

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***PSEUDOMONAS AEUROGINOSA VE
ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA
ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE
PULSE FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)
YÖNTEMİYLE TİPLENDİRİLMESİ***

Dr. ZEHRA YÜRÜKEN
UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE
2013

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***PSEUDOMONAS AEUROGINOSA VE
ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA
ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE
PULSE FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)
YÖNTEMİYLE TİPLENDİRİLMESİ***

Dr. ZEHRA YÜRÜKEN
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. LATİFE İŞERİ

KIRIKKALE
2013

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Uzmanlık öğrencisinin adı: Dr. Zehra YÜRÜKEN

Çalışmanın Başlığı: *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Çeşitli Antibiyotik Duyarlılıkları ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemiyle Tiplendirilmesi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinde “Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Eğitimi” çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıda belirtilen jüri üyeleri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 17.05.2013

İmza
Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji A.D
Jüri Başkanı
Doç. Dr. Latife İşeri

İmza
Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji A.D
Üye
Prof. Dr. Rıza Durmaz

İmza
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji A.D
Üye
Doç.Dr. Zafer Teoman Apan

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda emek, anlayış ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Latife İŞERİ'ye,

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda anlayış ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım; Prof. Dr. J. Sedef GÖÇMEN'e, Doç. Dr.Zafer Teoman APAN'a, Prof. Dr. Rıza DURMAZ 'a,

Tezim için gerekli suşları temin etmemde yardımcı olan Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji A.D'na, Prof.Dr.Canan AĞALAR 'a, Dr. Esra ŞAHİN'e. Moleküler tiplendirme aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen Türkiye Halk Sağlığı Kurumundaki Özlem ÜNALDI ve diğer çalışanlara,

Birlikte çalışmaktan dolayı mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Ümit ALANBAYI'na, Dr.Tuğba ATALAY'a, laboratuvar teknisyeni arkadaşlarım Tuba GÖKMEN'e ve Sinem ÖZDEMİR'e ,hastane personeli arkadaşlarıma, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen can yoldaşım sevgili eşim Dr. Mehmet YÜRÜKEN'e, en büyük mutluluk kaynaklarım olan oğullarım Kerem Baki ve Görkem'e ve aileme teşekkür ederim.

Dr. Zehra YÜRÜKEN

Mayıs 2013

ÖZET

YÜRÜKEN Z. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Çeşitli Antibiyotik Duyarlılıkları ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemiyle Tiplendirilmesi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2013.

2009-2010 yılları arasında hastanemiz Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen çeşitli materyallerden izole edilen 33 adet *Pseudomonas aeruginosa* ve 48 adet *Acinetobacter baumannii* suşu çalışma kapsamına alındı.

Bakterilerin tanımlanması standart klinik mikrobiyolojik yöntemler ile yapılmış, bu yöntemlere ek olarak daha iyi tanımlamanın yapılması için API 20NE (Biomerieux) sistemleri kullanılmıştır. Bakterilerin invitro koşullarda antibiyotiklere direnç durumları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bakterilerin klonal ilişkisi epidemiyolojik tiplendirmenin altın standardı olarak tanımlanan PFGE ile araştırıldı. *P. aeruginosa* suşlarının % 30,3'ü imipenem, % 39,4'ü aztreonama, % 30,3'ü amikasin, % 36,4'ü seftazidim, % 33,3'ü meropenem, % 30,3'ü sefepim, % 27,3'ü gentamisin, % 30,3'ü piperasilin-tazobaktama dirençli bulunmuştur. *A. baumannii* suşlarının %93,8'i piperasilin-tazobaktama, %77,1'i amikasine, %47,9'u gentamisine, %83,3'ü sefepime, %72,9'u imipeneme, %72,9'u meropeneme, %87,5'i seftazidime, %91,7'i aztreonama dirençli bulunmuştur. Bu çalışmada izole ettiğimiz suşların %40'ı çoklu antibiyotik direncine sahipti. %60'ı tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. En duyarlı oldukları antibiyotik ise %70 oranıyla CN, AK ve TPZ'ye olduğu saptandı. PFGE yöntemiyle tiplendirilen 33 adet *P. aeruginosa* suşundan 18 (%54,5) genotip saptandı. Bu genotiplerden 5 adeti küme oluşturan suşları içermektedir. Her kümedeki suş sayısı 2-8 arasında değişmektedir. Toplam 17 (%51,5) suş küme oluşturmaktadır. Bu suşlardan 4 adeti yakın ilişkili olarak değerlendirildi. Üç veya daha az bant farkı oluşturma kriteri dikkate alındığında suşların 21 (%63,6)'i klonal

