ayırımında hücresel yağ asidi ve ubiquinone analizinden de yararlanılabilir (39). Diğer fenotipik özellikleri Tablo 2’de verilmiştir. Bunlar aminoglikozidler, β-laktam antibiyotikleri, tetrasiklinler, kinolonlar ve sulfonamidleri de içeren birçok antimikrobiyal ajana duyarlıdır. İzolatların %50’si trimetoprim dirençli olarak rapor edilmiştir (39).

2.2.2. CDC Grup No–2 (*Bordetella holmesii*)

B. holmesii eskiden CDC Grup No–2 olarak sınıflandırılıyordu ve Gram negatif, küçük kokoid ve kısa basil olarak tanımlanmaktadır. Asakkarolitik, oksidaz negatif, hareketsiz, nazlı üreyen ve kahverengi, suda çözünebilir pigment üreten bir bakteridir. *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* ve *B. avium*’dan oksidaz aktivitesindeki eksiklik ve kahverengi, çözünebilir pigment üretimi ile ayrılabilir. *B. parapertussis*’den ise üreaz aktivitesindeki eksiklik ile ayrılabilir. Negatif nitrat reaksiyonu ile CDC Grup No–1’den ayrılırken; *Acinetobacter* türlerinden kahverengi, çözünebilir pigment üretimiyle ayrılır(40).

2.2.3. CDC Grup EO–5

A. baumannii’ye benzer bir biyokimyasal profil gösteren bu grup glukozu oksitleyen Gram negatif basillerden oluşmuştur. Hareketsiz ve oksidaz negatif olup, *Acinetobacter* türlerinden farklı olarak MacConkey agarda üreyemezler. Bazı suşlar sarı, suda çözünebilir bir pigment üretir. Hücresel yağ asidi analizi *Acinetobacter*’den

ayrımında yardımcıdır. Diğer özellikleri Tablo 2’de verilmiştir. İzolatlar kan, periton sıvısı, transtrakeal aspirat, safra kesesi ve bir kol yarısından elde edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık verileri mevcut değildir (1).

2.2.4. *Acinetobacter*

Nonfermenter bir izolatın *Acinetobacter* genusuna ait olabileceğine dair ilk ipucu Gram boyama morfolojisidir. Sıklıkla diplokok olarak görülebilen Gram negatif kokobasillerdir. Klinik örneklerin direkt preparatlarında ve pozitif kan kültür şişelerinden hazırlanan preparatlarda *Acinetobacter* türlerinin başlangıçta Gram pozitif kok olarak görünebileceği unutulmamalıdır. Kanlı agardaki inkübasyonun 24. saatinden sonra koloniler 0,5–2 mm çapında, yarı saydam-opak, dışbükey ve bütün olarak görünmektedir. Çoğu suş MacConkey agarda iyi ürer ve zayıf bir pembe renk tonu oluşturur. Bazı glukozu oksitleyen *Acinetobacter*’ ler ise glukoz eklenmiş tirozinli kalp infuzyon agar ya da kanlı agarın rengini esmerleştirebilir (41). Kontamine örneklerden *Acinetobacter* spp. izolasyonu için ayırıcı ve seçici besiyerleri tanımlanmıştır (42).

Acinetobacter türlerinin muhtemel identifikasyonu; sitokrom oksidaz aktivitesinin olmaması, hareketsizlik ve penisiline direnç temeline dayanılarak yapılabilir (Tablo 2).

A. baumannii sakkarolitikdir ve çoğu OF karbohidratlarını asidifiye eder; özellikle kesin identifikasyonu laktozdan hızlı asit üretimi tespiti ile yapılır (%1 ve %10 konsantrasyonları). Aksine *A. lwoffii* ise asakkarolitikdir. Genomik tür 7, yani *A. johnsonii* de asakkarolitikdir fakat 37 °C’de üreyememe özelliğiyle diğer tüm *Acinetobacter* türlerinden ayrılabilir.

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(1).

Genomik tür 1, *A. calcoaceticus* olarak adlandırılır ve özellikle topraktan izole edilir. Genomik tür 2, *A. baumannii* olarak adlandırılır ve önceden *A. calcoaceticus* var.

*anitratu*s olarak adlandırılırdı. Genomik tür 4, *A. haemolyticu*s olarak adlandırılır. Genomik tür 5, *A. junii*, genomik tür 7, *A. johnsonii*, genomik tür 8, *A. lwoffii* ve genomik tür 12, *A. radioresistens* olarak adlandırılmaktadır. Kalan genomik türlerin çoğu isimlendirilmemiştir. Fenotipik testlerin kullanıldığı DNA grupları 1, 2, 3 ve 13'e ait sakkarolitik suşların ayırımında bazı problemler bulunduğundan dolayı bazı laboratuvarlar bu grubun üyelerini “*Acinetobacter calcoaceticu*s-*A. baumannii* kompleks” ya da “sakkarolitik *Acinetobacter*” olarak rapor etmeyi tercih etmektedir. Benzer şekilde laboratuvarlar bu genusun nonsakkarolitik üyelerini “nonsakkarolitik *Acinetobacter*” olarak rapor edebilir (Tablo 2) (1).

Tablo 2. *Acinetobacter*, CDC grub bakterilerin biyokimyasal özellikleri

TEST	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	CDC group No-1	<i>Bordetella holmesii</i> (No-2)	<i>Bordetella parapertussis</i>	CDC group Eo-5
Oksidaz	-	-	-	-	-	-
Hareket	-	-	-	-	-	-
MacConkey agarda üreme	+	+	V(20)	+	+	-
42 °C de üreme	+	-	V(15)	-	V(18)	-
Glikoz kullanımı	+	-	-	-	-	+
NO ₃ indirgeme	-	-	+	-	-	-
Jelâtin	V	V	-	-	-	-
Üre	V	V	-	-	-	-
Pigmentasyon	-	-	-	Kahverengi	Kahverengi	Sarı

+, %90 ve üzeri pozitif; -, %90 ve üzeri negatif; V, %11-89 pozitif. Parantez içindeki numaralar pozitiflik yüzdeleri

2.3. Acinetobacterler ve Diğer Nonfermenterlerin İzolasyon ve İdentifikasyonuna Yaklaşım

Nonfermenterlerin hangi türlerinin identifiye edileceği laboratuvarların amaçları ve büyüklüklerine bağlı olarak değişmektedir. Referans laboratuvarlarının veya öğrencilerin eğitim gördüğü üniversite ve kliniklerin; klinik açıdan önemli tüm nonfermenterleri tür düzeyinde identifiye edilmesi gerekir. Öncelikli olarak topluma tıbbi hizmet veren laboratuvarlar sadece daha sıkça karşılaşılan türleri identifiye etmeli ve nadir izolatları bir referans laboratuvarına göndermelidir (1).

Nonfermentatif Gram negatif basiller enerji kaynağı olarak, fermentasyon dışındaki metabolik yollarda karbonhidratları kullanmayan aerobik, sporsuz basillerdir.

Kemoorganotrof bakteriler organik bileşiklerden enerji elde ederler. Klinikte karşılaşılan bakterilerin çoğu metabolik yollarında karbonhidratları kullanarak enerji elde ederler. İnfeksiyon hastalıkları etkeni olabilen bakterilerin identifikasyonu için çeşitli metabolik ürünlerin tespit edilmesi ve ölçümü şarttır. *Moraxella* genusu üyeleri gibi bazı bakteriler karbonhidratları metabolize edemez, daha ziyade aminoasit, alkol ve organik asitler gibi diğer organik bileşikleri parçalayarak enerji elde ederler. Nitrojeni kullanan ya da da sülfür veya demiri oksitleme yeteneğinde olan, serbest-yaşayan bakteriler basit inorganik kimyasallardan enerji elde edebilirler. Kemolitotrof olarak adlandırılan bu bakteriler insanda nadiren hastalık yapar.

2.4. Acinetobacter'lerin İdentifikasyonunda Kullanılan Testler (1)

2.4.1. MacConkey Agarda Ürememe Özelliği

Enterobacteriaceae üyelerinin tümü MacConkey agarda ürerken, bazı nonfermenterler üreyememektedir. Bu yüzden Gram negatif bir basil kanlı agarda ürüyor, MacConkeyde zayıf ürüyor ya da hiç üremiyorsa nonfermenterlerden şüphelenilebilir. Ancak bu kanı her zaman doğru olmayabilir, çünkü bazı nazik Gram negatif basiller de MacConkeyde üreyemez. Bakterinin Mac Conkeyde üreyebilme yeteneğini incelemek için, agar plakların yüzeyine ekim yapılır ve 24–48 saat inkübe edilir. Organizmalar 3mm çapında ya da daha büyük koloniler oluşturacak ve görmek

kolaylaşacaktır. Zayıf üreyen suşlar ise ya geniş bir alana dağılmış, zayıf, tespit edilmesi zor koloniler oluşturur ya da hiç üremez.

2.4.2. Glukoz Kullanımı

Enterobacteriaceae gibi fermentatif bakterilerin asit üretimini tespit etmek için kullanılan çoğu klasik kültür ortamları nonfermentatif basiller için uygun değildir. Bu kültür ortamları çoğu suşların gelişimi için uygun olmayıp, asit üretimi de pH indikatörünü değiştiremeyecek kadar zayıftır. Nonfermentatif basillerin metabolik özelliklerine uygun olan OF ortamı ilk Hugh ve Leifson tarafından tasarlanmıştır.

Hugh-Leifson OF ortamı %0,2 pepton ve %1,0 karbohidrat içermektedir ki bu da pepton/karbonhidrat oranınının 1/5 olduğu anlamına gelmektedir. Aksine karbonhidrat fermentasyonu için kullanılan ortamlarda bu oran 2/1'dir. Pepton oranındaki azalma ile aminoasitlerden ortamın pH' sını yükseltebilecek ve nonfermentatif basiller tarafından üretilen zayıf asitleri nötralize edebilecek özellikteki oksidatif ürünlerin oluşumu minimize edilmiştir. Bir başka açıdan, karbohidrat konsantrasyonunun atırılması ile mikroorganizmaların asit üretimi de artırılmış olacaktır. Agarın yarı-katı yoğunluğu, pH indikatörü olarak bromtimol mavisi kullanımı ve az bir miktar difosfat tamponu içeriği hep asit tespitini arttıracak şekilde tasarlanmıştır.

Test için her bir karbonhidrat ortamından 2 tüpe ihtiyaç duyulur. 1. tüp aerob ortamda tutulurken, diğer tüpün yüzeyi steril mineral yağ veya eritilmiş parafin ile kapatılır. Oksidatif mmikroorganizmalar sadece atmosferik oksijene maruz bırakılan tüpte asit üretirken, fermentatif organizmalar her iki tüpte asit üretir ve nonsakkarolitik bakteriler bu ortamda etkisiz kalmakta ve inkübasyonun ardından alkali bir pH oluşmaktadır (43).

OF testinin bazı sınırlamaları vardır. Yavaş üreyen nonfermentatif basiller birkaç gün için renk değişimi yapamayabilir ve aminoasitlerden amid üreten türler, zamanla tersine dönmekle beraber, zayıf asit reaksiyonları oluşturabilir ki bu da yanlış yorumlamaya neden olabilmektedir.

2.4.3. Pozitif Sitokrom Oksidaz Reaksiyonu

Kanlı agar ya da diğer temel izolasyon ortamında üretilen herhangi bir Gram negatif basil kolonisinin sitokrom oksidaz testi pozitif ise non-fermentatif olma ihtimali düşünülmelidir. Bununla birlikte bütün oksidaz pozitif, Gram negatif bakteriler non-fermenter değildir. Bu yüzden TSI ya da KIA ile glukoz kullanımı test edilmeli. *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio* gibi oksidaz pozitif fermenterlerin kültürleri non-fermenter olarak hatalı tanımlanabilir ki bu da identifikasyonu daha da zorlaştırır. Nonfermenterlerin oksidaz aktivitesini test etmede CDC'nin önerisi; %0,5 tetramethyl-*p*-phenylenediamine hydrochloride solüsyonu kullanılmasıdır. Bu solüsyon buzdolabında + 4 - 10°C'de koyu renkli bir şişede bir hafta süreyle muhafaza edilebilir. Bakteri kolonilerinin ürettiği agar besiyerinin yüzeyine bu solüsyondan birkaç damla damlatılabilir. Birkaç saniye içinde mavi bir renk oluşumu pozitif olarak kabul edilir. Negatif reaksiyon, daha duyarlı olan Kovac's yöntemiyle doğrulanabilir. Bu yöntemde bir parça filtre kâğıdı üzerine damlatılmış reagent ile saf olduğu bilinen plaktan birkaç koloni alınarak karıştırılır. 10 saniye içinde koyu mavi bir renk oluşumu pozitif bir reaksiyonun göstergesidir (1).

2.4.4. Hareket

Fermentatif organizmaların hareketini incelemeye kullanılan yarı-katı bir agar ortamı agarın sadece yüzeyinde üreyen nonfermentatif türler için uygun olmayabilir. Yarı-katı bir agar ortamı nonfermentatif organizmalar için kullanılırsa; ortamın sadece 4 mm altına kadar batırılarak inoküle edilir ve 4-6 saat içinde ilk okuma yapılır. Nonfermentatif bakterilerin çoğu hareketli suşları, ilk etapta agarın yüzeyine yakın bölgede zayıf bir bulanıklık gösterir ve uzamış inkübasyonla bu bulanıklık kaybolur. Okumalar yavaş üreyen suşların hareketini saptamak için 24 ve 48. saatlerde tekrar yapılmalıdır. 25°C'deki inkübasyon bazı suşların hareketini arttırmaktadır. Nonfermentatif bakterilerin hareket tespiti için tetrazolium'lu *Motility B Medium* (Remel, Lenexa, KS) iyi sonuç vermektedir.

Nonfermentatif bakterilerin çoğu türlerinin hareket tespitinde asılı-damla yöntemi daha net sonuç verebilmektedir. Bu yöntemde, 25°C'de 6-24 saatlik bir sıvı kültürde

üreyen bakterilerden bir öze dolusu alınarak lam üzerine yayılır ve üzerine lamel kapatılır. Daha çok tercih edilen ve daha pratik bir yaklaşımda da 18–24 saatlik bir kanlı agar yüzeyinde üremiş kolonilerden küçük bir miktar alınır ve kuru bir lam merkezine bırakılır. Lam merkezindeki inokülüm üzerine bir damla SF damlatılır ve üzerine lamel kapatılır. Her iki yöntemde de 40X’lik büyütmede, zayıf ışık ile organizmaların hareketi mikroskobik olarak incelenir. Doğru hareket tespiti için; brownian hareketten ya da lamel altındaki sıvı akışından farklı yönlerde gerçekleşen hareketin gösterilmesi gerekmektedir. Hareketli bakteriler yönsel hareket gösterir ve birbirlerine göre pozisyonları değişir. Brownian hareket ise sıvının hareketi nedeniyledir ve bakteriler birbirlerine göre aynı pozisyonda kalırlar(1,44).

2.4.5. Pigment Üretimi

Nonfermenterler birçok pigment üretir ve bunlardan bazıları özel bir identifikasyon yapmada yardımcı olur. Suda çözünmeyen pigmentler; karotenoidler (sarı-portakal rengi), violacein (menekşe rengi ya da mor) ve fenazinler (kırmızı, kestane rengi, sarı) olup, bunlar kolonilere ayırıcı renkler verir. Suda çözünen pigmentler fluorescein (piyoverdin), piyosiyanın, piyorubin, melanin ve çeşitli pigmentler ise kültür ortamının rengini değiştirmektedir. “Tech” ve “Flo” besiyerleri suda çözünen pigmentlerden piyosiyanın ve piyoverdin oluşumunu saptamak amacıyla geliştirilmiştir (45). Bu besiyerleri pigment üretimini saptamak amacıyla özel peptonlar içerir ve magnezyum ve sülfat iyonu konsantrasyonları arttırılmıştır. King ve arkadaşları temel besiyerinde kullanılan pepton çeşidinin pigment üretimini önemli derecede etkilediğini bulmuşlar. Bacto pepton piyosiyanın üretimi için son derece uygunken fluorescein için inhibitör etkiye sahiptir. Aksine proteoz pepton 3 ise fluorescein üretimini arttırırken piyosiyanın oluşumunu inhibe etmektedir. Fosfat konsantrasyonundaki bir artış da yine fluorescein üretimini arttırırken, piyosiyanın üretimini azaltmaktadır. Pigment üretimi aynı zamanda organizmaların jelâtin, patates ya da süt içeren ortamlarda, 25–30 °C de inkübe edilmesi ile de arttırılabilir. Piyoverdin “Flo” agarda UV ışığı altında floresan renk gözlenerek ya da görülebilir ışıkta besiyerindeki sarı pigment oluşumu gözlenerek tespit edilebilir(1).

2.4.6. Nitrat Redüksiyonu

Nitratin nitrite redüksiyonu bazı mikroorganizmaların oksidatif metabolizmanın bitiş noktasındaki son hidrojen alıcısı olan oksijeni serbest bırakmak için kullandığı biyokimyasal bir yolun yalnızca ilk basamağını oluşturur. Nonfermenterler için nitrat redüksiyon testi diğer organizmalara benzer bir biçimde yapılır. Nitrat içerikli besiyerinde gecelik inkübasyona bırakılmış kültüre sulfanilik asit ve α -naftilamin ilavesiyle kırmızı bir renk oluşumu ile test değerlendirilir. Eğer kırmızı bir renk oluşmazsa ya nitrat redüklenmemiş demektir ya da redüksiyon nitrit basamağından daha ileriye devam etmiş ve başka bileşenlere veya nitrojen gazına dönüşmüş demektir. Az miktarda çinko tozu ilavesiyle kırmızı renk oluşumu nitrat kalıntılarının varlığını gösterir ki bu da negatif bir test sonucu demektir. Renk değişiminin olmaması nitratin nitrit dışındaki bileşenlere redüklediğini gösterir ve bu da testin pozitif olduğu anlamına gelir (1).

2.4.7. Nitrat ve Nitritin Denitrifikasyonu

Bazı nonfermenterler nitrati ya da nitriti veya her ikisini de nitrojen gazına redükleyebilir. Ters çevrilmiş bir Durham tüpü ile nitrat-nitrit broth veya agar yüzeyi eğimli bir tüp kullanılabilir. Besiyeri karbonhidrat içermediğinden pozitif denitrifikasyon testini gösteren nitrat ya da nitritli bir gaz oluşmaz ki bu pozitif bir denitrifikasyon testini göstermektedir. Broth testini yorumlamak daha kolaydır çünkü ters çevrilmiş Durham tüpünde toplanan gaz kolaylıkla gözlenebilir. Eğimli agarda gaz kabarcıkları genelde tüpün dip kısmında toplanır ve testin pozitif olduğunu gösterir. Denitrifikasyonda kullanılan besiyerlerinin çoğu nitrat ve nitriti birlikte içerir. Floresan-denitrifikasyon ya da floresan-laktoz-denitrifikasyon şeklindeki kombine besiyerleri mevcuttur. Bu kombine besiyerleri çeşidine göre reaksiyonlar değişiklik gösterse de CDC tarafından önerilmektedir (1).

2.4.8. İndol Üretimi

Bazı zayıf tepkime veren nonfermenterler için indol üretimi tespitinde kullanılan yöntemde küçük modifikasyonlara ihtiyaç duyulur. Zenginleştirilmiş triptofan içerikli

bir besiyerine ihtiyaç duyulur. Bazı nonfermenterlerce sadece az miktarda indol üretildiği için, kültür ortamının yüzeyini az bir miktar ksilen ya da kloroform ile kaplamak yararlı olacaktır. Ksilen ya da kloroformu çok az miktarda eklemeye dikkat edilmeli, çünkü minimal dilüsyon dahi indol konsantrasyonunu daha da düşürecek ve Ehrlich ya da Kovac's ayırıcı ile indol tespitinin duyarlılığı düşecektir. Ayırıcın eklenmesiyle birlikte besiyeri yüzeyinde, fuşya rengi oluşumu indol oluşumunu göstermekte ve bu da pozitif test sonucuna karşılık gelmektedir. *Delftia acidovorans* triptofandan indol yerine anthranilic asit denen bir madde oluşturmakta ve bunun sonucunda da balkabağı turuncusu rengi ortaya çıkmaktadır.