yönden ilişkili bulundu. İzolatların 12 adeti (%36,3) özgü PFGE profili gösterdi. Kırksekiz adet *A. baumannii* suşundan ise 13 (%27,08) genotip saptandı. Genotiplerden 8 adeti küme oluşturan suşları içermektedir. Herbir kümedeki suş sayısı 2 ile 12 arasında değişmektedir. Toplam 41 (%85,4) suş küme oluşturmaktadır. Bu suşlardan 2 adeti yakın ilişkili olarak değerlendirildi. Üç ya da daha az bant farkı oluşturma kriteri dikkate alındığında suşların 43 (%89,5)'ü klonal yönden ilişkili olarak değerlendirildi. İzolatların 5 adeti (%10,4) özgü PFGE profili gösterdi.

Sonuç olarak yoğun bakım ünitesinden izole edilen 33 *P. aeruginosa* ve 48 *A. baumannii* suşunun çapraz geçişi gösterilmiştir. Bazen bir hasta bir iki ay ara ile aynı tür bakterinin farklı genotipiyle, bazende farklı hastalar aynı genotiple enfekte olmuştur. Çapraz bulaşın yüksek derecede saptanması ve özellikle *A. baumannii* suşlarının birçok ilaca karşı yüksek direnç oranları göstermesi yoğun bakım ünitelerinde acil önlemler alınması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, PFGE, klonal ilişki, genotip, bant farkı

ABSTRACT

YÜRÜKEN Z. Antibiotic Susceptibility and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Typing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates. Kırıkkale University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology. Thesis of Speciality, Kırıkkale, 2013.

A total of 33 *Pseudomonas aeruginosa* and 48 *Acinetobacter baumannii* strains isolated from the various materials at our hospital medical microbiology laboratory between 2009 -2010 include our study.

The identification of bacteria were done with standart clinic microbiological methods and API 20NE (Biomérieux) methods were used for the better characterization. The antibiotic resistance of isolates was defined with disc diffusion method by following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) advices. The clonal relationship of the strains were investigate with the PFGE which is the most important methods for epidemiologic classification. The rate of antibiotic resistance of *P. aeruginosa* are 30,3% to imipenem, 39,4% to aztreonam, 30,3% to amikasin, 36,4 % to ceftazidim, 33,3% to meropenem, 30,3 % to cefepim, 27,3% to gentamicin, 30,3% to piperacilin tazobactam. The rate of resistance of *A. baumannii* strains are 93,8% to piperacilin-tazobactam, 77,1% to amikasin, 47,9% to gentamicine, 83,3% to cefepim, 72,9% to imipenem, 72,9% to meropenem, 87,5% to ceftazidim, 91,7% to aztreonam. In this study 40 % of the isolates had a multiple antibiotic resistance. Sixty percent of the isolates showed resistance to all antibiotics. The most effective antibiotic is CN, AK and TPZ with the rate of 70%. PFGE yielded 18 genotype (% 54,5) among the 33 *P. aeruginosa* strains. Five of these genotypes included the clustered strains, each cluster included 2 to 8 strains. The total clustering rate was 51,5% (17/33 strains). Four strains were defined as closely related. A total 21 isolates showed PFGE profiles having less than four DNA bant differences from each other. This result indicated 63,6% clonal relationship among the *P. aeruginosa* strains. Twelve strains 36,3(%) showed unique PFGE profile. We determined 13 PFGE types

(27,08%) among 48 *A. baumannii* strains. Of these genotypes, 8 were cluster including 41 (85,4%) strains, 5 (10,4%) were unique.. The range of cluster varied from 2 to 12 strains. Two strains were defined as closely relationship. If three or less DNA band differences criteria is considered, 43 of these strains (89,5%) were classified in clonal relationship.

In conclusion; we found cross-transmission among the 33 *P. aeruginosa* and 48 *A. baumannii* strains isolated from intensive care unit in a six-month period. Sometimes, it was found that a patient was infected with the different genotypes of the same bacteria within a month or two month and sometimes different patients were infected by the same genotypes. The high cross-transmission rates among the tested isolates and high antibiotic resistance among the and, *A. baumannii* strains indicates the necessity of emergency precaution to keep infection off in the intensive care unite.

Keywords: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, PFGE, clonal relationship, genotype, band differences

İÇİNDEKİLER

ONAY SAFYASI	iii
TEŞEKKÜRLER	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
TABLolar	xiv
ŞEKİLLER.....	xv
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. PSEUDOMONASLAR VE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	3
2.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Virulans Faktörleri.....	4
2.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Epidemiyolojisi.....	9
2.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Neden Olduğu Hastalıklar	9
2.2. ACINETOBACTERLER VE ACINETOBACTER BAUMANNII	12
2.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Virulans Faktörleri	13
2.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Epidemiyolojisi	14
2.2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Neden Olduğu Hastalıklar	15
2.3. ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ MEKANİZMALARI	16
2.3.1. Betalaktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	20
2.3.2. Aminoglikozidlere Karşı Direnç Mekanizmaları.....	27
2.3.3. Tetrasiklin'e Karşı Direnç Mekanizmaları.....	27
2.3.4. Makrolid, linkozamid ve streptogramin B'ye Karşı Direnç Mekanizmaları.....	28
2.3.5. Kloramfenikol'e Karşı Direnç Mekanizmaları	29
2.3.6. Sulfonamidler ve trimetoprime Karşı Direnç Mekanizmaları.....	29
2.3.7. Kinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları	29
2.3.8. Glikopeptidlere Karşı Direnç Mekanizmaları	29
2.3.9. Rifampin'e Karşı Direnç Mekanizmaları	30

2.4. TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ	30
2.4.1. Fenotipik yöntemler	30
2.4.2. Genotipik yöntemler.....	31
2.5. PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESİS (PFGE)	33
2.5.1. PFGE’de Kullanılan Kontroller	36
2.5.2. Restriksiyon Profillerinin Analizi ve İzolatların Yakınlık Derecelerine Göre Sınıflandırılması	37
2.5.3. Sonuçların Rapor Edilmesi.....	37
GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. Bakterilerin İzolasyonu	38
3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	40
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ’nın PFGE İle Moleküler Tiplendirilmesi	40
3.3.1. İzolatların hazırlanması	40
3.3.2. İzolatların agaroz gömülmesi	41
3.3.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması	41
3.3.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması.....	42
3.3.5. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA’nın RE ile Kesilmesi	42
3.3.6. <i>P. Aeruginosa</i> DNA’sını İçeren Kalıpların XbaI RE ile kesimi	42
3.3.7. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi	43
3.3.8. Elektroforez	43
3.3.9. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi	44
3.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> ’nin PFGE İle Moleküler Tiplendirilmesi.....	44
3.4.1. İzolatların hazırlanması	44
3.4.2. İzolatların agaroz gömülmesi	45
3.4.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması	45
3.4.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması.....	46
3.4.5. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA’nın RE ile Kesilmesi.....	46
3.4.6. <i>A.baumannii</i> DNA’sını İçeren Kalıpların ApaI RE ile kesimi.....	46
3.4.7. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi	47
3.4.8. Elektroforez	47
3.4.9. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi	48
3.5. İstatistiksel İncelemeler	48

3.6. Etik Kurul Onayı	49
BULGULAR	50
4.1. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	50
4.2. Moleküler Tiplendirme Sonuçları	54
4.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın PFGE profilleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları	55
4.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin PFGE profilleri ve ve antibiyotiklere duyarlılıkları	58
TARTIŞMA	62
SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

NFGNB	: Non-Fermenter Gram Negatif Bakteriler
µm	: Mikrometre
°C	: Santigrad derece
EF2	: Elongasyon faktör 2
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
TSI	: Üç şekerli demirli agar
GM-1	: Gangliozyd reseptörü
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
ADP	: Adenozin difosfat
TNF	: Tümör nekrotizan faktör
ARDS	: Erişkin solunum stres sendromu
mm	: Milimetre
g	: Gram
ml	: Mililitre
Ark	: Arkadaşları
Spp.	: Species
RNA	: Ribo nükleik asit
PBP	: Penisilin bağlayan protein
OMP	: Outher membran protein
GN	: Gram negatif
GP	: Gram pozitif
ESBL	: Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar
EDTA	: Etilen tetra asetik asit
MBL	: Metallobetalaktamaz
LPS	: Lipopolisakkarit
Mg	: Magnezyum

RE	: Restriksiyon enzimi
AT	: Adenin timin
GC	: Guanin sitozin
EMB	: Eosin metilen mavisi agar
CLSI	: Clinical and laboratory standarts institute
°C	: Santigrad derece
mM	: Milimolar
HST	: Hücre süspansiyon tamponu
SDS	: Sodyum dodezil sülfat
BOS	: Beyin omirilik sıvısı
MYSTIC	: Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi

TABLÖLAR

Tablo 1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın virulans faktörleri ve biyolojik etkileri	8
Tablo 2: Betalaktamaz Grupları ve Özellikleri	26
Tablo 3: Tiplendirme yöntemleri	32
Tablo 4: Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tipleri	33
Tablo 5: Örnek türü ve izole edildiği bakteriler	50
Tablo 6: İzole edilen bakterilerin kadın erkek dağılımı	50
Tablo 7: <i>P. Aeruginosa</i> ve <i>A. Baumannii</i> enfeksiyonlarının 2009-2010 dağılımı	51
Tablo 8: Bakteri türüne göre antibiyotik dirençleri	52
Tablo 9: Tüm suşların özellikleri	52

ŞEKİLLER

Şekil 1: Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tipleri	34
Şekil 2: PFGE yapılış aşamaları	36
Şekil 3: Tiplendirmesi yapılan 33 <i>P. aeruginosa</i> suşunun PFGE profillerinin dendogramı.	57
Şekil 4: Tiplendirmesi yapılan 48 <i>A. baumannii</i> suşunun PFGE profillerinin dendogramı.	60

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Genellikle doğada saprofit olarak bulunan, immun sistemi baskılanmış ve hastanede yatan hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olan Non Fermenter Gram Negatif Bakteriler (NFGNB) den en sık izole edilen iki tanesi *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'dir.

Hastane enfeksiyonları, günümüzde enfeksiyon nedenleri arasında en önemli problemi oluşturmaktadır. Hastaneye yatan hastaların % 5-15'inde hastane enfeksiyonu gelişmektedir (1). Hastane enfeksiyonları hastalarda ciddi mortalite, morbiditeye neden olmakta ve getirdikleri ekonomik kayıplar sonucunda tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tıbbi ve ekonomik bir sorun olmaya devam etmektedir (1).

Acinetobacter cinsi bakteriler hastane enfeksiyonuna yol açan etkenler içinde önemli bir yer tutmaktadır (2). *Acinetobacter* enfeksiyonu, yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda gittikçe artan sıklıkta görülmektedir (3). Hastane enfeksiyonunda sık olarak saptanmalarının nedenleri, dış ortam koşullarında kolaylıkla yaşayabilmeleri ve antibiyotiklere karşı çoklu direnç kazanabilmeleridir (2, 4). *Acinetobacter* türleri hastane ortamında uzun süre canlılığını korur ve toprak, su, yiyecek gibi maddelerden izole edilebilir. Sağlıklı kişilerin florasında bulunabildiği gibi hastaneye yatırılarak tedavi edilen hastalarda kolonizasyon da yapabilirler (5, 6).

Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu tutulan tür *A. baumannii* 'dir (7-9). *A. johnsonii*, *A. lwoffii* ve *A. radioresistens* gibi diğer türler normal deri florasında bulunmaktadır ve aynı zamanda orofarinks ve vajina florasında da bulunabilir (10). *A. baumannii* enfeksiyonları gram negatif patojenler içerisinde kontrol ve tedavisi en güç olanlardan birisi haline gelmiştir (11, 12).

Hastane enfeksiyonu etkenleri içinde önemli yere sahip diğer bakteri grubu *Pseudomonas* cinsi bakterilerdir. *Pseudomonas* 'ların, insanlar için hastalandırıcı özellikte olan pek çok türü bulunmaktadır. Bunların en önemlisi *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Bu bakterilerin hastane ortam florasında endemik olarak buldukları, hasta tedavisinde kullanılan alet ve sıvılardan sıklıkla izole edildikleri bilinmektedir (13). *P. aeruginosa* minimal üreme koşullarında bile üreyebilmesi, doğada yaygın olarak bulunması, değişik virulans faktörlerinin olmasının yanı sıra, doğal olarak var olan direnç mekanizmaları ile oldukça önemli bir bakteridir (14).

Pseudomonaslar yoğun bakım üniteleri, yanık üniteleri, mekanik ventilatörler, kanser kemoterapisi uygulanan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan birimlerde daha fazla kolonize olur ve bu durum invazif enfeksiyonlara yatkınlık oluşturmaktadır (15, 16). Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden sorumlu tutulmaktadır (17).