2.4.9. Dekarboksilasyon

Bir aminoasidin dekarboksilasyonunu tespit etmede kullanılan Moller Yöntemi pH değişikliği temeline dayanır. Test edilecek organizmanın besiyerine inokülasyonu ve 35°C'de 24–48 saatlik inkübasyonunu takiben test ortamında alkali bir mor renk oluşumu pozitif test sonucunu göstermektedir. Çoğu nonfermenter zayıf dekarboksilaz aktivitesi göstermekte ve pH indikatör sistemini değiştirecek yeterlilikte amin oluşturamayabilir. Yöntemdeki bu eksiklik az miktarda (1/2ml) substrat kullanımı ve yüksek oranda enzim konsantrasyonuna sahip lac fazındaki organizmaların yoğun şekilde inokülasyonu ile giderilebilir. Ayrıca kültür ortamının yüzeyinin 4mm civarında vazelin ile kaplanmasıyla da duyarlılık artırılabilir. İnokülasyonun yapılmadığı, aminoasit içermeyen substrat kontrolünün (negatif kontrol) kullanımı renk değişimini karşılaştırmada şarttır. Besiyerinde bulunan az miktardaki glukozdan asit oluşumuna bağlı olarak ilk etapta meydana gelen sarı renk nonfermenterlerde görülmez, bunlarda daha ziyade reaksiyon sonundaki kuvvetli alkali mor renk oluşumu ile kontrol tüplerdeki daha açık mavi-yeşil renk karşılaştırılarak değerlendirme yapılır. Reaksiyonları negatif olarak değerlendirmeden önce tüpler 5 güne kadar 35 °C'de inkübe edilmeli. Bir indikatör olarak Ninhidrin'in kullanıldığı diğer sistemler dekarboksilaz aktivitesini tespit etmede daha duyarlı olabilir, çünkü direkt olarak aminlerle reaksiyona girerek mor renk oluşturur (1).

2.4.10. *Acinetobacter* ve Diğer Nonfermenter Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Ticari Kit Sistemleri

Ticari kit sistemleri; zayıf, geç üreyen ve biyokimyasal aktiviteleri geç ortaya çıkan non fermenter bakterilerde yanlış sonuçlar verebilir (1).

Oxi/Ferm Tube(Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville MD)

API 20E (BioMerieux, Hazelwood MO)

API 20NE(BioMerieux)

Remel Uni-N/F System(Remel, Lenexa, KS)

Crystal Enteric/Nonfementer System (Becton Dickinson Microbiology Systems)

RapID NF Plus (Remel)

Biolog System (Biolog, Hayward CA)

The Vitek Legacy System(BioMerieux)

The Vitek 2 System

The Microscan Walkaway–96, Walkaway–40, and Autossan–4 System(Dade Behring, West Sacramento CA)

The Sensititre AP80 System(TREK Diagnostic System, Cleveland, OH)

The Phoenix System(Becton Dickinson Microbiology Systems)

2.5. *Acinetobacter*'lerin Virülans Faktörleri

Acinetobacter'ler patojenitesi düşük bakterilerdir. Polisakkarit yapısındaki kapsülü L-rharmoz, d-glukoz, D-glukuronik asit, D-mannoz'dan oluşmaktadır. Polisakkarit kapsülün bakterinin yüzeyini daha hidrofilik yapması, fimbriaların epitel yüzeyine adezyon yeteneği, doku lipitlerini paçalayan enzimlerin üretilmesi, hücre duvarındaki lipit A ve lipopolisakkaritlerin toksik etkileri bakterinin virülansını artırır. Septisemi sırasında oluşan semptomlardan endotoksinler sorumludur. Virülansın sorumlu önemli bir faktör de slime oluşturmalarıdır. *Acinetobacter*'lerin yaklaşık %14'ü slime oluşturmaktadır. Slime nötrofillere karşı sitotoksikite ve peritoneal eksudaya

nötrofil migrasyonunun inhibisyonunda önemli rol oynar (18,46). Üremesi için gerekli demiri insan vücudundan sağlaması diğer bir virülans özelliğidir (47).

2.6. *Acinetobacter*'lerin Sebep Olduğu İnfeksiyonlar

Acinetobacter baumannii, yoğun bakım ünitesinde şiddetli hastane infeksiyonlarından sorumlu, önemli bir fırsatçı patojendir (4).

Acinetobacter türleri pnömoni (en sık endotrakeal tüp ya da trakeostomilerle ilişkili), endokardit, menenjit, deri ve yara infeksiyonları, peritonit ve üriner yol infeksiyonları gibi çeşitli infeksiyonlara neden olabilmektedir. Konjunktivit, osteomyelit ve sinovit gibi sporadik vakaları da bildirilmiştir (1–3). Özellikle hastane yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardaki ventilatör-ilişkili pnömoni başta olmak üzere nozokomiyal pnömoni ajanı olarak da baskın role sahiptir (4,5). *A. ursingii* hastanede yatan hastalarda kan yolu infeksiyonları etkeni olarak gösterilmiştir (48). *A. junii* özellikle pediatrik hastalarda oküler infeksiyon ve bakteriyemilerin nadir bir etkenidir (49). HIV (+) bir hastada toplum kaynaklı bir *A. radioresistens* bakteriyemisi rapor edilmiştir (50).

2.7. *Acinetobacter*'lerde Antibiyotik Direnci

Acinetobacter türleri birçok antibiyotiğe direnç gösterme eğilimindedir. Ancak *A. lwoffii* diğer türlerden daha duyarlıdır. Penisilin, ampisilin ve sefalotine hemen hemen tüm grup üyelerinde direnç gözlenmekte olup, suşların çoğu kloramfenikole dirençlidir (51). İkinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere ve trimetoprim/sulfametoksazole duyarlılıklarının değişken olduğu rapor edilmiştir. Son yıllarda *Acinetobacter* türleri arasında aminoglikozidlere direncin artma eğiliminde olduğu düşünülmektedir. Yine nozokomiyal salgınlarda karbapenem dirençli *Acinetobacter* türlerini de içeren çoklu ilaç direnci gösteren suşlarda bir artış görülmektedir (31,32).

Acinetobacter türleri için antimikrobiyal duyarlılık testi problem yaratabilmektedir. CDC' de Swenson ve ark. Kullandıkları standardize mikrobroth dilusyon testi sonuçlarının bazı antibiyotikler için standardize disk difüzyon yöntemi sonuçlarıyla uyuşmadığını görmüşler. Mikrobroth dilusyon yöntemiyle β -laktam ve β -

laktam inhibitör kombinasyonu antibiyotiklere tipik olarak daha fazla direnç görülmesi gibi majör hatalar sıktır (52).

Bir aminoglikozid ve tikarsilin ya da piperasilin ile kombine tedavi sinerjistik etki gösterir ve ciddi infeksiyonlarda etkili olabilir. Bazı çalışmalar çoklu direnç gösteren *Acinetobacter* infeksiyonları için ampisilin veya sefoperazon ile sulbaktam kombinasyonunun klinik yararını kanıtlamıştır (53–55). Çoklu dirençli *Acinetobacter*'lere karşı aktif olduğu gösterilen tek antibakteriyel ajan kolistindir (56).

2.7.1. Antibiyotiklere Direncin Biyokimyasal ve Genetik Mekanizmaları

Acinetobacter'lerde türler arasında antibiyotik direnç genlerinin transferinde konjugasyon mekanizması önemli rol oynar (18.57)

Plazmidler ve transpozonlar çoğu prokaryot organizmalar ve *Acinetobacter* türlerinin biyolojisinde önemli rol oynarlar. *Acinetobacter*'lerin %80 oranında farklı büyüklüklerde çok sayıda plazmid taşıdıkları bildirilmektedir. Sadece birkaç çalışmada; direnç genlerinin plazmid aracılığı ile transferi gösterilmektedir. Ayrıca kromozomda lokalize transpozonlar aracılığıyla çoğul antibiyotik direnç geninin taşındığı rapor edilmiştir (18).

2.7.1.1. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

- İlk olarak ESBL 1980'lerin ortasında tanımlandı. Bir veya daha fazla aminoasit yerine geçen TEM ve SHV plazmid aracılı penisilinazlar çok önceki mutant örneklerdi.
- Mutasyonlar oksimino gruplarının sapmasına neden olan ve β laktam halkasına saldıran aktif bölgeleri arttırmaktadır.
- >200' den çok mutant tüm oksimino-sefalosporinlere saldırmakta fakat alfa metoksi sefalosporinlere (sefamisin) veya karbepenemlere etki edememektedir (58).
- Bakterilerin sitoplazmik membranları üzerinde bulunan ve bakteri hücre duvarında peptoglikan sentezinden sorumlu olan penisilin bağlayıcı protein adı

verilen hedef proteinlere bağlanarak etkilerini göstermektedir. Beta-laktam antibiyotiklerin hedeflerine bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için gram negatif bakterilerde porin adı verilen içi su dolu protein kanalcıklardan geçmeleri, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta-laktamazlardan etkilenmemesi gerekmektedir (59,60).

- Verilerin sırasına göre β laktamazlar 4 sınıfa ayrılırlar, her biri genellikle plazmid aracılı veya kromozomal tipi içerir.
- 1970'lere kadar çoğu izolat antibiyotiklerin çoğuna duyarlıydılar.
- Daha sonra *A.baumannii* her antibiyotik sınıfına direnç geliştirebilecek bir meyile sahip olduğu gösterilmiştir (61).
- Klasik penisilinazlar yaygındır. Ve bir kaç izolatta ESBL ve VEB-1 enzimli bir kopya kuzey doğu Fransa'da bulunmuştur. 2003-2004 (62).
- 1990'ların son dönemlerinde karbapenemler *Acinetobacter* infeksiyonlarında kullanılan tek ajandı. Son yıllarda karbapenem direnci artmaktadır. Uzak doğuda bazı salgınlarda IMP ve VIM metallo β -laktamazlı klonları vardı. Non β -laktamazlı izolat direnci de rapor edilmiştir (63).
- Bütün *A. baumannii* izolatları özel bir D sınıfı karbapenemazı olan OXA-51 benzeri enzime sahiptir. *Acinetobacter*'e karşı karbapenem aktivitesinin erozyonu verilen alternatif ajanların yetersizliğini ortaya koymakta Tedavi intravenöz polimiksinlere bağlı olmaya başladı. Yeni bir tetrasiklin türevi olan tigesiklinin alternatif olup olmadığı ve pnömonilerde polimiksinlerin eklenmesinin değerli olup olmadığı yüksek konsantrasyonlarda verilmesi tartışma konusudur (58).

2.7.1.2. Aminoglikozitlere Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter infeksiyonlarının tedavisinde aminoglikozitlerin sıklıkla kullanılması sonucunda bu antibiyotiklere direnç gelişimi artmaktadır. *Acinetobacter*

suşlarında aminoglikozit modifiye edici enzimlerinden asetiltransferaz, nukleotidiltransferaz ve fosfotransferaz enzimleri ile aminoglikozitlere direnç gelişmektedir. Aminoglikozit direnç genleri plazmid ve transpozon kaynaklıdır (18,64). Ancak bu enzimlerin sıklıkları ülkelere göre değişmektedir. Bazı suşlar ise birden fazla tipte aminoglikozit direnç geni içerebilmektedirler. Ayrıca sadece *A. haemolyticus*'un içerdiği AAC(6)-Ig geni amikasin direncinden sorumludur ve bu türün identifikasyonunda kullanılabilir (18).

2.7.1.3. Kinolonlara Direnç Mekanizmaları

Mekanizma tam bilinmemesine rağmen *Acinetobaeter'* lerde 4-kinolanlara kolaylıkla direnç gelişmektedir (18). Diğer organizmalardaki 4-kinolanlara dirençten özellikle *gyrA* mutasyonları ile oluşan DNA giraz subunitindeki yapısal değişiklikler sorumlu tutulmaktadır. Bu gen bölgesinde Gly-81, Ser-83, Ala-84 ve Gln-106'nin yerine değişik aminoasitler geçmesi ile direnç gelişmektedir. Nadir görülen yüksek düzey dirençten ise subunit B'deki değişikliklerin sebebi sonucu oluşan *gyr B* mutasyonları sorumludur (18,65).

Başka bir direnç mekanizması ise *Acinetobacter* hücre duvarlarının antibiyotiklere karşı az geçirgen olmasıdır. 4-kinolanlara karşı dirençte dış membrandaki değişiklikler sonucu içeriye alınmanın azalması sorumlu tutulmaktadır (18).

2.7.1.4. Diğer Antibiotiklere Direnç Mekanizmaları

Yüksek düzey trimetoprim direnci (MIC>1000 mg/L) konjugatif plazmitte bulunan transpozonlardaki çoklu direnç genleri ile ilişkilidir. Benzer olarak kloramfenikol asetiltransferaz I (CATI) geni kromozom ve plazmid DNA'sı ile ilişkilidir (18).

Tablo 3. *Acinetobacter*'lerde bulunan antibiyotik direnç mekanizmaları

ANTİBİYOTİK	MEKANİZMA
B-LAKTAMLAR	Penetrasyonun azalması Hedef molekülde değişiklik B-laktamaz (plazmid ve kromozomal), GSBL (PER-I)
İMİPENEM	İmipenemaz
FLOROKİNOLONLAR	Hedef molekülde değişiklik Penetrasyonun azalması Aktif dışarı atma
AMİNOGLİKOZİTLER	Enzim ile modifikasyon İçeri alınmanın azalması

2.8. *Acinetobacter*'in Epidemiyolojisi

Acinetobacter'ler vücudun koltuk altı, kasıklar, parmak araları gibi nemli bölgelerinin florasında yer alırlar. Hospitalize hastalarda ve çeşitli salgınlarda cilt, boğaz, solunum sistemi ve sindirim sisteminde yüksek düzeyde kolonizasyon gösteren olgular yayınlanmıştır. Yoğun bakım ünitelerinde mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda bu cihazların kontaminasyonu nedeniyle solunum yollarında kolonizasyon çok yüksektir. Buradan sağlık personelinin ellerine bulaşmakta ve yayılmaktadır. Ayrıca yoğun bakıma yatan hastalarda *Acinetobacter* 'lerin orofaringeal ve sindirim yolu kolonizasyonu salgınlar için önemli bir rezervuardır (18–20).

Nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonları her bölgeyi tutabilir. Ancak özellikle solunum sistemi, cilt ve yaralarda yaygındır. Cilt ve solunum yollarından izole edilenlerin büyük kısmı kolonizasyon olarak değerlendirilir. İzolasyon oranı son yıllarda artmaktadır. Gelecekte hastane infeksiyonu salgınlarında önemli yer tutacağı bildirilmektedir (18,66).

Salgınların önlenmesi klasik epidemiyolojik bilgiler yanında, etken mikroorganizmanın kaynak ve bulaş yolları hakkında belirleyici bilgiler sağlayan suş tiplendirme yöntemlerinin de katkısı fazladır. Suş tiplendirilmesi mikroorganizmaların izole edildiği farklı kaynaklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır.

2.9. *Acinetobacter*'lerin tiplendirmesinde kullanılan yöntemler

Nozokomiyal infeksiyonların epidemiyolojisinin ve patojen kontrol metodlarının belirlenmesinde patojenlerin yayılımını ve ilişkililiğini bilmek gerekir. Patojen tiplendirmenin rolü epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların aynı zamanda genetik olarak da ilişkililiğini saptamaktır. Geçmişte nozokomiyal patojenlerin bu tip bir analizi biyotip, serotip, bakteriyofaj ya da bakteriyosin tipleri ve antimikrobiyal duyarlılık profilleri gibi fenotipik karakteristiklerinin karşılaştırılmasına dayandırılıyordu. Bu yaklaşım DNA temelli yeni teknolojilerde ya da moleküler analiz uygulamalarındaki gelişmelerle birlikte son 20 yıldır değişmeye başladı. Bu DNA-temelli moleküler metodlar; PFGE ve diğer restriksiyon bazlı metodlar, plazmid analizi ve PZR bazlı tiplendirme metodlarından oluşmaktadır. Nozokomiyal patojenlerin tiplendirmesinde kullanılan moleküler metodların işbirliği, suşların akrabalığına ilişkin daha temel bir değerlendirme elde etme çabalarına yardım eder. Patojenlerin klonal ilişkisini saptamanın amacı; organizmanın kaynağının tanımlanması, infeksiyöz suşları, noninfeksiyözlerden ayırmak ve infeksiyonun relaps mı yoksa reinfeksiyon mu olduğunu anlamaktır. Hastane kaynaklı infeksiyon etkeni olan türlerin çoğu aynı zamanda yaygın kommensal organizmalardan oluşmakta ve bu yüzden “hastadan elde edilen izolat infeksiyona neden olan patojenik bir suş mudur? Yoksa infeksiyon kaynağı olmayan kommensal bir kontaminant mıdır?” karar verebilmek önemli. Yine aynı şekilde, “ilk infeksiyon etkeninden farklı bir suşla yeni bir infeksiyon mu? Gelişmiş (reinfeksiyon) yoksa orijinal infeksiyonun muhtemel bir relapsı mı söz konusu?” ayrımını yapmak oldukça önemlidir. Eğer relaps söz konusu ise ilk tedavi rejiminin etkili olmadığı ve alternatif tedavi rejimine ihtiyaç duyulduğu anlamına gelmektedir (21–30).

Patojenler klinik epidemiyolojik verilerle desteklenen moleküler tiplendirme metodları kullanılarak tanımlanmış salgın ile ilişkilendirilir. Ardından bulaşın şekli

(rezervuar ve vektör) ve alınan spesifik kontrol önlemlerini de içeren enfeksiyonun epidemiyolojisi hakkında neden-sonuç ilişkisine ilişkin bir hipotez üretilir. Enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkililiği ve tedavi rejiminin etkinliğini değerlendirmek için sürekli sürveyans şarttır.

2.9.1. Fenotipik yöntemler

Organizmaların identifikasyon ve tiplemesinde kullanılan ilk metotlar fenotipik özelliklerine dayanıyordu. En yaygın kullanılan tekniklerden biri biyotipleme ya da biyokimyasal reaksiyonları, morfolojileri ve çevresel toleranslarındaki farklılıklar gibi özelliklerine bağlı olarak suşların ayırımıdır. Biyotipleme sıklıkla mikroorganizmaların farklı büyüme ortamlarındaki bileşenleri kullanma ve bazı kimyasal reaksiyonları gerçekleştirme yeteneklerine bağlı olarak saptanmaları için kullanılır, fakat aynı zamanda organizmalar arasındaki biyokimyasal farklılık ile ilişkili olarak belli bir türün üyelerini ayırmada da yardımcı olabilir. Biyotipleme şu anda da türlerin identifikasyonu için dizayn edilmiş otomatize sistemler aracılığıyla laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır (21).

Antimikrobiyal duyarlılık testi klinik mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak yapılan bir testtir. Antimikrobiyal duyarlılık testi otomatize broth mikrodilüsyon ya da disk difüzyon yöntemleri kullanılarak yapılır. Hem disk difüzyon hem de broth dilüsyon dikkatlice standardize edilmektedir ve böylece laboratuvarlar içi ve arasında tekrarlanabilirliği yüksektir. Genetik ve epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan izolatlar aynı duyarlılık paternini verebileceğinden dolayı çoğu epidemiyolojik çalışmada antibiyogram sınırlı değere sahiptir. Aslında çoğu kez hastae ortamındaki bu antimikrobiyal direnç fenotiplerinin dağılımını çalışmak için farklı genotipleme metotları kullanılır (67,68).