Hastane enfeksiyonlarının artması enfeksiyon kontrol uygulamalarındaki hatalara bağlıdır. Hastaların bir kısmının *A.baumannii* ve *P. aeruginosa* ile enfekte ya da kolonize olduğu durumlarda; hastalar arasındaki çapraz geçişler kolonizasyon ve/veya salgın oluşumunu artırır. Hastanede salgınların önlenmesinde klasik epidemiyolojik bilgiler yanında, mikroorganizmanın kaynağı ve bulaş yolları hakkında belirleyici bilgiler sağlayan suş tiplendirme yöntemlerinin katkısı fazladır. Suş tiplendirilmesi mikroorganizmaların izole edildiği farklı kaynaklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (18, 19). Eskiden farklı materyallerden izole edilmiş nazokomiyal patojenlerin arasındaki epidemiyolojik ilişkinin belirlenmesi biyotip, serotip, bakteriyofaj ya da bakteriyosin tipleri ve antimikrobiyal duyarlılık profilleri gibi fenotipik özelliklerinin karşılaştırılmasına dayandırılıyordu. Son 20 yıldır DNA temelli yeni teknolojilerle veya moleküler analiz uygulamalarındaki gelişmelerle birlikte bu değerlendirme 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 (20-22).

Bu çalışmada; Hastanemizde sık görülen *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının yayılımını ve hastanemizde sık kullanılan antibiyotiklere direnç gelişimini gözler önüne sermek ve önlemek için çağrıda bulunmak amacıyla, yoğun bakım ünitesi örneklerinden izole edilen her iki bakterinin de suşları arasındaki klonal ilişkiler PFGE yöntemiyle araştırılmış, antibiyotiklere direnç oranları saptanmış, benzer suşların antibiyotiklere karşı direnç durumları incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.PSEUDOMONASLAR VE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

İnsanları hastalandırıcı özellikte olan pek çok *Pseudomonas* cinsi bakteri türü bulunmaktadır. Bunların en önemlisi *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa* doğada, toprak ve sulara yaygın olarak bulunan, kısıtlı besin maddesi içeren ortamlarda bile yaşayabilen fırsatçı bir patojendir. İlk kez 1850'de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmış ve *Bacillus pyocyaneus* ve daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. Piyosiyanın izolasyonu 1862'de Lucke tarafından yapılmıştır (23). 1882'de Fransız eczacı Carle Gessard, Pasteur'ün kültür yöntemlerini yara akıntılarındaki mavi ve yeşil pigmentlere uygulayarak *P. aeruginosa*'yı saf kültür halinde izole etmiştir. 1886 yılında Finkelstein adlı araştırmacı antemortem bir çocukta, 1889 yılında da Brill ve Libman adlı araştırmacılar yetişkin kanından *P. aeruginosa*'yı enfeksiyon etkeni olarak izole etmişlerdir. 1897'de Hitschman ve Kreibich, 1917'de Frenkel ve 1925'de Osler patojen bir bakteri olarak tanımlamışlardır (23, 24). 19. yüzyılın sonunda insanın hemen hemen tüm anatomik bölgelerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. 1980'lerden sonra hastane enfeksiyon etkeni olarak dikkat çekmeye başlamıştır (25). 1973 yılında Palleroni ve arkadaşları tarafından geliştirilen rRNA-DNA dizilim benzerliklerini temel alan genotipik sınıflandırmaya göre ise. pseudomonaslar beş gruba ayrılmıştır (26, 27).

P. aeruginosa gram-negatif, sporsuz, düz veya hafif kıvrık, 1,5-3 µm boyunda, 0,5-0,8 µm genişliğinde ve Pseudomonadaceae ailesi içindeki patojen türdür. Kirpikli ve hareketli, zorunlu aropturlar. Çoğu izolatlar kanlı agarda beta hemolitikdir ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturur. Rutin kullanılan besiyerlerinde optimal 30-37°C'de ve hafif alkali ortamda kolayca ürerler. Kültürlerde piyosiyanın adı verilen çözüner fenazin pigmenti üretmesi en önemli özelliklerinden biridir. Piyosiyanın dışında bakteri kırmızı pigmentten sorumlu piyoverdin, siyah pigmentten sorumlu piyomelanin veya sarı-yeşil ya da yeşil-kahverengi renk veren piyoverdin pigmenti içerebilir. Piyosiyanın ve piyoverdin pigmentlerinin bulunduğu bakteri

izolatları kültür ortamında yeşil-mavi koloniler oluşturur. *P. aeruginosa*'nın epitel hücrelerine tutunmayı sağlayan piluslar ve tutunucu hücre yüzeyi yapıları olmak üzere iki protein adezini vardır. İki çeşit hemolizin yapar; biri ısıya duyarlı, fosfolipaz C olarak adlandırılan bir protein ve diğeri ısıya dayanıklı bir glikolipittir. Lipit A endotoksini organizmanın biyolojik etkisini düzenler. Ekzotoksin A ise hücre dışı bir enzim olup, elongasyon faktör 2'yi (EF2) inaktive ederek protein sentezini inhibe eder (28). *Pseudomonas aeruginosa*'nın kültürdeki aromatik meyve kokusu karakteristiktir. Bu özellik 2-aminosetofenon' a aittir. *Pseudomonas aeruginosa* karbonhidratları fermente etmez. Glikoz ve ksilozu, oksidasyon yoluyla parçalar fakat maltoza etkisizdir. Katalaz ve oksidaz testleri pozitifdir. L- arjinin dihidrolaz üretiminin, L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz üretiminin negatif olması, indol ve H₂S oluşturmaması, metil kırmızısı ve Voges Proskauer testlerinin negatif olması, jelatini hidrolize etmesi, üreyi parçalaması, sitratı kullanabilmesi ve nitratın gaz oluşturmaması, üç şekerli demirli (TSI) besiyerinde reaksiyon oluşturmaması gibi özellikleri tanıda yardımcı olan biyokimyasal testlerdir (29-31).

P. aeruginosa sağlıklı insanlarda nadiren hastalığa neden olur. Konak savunmasının bozulmasına neden olan yanık, kanser kemoterapisi, uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, üriner veya damar içi kateter, endotrakeal entübasyon gibi savunma mekanizmalarının bozulduğu durumlar ayrıca nötropeni, hipogammaglobulinemi, kompleman eksikliği gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar enfeksiyona zemin hazırlar (28). *P. aeruginosa* enfeksiyonu kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım olmak üzere üç aşamada gelişir. Cilt ve mukoza yüzeylerine kolonize olan bakterilerin yayılımında virülans faktörleri, konağın immun direnci ve fiziksel savunma mekanizmaları önemli yer tutar. Enfeksiyon, kolonizasyon aşamasında kalabilir ya da sistemik enfeksiyona ilerleyebilir (24, 32).

2.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Virülans Faktörleri

Pili ve Fimbrialar: Piluslar ve hücre yüzeyine tutunucu yapıları (pilus dışı adezinler) olmak üzere iki protein adezini vardır. Bu yapılar epitel hücrelerine tutunmayı sağlarlar. Pilusların saflaştırılması da, bu yapılara karşı gelişen antikorlar da epitele tutunmayı engeller. Piluslar siyalik asitsiz gangliozid reseptörlere (asialo GM-1) tutunur. *Pseudomonas aeruginosa* kökenleri aynı zamanda nöraminidaz üretir

ve oluşan nöraminidaz gangliozidlerdeki siyalik asit kalıntılarını kaldırır. Böylece pilusların tutunması için daha uygun bölgeler oluşturulmuş olur. *Pseudomonas aeruginosa*, pilusları ile epitel hücrelerine tutunur fakat musine tutunamaz. Pilus dışı adezinlerin bir bölümü hem epitele hem musine tutunmayı, diğerleri ise yalnızca musine tutunmayı sağlar (28, 33, 34).

Polisakkarid kapsül: *Pseudomonas aeruginosa* kökenleri, bazı koşullarda polisakkarit yapıda kapsül benzeri yapılar yapar. Bu kapsüller yapılar aynı zamanda glikokaliks, ekzopolisakkarit ya da aljinat olarak da adlandırılır. Kapsül benzeri yapı aljinatla sonlanan, tekrar eden yapılar şeklinde mannuronik asit ve glukuronik asitten oluşmaktadır. Bu karbonhidrat bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenir. Bakteriyi mukosiliyer aktivite, fagositik hücreler, antikorlar ve kompleman gibi konak savunmasından korur. Mukoid kökenlerin çoğu kistik fibrozlu hastaların örneklerinden izole edilir. Ayrıca aljinat, *Pseudomonas aeruginosa* tedavisinde kullanılan aminoglikozidlerin bakterisid etkisini engeller (28, 33, 34). Biyofilm özelliği gösteren ekzopolisakkaritler, bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler. Ayrıca biyofilm bakteriyi yalnızca dış ortamdaki koruyarak yaşayabilmesi için değil aynı zamanda genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de daha iyi ortamlar hazırlanmasında işlev görür (35).