Serotiplendirme bir dizi antikor kullanılarak bakterilerin yüzeyindeki antijenlerin tespit edilmesi yoluyla antijenik çeşitliliğin gösterilmesidir. Serotipleme metotları bazı bakteriyel patojen türlerin taksonomik sınıflandırılmasında 10 yıldır kullanılmaktadır. Serotipleme aynı zamanda *Klebsiella* ve *Pseudomonas* gibi nozokomiyal patojenlerin tür içi suş ayırımında epidemiyolojik değer taşımaktadır. Bikaç farklı yolla serotipleme

yapılabilir. En çok bir bakteriyel hücre süspansiyonunun antikor paneli ile karıştırıldığı direkt antijen-antikor aglütinasyon yöntemi kullanılır. Aglütinasyon profillerine göre serolojik tipe karar verilir (21,69–71).

Bakteriyofaj ve bakteriyosin tiplendirmesi epidemiyolojik olarak bakterilerle sınırlıdır. Bakteriyofaj tiplemesi belli bir takım faja dirençli ya da duyarlılık paternine dayanarak bakterilerin sınıflandırılmasıdır. Bakteriyofajlar bazı bakterilerin hücre duvarlarına tutunarak içeri girip çoğalabilen ve çoğu kez hücrenin lizisine neden olan virüslerdir. Bu olay hücre yüzeyindeki fajın bağlanacağı reseptörün uygunluğuna bağlıdır. Sıklıkla patojenlerin farklı suşları farklı reseptör kohortlarına sahip olup, bu da farklı lizis profillerine yol açar. Bakteriyofaj tiplemesi biyolojik olarak aktif fajların yaygın olarak bulunamamasından ve yöntemin teknik zorluğundan dolayı kolaylıkla yapılamamaktadır. Buna ilaveten suşlar diğer bakteriler tarafından üretilen genellikle proteinlerden oluşan bir dizi heterojen maddeye karşı duyarlılıklarına göre de tiplendirilebilir. Bu inhibitör maddeler ya da bakteriyosinler çoğunlukla yakın ilişkili türlerin gelişimini sınırlar. Bakteriyosin tipleme faj tiplemesindeki eksiklikler benzer nedenlerden dolayı sınırlı kullanıma sahiptir.

Fenotipik metotların dezavantajları: Nozokomiyal patojenlerin karakterizasyonu için fenotipik metotların kullanımı bununla birlikte bu metotlar mikroorganizmaların tiplendirilmesinde bazı eksikliklere sahiptir. Serotiplemenin kısıtlayıcılığı; belli antiserumların elde edilebilme zorluğu ve farklı yöntemlerin standardizasyonu ile ilgili problemler. Biyotiplemede; mikroorganizmaların biyolojik özelliklerini değiştirebilen gen ekspresyonu ve rastgele mutasyonlardaki varyasyonlardan dolayı ayırım gücü düşüklüğü. Biyotipleme enterokoklar gibi nadir biyokimyasal çeşitliliğe sahip suları ayıramamakta ve bu yüzden epidemiyolojik çalışmalarda yetersizdir. Bakteriyofaj tiplemesi çok emek gerektiren zahmetli bir yöntemdir ve çoğunlukla tekrarlanabilirlik ve standardizasyonu zayıftır. *P. aeruginosa* ve *Candida* türleri gibi kolaylıkla tiplendirilemeyen organizmalar için diğer fenotipik metodlar başarısız olursa bakteriyosin tiplemesi yararlı olabilir. Bu sınırlandırmalara rağmen fenotipik karakterizasyon infeksiyon hastalıklarının yönetiminde önemli bir rol oynamaya devam

etmektedir. Örneğin, rutin antimikrobiyal duyarlılık testi klinik mikrobiyoloji laboratuvarı için eşsiz bir antimikrobiyal direnç paterni sağlamakta ki bu da sıklıkla hastalar arasında potansiyel hastalık problemlerinin erken bir göstergesi olarak görev yapmaktadır (21,72–74).

2.9.2. Genotiplendirme metotları

Hastane kaynaklı infeksiyonların kontrolü ve çalışılmasına genotipik metotları uygulamadaki amaç; nozokomiyal bir salgın sırasında toplanan epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlar arasında bir bağ kurabilmektir. Başka bir deyişle, nozokomiyal bir salgın izolatları genetik olarak ilişkilidir ve bu yüzden de aynı suştan köken alırlar. Böylece, infeksiyon kontrolünde suş tiplemenin kullanımı bazı ilkelere bağlıdır;

1. Salgınla ilişkili izolatlar tek bir (ortak) prekürsör ya da klonun yakın soyundan olmalı,
2. Bu izolatlar aynı genotipe sahip olmalı
3. Epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar farklı genotiplere sahip olmalı

Bu kuralların bazı istisnaları var. Örneğin, eğer bir tür ya da subtipin içindeki genetik çeşitlilik sınırlı ise ya da eğer genotiplendirme yöntemi nonklonal izolatları ayırmada yeterli değilse; epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar benzer ya da ayırt edilemez genotiplere sahip olabilir. Bazen de salgın sırasında mutasyon, plazmid aktarımı gibi genetik olaylar olabilir, böylece suşların benzer olup olmadığını bilmek yeterli olmayabilir fakat daha ziyade izolatların nasıl ilişkili ya da ilişkisiz olduğunu bilmek şart olabilir (21).

2.9.2.1. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Kromozom hücrenin kimliğini belirleyen en önemli bileşendir ve bu yüzden suşlar arası ilişkililiği tespit etmede ayrıcalıklı bir ölçüm sunar. Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu farklı boyutlarda bir dizi fragment oluşur ve agaroz jel elektroforezi ile analiz edildiğinde bu fragmentler farklı paternler oluşturur. Enzimler çoğunlukla bakteriyel kromozomdaki sayısız tanınmış bölgelerdeki DNA'yı kesmek için kullanılır ve ardından çok sayıdaki bant fragmentini yeterli ve doğru olarak

karşılaştırmak için konvensiyonel agaroz jel elektroforezi yapılır. Son zamanlarda analiz için DNA'yı daha az sıklıkta kesen restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır. Oluşan DNA fragmentleri konvensiyonel agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmayacak kadar büyüktür. Genellikle PFGE olarak sınıflandırılan birkaç alternatif metod bu büyük DNA fragmentlerini ayırabilmektedir (75–79). Konvensiyonel agaroz jel elektroforezinde 40–50 kb üzerindeki DNA fragmentlerinin yeterli oranda yürümesi mümkün değildir. PFGE'de DNA'nın ayrıştırıldığı elektriksel alanın yönü periyodik olarak değiştirilerek çoğunlukla megabaz-boyutlu DNA olarak adlandırılan 1,000 kb'dan daha uzun DNA moleküllerinin ayrıştırılması mümkün kılınmaktadır. PFGE metodlarında, farklı açılarda ve belirli aralıklarda yönü değiştirilen elektrik akımıyla DNA parçalarının büyüklüklerine göre ayrıştırılması sağlanır. En yaygın kullanılan iki şekli vardır; CHEF (contour-clamped homogenous electric field) ve “field inversion” (alan değiştirme) jel elektroforezi. “Field inversion” jel elektroforezinde periyodik olarak 180° tersine çevrilen elektriksel alanın oryantasyonunun sağlandığı konvensiyonel bir elektroforez tankı kullanılır. CHEF'de ayırıştırma için son derece yeterli elektrik alan koşullarının sağlayan çoklu elektrotlara sahip daha kompleks bir elektroforez tankı kullanılır. Tipik olarak elektroforez cihazı 120° açılarla elektrik akımının yönünü değiştirerek DNA moleküllerine yön verir. CHEF çeşitli antimikrobiyal-dirençli bakterilerin yayılımını değerlendirmede kullanılır. İzolatların eş ya da ilişkili diye adlandırılan restriksiyon endonükleaz patern bulguları tek bir suştan yayılımı göstermektedir.

PFGE ile oluşturulan DNA fragment paternlerinin yorumlanması ve nozokomiyal patojenlerin tiplemesinde epidemiyolojik olarak kullanışlı bilgi haline çevrilmesi için klinik mikrobiyologlar PFGE paternlerinin nasıl karşılaştırılacağını ve rastgele genetik olayların bu paternleri nasıl değiştirdiğini anlaması gerekir. İdeal olarak, PFGE izolatları birbirleriyle aynı ve epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlardan tamamen farklı olan bir salgın suşunu temsil eder. Alternatif olarak, bir salgın sırasında restriksiyon profilini değiştirebilen nokta mutasyonu ya da DNA'nın insersiyon ve delesyonları gibi rastgele genetik olaylar gerçekleşebilir. Yorumlayıcı kriterin amacı suşlardaki gerçek farklılıkları, bir nozokomiyal salgın sırasında olabilecek rastgele genetiksel polimorfizmlerden ayırabilecek bir klavuz oluşturmaktır. Uygun yorumlayıcı

kriter varsayılan salgın suşu ve birbirinden farklı izolatlar arasındaki restriksiyon patern değişikliklerini ilişkilendirmek ve izolatın salgına ait olduğuna dair olası bir tahmin yürütmek için tutarlı, objektif bir rehber sağlar. Bu ilişkilendirme elde edilen patern değişikliklerini yorumlamada gerekli çeşitli genetik olaylar üzerinde yoğunlaşır (80-84). Çünkü organizmanın genetik bileşeninin yalnızca küçük bir kısmı analiz edilmektedir, benzer sonuçlar veren izolatlar “ayırtdilemez” olarak sınıflandırılır, “eş” değil.

PFGE'nin yorumlanmasında çoğunlukla Tenover tarafından önerilen guideline kullanılır (85). Buna göre 3 fragmentin 1 bant paterni farklılığı; tek bir genetik olay sonucu oluşmuştur ve bu yüzden bu izolatlar yüksek derecede yakın ilişkili olarak sınıflandırılır. 6 restriksiyon fragmenti için 4 bant farklılığı 2 genetik olay sonucu oluşmuştur ve 7 restriksiyon fragmentinden daha büyük farklılıklar 3 ya da daha fazla genetik olay sonucu oluşmuş demektir. PFGE analizinde 3 fragment ile farklı bulunan izolatlar aynı suşun epidemiyolojik olarak ilişkili subtipini ifade edebilir. Bunun aksine, 3 restriksiyon fragmentinden daha fazla yerde farklılık gösteren izolatlar daha zayıf bir epidemiyolojik ilişki gösterebilir. PFGE ve diğer tiplleme metotları kullanılarak yapılan bazı araştırmalar RE bölgesini değiştirebilen ya da yeni bir RE bölgesi oluşturabilen ya da plazmid, bakteriyofaj ya da insersiyon sekansları ile ilişkili DNA insersiyon/delesyonları gibi tek genetik olayların tahmin edilemeyecek kadar kısa sürede hatta iyi tanımlanmış bir salgının 1–3 ayı içinde olabileceğini göstermiştir. Salgın suşuyla karşılaştırılan fragment paternlerindeki farklılık yoluyla 2 genetik değişim olayının tespiti ile bir salgınla ilişkililiğin belirlenmesi her zaman kolay olmamaktadır. Sonuçlar bu izolatların ilişkili olduğunu gösterebilir (özellikle de izolatlar 3–6 ay gibi uzun bir zaman periyodunda toplanmışsa), fakat aynı zamanda suşların ilişkisiz ve salgının bir parçası olmadığı ihtimali de unutulmamalıdır (72).

Çoğunlukla nozokomiyal bir hastalık salgını durumunda, PFGE paternlerinin analizi BioNumerics gibi bir yazılım program kullanılarak yapılır ya da DNA parmakizi analizi için mevcut diğer programlardan biri kullanılarak yapılır. Rementeria ve arkadaşları 3 software paketinin (GelCompar version 4.0 [Applied Maths], Molecular Analyst Fingerprinting version 1.0 [Bio-Rad, Hercules, CA] ve BioImage version 3.2

[BioImage Corp., Ann Arbor, MI]) ve manuel görüntüleme sonuçlarını karşılaştırmış ve her bir metodun jel analizi için kabul edilebilir sonuçlar verdiğini, ancak her metodun belirlediği genotipler arasında bazı farklılıklar olduğunu görmüşler (86). Az sayıda izolat profilinin çıplak gözle incelenmesi yapılabilirken, software programlar çoklu jellein değerlendirilmesinde band paternlerini normalize edebilmekte ve veribankasında verileri depolamaktadır, bu yüzden de çok sayıdaki suş profillerini karşılaştırmada bu programlar daha uygundur. Çoğu analiz programları aynı zamanda suşların evriminin ve izolatlar arası atasal ilişkisinin belirlendiği filogenetik analizini sağlayan algoritmalar içerir (87,88). Genelde suşlar %100 benzerlik gösteriyorsa eş kabul edilir ve %80'den daha fazla benzerlik gösteriyorsa klonal olarak ilişkili kabul edilir. Tipik filogenetik çıktı dendogram olarak ifade edilir ve suş neslinin ve gruplar arası genetik benzerlik ve farklılıklarının görsel bir temsilidir.

PFGE mevcut metotlar arasında tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü en yüksek yöntemlerden biridir ve genelde çoğu epidemiyolojik değerlendirmede tercih edilen metottur.

2.9.2.2. Moleküler Tiplendirmede Kullanılan Diğer Yöntemler (21)

Southern Blot Analizi-Ribotipleme: İzolatların tiplendirilmesinde az-kesen RE enzimlerine ve PFGE'ne ilave olarak RFLP'de kullanılmaktadır. Southern blotlamada yorumlanabilir bant sayısı elde edilir. Kromozomal DNA'yı kesen tipik restriksiyon enzimleri uygun analiz için çok sayıda fragmente ayırır ve suşlar arası genetik karşılaştırmaya olanak sağlar. Bu sınırlayıcı özelliğin üstesinden gelebilmek için Southern blotlama kullanılabilir. Kısaca, bakteriyel DNA sık-kesen bir restriksiyon enzimi kullanılarak kesilir, DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılır ve daha sonra fragmentler nitroselüloz ya da naylon bir membrana transfer edilir. Sonra özgül DNA dizilimlerinin kolorimetrik ya da radyoaktif madde ile işaretlendiği homolog bir DNA parçası (prob) membrandaki DNA'ya tutturulur. Uygun koşullar altında, prob komplementer bir baz çiftine hibridize olur ve proba işaretli bant paterni değerlendirilir. Bu metodun ayırım gücü bakteriyel genomdaki hedeflenen genetik elementlerin kopya sayısı ve elektroforezi takiben restriksiyon fragmentlerinin

arasındaki dağılımıyla ilişkilidir. Elde edilen fragmentlerin sayı ve büyüklüğündeki değişiklikler mikroorganizmaların tiplemesinde kullanılır. Southern blotlamadaki en yaygın hedeflerden biri rRNA genidir ve bu da ribotipleme olarak adlandırılır. Tipik olarak, ribotiplemenin ayırım gücü PFGE ya da diğer PZR-bazlı metotlardan daha az olarak görünmektedir; ancak bazı organizmalar bu metotla çalışılmaktadır. Ribotiplemenin potansiyel bir avantajı son derece otomatizedir ve böylece insan gücünde tasarruf sağlanır ve kişiden kaynaklanan değişiklikler sınırlandırılmış olmaktadır.

Plazmit Analizi: Plazmit tipleme bakteriyel tipleme aracı olarak kullanılan ilk moleküler metottur. Plazmitler kendi kendine replike olabilen, sıkça transfer edilebilen prokaryotik sitoplazma içindeki ekstrakromozomal DNA elementleridir. Plazmit izolasyonunu takiben tipleme yapılır ve agaroz jel elektroforezi ile plazmitlerin sayı ve büyüklükleri karşılaştırılır. Bazı bakteriler 100–150 kb gibi ayrıştırılmaları zor olan büyük plazmitlere sahiptir; bu suşlar için, yöntemle plazmit izolasyonunu takiben bir RE kesim basamağı ilave edilir ve oluşan çok sayıda fragment sayesinde suşların ilişkililiğinin yorumlanması daha kolaylaşır. Plazmit restriksiyonu aynı zamanda 50 kb'dan daha küçük plazmitlere sahip Stafilokok ve Enterokok analizi için yaygın olarak kullanılır. Restriksiyon enzim analizinin yöntemle dâhil edilmesi yöntemin ayırım gücünü artırır.

Plazmit içeriğinin değerlendirilmesi genellikle suş ilişkililiğinin belirlenmesinde kullanışlı değildir. Eğer şüpheli bir nozokomiyal salgın izolatları 3 ya da daha fazla ortak plazmit içeriyorsa (15 kb'dan daha küçük plazmitlere ilave zayıf bant gibi görünen açık sirküler ya da lineer formlar hariç) istisnai bir durum olabilir (koagülaz negatif stafilokoklar, *K. pneumoniae* ve diğer Gram negatif basiller gibi suşlarda yaygın olarak görüldüğü gibi). Bu durumda ilave testler yapılmaksızın epidemiyolojik olarak ilişkilidir denilebilir. Daha az plazmit ile testin ayırım gücü azalır. Benzer antimikrobiyal direnç profili gösteren ve PFGE ya da diğer yöntemlerle klonal ilişki saptanmayan izolatlarda plazmit yayılımından şüphelenilebilir.

Plazmit analizi farklı PFGE profili gösteren izolatlar arasında ve hastanedeki farklı organizma türleri arasındaki evrimin ve antibiyotik direncinin yayılımının belirlenmesinde uygulanabilir. Plazmitler genelde endemik ve epidemik suşlar arasındaki ayrımı yapmaya yardımcı olmaz, çünkü plazmitler sonradan kazanılabilen ya da kaybedilebilen hareketli ekstrakromozomal DNA fragmentleridir. Epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların farklı plazmit profili gösterebilmeleri bu plazmit hareketliliğinin bir sonucudur. Çoğu plazmit antibiyotik direnç determinantları taşır ve bunlar plazmitlerin ve kromozomun içine ya da dışına taşınabilen hareketli genetik elementler (transpozon) üzerinde bulunabilir ki bu da plazmidin DNA kompozisyonunun hızla değişebileceği anlamına gelir. Plazmit içeriğinin analizi bir direnç özelliğinin yayılımından sorumlu epidemik bir plazmitin araştırılmasıyla sınırlıdır. Antibiyotik direncini eksprese etmede nozokomiyal organizmalara selektif bir baskı, böyle plazmitlerin suşlar ve diğer türler arasında hızla yayılımına neden olabilir.

Klonal olarak ilişkisiz suşlar arasında plazmit yayılımını değerlendirmek için direnç plazmitlerinin izolasyonu ve restriksiyon analizi şarttır. Farklı türlerden izolatlar ya da aynı türün PFGE ve plazmit içeriği profili farklı olan izolatları benzer direnç genlerine sahipse bir transpozon epidemisi düşünülür. Potansiyel bir transpozon epidemisini belirlemede daha detaylı analiz için transpozonun PZR ve DNA sekanslaması yapılabilir. Nozokomiyal patojenlerin epidemiyolojisini açıklamada çoğu Gram negatif organizmalar sadece tek bir ve çoğunlukla son derece korunmuş plazmite sahiptir ve bu plazmit epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlarda bile RE ile kesim sonrası benzer paternler gösterir; bu yüzden bu ya da buna benzer özellikteki izolatlar için ilave tipleme tekniklerinin kullanımı önerilmektedir.

PZR Aracılı Tipleme Metotları: PZR bir hedef nükleik asit sekansının çok miktarda sentezinin sağlandığı bir in-vitro biyokimyasal reaksiyondur. Yöntem için gerekenler; 1) tiplendirilecek olan organizmadan elde edilen kalıp DNA, 2) amplifiye edilecek olan kalıp DNA üzerindeki dizinin yanında olacak şekilde dizayn edilmiş iki komplementer oligonükleotid primer 3) ısı-stabil DNA polimeraz. PZR primerleri polimerazın bazları eklemesi için bir başlangıç noktası olarak görev yapar ve kalıba

komplementer olarak bir dizi eklenir. Her amplifikasyon siklusu; çift zincirli DNA'nın tek zincir haline dönüştüğü sıcak bir denatürasyon fazı (94–96 °C), primerlerin tek zincir üzerindeki hedef diziyeye bağlandığı bir bağlanma fazı (54 °C) ve bir uzama fazından (72 °C) oluşur. Uzama fazı boyunca DNA kopya sayısı 2 katına çıkar ve çift zincirli DNA molekülünün çok sayıda kopyası oluşturulmuş olur.

Multipleks PZR: PZR tiplemesinin etkinliğini artırmak ve reagent maliyetini düşürmek için tek bir reaksiyon tüpünde çoklu primer seti kullanılarak yapılan PZR yöntemidir. Primerlerin dizaynı önemlidir. Örneğin primerlerin tümü çok yakın bir optimum annealing ısısına sahip olmalı ve ayrıca amplifikasyon ürünleri yorumlamayı kolaylaştırmak için birbirinden oldukça farklı büyüklükte olmalı. Eğer amplifikasyon ürünleri çok yakın büyüklükte olursa amplifikasyon ürününün özdeşliğine karar vermek zorlaşır. Yine ayrıca farklı primerlerin karıştırılması potansiyel olarak amplifikasyon işleminin engellenmesine neden olabilir, bu yüzden reaksiyonun, özellikle de reaksiyon karışımında bulunan çok sayıdaki primer çiftinin optimizasyonu zordur.

Nested PZR: PZR'da aşırı bir duyarlılık ve özgüllüğe ihtiyaç duyulduğunda yapılabilir. Ardışık olarak 2 PZR primer seti kullanılır. İlk primer seti hedef bir diziyi amplifiye etmede kullanılır (ikinci primer seti için duyarlılık artırılır); amplikon ikinci bir amplifikasyonda kalıp olarak kullanılır ve ilk amplikonun iç kısmında bir bölgeye özgü ikinci primer seti kullanılır. Eğer ilk amplifikasyonda uygun hedef amplifiye edildiyse ikinci amplifikasyon gerçekleşir; eğer ilk amplifikasyon nonspesifik ise ikinci amplifikasyon gerçekleşmeyecektir ki bu da özgüllüğü artırır. Nested PZR'ın bir dezavantajı reaksiyon tüpü 2. primer seti konulacağı zaman açılır ve böylece çalışma ortamının amplifiye DNA ile kontaminasyonu söz konusudur.

AP-PZR (Arbitrarily primed PZR) ve randomly amplified polymorphic DNA assay: Her ikisi de rastgele bir primerin kullanıldığı PZR tekniğidir. Amplifikasyonda kullanılan rastgele primer herhangi bir spesifik bakteriyel DNA dizisini amplifiye etmek için hedeflemez. Primerin rastgele bağlanmaları, amplifikasyon sırasında kullanılan düşük annealing ısısı ile sağlanır ve bunun sonucu olarak çok sayıda rastgele kromozomal bölgelere eksik hibridizasyon ile DNA sentezi gerçekleştirilir. Eğer

primerlerin ikisi de komplementer zincirler üzerinde DNA fragmentinin sentezini sağlamak için birbirlerine yeteri kadar yakın bağlanırsa amplifikasyon devam eder. Yöntem nozokomiyal patojenler için öteki tiplene metotlarının çoğundan çok daha hızlı olsa da, standardizasyonu sağlanamamıştır. Reaksiyon koşullarındaki ya da reagentlardaki küçük değişiklikler sonuçların tekrarlanabilirliğini zorlaştırabilir ve oluşan bant paternlerinde farklılıklara neden olabilir. Bu yüzden, potansiyel salgın suşları arasında karşılaştırma yapmak çok zor olabilir. Sıkı kontrol edildiğinde, özellikle farklı primerlerle çoklu amplifikasyonlar yapıldığında AP-PZR yüksek düzeyde bir ayırma sağlayabilir.

AP-PZR sonuçlarının yorumlanması bazen zordur, çünkü AP-PZR varyasyonu spesifik genetik olaylar ile sıkı ilişkili değildir. Bu yüzden daha önce PFGE için belirlenen kurallar tipik AP-PZR paternlerine uygulanamaz. Eğer suşlar eş fragment paternlerine sahipse ya da 3 veya daha fazla fragment farklılığına sahip paternler söz konusu ise yorumlama daha kolaylaşır ve sırasıyla ya klonal ya da ilişkisiz olarak adlandırılır. Fakat tek bir bant büyüklüğündeki bir değişikliği ya da birkaç bant yoğunluğunu yorumlamada bir kriter yoktur.

AFLP (Amplified fragment length polymorphism): Restriksiyon enzimi ile kesimin ve PZR'ın bir kombinasyonudur. DNA biri diğerinden daha sık aralıklarla kesen 2 farklı RE ile kesilir. Bu restriksiyon stratejisi ile çok sayıda fragment oluşturulur. Sonuçları daha uygun yorumlayabilmek için izolatların karşılaştırılmasında sadece spesifik bir altküme kullanılır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Hastalar ve *Acinetobacter* İzolatları

750 yataklı İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde; Ocak 2005-Aralık 2007 tarihleri arasında, servislerde yatan hastaların laboratuvara gönderilen kültür örneklerinden üreyen, 130 hastaya ait 135 *Acinetobacter* suşu çalışmaya alındı. Kültür materyellerinde *Acinetobacter* spp. üreyen bütün hastalar, hastanemiz Enfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından değerlendirilerek Amerika'daki Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) kriterlerine göre hastane enfeksiyonu olup olmadıklarına karar verildi (89). Kolonizasyon veya kontaminasyon olarak değerlendirilen kültür sonuçları çalışmadan çıkarıldı. Bir hastanın aynı dönemde farklı kültür numunelerinde üreyen birden fazla bakteri olduğu durumlarda çalışmaya sadece bir numenede üreyen *Acinetobacter* spp. alındı. Aynı hastaya ait farklı dönemlerde kültür numunelerinde üreyen ve enfeksiyon etkeni kabul edilen *Acinetobacter*' ler çalışmaya alındı.

3.2. Epidemiyolojik İlişki ve Risk Faktörlerine Ait Bilgilerin Toplanması

Çalışmaya alınan hastane enfeksiyonu kabul edilen her hasta için hasta başına gidilerek aşağıda sunulan 'Bakteriyolojide Epidemiyolojik Çalışma formu' düzenlendi.

Bakteriyolojide Epidemiyolojik Çalışma formu

Dosya No:
Ad-Soyad:
Cinsiyet-Yaş:
Hastaneye Yatış Tarihi:
Servis/Kaldığı oda:
Hastaneye evden mi başka sağlık kuruluşundan mı geldi?
Servisler arası değişim?
Hizmet veren personel ve ortak kullanılan malzemeler:
Klinik Tanı:
Hastaneye yatışta infeksiyon var mı?
Yoksa infeksiyon ne zaman gelişti?
Kültür alındı mı? Ne zaman?
Numune tipi:
Kültür öncesi antibiyotik kullanımı var mı?
Kültür sonrası antibiyotik kullanımı var mı?
Cerrahi girişim/Anestezi/İnvaziv girişim uygulandıysa; Ne zaman? Nerede? Ne tip?
Altta yatan hastalığı var mı? Evet, ise ne?
Yatağa bağlı mı?
Beslenme tipi
Sondalı mı?
Kültür sonucu:
Antibiyogram sonucu:

3.3. Bakterilerin Tanımlanması

Hastanede yatan hastalardan alınan klinik örnekler, kanlı agara ekildi ve 35°C de 24 saat etüvde bekletildi. *Acinetobacter* düşünülen tipik kolonilerin gram boyaması, koloni morfolojileri, oksidaz ve glukoz, laktöz, sükröz fermentasyon aktivitelerine, katalaz reaksiyonlarına bakıldı. Phoneix 100 BD sistemi (Becton Dickinson Microbiology Systems) ile identifikasyonları ve tür düzeyinde tanımlanması yapıldı.

3.4. Suşların Antibiyotik Duyarlılık Profilleri

Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) standartlarına uygun olarak yapıldı (90).

Kanlı agarda üreyen saf *Acinetobacter spp.* suşları steril % 0.9 serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland olacak şekilde homojenize edildi. Steril eküvyon yardımıyla 4mm kalınlığındaki Müller Hilton agar besiyerine ekildi. Antibiyotik diskleri 2cm aralıklarla yerleştirildi. 35°C de 18- 24 saat etüvde bekletildi. 18–24 saat sonra okundu.

Kullanılan antibiyotik diskleri: piperasilin (100 µg), piperasilin/tazobactam(100 µg/10 µg), sefepim (30 µg), seftazidim (30µg), seftriakson (30µg), imipenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), tobramisin (10 µg), doksisisiklin (30 µg), levofloksasin (5 µg), Trimetoprim/sulfametoksazol (1.25 µg /23 µg) ve ampisilin/sulbaktam(20 µg) ile duyarlılık çalışması yapıldı.

Disk difüzyon yöntemiyle imipeneme dirençli suşlar, imipenem E-testle doğrulandı.

Acinetobacter suşlarının netilmisine duyarlılığını nonfermenter bakterilerdeki netilmisin duyarlılığına göre değerlendirildi.

Pandrug direnç ihtimali olan 34 *Acinetobacter spp.* suşun kolitsin ve tigesiklin duyarlılıklarına disk difüzyon yöntemiyle bakıldı. Kolistin duyarlılığı nonfermenter bakterilerdeki zon çapına göre değerlendirildi. Tigesiklin duyarlılığı için Jones ve arkadaşlarının yaptığı çalışma referans alındı (91).

3.5. Moleküler Tiplendirme

Ocak 2005-Aralık 2007 tarihleri arasında, servislerde yatan hastaların numunelerinde üreyen 135 *Acinetobacter* suşuna PFGE çalışıldı. PFGE uygulamasında Durmaz ve arkadaşlarının (92) optimize ettiği protokol izlendi.

3.5.1. İzolatların hazırlanması

Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapılır. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0) içinde süspansiyon edilir. Hücre süspansiyonu, 2500 x g'de, 4°C'de, 15 dakika (alternatif olarak 13 000 x g 4°C'de 2 dakika) santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılır. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapılır. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UV/Vis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans olacak şekilde ayarlanır. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agaroz gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletilir.

3.5.2. İzolatların Agaroz Gömülmesi

HST içerisinde %2'lik düşük erime ısı agaroz (Gibco BRL, Paisley, UK) hazırlanır. 0.50 g agaroz, 100 ml'lik balona koyulur, üzerine 23,5 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır. Tekrar 2–3 saniye mikrodalga fırınında tutulur. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlanır. %20'lik sodyum dodezil sülfattan (50°C de ısıtılmış) 1.25 ml eklenerek iyice karıştırılır.

Agaroz-SDS karışımından 200 µl Ependorf tüplere dağıtılır ve 45–50°C'deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bekletilir. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50 °C'de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısı agaroz-SDS bulunan tüpe eklenir. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanır. Bekletilmeden, hücre-agaroz-SDS karışımından -

hava kabarcığı olmayacak şekilde- agaroz kalıbına (10 mm by 5 mm by 1,5 mm, Bio Rad Laboratories) 100 µl dağıtılır. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletilir. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlanmaktadır.

3.5.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

Beş ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre lizis solüsyon I (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konulur. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirilir. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir. Lizis solüsyon I dökülerek, yerine 0.5 ml hücre lizis solüsyon II (0.5 M EDTA, %1 sarkozil, 400 µg/ml proteinaz K) konulur. 55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir.

3.5.4. Hücre Lizizinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkınması

Dikkatlice lizis solüsyonu II aspire edilir. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50 °C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4 ml eklenerek, 50 °C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletilir. Su tamamen aspire edilir. Su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlanır. Su tamamen aspire edilir. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere), 4 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) tamponuyla yıkanır. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş olur.

3.5.5. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın RE ile Kesilmesi

A. baumannii için etkinliği daha önce araştırılmış olan *Apa* I (30Ü) enzimi kullanılmıştır.

3.5.6. *A. baumannii* DNA'sını İçeren Kalıpların *Apa* I RE ile kesimi

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla ¼ oranında kesilir. Parçalardan biri, 100 µl 1x *Apa*I tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletir. Sonra sıvı aspire edilir.

2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır.

10 µl 10x *Apa* I tamponu,

3 µl *Apa* I enzimi (10 U /µl) (Promega Corporation, WI, USA)

1 µl BSA (10 µg/ µl)

86 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)

Toplam hacim 100 µl

3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 2 saat inkübe edilir.

4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletilir.

3.5.7. Elektroforez Jelinin Hazırlaması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

0.5 x TBE (44,5 mM Trisma base, 44,5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,0) içinde 100 ml olacak şekilde %1’lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlanır. 1 gr “pulsed-field certified agarose” 200 ml’lik balona konur. Üzerine 100 ml 0,5 x TBE eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır. Balonun ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutulur. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45–50 °C’lik su banyosuna konulur. Agaroz dökülecek kaset hazırlanır, sızdırmaması için etrafı bantlanır. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konulur. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirilir. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol süşuna ait kalıplar yüklenir. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınır. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA’nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirilir. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine dökülür. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakılır. Tarak dikkatlice çıkarılır. İstenirse çukurlar %1’lik

agarozla doldurulabilir. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılır, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0,5 x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilir.

3.5.8. Elektroforez

A. baumannii bakterileri için aynı elektroforez koşulları uygulanır. CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları: Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14 °C, süre 20 saat (TBE tamponu pH=8,0).

3.5.9. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınır. 20 dakika boyanır.
2. UV ışığa altında görüntülenir.
3. *Gel logic 2200 imaging system* (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilir. Resimler TIFF formatında kayıt edilir.
4. GelCompar II yazılım sistemi (version 3,0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edilir. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapılır. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin, dendogramı oluşturulur ve kümeleşme analizi yapılır. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlenir. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %1–1.5 olarak alınır.
5. Tenover ve arkadaşları (93) tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirilir.

- *Aynı izolatlar*: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik olarak farksız kabul edilir. Epidemiyolojik olarak ilişkilidir.
- *Yakın ilişkili izolatlar*: Salgın suşu ile aralarında 2–3 bant farkı vardır. Büyük bir olasılıkla salgınla ilişkili suşlardır.
- *Muhtemel ilişkili izolatlar*: Salgın suşları ile aralarında 4–6 bant farkı vardır. Muhtemelen salgınla ilişkilidirler.
- *İlişkisiz izolatlar*: Aralarında ≥ 7 bant farkı olan suşlardır. Salgınla ilişkileri bulunmayan suşlardır.

4. BULGULAR

4.1. Epidemiyolojik Bilgiler

Tutgut Özal Tıp Merkezinde üç yıllık sürede hastane infeksiyon tanısı doğrulanmış 130 hastanın çeşitli klinik örneklerinden üretilen 135 *Acinetobacter* suşunun 131 (%97) tanesi *A. baumannii* ve 4 (%3) tanesi *A. lwoffii* olarak tanımlandı. Bu örneklerden 38 tanesi 2005, 23 tanesi 2006, 74 tanesi 2007 yılına ait izolatlarıdır. Suşların 75 (%55,5) tanesi yoğun bakımlardan, 60 (%44,5) tanesi diğer klinik servislerden izole edilmiştir. Anestezi-Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinde 29 (%38,7) suş, Beyin Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinde 16 (%21,3), Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinde 12 (%16), Dâhiliye Yoğun Bakım Ünitesinde 11 (%14,7), Pediatri Yoğun Bakım Ünitesinde dört (%5,3), Kalp Damar Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinde iki (%2,7) Koroner Yoğun Bakım Ünitesinde bir (%1,3) *Acinetobacter* üretilmiştir. Yoğun bakım dışındaki servislerden, Ortopedi servisinde on üç, Nefroloji Servisinde yedi, Genel Cerrahi Servisinde altı, Organ nakli Servisinde altı, Beyin Cerrahi Servisinde beş ve diğer servislerden 23 *Acinetobacter* spp. İzole edildi (Tablo 4).

Tablo 4. *Acinetobacter*'lerin kliniklere göre dağılımı

Yoğun Bakımlar	Hasta Sayısı	Servisler	Hasta Sayısı
Anestezi yoğun bakım	29	Ortopedi	13
Beyin cerrahi yoğun bakım	16	Nefroloji	7
Cerrahi yoğun bakım	12	Genel cerrahi	6
Dâhiliye yoğun bakım	11	Organ nakli	6
Pediatri yoğun bakım	4	Beyin cerrahi	5
Kalp damar cerrahi yoğun bakım	2	Diğer servisler	23
Koroner Yoğun bakım	1		
Toplam	75	Toplam	60

Acinetobacter'ler çoğunlukla trakeal aspirasyon (%31), kan (%26), yara (%18,5) ve idrar (%16,4) kültürlerinden izole edildi. İzolasyon yapılan diğer klinik örnekler Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. *Acinetobacter* suşlarının izole edildiği klinik örnekler

İzolasyon yeri	Örnek sayısı
Trakeal aspirasyon	42
Kan	35
Yara	25
İdrar	21
Parasentez	4
Brokoalveoler lavaj	2
BOS	2
Plevra	2
Ekleme sıvısı	1
Katater	1

Acinetobacter üretilen hastaların 84 (%62,2) 'u erkek ve 51 (%37,8) 'i kadındı. Hastaların yaşları 2–80 arasında değişmektedir (ortalama yaş 50). *Acinetobacter*'ler sıklıkla 61–80 yaş grubundaki hastalardan izole edildi (Tablo 6).

Tablo 6. *Acinetobacter* suşlarının izole edildiği hastaların yaş grubuna göre dağılımı

Yaş aralığı	0–20 yaş	21–40 yaş	41–60 yaş	61–80 yaş	80 yaş ve üstü
Sayı	20	24	39	47	5
Yüzde	15,4	18,5	30	36	3,8

Hastaların 87 (%64,4) 'sine en az bir invaziv girişim uygulanmıştır. Hastaların 55 (%40,7)'sinde infeksiyon riski açısından altta yatan bir hastalık bulunmaktadır. Bunlardan 32 tanesi kanser tanısı, ondört tanesi diyabet tanısı, sekiz tanesi kronik böbrek yetmezliği, bir tanesi KOAH tanısı almış hastalardı. Hastalarda, hastaneye yatışlarının ortalama 19,6 gününde *Acinetobacter spp.*' ye bağlı infeksiyon gelişti. Çalışmaya aldığımız 130 hastadan 47 (%36) tanesi ex oldu. 97 (%74) hasta taburcu oldu (Tablo 7).

Tablo 7. *Acinetobacter* suşlarının izole edildiği hastaların epidemiyolojik bilgileri

Hastalar	Altta yatan hastalık	İnvaziv girişim	Ventilatör cihazına bağlı	İmmün yetmezlik	Servisler arası transfer	Profilaktik antibiyotik kullanan	Sondalı hasta	Ex
Sayı	55	87	47	32	61	50	95	47
Yüzde	40,7	64,4	36	24,6	46,9	38,46	73	36

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Test edilen suşlara karşı en az direncin netilmisine (% 7); en fazla direncin ise piperasiline (%92), seftriaksona (% 81), doksisikline (%69) ve gentamisine (% 67) karşı olduğu saptanmıştır. Diğer antibiyotiklerin etkinliği Tablo 6'da verilmiştir. *Acinetobacter spp.* nin antibiyotik direnç profilleri yıllara göre karşılaştırma yapıldığında: piperpiperasilin, seftriakson, gentamisin, doksisiklin, Trimetoprim/sulfametaksazole direnç oranlarında belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. 2005 yılı ile 2007 yılı kıyaslandığında: piperasilin/tazobactamda direnç oranı %47'den %76' ya; sefepimde % 42'den %77' ye; seftazidimde %47'den %77'ye, imipenemde sıfırdan %39' a, netilmisinde sıfırdan %14'e, amikasinde %18'den %53' e, tobramisinde yüzde 18'den %47' ye, levofloksasinde % 24'den %55'e, ampisilin/sulbaktamda %18'den % 46'ya artış görülmektedir (Tablo 8).