Nörominidaz: Pseudomonaslar siyalik asidin olmadığı gangliosid reseptörlerine öncelikli olarak bağlanırlar. Nöraminidaz da siyalik asidi uzaklaştırarak pilinin GM-1 reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır (33).

Endotoksin: Lipopolisakkarit yapısındadır. Araşidonik asit metabolitlerinin üretimini artırarak ateş, şok, diseminan intravasküler koagülasyon ve metabolik değişikliklerle karakterize septik şok sendromuna neden olur (28, 33).

Ekzotoksin A (Lipid A): Hücre dışında ve 613 aminoasitten oluşan bir enzimdir. *P. aeruginosa*'nın en önemli virulans faktörüdür ve yapısında adenosin difosfat (ADP) riboziltransferaz bulunmaktadır. *P. aeruginosa*'nın klinik izolatları tarafından üretilen difteri benzeri bir toksindir. Memeli protein sentezini nikotinamid adenin dinukleotid (NAD)'ın adenosin difosfat (ADP) riboz parçasını elongasyon faktör 2 (EF 2) ile

kovalent bağlanmasını sağlayarak, polipeptid uzatma basamağında bu faktörün katalize etme özelliğini inaktive eder (36). Ekzotoksin A salgılamayan suşlar, salgılayanlara oranla daha hafif şiddette hasara neden olmaktadır (33, 37).

Enterotoksin: Normal gastrointestinal aktivitenin kesintiye uğramasına neden olarak diyareye yol açar (33).

Piyosiyanin: Bakterinin ürettiği bu pigment solunum yollarında bulunan siliyer hücrelerin fonksiyonlarını bozar. Toksik serbest radikallerin ortama yayılmasına ve doku hasarının artmasına yol açar. Akciğerde oksidatif ve nötrofil bağlantılı doku hasarına neden olur (33, 37).

Ekzoenzim S-T (ExoS): Ekzotoksin A gibi sitotoksik etkisi olan ADP riboziltransferaz zincirinden oluşur (38). Guanozin trifosfat bağlayan proteinleri ribolize eder. Ekzoenzim S, *P. aeruginosa*'nın tip III sekresyon aygıtı denilen transmembran proteinleri dizisi yoluyla bakteriyel sitozolden konakçı hücre sitoplazmasının içine doğrudan hücre teması ile sunulur (36). Bakterilerin yayılmasını ve invazyonunu kolaylaştırır ve virulansı yüksek suşlarda güçlü nekrotik etkisi vardır. Spesifik olarak yanık yaraları üzerinde ve akciğerde enfeksiyonların ortaya çıkmasına neden olur(33).

Ekstrasellüler proteazlar (Elastaz-alkalin proteaz): Elastaz enzimi elastin içeren doku hasarından sorumludur. Komplemanın parçalanması, interferon gamma ve tümör nekrotizan faktör (TNF)'nin inhibe edilmesine ve IgG ve IgA yıkımına neden olur. Akciğer parenkim hasarına ve pseudomonas sepsisinin deri bulgusu olan ektima gangrenozuma neden olur. Nötrofil kemotaksisini engeller. Bakterilerin yayılımını artırır. Alkalin proteaz proteinleri sindirerek doku nekrozunu başlatan güçlü bir antikoagülan etkiye sahip tümör nekrotizan faktör (TNF)'inde içinde olduğu çok sayıda sitokini inaktive eden bir enzimdir. Her iki proteaz deride, akciğerde ve kornea'da nekrozlara sebep olur(33, 39, 40).

Hemoliziner: *P. aeruginosa*'nın iki çeşit hemolizini vardır. Isıya duyarlı fosfolipaz C ile ısıya dayanıklı bir glikopeptid. Fosfolipaz C sürfaktanın yapıtaşlarından olan

fosfatidilkolini parçalayarak, pulmoner atelettazinin gelişmesine neden olur. Isıya dayanıklı glikopeptid olan rhamnolipid ise solunum yollarındaki mukosilyer aktiviteyi inhibe eder. Siliyer aktivitenin azalması ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının oluşmasından sorumludur (33, 40). Lipidleri ve lestinini parçalayarak doku invazyonuna yardımcı olurlar. Protezlar gibi hemolizinler de nekroz yaparak, enfeksiyonun doku invazyonuna yardım eder (37).