Pandrug direnç ihtimali olan 34 *Acinetobacter spp.* Suşun kolitsin ve tigesiklin duyarlılıklarına disk difüzyon yöntemiyle bakıldı. Suşlardan kolistine iki, tigesikline dokuz suş dirençli bulundu.

Test edilen suşlardan üç veya daha fazla grub antibiyotiğe (MDR) dirençli suş sayısı 77 (%57), kolistin ve tigesiklin (XDR) hariç diğer antibiyotiklere dirençli bakteri sayısı 23 (%17), pandrug dirençli suş sayısı iki (%1,5) bulundu

Tablo 8. Test edilen 135 *Acinetobacter* suşunun antibiyotik direnç yüzdeleri

ANTİBİYOTİKLER	2005 N=38	2006 N=23	2007 N=74	2005–2007 N=135
PIP	89	83	95	92
TZP	47	52	76	64
FEP	42	61	77	64
CAZ	47	61	77	66
CRO	79	74	84	81
İPM	0	22	39	25
NET	0	0	14	7
GM	66	48	74	67
AK	18	22	53	39
TOB	18	22	47	35
DOX	68	83	66	69
LVX	24	48	55	45
SXT	66	61	69	67
SAM	18	48	46	38

N: suş sayısı, piperasilin (PIP), piperasilin/tazobactam(TZP), sefepim (FEP), seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO), imipenem (İPM), gentamisin (GM), amikasin (GM), tobramisin (TOB), doksisisiklin (DOX), levofloksasin (LVX), Trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), ampisilin/sulbaktam (SAM)

4.3. Moleküler Tiplendirme

PFGE yöntemiyle tiplendirmeye alınan 135 suşun dört tanesinden sonuç alınamadı. Sonuç alınamayan bakterinin kültürünün saf olup olmadığı kontrol edildi. *A. baumannii* olduğu teyit edildi. Üç kez aynı PFGE protokülü ile markırlarla birlikte tekrar çalışıldı, sonuç alınamadı. PFGE ile tiplendirilen 131 *Acinetobacter* spp. izolatının dendogramı (Şekil 1) ve aynı kümede olan bakterilerin antibiyotik duyarlılık profilleri (tablo 9) verildi.

PFGE yöntemiyle 131 *Acinetobacter* spp. suşunun 82 (%62,6)'sinin küme içinde olduğu saptandı. Bu suşlar 15 küme içinde yer almaktadır. Kümeleşmede suş aralığı 2–27 arasında değişmektedir. On beş kümeden iki tanesi (VII-a ve XII-a) aynı zamanda diğer iki kümeyle yakın, üç tanesi (VII-b, XII-b, XXIX-b) ise diğer üç kümeyle muhtemel ilişkiliydi. Tiplendirilen suşların beş tanesi yakın ilişkili, yedisi muhtemel ilişkili olarak saptandı. Bu verilere göre tiplendirilen suşların %72,3'ü klonal yönden ilişkili olarak hesaplandı. İzolatların 37 tanesi (%28) özgü PFGE profili gösterdi. Toplam 131 suş içinde 64(%48,9) PFGE paterni belirlendi.

4.4. Küme İçinde Yer Alan Suşların Epidemiyolojik İlişkileri

Birinci küme (V): İki suş içermektedir. İlk suş 3.10.2005 tarihinde dâhiliye yoğun bakımda, ikinci suş üç gün sonra nefroloji servisinde yatan hastanın kan kültüründe izole edildi. Nefroloji servisinde yatan hasta kronik böbrek yetmezliği ve diyabet tanısıyla dâhiliye yoğun bakımda tedavi görmüştür

İkinci küme (VII): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 13.9.2006 tarihinde ortopedi servisinde yatan hastanın yara kültüründe izole edildi. İkinci suş yaklaşık iki ay sonra aynı serviste yatan hastanın yara kültüründe izole edildi.

Üçüncü küme (VII-a): İki suştan oluşmaktadır. Aynı zamanda ikinci kümeyle yakın ilişkilidir. İlk suş 4.12.2006 tarihinde genel cerrahi servisinde yatan hastanın idrar kültüründe izole edildi. Hasta aynı zamanda ortepi servisinde de tedavi gördü. İkinci suş iki ay sonra cerrahi yoğun bakımda yatan hastanın idrar kültüründe izole edildi.

Dördüncü küme (VII-b): İki suştan oluşmaktadır. Aynı zamanda ikinci kümeyle muhtemel ilişkilidir. İlk suş 6.11.2007 tarihinde dâhiliye yoğun bakımda yatan hastanın trakeal aspirasyon kültüründe izole edildi. Hasta aynı zamanda ortopedi servisinde de tedavi gördü. İkinci suş yaklaşık 6 ay sonra ortopedi servisinde yatan hastanın yara kültüründe izole edildi.

Beşinci küme (VIII): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 10.10.2005 tarihinde anestezi yoğun bakım servisinde yatan hastanın trakeal aspirasyon kültüründen izole edildi. İkinci suş 16.8.2006 tarihinde dâhiliye yoğun bakım servisinde yatan hastanın kan kültürü örneğinde izole edildi.

Altıncı küme (IX): On bir suştan oluşmaktadır. İlk suş 8.9.2005 tarihinde üroloji servisinde yatan hastanın idrar kültürü örneğinden izole edildi. Bu hasta tedavisi sırasında cerrahi yoğun bakım servisine yatırıldı. Bu suş küme içerisinde yaklaşık 27 ay çevrede varlığını sürdürdü. Yoğun bakımlarda altı hastanın, genel cerrahi servisinde bir, nöroloji servisinde bir, nefroloji servisinde ve beyin cerrahi servisinde bir hasta infekte oldu.

Yedinci küme (X): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 27.1.2005 tarihinde göğüs sevisinde, ikinci suş yaklaşık altı ay sonra kadın doğum servisinde yatan hastanın idrar kültüründe izole edildi.

Sekizinci küme (XII): On suştan oluşmaktadır. İlk suş 28.1.2005 tarihinde anestezi yoğun bakımda yatan hastanın trakeal aspirasyon kültüründen izole edildi. Yoğun bakımlarda sekiz hasta, beyin cerrahi servisinde bir, plastik cerrahi servisinde bir hasta infekte oldu.

Dokuzuncu küme (XII-a): Üç suştan oluşmaktadır. Aynı zamanda sekizinci kümeyle yakın ilişkilidir. İlk suş 26.8.2005 tarihinde, ikinci suş bir ay sonra beyin cerrahi yoğun bakım servisinde, üçüncü izolat yaklaşık bir yıl sonra nefroloji servisinde yatan hastanın trakeal aspirasyon kültüründe izole edildi.

Onuncu küme (XII-b): İki suştan oluşmaktadır. Aynı zamanda sekizinci kümedeki suşlarla muhtemel ilişkilidir. İlk suş 25.10.2007 tarihinde göğüs hastalıkları

servisinde plevra kültüründe izole edildi. İkinci izolat beş gün sonra ortopedi servisinde yatan hastanın eklem sıvısı kültüründe izole edildi.

Onbirinci küme (XX): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 28.11.2007 tarihinde anestezi yoğun bakım servisinde yatan hastanın yara kültüründen izole edildi. İkinci suş onaltı gün sonra cerrahi yoğun bakım servisinde yatan hastanın bronkoalveoler lavaj kültürü örneğinde izole edildi.

Onikinci küme (XXIX): Yirmi yedi suşla en büyük kümeyi oluşturmaktadır. Bu küme içinde yer alan klon yaklaşık dokuz ay süreyle hastane ortamında varlığını sürdürdü. İlk suş 26.3.2007 tarihinde dâhiliye yoğun bakım servisinde yatan hastanın trakeal aspirasyon kültüründen izole edildi. Yoğun bakım servislerinde onaltı, genel cerrahi servisinde üç, organ nakli servisinde beş, beyin cerrahi servisinde bir, göğüs hatalıkları servisinde bir ve intaniye servisinde bir hasta aynı klonla infekte oldu.

Onüçüncü küme (XXIX-b): İki suştan oluşmaktadır. Aynı zamanda onikinci kümeyle muhtemel ilişkilidir. İlk suş 18.9.2006 tarihinde anestezi yoğun bakım servisinde yatan hastanın kan kültüründe izole edildi. İkinci suş aynı yoğun bakımda yatan hastanın trakeal aspirasyon kültürü örneğinde izole edildi.

Ondördüncü küme (XXXV): Sekiz suştan oluşmaktadır. Ortopedi servisinde 6 hastanın yara kültüründe, Anestezi yoğun bakım servisinde bir ve cerrahi yoğun bakımda bir hasta aynı klonla infekte oldu. İlk suş 20.3.2007 tarihinde ortopedi servisinde yatan hastanın yara kültürü örneğinde izole edildi.

Onbeşinci küme (XXXIV): Beş suştan oluşmaktadır. İlk suş 11.5.2005 tarihinde anestezi yoğun bakım servisinde yatan hastanın kan kültürü örneğinden izole edildi. Yoğun bakımlarda dört suş, ortopedi servisinde bir suş izole edildi.

Küme içersisinde en fazla suş sayısı (27 suş) onikinci kümededir. Kümede en uzun süre klonun varlığını sürdürmesi yirmi yedi ayla altıncı kümedeydi. En kısa süre on altı günle on birinci kümedeydi.

4.5. Aynı Hastalardan Farklı Zamanlarda İzole edilmiş Suşların PFGE

Sonuçları

PFGE ile tiplendirilen, 111 ve 123 nolu suşlar aynı hastaya aitti. Her iki suшта on ikinci küme içerisinde yer almaktadır. Hastaya ait ilk suş 30.7.2007 tarihinde karaciğer yetmezliği ve diyabet tanısıyla organ nakli servisinde yatan hastanın parasentez sıvısı kültürü örneğinde izole edildi. İkinci suş 15.10.2007 tarihinde karaciğer naklinden sonra kan kültürü örneğinde izole edildi.

PFGE ile tiplendirilen, 63 ve 70 nolu suşlar aynı hastaya ait olup, ilk suş 12.1.2007 tarihinde beyin cerrahi yoğun bakım servisinde yatan hastanın idrar kültüründe izole edildi. Suş sekizinci küme içerisinde yer almaktadır. İkinci suş üç ay sonra kan kültürü örneğinde izole edildi. Suş farklı bir küme olan on ikinci küme içerisinde bulunmaktadır.

PFGE ile tiplendirilen, 28 ve 29 nolu suşlar aynı hastanın izolatları olup sekiz ay arayla izole edildiler. 28 stok numaralı izolat birinci küme içerisinde yer aldığı halde, 29 stok numaralı suş herhangi bir küme içerisinde yer almadı.

PFGE ile tiplendirilen, 47 ve 48 nolu suşlar hastanın bir hafta arayla kan ve trakeal aspirasyon kültür örneğinde izole edildi. İlk suş herhangi bir küme içerisinde yer almadı. İkinci suş on beşinci küme içinde bulunmaktadır.

PFGE ile tiplendirilen, 82 ve 139 nolu suşlar aynı hastanın izolatları olup yedi ay arayla izole edildiler. Her iki suшта PFGE yöntemiyle tiplendirilemedi.

Çalışmaya alınan 130 hastadan dört tanesine karaciğer nakli yapıldı. Bu dört hastadan izole edilen suşlar on ikinci küme içerisinde yer alıp organ nakli servisi ve anestezi yoğun bakım servisinde yatan hastalara ait izolatlardır.

On ikinci kümeye ait 27 suştan 25 tanesi imipenem ve amikasin dirençli bulundu. Diğer kümelere göre antibiyotiklere en fazla direncin gözleendiği kümedir.

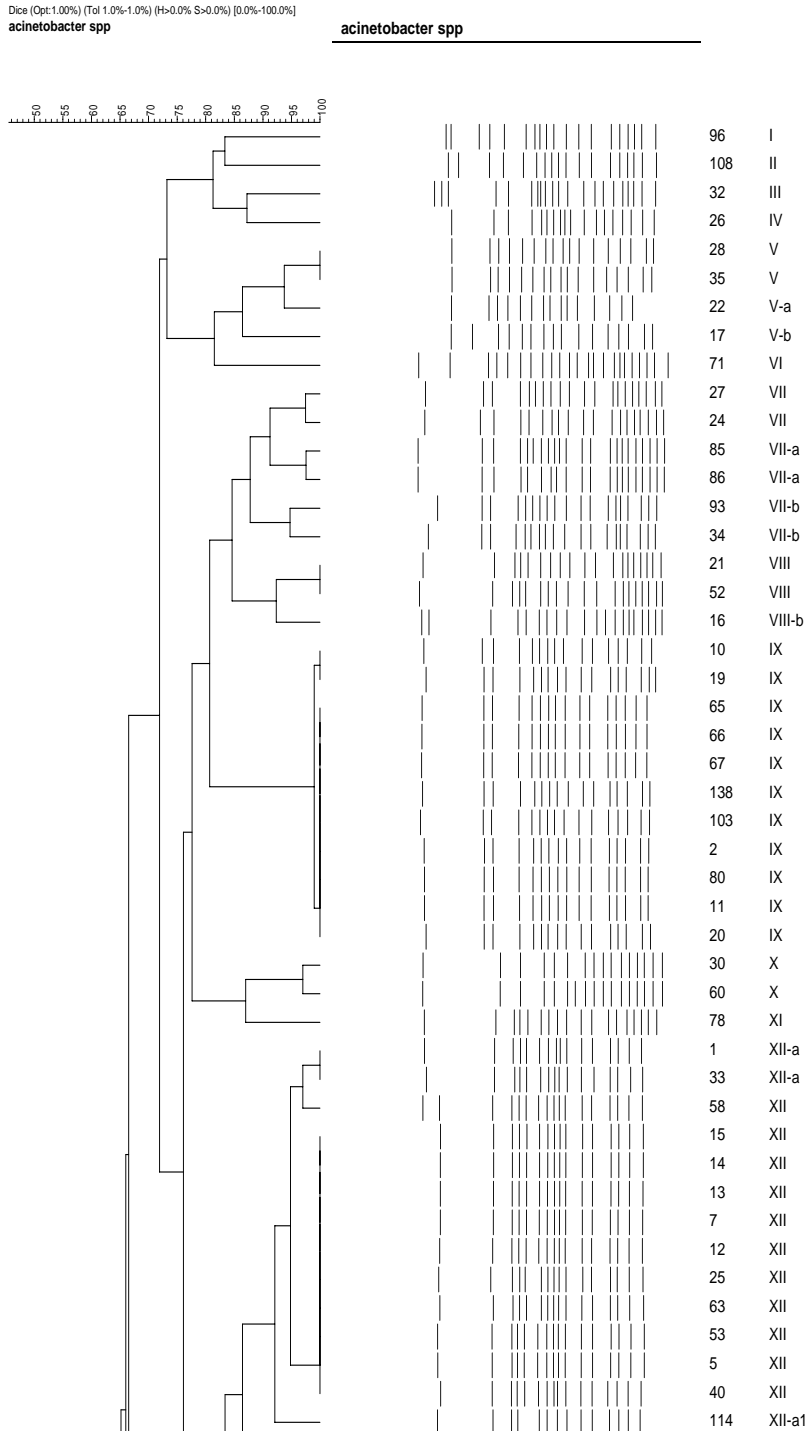
Aynı kümeye ait suşların antibiyotik direnç profilleri büyük oranda aynı olup, antibiyotik profilleri farklı olan suşlarda olabilmektedir. Kümelerde yer alan suşların antibiyotik profilleri tablo(9)da gösterildi.

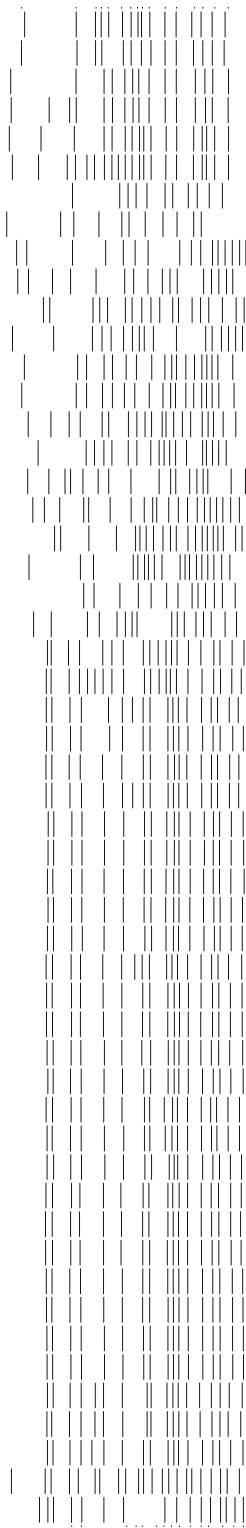
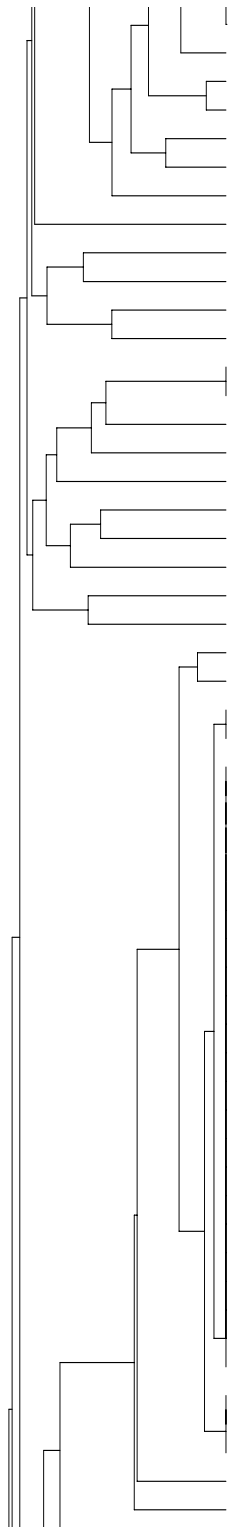
Tablo 9. Aynı kümedeki izolatların antibiyotiklere duyarlılık profilleri

Stok no	PFGE type	PIP	TZP	FEP	CAZ	CRO	İMP	NET	GM	AK	TOB	dox	LVX	SXT	SAM	Antibiyotik tip
28	V	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	S	1
35	V	R	R	I	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	S	1a
22	V-a	R	R	I	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	S	1a
17	V-b	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	2
24	VII	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	3
27	VII	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	4
85	VII-a	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	I	R	I	R	4a
86	VII-a	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	5
34	VII-b	R	R	R	R	R	S	I	R	S	I	R	R	R	R	6
93	VII-b	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	7
21	VIII	R	I	I	I	R	S	S	R	S	S	R	S	R	I	8
52	VIII	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	9
16	VIII-a	R	S	S	I	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	10
2	IX	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	I	R	S	R	11
11	IX	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	12
10	IX	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	13
19	IX	R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	13a
20	IX	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	13a1
65	IX	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	14
66	IX	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	14
67	IX	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	I	S	R	14a
80	IX	R	S	R	R	R	S	S	R	S	I	S	S	S	R	15
103	IX	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	I	R	S	I	16
138	IX	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R	R	17
30	X	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S	18
60	X	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	19
5	XII	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	I	20
7	XII	R	I	I	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R	I	21
12	XII	R	I	I	I	R	S	S	R	R	S	R	S	R	I	22
13	XII	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R	I	22a
14	XII	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R	I	22a
15	XII	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	23
25	XII	R	R	I	I	R	S	S	R	S	S	R	S	R	I	24
40	XII	R	I	I	I	R	S	S	R	S	S	R	S	R	I	24a
53	XII	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	25
63	XII	R	I	R	I	R	S	S	R	S	S	R	S	R	I	26
125	XII	R	I	I	I	R	S	S	I	S	S	S	R	S	S	27
127	XII	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	28
1	XII-a	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	I	S	29
33	XII-a	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	29a
58	XII-a	R	R	I	I	R	S	S	R	S	R	R	S	R	I	30
114	XII-a1	R	R	I	I	R	S	S	R	I	S	S	S	R	I	31
50	XIII	R	I	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	32
38	XIII-b	R	S	I	I	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	33
137	XX	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	34

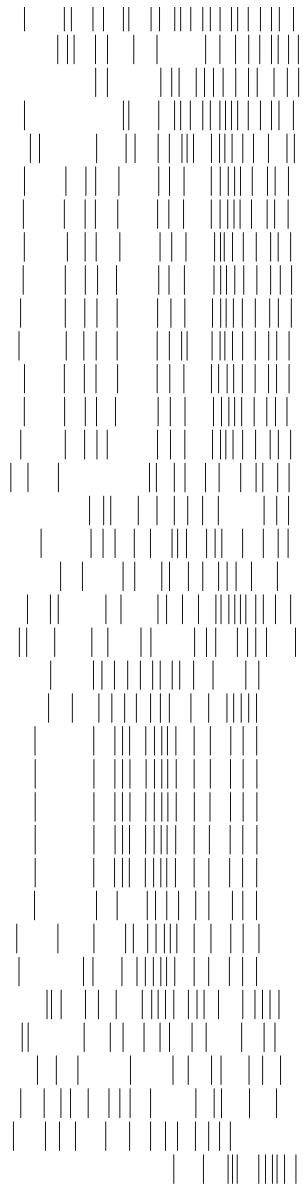
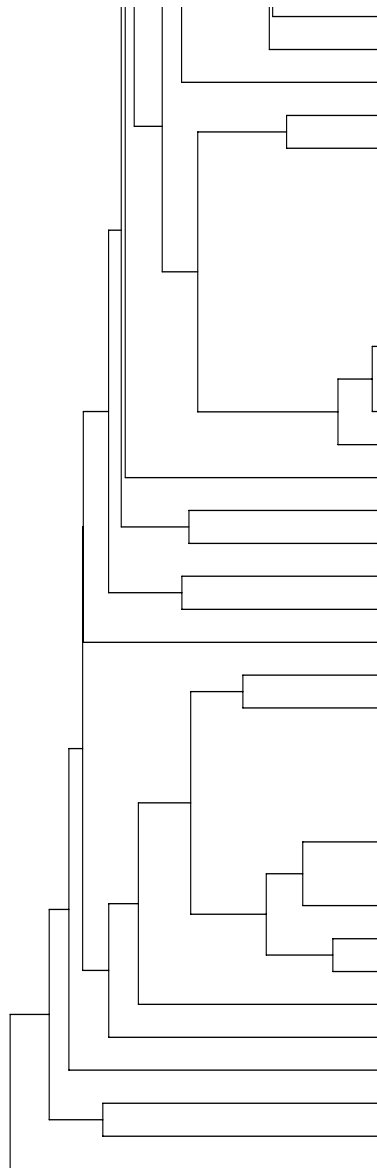
140	XX	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	R	R	R	I	35
68	XXIX	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	36
70	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
72	XXIX	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	37
73	XXIX	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	I	38
75	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	36a1
76	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
79	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
83	XXIX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	39
91	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
92	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
97	XXIX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	39a
98	XXIX	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	36
102	XXIX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	39
106	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
109	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
111	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
113	XXIX	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	36a2
115	XXIX	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	36a2
118	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
119	XXIX	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	36a2
120	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
123	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
132	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	36a1
142	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
144	XXIX	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	40
145	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
116	XXIX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
3	XXIX-b	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	36a
8	XXIX-b	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	36a2
69	XXV	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S	R	S	R	I	40
74	XXV	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S	R	S	R	R	40a
77	XXV	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S	R	S	R	R	40a
94	XXV	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	S	R	I	40a1
105	XXV	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R	S	40a2
124	XXV	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	41
135	XXV	R	I	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	42
141	XXV	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R	S	43
104	XXV-a	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	44
41	XXXXIV	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R	I	45
42	XXXXIV	R	I	I	I	R	S	S	R	S	S	R	S	R	I	46
48	XXXXIV	R	I	I	I	R	S	S	R	S	S	R	S	R	I	46
59	XXXXIV	R	R	I	I	R	S	S	R	R	S	R	S	R	R	47
62	XXXXIV	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	I	48
49	XXXXIV-a	R	I	I	I	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	45a
44	XXXXV	R	I	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R	49
46	XXXXV-b	R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	50

Şekil 1. PFGE *Acinetobacter* dendrogram





- 40 XII
- 114 XII-a1
- 125 XII-b
- 127 XII-b
- 50 XIII
- 38 XIII-b
- 129 XIV
- 57 XV
- 55 XVI
- 112 XVII
- 136 XVIII
- 36 XIX
- 140 XX
- 137 XX
- 89 XXI
- 6 XXII
- 43 XXIII
- 23 XXIV
- 84 XXV
- 31 XXVI
- 54 XXVII
- 9 XXVIII
- 3 XXIX-b
- 8 XXIX-b
- 68 XXIX
- 118 XXIX
- 132 XXIX
- 70 XXIX
- 102 XXIX
- 123 XXIX
- 142 XXIX
- 144 XXIX
- 145 XXIX
- 83 XXIX
- 97 XXIX
- 98 XXIX
- 106 XXIX
- 92 XXIX
- 76 XXIX
- 79 XXIX
- 72 XXIX
- 109 XXIX
- 111 XXIX
- 113 XXIX
- 115 XXIX
- 116 XXIX
- 119 XXIX
- 120 XXIX
- 73 XXIX
- 75 XXIX
- 91 XXIX
- 100 XXX
- 143 XXXI



- 100 XXX
- 143 XXXI
- 87 XXXII
- 99 XXXIII
- 45 XXXIV
- 69 XXXV
- 74 XXXV
- 124 XXXV
- 141 XXXV
- 105 XXXV
- 94 XXXV
- 77 XXXV
- 135 XXXV
- 104 XXXV-a
- 110 XXXVI
- 107 XXXVII
- 37 XXXVIII
- 51 XXIX
- 29 XXXX
- 64 XXXXI
- 39 XXXXII
- 47 XXXXIII
- 42 XXXXIV
- 48 XXXXIV
- 59 XXXXIV
- 62 XXXXIV
- 41 XXXXIV
- 49 XXXXIV-a
- 44 XXXXV
- 46 XXXXV-b
- 95 XXXXVI
- 128 XXXXVII
- 4 XXXXVIII
- 56 IXL
- 61 L
- 18 LI

5. TARTIŞMA

Acinetobacter türlerinin yoğun bakımlarda, sıklıkla kullanılan mekanik aletlerin yüzeylerinde, hastalarda ve personelde sıklıkla kolonize olmaları ve özellikle yatan hastaların çoğunlukla geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi almaları bakterilerin bu birimlerden sıklıkla izole edilmelerine neden olmaktadır (94). Bu çalışmada da izolatların çoğunluğu (%55,5) yoğun bakımlardan izole edilmiştir. Yoğun bakım servisleri arasında en fazla (%38,7) Anestezi-Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinden izolasyon yapılmıştır.

Travma, mekanik ventilasyon ve invaziv işlemler *A. baumannii*'ye bağlı gelişen nozokomiyal infeksiyonlarla ilgili risk faktörleridir (6). Çalışmamızda hastaların 87'sine (%64,4) en az bir invaziv girişim uygulanmış, 55'inde (%40,7) infeksiyon riski açısından altta yatan bir hastalık kaydedilmiştir. Bunlardan 32 tanesi kanser tanısı, on dört tanesi diyabet tanısı, sekiz tanesi kronik böbrek yetmezliği tanısı, bir tanesi KOAH tanısı almış hastalardan oluşmaktadır.

A. baumannii; bakteriyemi, üriner yol infeksiyonları ve sekonder menenjitler gibi birçok nozokomiyal infeksiyonlarla ilişkilendirilmiş olup, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardaki ventilatör-ilişkili pnömoni başta olmak üzere, nozokomiyal pnömoni ajanı olarak da baskın role sahiptir (4,5). Diğer *Acinetobacter* türlerine göre *A. lwoffii* menenjitlerle daha çok ilişkilendirilmektedir (9). Hastanemizde infeksiyon etkeni olarak değerlendirilen 135 *Acinetobacter* suşunun 131 (%97) *A. baumannii* ve 4 (%3) *A. lwoffii* olarak tanımlandı. Literatüre paralel olarak *A. baumannii* izolatlarının üçte biri trakeal aspirasyon kültüründen, yaklaşık dörtte biri ise kan kültüründen izole edildi. Beyin cerrahi ve beyin cerrahi yoğun bakım servisinde yatan hastaların BOS kültüründen iki *Acinetobacter baumannii* izole edildi. *A. baumannii*'nin izole edildiği iki hastaya invaziv işlem uygulanmıştı. Hastalardan birinde immün yetmezlik, diğer hastada Arnold-Chiari sendromu vardı. Diğer çalışmalardan farklı olarak *A. lwoffii* menenjit etkeni olarak izole edilmedi.

Acinetobacter baumannii kolonizasyonu ve daha önemlisi infeksiyonlarında morbidite ve mortalite artışlarına etkisi ile ilgili tartışmalar hala devam etmektedir.

Araştırmacılar *A. baumannii* infeksiyonlarının mortalitelerle ilişkili olduğu ile ilgili bulgulara ulaşmasına rağmen, bazıları bu sonuçların sadece *A. baumannii* infeksiyonu veya kazanımına bağlı olmadığını, kritik hastaların birçok etmeden etkilenebileceğini ve bundan dolayı 6l6mlerin arttığı d6ř6n6lmektedir. *A. baumannii* ye bağlı genel mortalite oranı %7,8–23 iken, yoğun bakımlarda bu değerler %10–43 arasında değişmektedir (95–100).

Bu çalışmadaki mortalite oranı diğer çalışma sonuşlarına g6re daha y6ksek (%36) bulundu. Mortalite oranının y6ksek olması; çalışmaya alınan hastaların %55'inin yoğun bakım servislerinde yatmaları olabilir. Buna ilaveten hastalarımızın çoğunda invaziv girişim ve infeksiyon açısından risk oluşturacak ilave hastalıkların bulunması olabilir.

Acinetobacter t6rleri sıklıkla birçok antibiyotiğe direnç g6sterdikleri için tedavide g6l6đe neden olarak hastanede yatan hastalar için ciddi tehdit oluşturmaktadırlar. Bu bakterilerde g6zlenen antibiyotik direnci, antibiyotik kullanma alışkanlığı ve çevresel fakt6rlerin de etkisiyle çeşitli hastaneler ve 6lkeler arasında farklılık g6sterebilmektedir (101).

6lkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *A. baumannii* için direnç oranları oldukça geniş aralıklarda bildirilmiştir. Direnç oranları imipenem için %0–63, siprofloksasin için %32–87, amikasin için %20–70, sefepim için %46–93.3, ofloksasin için, gentamisin için %62–87, trimetoprim/ sulfametoksazol için %63–75, piperasilin/tazobaktam için %44.1–100, seftriakson için % 77–85, piperasilin için %77.5–100, ampisilin/sulbaktam için %35–92.5 aralığında bildirilmiştir (102–111).

Bizim çalışmada test edilen suşlara karşı en etkili olan antibiyotik netilmisin (% 7), en az etkili antibiyotikler ise piperasilin (%92), seftriakson (% 81), doksisiklin (%69) ve gentamisin (% 67) olarak bulundu.

A.baumannii izolatlarının antibiyotik direnç profilleri zaman içinde değişmektedir. Yıllara g6re direnç profillerinin kıyaslandığı çalışmalarda farklı sonuşlarla karşılaşılmaktadır.

Gazi ve arkadaşları, 2002–2004 yılları arasında izole ettikleri *402 Acinetobacter baumannii* suşununun direnç profillerini karşılaştırdıkları çalışmada; 2002 suşlarında piperasilin-tazobaktamda %22' den % 75.82 e ve seftazidimde %62' den % 80,2' ye, 2004 suşlarında ise, gentamisin %68,5' den %90,1 e, netilmisinde %18,5' den %62,2 ye, amikasin %2,2 den %47,7 ye, ampisilin-sulbaktamda %41,3' den %84,7' ye, seftriaksonda %76,1' den % 96,1' e ve imipenemde % 28,3' den % 62,2' ye bir artış tespit etmişlerdir. Direnç oranlarında bir önceki yıla göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmiştir(111).

İzmir'de Arda ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *A.baumannii* suşlarında antibiyotik direnç oranlarını 1995 ve 1999 yıllarında imipenem için % 6 ve % 63, seftazidim için % 61 ve % 93, piperasilin/tazobaktam için % 78 ve % 100, siprofloksasin için % 44 ve % 97, gentamisin için % 33 ve % 87, amikasin için % 22 ve % 83 olarak bildirilmişlerdir. (112).

Gülhan ve arkadaşları 2004 ve 2006 yıllarındaki direnç değişimlerini izlemek için yaptıkları çalışmada; karbapenemde %7'den %25, siprofloksasinde %54'ten %82 ye istatistiksel olarak anlamlı direnç artışı saptamışlardır (113).

Tatman ve arkadaşları 1996 öncesi ve sonrası, *Acinetobacter spp.* direnç oranlarını karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada; sefepim, seftazidim, ampisilin-sulbaktam, amikasin ve siprofloksasine 1996 yılından itibaren artan bir direnç saptamışlar. 1996 öncesi ve 1996 sonrası ortalama direnç oranlarını sefepimde % 30'dan % 73'e, seftazidime % 38'den % 81'e, ampisilin-sulbaktamda % 35'ten % 73'e, amikasinde % 8'den % 57'e, siprofloksasinde % 5'ten % 46'ya direnç artışı gözlemişlerdir. Tikarsilin-klavulanik asit ve tobramisinde yıllar içinde anlamlı direnç değişikliği tespit etmemişlerdir (114).

Masterton ve arkadaşları *A.baumannii* ile yaptıkları çalışmalarda; 1997–1998, 1999–2000, 2001–2002 yılları arasında antibiyotik duyarlılık oranlarını MIC90 mg/L (% duyarlılık) karşılaştırmışlar. Yıllara göre imipenem ve piperacillin/tazobactam da anlamlı bir değişim olmadığı halde, seftazidim ve gentamisin de anlamlı artış kaydetmişlerdir (115).

İspanya’da 6 yıllık bir periyotta (1991–1996) 1532 klinik izolatla yapılan bir çalışmada direnç oranlarında siprofloksasin için % 54,4’den % 90,4’e, amikasin için % 21’den % 83,7’ye trimetoprim/sulfametoksazol için % 41,1’den % 88,9’a, imipenem için % 1,3’den % 80’e, ampisilin/sulbaktam için %65,7’den % 84,1’e varan artışlar bildirilmiştir (116).

Antibiyotik direnç durumunun yıllar içinde değişimini gösteren en kapsamlı çalışmalardan biri olan James arkadaşlarının 1998–2001 yılları arasında *A.baumannii* izolatlarındaki antibiyotik direnç değişimleri Tablo 10’ da verildi (117).

Tablo 10. *A.baumannii* izolatlarının 1998–2001 antibiyotik direnç yüzdeleri

Antibiyotikler	% direnç		
	Diğer servisler	Yoğun bakım	
Amikasin	1998	18,7	11.0
	1999	12.0	14.6
	2000	12.9	11.9
	2001	17.3	9.1
	1998–2001	15.7	11.3
Sefepime	1998	23.9	29,9
	1999	27.2	40,4
	2000	30.7	30,5
	2001	30,2	22,3
	1998–2001	28,5	28,4
Seftazidim	1998	27,8	14,1
	1999	23	18,6
	2000	26,1	27,2
	2001	31,8	25,4
	1998–2001	27,3	21,7

Siprofloksasin	1998	57,3	46,2
	1999	55,1	44,8
	2000	56,2	51,2
	2001	63	53,8
	1998–2001	57,6	48,9
Gentamisin	1998	54,3	39,6
	1999	49,8	48,4
	2000	49,9	46,3
	2001	52,8	43,8
	1998–2001	51,9	44,4
Imipenem	1998	1,6	2,8
	1999	2,2	4,1
	2000	3,5	1,2
	2001	6,1	3,8
	1998–2001	3,1	3
Levofloxacin	1998	50,8	-
	1999	46,9	43,2
	2000	48,9	38,1
	2001	51,3	44
	1998–2001	49,5	41,9
Piperacillin-tazobactam	1998	13,7	-
	1999	20,6	-
	2000	22,9	-
	2001	23,2	-
	1998–2001	20,4	-

Dünyadaki değişik bölgelerde farklı tarihlerde yapılan direnç çalışmalarının bulguları Tablo 11’de özetlenmiştir (118).

Tablo 11. Farklı tarihlerde değişik coğrafik bölgelerdeki direnç yüzdeleri

Coğrafik bölge	Yıl	FEP	CAZ	CIP	GM	IMP	LVX	SAM	MEM	TZP	SXT	Kaynak
Kuzey Amerika	2001–2004	57	54	54		89		71	84			49
	1998–2003	63	62	61	64	93				63		50
Avrupa	2001–2004	44	40	39		74		48	70			49
Asya	2001–2004	58	58	55		74	59		73			49
Latin Amerika	2001–2004	36	32	35		86		52	84			49
Bu Çalışma	2005–2007	36	34		33	75	55	62		36	33	

Çalışmamızda *Acinetobacter spp.* nin antibiyotik direnç pofillerindeki değişimin yıllara göre karşılaştırması yapıldığında: piperasilin, seftriakson, gentamisin, doksisisiklin, trimetoprim/sulfametoksazole direnç oranlarında belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. 2005 yılı ile 2007 yılı kıyaslandığında; piperasilin/tazobactamda direnç oranı %47’den %76’ ya, sefepimde %42’ den %77’ ye, seftazidimde % 47’ den %77’ ye, imipenemde sıfırdan %39’ a, netilmisinde sıfırdan %14’ e, amikasinde %18’ den %53’ e, tobramisinde % 18’ den %47’ ye, levofloksasinde % 24’ den %55’ e, ampisilin/sulbaktamda % 16’ dan % 46’ ya direnç artışı görülmektedir. İmipeneme 2005 yılında, netilmisine 2005 ve 2006 yılında dirence rastlanmadı.

Bütün *A. baumannii* izolatları özel bir D sınıfı karbapenemazı olan OXA–51 benzeri enzimine sahiptir. *Acinetobacter*’e karşı karbapenem aktivitesinin erozyonu

verilen alternatif ajanların yetersizliğini ortaya koymakta dolayısıyla tedavi intravenöz polimiksinlere bağlı olmaktadır. Yeni bir tetrasiklin türevi olan tigesiklinin alternatif olup olmadığı ve pnömonilerde polimiksinlerin eklenmesinin değerli olup olmadığı, yüksek konsantrasyonlarda verilmesi tartışma konusudur (58).

Gram negatif bakterilerde direnci tanımlamada kullanılan terimler açısından uluslararası uzlaşma henüz sağlanmamış görünmektedir. Genel eğilim ≥ 3 ilaç grubuna direnç MDR (multi drug resistant) olarak tanımlanması yönündedir (119). Tigesiklin ve kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere direnç için "extreme-resistance, extensive resistance" (XDR) terimi benimsenmiştir. Tigesiklin ve kolistin dâhil varolan tüm antibiyotiklere direnç için ise "pan-resistance" (PDR) terimleri kullanılmaktadır (119,120). MDR *Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları ile oluşan infeksiyonlar sağlık kuruluşlarının yaygın bir sorunu haline gelmiştir. Bu suşların sürekli olarak antibiyotiklere direnç geliştirmeleri sadece bir tek antimikrobiyal ajana duyarlı olan ve giderek mevcut tüm ilaçlara dirençli olan PDR izolatların ortaya çıkmasına neden olmuştur. PDR klinik izolatların sıklığı, bu izolatlarla ilişkili infeksiyonların tedavi seçenekleri ve mortalite ve morbidite oranlarına ilişkin veriler klinik ve halk sağlığı açısından büyük öneme sahiptir (121).

Bu çalışmada PDR ihtimali olan 34 *Acinetobacter spp.* suşunun kolistin ve tigesiklin duyarlılıklarına disk difüzyon yöntemi kullanılarak bakıldı. Kolistine iki, tigesikline dokuz suş dirençli bulundu.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, *A. baumannii* izolatlarındaki antibiyotik direnç profillerindeki değişikliğin, ilaç kullanım miktarına bağlı olduğunu göstermektedir. Antibiyotiklerin çok kullanımı MDR'lerin neden olduğu salgınların yayılımına katkıda bulunmaktadır. Aminoglikozit ve geniş spektrumlu sefalosporin kullanımı *A. baumannii* izolatları ile infeksiyon kazanma riskini arttırmaktadır (122). Kan kültürü infeksiyonlarında MDR'lerin gelişmesinde, tedavide ilk olarak aminoglikozit kullanılması risk faktörü olarak tanımlanmıştır (123).

Garcia-Penuela ve arkadaşları, 2004 yılında 74, 2005 yılında 30 *Acinetobacter baumannii* suşuyla yaptıkları çalışmada kolistin direnç oranını sırasıyla %1,4, %3,3

bulmuşlar (124). Gales ve arkadaşları, 2001–2004 yılları arasında sürveyans çalışmasında 2621 *Acinetobacter* spp. izolatında polimiksin direnç oranını % 2, PDR oranını %0,3, Henwood ve arkadaşları 25 laboratuvarında yaptıkları sürveyans çalışmasında 443 *A. baumannii* izolatında polimiksin direnç oranını %2,7 olarak tespit etmişlerdir (125,126).

Gales ve arkadaşları, *A. baumannii* izolatında polimiksin direnç yüzdesini %5, Valero ve arkadaşları % 13,1, Catchpole ve arkadaşları % 4 bulmuşlardır (127–129). Yurt dışında yapılan çalışmalarda en yüksek polimiksin dirençli izolat oranı %13,1 ile bir sürveyans çalışmasında bildirilmiştir (130). Oysa geri kalan çalışmalarda bu oran %5 in altında bulunmuştur.

Acinetobacter'ler kolistine dirençli olup, diğer antibiyotiklere duyarlı bulunabilmektedir (121). Çalışmamızda bu tanıma uyan suş bulunamadı.

Bu çalışmada test edilen suşlardan üç veya daha fazla grup antibiyotiğe dirençli suş sayısı (MDR) 77 (%57), kolistin ve tigesiklin (XDR) hariç diğer antibiyotiklere dirençli bakteri sayısı 23 (%17), pandrug dirençli suş sayısı iki (%1,5) bulundu. Bu sonuç yurt dışındaki çalışmalarla uyumludur.

Karbapenemler multidrug dirençli *Acinetobacter* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan güncel antibiyotiklerdir (131). Bununla birlikte karbapenem direnci giderek daha çok rapor edilmekte ve günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir. *Acinetobacterler*'de karbapenem direncine yol açan en önemli faktör, dış membran geçirgenlinin azalması ve AmpC beta-lactamase üretmeleridir (132,133). *Acinetobacter*'ler de kazanılmış karbapenem direnci sıklıkla karbapenemaz üretimiyle ilişkilidir ki; IMP, VİM ve SIM tip metallolaktamaz veya OXA–23-,OXA–24-, ve OXA–58, tip D sınıfı karbapenemaz üretimi bunlar arasındadır (134,135). Doğal oksasilinazın (OXA–51) aşırı üretimi de *Acinetobacter baumannii* de kazanılmış karbapenem direnci ile ilişkilendirilebilir (119).

Karbapeneme dirençli *A. baumannii*, suşları dünyada yaygın olarak bildirilmiştir (134,136). Çin'de 1996–2002 yılları arasında 19 eğitim hastanesinin yoğun bakım

ünitelerinde yapılan ulusal sürveyans çalışmasındaki veriler *Acinetobacter* izolatlarının %5'inin imipenem dirençli olduğunu göstermiştir (137). On farklı coğrafik bölgedeki hastanelerde yapılan diğer bir sürveyans çalışmasında 2003'teki %4,5 olan imipenem direncinin 2004'de %18,2'ye yükseldiği gösterilmiştir (129). Pekin'de 1600 yataklı üçüncü basamak bir eğitim hastanesinde yapılan bir çalışmada 1993- 2003 yılları arasında imipenem direnci %5 iken 2004 yılında hızla artarak yoğun bakımlarda %50'nin üzerine, yoğun bakım dışındaki servislerde %20'ye yükselmiştir. Bu izolatlar aynı zamanda ampisilin-sulbaktam, seftazidim, sefepim, piperasilin-tazobaktam, siprofloksasin ve amikasin gibi yaygın kullanılan diğer antibiyotiklere dirençli bulunmuştur (138). Sinha ve arkadaşları, 150 klinik örnekle yaptıkları çalışmada karbapenem direncini %14, Hindistanda, Taneja ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada %20, Corbella ve arkadaşları yoğun bakım hastalarında %36, Manikal ve arkadaşları New York Hastanesinde %50 bulmuşlardır (139–142).

Hastanemizde 2005 yılında imipenem direncine rastlanmazken, 2006 yılında %22'ye 2007 yılında % 39'a yükselmiştir. Bu izolatlar aynı zamanda MDR *Acinetobacter* izolatlarıydı. Hastanemizde gram negatif bakterilere bağlı infeksiyon düşünülen hastalara profilaktik ve ampirik olarak karbapenem tedavisine başlanmaktadır. Bu da *Acinetobacter*' lerde karbapenem direncinin artmasına yardımcı olmaktadır.

PFGE tiplendirmesinin sonucunda hastanemizdeki *Acinetobacter spp.* suşlarının yaklaşık dörtte üçü gibi oldukça yüksek bir kısmının klonal yönden ilişkili oldukları saptandı. Küme oluşturan suşlar baskın olarak solunum yolu kültürü 35 (%42,7) ve kan kültürü 24 (%29,3) örneğinden izole edilen bakterilerdi. Bazı kümelerde suş sayısı 27 kadar yüksek rakamlara ulaşmaktadır. Bu durum çapraz bulaş derecesinin büyüklüğünü ciddi biçimde ortaya koymaktadır. Bu küme içinde yer alan 27 suş yaklaşık dokuz ay hastanemizde varlığını sürdürmüştür. Diğer bir kümenin hastanemizde kalış süresi 27 aya kadar uzamıştır. Bu veriler *A. baumannii* gibi önemli nozokomiyal patojenin hastanede kolayca yayılabildiğini ve uygun korunma ve kontrol önemlerinin alınmaması halinde yıllarca hastane ortamında kalabileceğini vurgulamaktadır.

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bir klon yaklaşık 6 yıl varlığını sürdürmüştür (143). Prashanth ve arkadaşları; yaptıkları çalışmada yoğun bakımlarda üreyen 71 *Acinetobacter* izolatını PFGE ile tiplendirmişler, 59 (%83) farklı patern belirlemişlerdir (144).

Klonal olarak ilişkili suşlar, zaman geçtikçe ilaçlara duyarlılık profilleri değişim göstermektedir. On ikinci kümemiz aynı zamanda antibiyotiklere en dirençli küme olarak bulundu. Bu küme içerisinde bulunan tüm izolatlar MDR olarak bulundu. Küme içerisinde bulunan izolatlardan yalnızca ikisi imipeneme duyarlı bulunmuştur (Tablo 7). Küme içerisinde yer alan kökenlerin antibiyotiklere duyarlılık profillerinde önemli değişimler kaydedilmektedir (Tablo 7). Aynı klondaki izolatların farklı antibiyotik paternleri göstermelerinin sebebi birkaç şekilde açıklanabilir. Bunlardan birincisi; klonal yönden ilişkili oldukları halde direnç profili farklı olan suşlarda direnç gelişimine yol açan genetik olay ile PFGE profiline sebep olan genetik değişimin hızlarının farklı olması. İkinci sebep klonal yönden farklı oldukları halde ortak direnç profili sergileyen suşlarda direncin kaynağı plazmitlerin transferi şeklinde olabilir. Genel olarak ortak direnç ve PFGE profili gösteren suşlarda direnç yayılımının klonal yayılıma paralel olduğu kabul edilmektedir (145,146).

Isparta şehrinde Süleyman Demirel Üniversitesine Sesli Çetin ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada (147) genotip analizi yapılan 66 *A. baumannii* izolatında 36 PFGE paterni, on iki küme oluşturmaktadır. Epidemiyolojik ilişki oranını %80,3 olarak bulmuşlardır.

Kontamine çevresel kaynaklar; nemlendiriciler, monitörler, hasta bakıcıların elleri gibi çevresel kaynaklar salgınlara sebep olabilmektedir. Çok çeşitli analizlerle daha önceden aynı yoğun bakım ünitesinde *A.baumannii* kazanımı için en büyük risk faktörün mekanik ventilasyon olduğunu ispatlanmıştır (122).

Çalışmamızda klonal yayılım diğer çalışmalara uyumlu olarak yoğun bakımlarda daha baskın bulundu. Hastanemizde bütün yoğun bakım servisleri aynı katta olup, hastane personeli ve ventilatör cihazları ortak kullanılmaktadır. Yoğun bakımlar arasında hasta transferleri sık yapılmaktadır. Yoğun bakım servisleriyle; yoğun bakımla

ilgili olan servisler arasında hasta transferleri çok sık olmaktadır. Bu da hastanemizde *A.baumannii* klonlarının yayılmasını arttırmaktadır. Elimizdeki epidemiyolojik veriler bunu desteklemektedir. Ayrıca 35 izolatın solunum yolu örneğine ait kültürlerden üretilmesi ve bunların ventilatör cihazına bağlı hastalar olması, *A. baumannii* enfeksiyonları için en büyük risk faktörünün mekanik ventilasyon olduğu bilgisiyle uyusmaktadır (122).

Hui Wang ve arkadaşları, 1999–2005 yılları arasında 11 hastanede 221 imipenem dirençli izolatı PFGE ile tiplendikleri çalışmada; iki veya daha fazla subtipten oluşan 15 patern tanımlamışlar. Bu çalışma periyodu esnasında dört şehirde 10 hastanede klonal yayılım saptamışlar. Enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasına rağmen hastanenin farklı 19 servisinde imipenem dirençli klon izolatları bulmuşlar. Yetmiş dört vakadan; 33 vaka pulmoner enfeksiyonlu, 15 vaka bakteriyemili olup sırasıyla yaklaşık ölüm oranları %22,1 ve %40,2 bulmuşlar. Yirmi sekiz vakayı kolonize olarak sınıflandırmışlar. Enfeksiyonun gelişme süresi 27,8 gün olarak tespit etmişler. *Acinetobacter* izolasyonu olan bütün hastaların altta yatan bir hastalığı bulunmakta ve % 70 i geniş spektrumlu antibiyotik kullanmaktadır. Ayrıca bir klonun hastane çevresinde 6 yıl varlığını sürdürmüş olduğu tespit edilmiştir. Ancak klonal yayılım olan hastaneler arasındaki, hasta transferlerine rastlanmamıştır (143).

Yaptığımız çalışmada imipenem dirençli 34 (%26) izolat PFGE analizi ile yapılan incelemede on beş patern ve iki kümeden oluşmaktadır. İmipenem direnci bulunan ilk küme yirmi beş izolattan oluşmaktadır. İkinci küme iki izolattan oluşmaktadır. Birinci kümeyle, ikinci küme muhtemel ilişkilidir. Klon hastanemizdeki varlığını yaklaşık dokuz ay sürdürdü. On serviste klonal yayılım mevcuttu. Yayılım ve bulaşın; servisler arası hasta transferi, ortak hastane personeli, ortak kullanılan ventilatör cihazlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. İzolatların yirmi iki tanesi yoğun bakımlarda, on iki tanesi diğer servislerde üretildi. Alt solunum yolları kültür örneklerinde on beş izolat, kan kültürü örneğinde dokuz, idrar kültürü örneğinde dört, parasentez ve yara kültür örneklerinde üç izolat üretildi. Bu klon içinde yer alan

hastalardaki ölüm oranı (%47) hastane genelinde saptadığımız değerden (%36) oldukça yüksek bulunmuştur.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmanın yapıldığı üç yıl boyunca *A.baumannii*' ye bağlı hastane infeksiyonlarına özellikle yoğun bakımlarda rastlanmaktadır.
2. Hastane etkeni olarak üretilen *Acinetobacter* suşları arasında yüksek antibiyotik direnci görülmekte, direnç yıllar içinde önemli artışlar göstermektedir.
3. Hastanemizde izole edilen *Acinetobacter spp.* suşları arasında MDR, XDR, PDR oranlarının artışı dikkat çekicidir.
4. Hastalar arasında suşların bulaş derecesinin oldukça yüksek olduğu, hastanedeki klonun uzun periyotlarda ortamda kalabildiği, genel hasta ölüm oranlarının diğer çalışmalardan daha fazla olduğu saptanmıştır
5. Moleküler tiplendirme çalışmalarının desteğini alarak hastanemizde daha etkili bir korunma ve kontrol önlemlerinin alınması gerekliliği ortaya konulmuştur.

7. ÖZET

NOZOKOMİYAL *ACINETOBACTER* İZOLATLARINDA DİRENÇ ve KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde; Ocak 2005-Aralık 2007 tarihleri arasında, yatan hastalardan üretilen 135 *Acinetobacter* suşu çalışmaya alındı. *Acinetobacter* izolatlarının 131 tanesi (%97) *A. baumannii* ve 4 tanesi (%3) *A. lwoffii* olarak tanımlandı. *Acinetobacter* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarına, Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle bakıldı. Test edilen suşlara karşı en az direncin netilmisin (% 7); en fazla direncin ise piperasilin (%92), seftriakson (% 81) ve doksisisikline (%69) karşı olduğu saptandı. Direnç pofilleri yıllara göre karşılaştırıldığında (2005–2007): piperasilin, seftriakson, gentamisin, doksisisiklin, trimetoprim/sulfametoksazole direnç oranlarında belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. Piperasilin/tazobactamda direnç oranı %47'den %76'ya; sefepimde %42'den %77'ye; seftazidimde %47'den %77'ye, imipenemde sıfırdan %39' a, netilmisinde sıfırdan %14'e, amikasinde %18'den %53'e, tobramisinde %18'den %47'ye, levofloksasinde %24'den %55'e, ampisilin/sulbaktamda %18'den % 46'ya artmaktadır. Üç veya daha fazla grup antibiyotiğe dirençli suş sayısı 77 (%57), kolistin ve tigesiklin hariç diğer antibiyotiklere dirençli suş sayısı 23 (%17), tüm ilaçlara dirençli suş sayısı iki (%1,5) olarak bulundu.

PFGE yöntemiyle 131 *Acinetobacter spp.* suşunun 82 (%62,6)'sinin küme içinde olduğu saptandı. Bu suşlar 15 küme içinde yer almaktadır. Kümeleşmede suş aralığı 2–27 arasında değişmektedir. Tiplendirilen suşların %72,3'ü klonal yönden ilişkili bulundu. İzolatların 37 tanesi (%28) özgün PFGE profili gösterdi. Toplam 131 suş içinde 64 (%48,9) PFGE paterni belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter*, PFGE, küme, direnç

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF RESISTANCE AND CLONAL RELATEDNESS AMONG THE NOSOCOMIAL *ACINETOBACTER* ISOLATES

A total of 135 *Acinetobacter* strains isolated from 130 hospitalized patients at Inonu University Turgut Ozal Medical Center were studied in January 2005- November 2007. Of the 135 *Acinetobacter* isolates, 131 (97%) were *A baumannii* and 4 were *A. lwoffii* (3%). Antibiotic susceptibilities of *Acinetobacter* isolates were investigated by Kirby Bauer disk diffusion method. Minimal resistance among performed strains were detected in netilmisin (7%), where as maximum resistance were at piperacilline (92%), ceftriaxone (81%) and doxycycline (69%). When we compared resistance profiles in 2005 regarded to 2007, there was no difference in antibiotic resistance to piperacilline, ceftriaxone, gentamycine, doxycycline, trimetophrime/sulfomethoxazole. Resistance rates increased from 47% to 76% for piperacilline-tazobactam, 42% to 77% for cephepime, 0% to 39% for imipenem, 0% to 14% for netilmisin, 18% to 53% for amikacin, 18% to 47% for tobramycin, 24% to 55% for levofloxacin, 18% to 46% for ampicilline/sulbactam. The number of strains that were resistant to three or more antibiotics were 77 (57%), and the number of strains that resistant to all antibiotics except colistin and tigecycline were 23 (17%), and there were 2 (1.5%) strains which resistant to all of antibiotics.

Pulsed Field Gel Electrophoresis typing of the 131 strains showed that 82 (62,6%) *Acinetobacter* strains were in clusters. These strains were in 15 clusters. The number of strains that generated these clusters were between 2-27. The strains genotyped were determined as clonally related with a high rate of 72,3%. Thirty-seven strains of isolates had shown spesific PFGE profiles. It had been determined that there were 64 (%48,9) spesific PFGE pattern among 131 *Acinetobacter* strains.

Key word: *Acinetobacter*, PFGE, cluster, resistant

9. KAYNAKLAR

- 1) Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology; 6th ed. Lippincott Philadelphia. 2006:316–355.
- 2) Buxton AE, Anderson RL, Werdegar D, et al. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*. *Am J Med* 1978;65:507–513.
- 3) Lyons RW. Ecology, clinical significance and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* and *Moraxella*. In: Gilardi GL. Ed. Nonfermentative Gram Negative Rods: Laboratory Identification and Clinical Aspects.:New York: Marcel Dekker, 1985;159-179.
- 4) Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148–165.
- 5) Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:284–295.
- 6) Parvez F.M., Jarvis W.R. Nosocomial infections in the nursery. *Semin Pediatr Infect Dis* 1999;10:119–29.
- 7) Beck-Sague CM, Jarvis WR, Brook JH, et al. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *Am J Epidemiol* 1990;132:723–733.
- 8) Lortholary O, Fagon J-Y, Hoi AB, et al. Nosocomial acquisition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 1995;20:790–796.
- 9) Siegman-Igra Y, Bar-Yosef S, Gorea A et al. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin Infect Dis* 1993;17:843–849.

- 10) Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* 2004;38:1449–1459.
- 11) Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2005;25:11–25.
- 12) Cisneros JM, Rodriguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features, and treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002;8:687–693.
- 13) Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jimenez- Jimenez FJ, Monterrubio-Villar J, Gili-Miner M. Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 1999;27:1794–1799.
- 14) Ayan M, Durmaz R, Aktas E. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2003;54,39–45.
- 15) Neely AN: A survey of gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *Journal of Burn Care and Rehabilitation* 2000;21:523–527
- 16) Jawad A, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM: Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996;34:2881–2887
- 17) Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H: Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1394–1397.
- 18) Bergogne- Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, and epidemiological features. *J Clin Microbiol Rew* 1996;9:148–165.

- 28) Goering RV. 1995. The application of pulsed-field gel electrophoresis to the analysis of global dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, p. 75–81. In Brun-Buisson C, Casewell MW, El Solh N, Re´gnier B (ed.), Maurice Rapin colloquia: methicillin resistant staphylococci. Flammarion Me´decine-Sciences, Paris, France
- 29) Goering RV, Winters MA. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30:577–580.
- 30) Jarvis WR. Usefulness of molecular epidemiology for outbreak investigations. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1994;15:500–503
- 31) Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:635–643.
- 32) Hsueh PR, LJ, Chen CY, et al. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002;8:827–832.
- 33) Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997;41:881–885.
- 34) Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37: 750–753.
- 35) Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the Prokaryotes. Begery’s Manual of Systematic Bacteriology. Ed.2. Release 5.0., May 2004, New York: Springer-Verlag,
- 36) Bouvet PJM, Gimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* spp. nov, *Acinetobacter haemolyticus*

- spp., *Acinetobacter johnsonii* spp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986;36:228–240
- 37) Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 1989;97: 595–605
 - 38) Bouvet BJM, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species of the genus *acinetobacter*. *Res Microbiol* 1989;140:291–299
 - 39) Hollis DG, Moss CW, Daneshvar MI, Meadows L, et al. Characterization of Centers for Disease Control group NO–1, a fastidious, nonoxidative, gram negative organism associated with dog and cat bites. *J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;31:746–748.
 - 40) Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE et al. *Bodetella holmesii* spp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin. Microbiol* 1995;33:1–7.
 - 41) Siau H, Yuen KY, Ho PL. Identification of *acinetobacter* on blood agar in presence of D-glucose by unique browning effect. *J Clin Microbiol* 1998;36:1404–1407.
 - 42) Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, et al. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton’s agar. *J Clin Microbiol* 1994;32:2353–2358.
 - 43) Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1953;66:24–26.
 - 44) Clark WA. A simplified Leifson flagella stain. *J Clin Microbiol* 1976;3:632–634.
 - 45) King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 1954;44:301–307
 - 46) Obana Y. Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 1986; 30:645–657.

- 47) Smith AW, Freeman S, Minett WG, Lambert PA. Characterization of a siderophore from *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990;70:29–32.
- 48) Loubinoux J, Mihaila-Amrouche L, Le Fleche A, et al. Bacteremia caused by *Acinetobacter ursingii*. *J Clin Microbiol* 2003;41:1337–1338.
- 49) Linde HJ, Hahn J, Holler E, et al. Septicemia due to *Acinetobacter junii*. *J Clin Microbiol* 2002;40:2696–2697.
- 50) Visca P, Petrucca A, De Mori P, et al. Community-acquired *Acinetobacter radioresistens* bacteremia in a HIV-positive patient. *Emerg Infect Dis* 2001;7:1032–1035.
- 51) Seifert H, Baginski R, Schulze A, et al. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:750–753.
- 52) Swenson JM, Killgore GE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. *J Clin Microbiol* 2004;42:5102–5108.
- 53) Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, et al. In vitro activities of the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with β -lactams against epidemiologically characterized multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents and Chemother* 2004;48:1586–1592.
- 54) Jellison TK, McKinnon PS, Rybac MJ. Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy* 2001;21:142–148.
- 55) Levin AS: Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:144–153.

- 56) Jiemenez-Mejias ME, Pichardo-Guerrero C, Marquez-Rivas FJ, et al. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:212–214.
- 57) Chopeda BA, Wise PJ, Towner KJ. Plasmid transfer and behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65. *J Gen Microbiol* 1985;131:2805–2811
- 58) Livermore Dm, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006;14:413–20.
- 59) Zimmermann W, Rosselet A. Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977;12, 368–372
- 60) Jacobs C. et al. AmpD, essential for both β -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol. Microbiol.* 1995;15, 553–559
- 61) Bergogne-Berezin E. The increasing role of *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Curr. Infect. Dis. Rep* 2001;3: 440–444.
- 62) Carbonne A. et al. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J. Hosp. Infect.* 2005; 60:14–18.
- 63) Walsh TR. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18: 306–325.
- 64) Allen Dm, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, ed(s). Principles ve Practice of infectious Diseases. 4th ed. Philadelphiae: Churcill Livingstone Inc. 2000:2339–2344.
- 65) Gür D. Hastane infeksiyonu etkeni Gram negatif non fermantatif basiller ve antibiyotiklere direnç sorunu. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1999;3:33–39

- 66) Gulati S, Kapil A, Das B, Dwivedi SN, Mahapatra AK. Nasocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ICU. *Neurol India* 200;49:134–137.
- 67) Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:1415–1418.
- 68) Rudolph KM, Parkinson AJ, Roberts MC. Molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis and antibiogram of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B isolates from selected areas within the United States. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:2703–2707
- 69) Babl FE, Pelton SI, Theodore S, Klein JO. Constancy of distribution of serogroups of invasive pneumococcal isolates among children: experience during 4 decades. *Clin. Infect. Dis.* 2001;32:1155–1161.
- 70) Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lobo RS, Pinheiro RM, Salgado K, Ribeiro Dourado CM, Tavares-Neto J, Rocha H, Galvao Reis M, Johnson WD, Jr, Riley LW. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 2000;30:78–86.
- 71) Poh CL, Lau QC. Subtyping of *Neisseria gonorrhoeae* auxotype- serovar groups by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.* 1993;38:366–370.
- 72) Holmberg, SD, Wachsmuth IW, Hickman-Brenner FW, Cohen ML. Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 1984;19:100–104.
- 73) Hopkins KL, Desai M, Frost JA, Stanley J, Logan JM. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:229–235.

- 74) Lindholm L, Sarkkinen H. Direct identification of gram-positive cocci from routine blood cultures by using Accuprobe tests. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:5609–5613
- 75) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (ed.). 1994. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- 76) Carle GF, Frank M, Olson MV. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. 1986; 232: 65–68
- 77) Chang N, Chui L. A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 31:275–279.
- 78) Finney M. 1993. Pulsed-field gel electrophoresis, p. 2.5.9–2.5.17. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), Current protocols in molecular biology, vol. 1. Greene-Wiley, New York, N.Y
- 79) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 80) Arbeit RD, Arthur M, Dunn R, Kim C, Selander RK, Goldstein R. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed-field electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* 1990; 161:230–235.
- 81) Goering RV. 1998. The molecular epidemiology of nosocomial infection: an overview of principles, application, and interpretation, p. 131–157. In S. Specter, M. Bendinelli, and H. Friedman (ed.), Rapid detection of infectious agents. Plenum Press, New York, N.Y.
- 82) Struelens MJ, Gerner-Smidt P, Rosdahl V, El Solh N, Etienne J, Nicolas MH, Rømling U, Witte W, Legakis N, Van Belkum A, Dijkshoorn L, De Lencastre H, Garaizar J, Blanc D, Bauernfeind A, Cookson BD, Pitt TL. Consensus guidelines

for appropriate use and evaluation of microbial epidemiological typing systems. *Clin. Microbiol Infect.* 1996;2:1–10.

- 83) Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:407–415.
- 84) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, the Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1997;18:426–439.
- 85) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:2233–2239.
- 86) Rementeria A, Gallego L, Quindos G, Garaizar J. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001;7:331–336.
- 87) Backeljau T, De Bruyn L, De Wolf H, Jordaens K, Van Dongen S, Winnepenninckx B. Multiple UPGMA and neighbor-joining trees and the performance of some computer packages. *Mol. Biol. Evol.* 1996; 13:309– 313.
- 88) Jorgensen M, Givney R, Pegler M, Vickery A, Funnell G. Typing multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*: conflicting epidemiological data produced by genotypic and phenotypic methods clarified by phylogenetic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34:398–403.
- 89) Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, *Am J Infect Control* 1988; 16:128–40.

- 90) Clinical and Laboratory Standards Institute 2008. Performance standart for antimicrobial disk susceptibility Testing; Approved standard M2-A9 and M7-A7, 18 th ed. CLSI, Wayne, PA.
- 91) Jones R, Feraro M, Relle L, Schreckenbeger P, Swenson J, Sader H. Multicenter studies of tigecycline Disk Diffusion Susceptibility Results for Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol* . 2007;6:227–230
- 92) Durmaz R, Oflu B, Çalışkan A, Gürsoy N. Acinetobacter baumannii, Escherichia coli, ve Klebsiella türlerinin moleküler tiplendirilmesinde kullanılabilecek kısa süreli "PULSED-FIELD GEL" ELEKTROFOREZ (PFGE) Protokülü. *Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Dergisi* 2007;21(2):113–117
- 93) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18(6):426–39.
- 94) Mulin B, Talon D, Viel JF et al: Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant Acinetobacter baumannii, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14(7):569–76.
- 95) Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II: Attributable mortality of Acinetobacter baumannii infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care*. 2006;10 (2):R48. Review.
- 96) Blot S, Vandewoude K, Colardyn F: Nosocomial bacteremia involving Acinetobacter baumannii in critically ill patients: a matched cohort study. *Intensive Care Med* 2003, 29:471–475.
- 97) Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J: Clinical impact of pneumonia caused by Acinetobacter baumannii in intubated patients: a matched cohort study. *Crit Care Med* 2003, 31:2478–2482

- 98) Wisplinghoff H, Perbix W, Seifert H: Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. *Clin Infect Dis* 1999, 28:59–66.
- 99) Lortholary O, Fagon JY, Hoi AB, Slama MA, Pierre J, Giral P, Rosenzweig R, Gutmann L, Safar M, Acar J: Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 1995, 20:790–796.
- 100) Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jimenez-Jimenez FJ, Monterrubio-Villar J, Gili-Miner M: Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Crit Care Med* 1999, 27:1794–1799.
- 101) Villers D, Espaze E, Coste-Burel M et al: Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology, *Ann Intern Med* 1998;129(3):182–9.
- 102) Yavuz M, Şahin İ, Behçet M, Öztürk E, Kaya D: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, *ANKEM Dergisi* 2006;20(2):107–110
- 103) Arda B, Yamazhan T, Ulusoy S, Özinel MA: Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen non-fermentatif Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılığındaki 4 yıllık değişim (1995–1999) (özet), *ANKEM Derg.*2000;14(2):153
- 104) Erol S, Yazgı H, Aktaş O, Özkurt Z: Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarında antibiyotik direnci, *Hastane İnfeksiyon Derg* 2002;6(1):19–23.
- 105) Gürler N, Öngen B, Kurtay Demir F, Öksüz L, Karayay S, Töreci K: 1999 yılında cerrahat, yara sürüntüsü ve benzeri örneklerden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobik maddelere duyarlılıkları (özet), *ANKEM Derg* 2000;14:(2):161.
- 106) Karşlıgil T, Balcı I, Zer Y: Antibacterial sensitivity of *Acinetobacter* strains isolated from nosocomial infections, *J Int Med Res* 2004; 32(4): 436–41.

- 107)** Tatman-Otkun M, Gürcan Ş, Özer B, Türe M: Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde 1994'den 2000'e yıllık antibiyotik direnç değişimi, *ANKEM Derg* 2003;17(1):1–6.
- 108)** Toraman ZA, Çelik AÖ: Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması, *Fırat Tıp Derg* 2003; 8(1):20–2.
- 109)** Yapar N, Erdenizmenli M, Gülay Z. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* ve *Staphylococcus* türlerinin antibiyotik direnci, *İnfeksiyon Derg* 2000;14(4):507–9.
- 110)** Yaylı G, Aksoy S: Hastane infeksiyonlarından izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003;33(1):61–3.
- 111)** Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, İnmez E, Dinç G, Özbakkaloğlu B. Yoğun Bakım Ünitesinde Ve Diğer Ünitelerde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında İnvitro Antibiyotik Direnci. *ANKEM Derg* 2005;19(3):115–118.
- 112)** Arda B, Yamazhan T, Ulusoy S, Özinel MA. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinin antibiyotik duyarlılığındaki dört yıllık değişim (1995 ve 1999). *Hastane infeksiyon Derg*.2001;5(1):49–53.
- 113)** Gülhan B, Özekinci T, Atmaca S, Bilek H. 2004–2006 Yıllarında İzole Edilen *A.baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnci. *ANKEM Derg* 2007;21(1):32–36.
- 114)** Tatman M, Gürcan Ş, Özer B, Türe M. Nozokomiyal *A.baumannii* Kökenlerinde 1994'den 2000'e Yıllık Antibiyotik Direnç Değişimi. *Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Dergisi* 2003;17(1):1–6
- 115)** Robert G. Masterton, Philip J. Turner: Trends in antimicrobial susceptibility in UK centres: the MYSTIC Programme (1997–2002), *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006;27:69–72

- 116)** Ruiz J, Nunez ML, Perez J, Simarro E, Martinez-Campos L, Gomez J: Evolution of resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* over a 6-year period, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(4):292–5.
- 117)** James A. Karlowsky, Deborah C. Draghi, Mark E. Jones, Clyde Thornsberry, Ian R. Friedland, and Daniel F. Sahm. Surveillance for Antimicrobial Susceptibility among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;5:1681–1688
- 118)** Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51 (10):3471–84.
- 119)** Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y: On behalf of ReAct-Action on Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 813–21
- 120)** Falagas ME, Bliziotis IA, Kasiakou SK, Samonis G. Outcome of infections due to pandrug-resistance gram-negative bacteria. *BMC Infect Disease* 2005; 5: 24
- 121)** Falagas ME, Bliziotis IA: Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007;29: 630–636
- 122)** Villari P, Iacuzio L, Vozzella EA, Bosco U. 1999. Unusual genetic heterogeneity of *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Italy. *Am. J. Infect. Control* 27: 247–253.
- 123)** Smolyakov R, Borera A, Riesenberga K, Schlaeffera F, Alkana M, Porathb A, Rimarb D, Almogc Y, Gilad J. 2003. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *J. Hosp. Infect.* 54: 32–38.
- 124)** Garcia-Penuela E, Aznar E, Alarcon T, Lopez-Brea M: Susceptibility pattern of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Madrid vs. Hong Kong. *Rev Esp Quimioter* 2006;19: 45–50.

- 125)** Gales AC, Jones RN, Sader HS: Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). *Clin Microbiol Infect* 2006;12:315–21.
- 126)** Henwood CJ, Gatward T, Warner M, et al: Antibiotic resistance among clinical isolates of Acinetobacter in the UK, and in vitro evaluation of tigecycline (GAR–936). *J Antimicrob Chemother* 2002;49:479–87.
- 127)** Gales AC, Reis AO, Jones RN: Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* 2001;39:183–90.
- 128)** Valero E, Sevillano D, Calvo A, Garcia R, Leturia A, Gomez-Lus ML. Activity of new fluoroquinolones against clinical isolates of Acinetobacter baumannii. *Rev Esp Quimioter* 2001;14:358–63.
- 129)** Catchpole CR, Andrews JM, Brenwald N, Wise R. A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:255–60.
- 130)** Duenas Diez AI, Bratos Perez MA, Eiros Bouza JM, et al. Susceptibility of the Acinetobacter calcoaceticus–A. baumannii complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:487–93.
- 131)** Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y: Update on Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii infections in the healthcare setting. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2005;18:306–313.
- 132)** Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R: Molecular epidemiology and mechanisms of Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii endemic in New York City. *Clin Infect Dis* 2003;37:214-20.

- 133)** Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ: Consideration in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Inf Dis* 2003;36:1268–74
- 134)** Brown S, Amyes S: OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;57:1–3.
- 135)** Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12:826–836.
- 136)** Livermore, D. M. The threat from the pink corner. *Ann. Med.*2003;35:226–234.
- 137)** Wang H, Chen M. Surveillance for antimicrobial resistance among clinical isolates of gram-negative bacteria from intensive care unit patients in China, 1996 to 2002. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 51:201–208.
- 138)** Wang H, Chen M, Ni Y, Chen D, Sun Z, Chen Y, Zhao W, Zou X, Yu Y, Hu Z, Huang X, Xu Y, Xie X, Chu Y, Wang Q, Mei Y, Tian B, Zhang P, Kong Q, Yu X, Pan Y. Antimicrobial resistance analysis among nosocomial gram-negative bacilli from 10 teaching hospitals in China. *Chin. J. Lab. Med.* 2005;28:1295–1303.
- 139)** Sinha M, Srinivasa H: Mechanisms of resistance to carbapenems in meropenem resistant *Acinetobacter* isolates from clinical samples. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2007;25:121–5
- 140)** Taneja N, Maharwal S, Sharma M: Imipenem resistance in nonfermenters causing nosocomial urinary tract infections. *Indian J Med Sci* 2003;57:294–9.
- 141)** Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, et al: Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2000;38: 4086–95.
- 142)** Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J: Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide

prevalence, inter-institutional spread and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000;31:101–6.

- 143) Wang H, Guo P, Sun H, Wang, H, Yang O, Chen, M, Xu, Y and Zhu Y. Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;10: 4022–4028
- 144) Prashanth K, Badrinath S. Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. *Indian J Med Res* 2005;11;122:408–418
- 145) Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington, DC: *American Society for Microbiology*; 1993:563–72.
- 146) Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature *J Hosp Infect*. 2006; 64: 7–15.
- 147) Emel Sesli Cetin, Riza Durmaz, Tulay Tetik, Baris Otlu, Selcuk Kaya, and Ahmet Caliskan. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *American Journal of Infection Control* (baskıda).

NOZOKOMİYAL *ACINETOBACTER* İZOLATLARINDA DİRENÇ ve KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde; Ocak 2005-Aralık 2007 tarihleri arasında, yatan hastalardan üretilen 135 *Acinetobacter* suşu çalışmaya alındı. *Acinetobacter* izolatlarının 131 tanesi (%97) *A. baumannii* ve 4 tanesi (%3) *A. lwoffii* olarak tanımlandı.

Acinetobacter suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarına, Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle bakıldı. Test edilen suşlara karşı en az direncin netilmisin (% 7); en fazla direncin ise piperasilin (%92), seftriakson (% 81) ve doksisisikline (%69) karşı olduğu saptandı. Direnç profilleri yıllara göre karşılaştırıldığında (2005–2007): piperasilin, seftriakson, gentamisin, doksisisiklin, trimetoprim/sulfametoksazole direnç oranlarında belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. Piperasilin/tazobactamda direnç oranı %47'den %76'ya; sefepimde %42'den %77'ye; seftazidimde %47'den %77'ye, imipenemde sıfırdan %39' a, netilmisinde sıfırdan %14'e, amikaside %18'den %53'e, tobramisinde %18'den %47'ye, levofloksasinde %24'den %55'e, ampisilin/sulbaktamda %18'den % 46'ya artmaktadır. Üç veya daha fazla grup antibiyotiğe dirençli suş sayısı 77 (%57), kolistin ve tigesiklin hariç diğer antibiyotiklere dirençli suş sayısı 23 (%17), tüm ilaçlara dirençli suş sayısı iki (%1,5) olarak bulundu.

PFGE yöntemiyle 131 *Acinetobacter spp.* suşunun 82 (%62,6)'sinin küme içinde olduğu saptandı. Bu suşlar 15 küme içinde yer almaktadır. Kümeleşmede suş aralığı 2–27 arasında değişmektedir. Tiplendirilen suşların %72,3'ü klonal yönden ilişkili bulundu. İzolatların 37 tanesi (%28) özgün PFGE profili gösterdi. Toplam 131 suş içinde 64 (%48,9) PFGE paterni belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter*, PFGE, küme, direnç

INVESTIGATION OF RESISTANCE AND CLONAL RELATEDNESS AMONG THE NOSOCOMIAL *ACINETOBACTER* ISOLATES

SUMMARY

A total of 135 *Acinetobacter* strains isolated from 130 hospitalized patients at Inonu University Turgut Ozal Medical Center were studied in January 2005- November 2007. Of the 135 *Acinetobacter* isolates, 131 (97%) were *A. baumannii* and 4 were *A. lwoffii* (3%). Antibiotic susceptibilities of *Acinetobacter* isolates were investigated by Kirby Bauer disk diffusion method. Minimal resistance among performed strains were detected in netilmisin (7%), where as maximum resistance were at piperacilline (92%), ceftriaxone (81%) and doxycycline (69%). When we compared resistance profiles in 2005 regarded to 2007, there was no difference in antibiotic resistance to piperacilline, ceftriaxone, gentamycine, doxycycline, trimetophrime/sulfomethoxazole. Resistance rates increased from 47% to 76% for piperacilline-tazobactam, 42% to 77% for cephepime, 0% to 39% for imipenem, 0% to 14% for netilmisin, 18% to 53% for amikacin, 18% to 47% for tobramycin, 24% to 55% for levofloxacin, 18% to 46% for ampicilline/sulbactam. The number of strains that were resistant to three or more antibiotics were 77 (57%), and the number of strains that resistant to all antibiotics except colistin and tigecycline were 23 (17%), and there were 2 (1.5%) strains which resistant to all of antibiotics.

Pulsed Field Gel Electrophoresis typing of the 131 strains showed that 82 (62,6%) *Acinetobacter* strains were in clusters. These strains were in 15 clusters. The number of strains that generated these clusters were between 2-27. The strains genotyped were determined as clonally related with a high rate of 72,3%. Thirty-seven strains of isolates had shown spesific PFGE profiles. It had been determined that there were 64 (%48,9) spesific PFGE pattern among 131 *Acinetobacter* strains.

Key word: *Acinetobacter*, PFGE, cluster, resistant