Sitotoksin (lökosidin): Lökosit fonksiyonlarını bozarak etki ederler, deney hayvanlarında pulmoner mikrovasküler hasar yaptığı gösterilmiştir (33, 40).

Tablo 1. *P. aeruginosa* 'nın virulans faktörleri ve biyolojik etkileri
Virülans faktörleri **Biyolojik etkileri**

Yapısal faktörler

Kapsül :	Mukoid polisakkaridin yapılması Adhezyon sağlanması Antibiyotiklerin bakterisidal etkisinin azaltılması Nötrofil ve lenfosit aktivasyonunun önlenmesi
Nöraminidaz :	Pilusların adezyonunun kolaylaştırılması
Piluslar ve Nonpilus Adezinler:	Akciğer ve yara yerine adezyonun sağlanması
Lipopolisakkarid :	Endotoksik aktivite
Piyosiyenin :	Siliyer fonksiyonun bozulması İnflamasyonun başlatılması Toksik oksijen radikallerinin salınması ve doku hasarı

Toksin ve enzimler

Ekzotoksin A :	Protein sentezinin EF2 etkileyerek önlenmesi Doku hasarının oluşması İmmünsüpresyonun sağlanması
Ekzotoksin S :	Protein sentezinin önlenmesi, immünsüpresyon
Sitotoksin :	Lökosit fonksiyonlarının bozulması Pulmoner mikrovasküler yapıların hasarlanması
Elastaz, Alkalın Proteaz :	Elastin içeren dokuların harabiyeti
Fosfolipaz C :	İnflamasyon başlatılması
Rhamnolipid :	Lesitin içeren dokuların harabiyeti ve pulmoner siliyer aktivitenin inhibisyonu

2.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Epidemiyolojisi

P. aeruginosa toprak, su ve organik maddeler gibi besin maddeleri bulunan ortamlarda yaşayabilen fırsatçı patojen bakteridir. Nemli ortamlarda üreyebilir. Hastane ortamlarında solunum cihazları, endoskoplar, enfüzyon cihazları, damar içi kataterler, lavabolar, duşlar, paspaslar, temizlik solüsyonları ve çiçekler gibi maddelerde enfeksiyon kaynaklarıdır (37). Farklı fiziksel koşullara çok kolay uyum sağlar ve enfeksiyonların çoğu hastaneden kazanılır. İnsanların normal florasında da bulunabilir. Hastane dışındaki veya hastaneye başvuran kişilerde düşük oranda bulunur. Deride % 0-2, burun mukozasında % 0-3, boğazda % 0-6, dışkıda % 2,6-24 arasında bulunur. Yoğun bakım ünitelerinde, yanık ünitelerinde, mekanik ventilatörlerde, kanser kemoterapisi uygulanan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan birimlerde daha fazla kolonize olur ve bu durum inatçı enfeksiyonlara yatkınlık oluşturmaktadır (16, 20).

2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Neden Olduğu Hastalıklar

P. aeruginosa, sık rastlanan bir insan saprofitidir ve immün sistem yetersizliği olan insanlarda nadiren hastalığa neden olur. Konak savunmasının bozulduğu, immün sistemin baskılandığı durumlarda; örneğin: yanık, kanser kemoterapisi alan hastalar, uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, üriner veya damar içi kateter kullanımı, endotrakeal entübasyon ayrıca nötropeni, hipogamaglobulinemi, kompleman eksikliği gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar enfeksiyona zemin hazırlar (28). *P. aeruginosa* enfeksiyonu ilk önce kolonizasyon, sonra invazyon ve en son sistemik yayılım olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Konağın immün direnci, bakterinin virülans faktörleri ve fiziksel savunma mekanizmaları arasındaki dengeye göre enfeksiyon, kolonizasyon aşamasında kalabilir ya da sistemik enfeksiyona ilerleyebilir (24, 33).

Endokardit: İntravenöz ilaç kullanan insanların doğal kalp kapaklarına yerleşerek ve protez kapağı olanların protezlerinde infektif endokardite neden olur (41-44).

Solunum sistemi enfeksiyonları: Solunum veya sistemik immün sisteminde bozukluk olan kişilerde akut, hayatı tehdit eden pnömoniye sebep olabilir. Hastane ortamında özellikle de yoğun bakım ünitelerinde bulunan ve aynı zamanda mekanik ventilatöre bağlanmak ve daha önce antibiyotik kullanılması gibi durumlarda bakterinin pnömoni yapma ihtimali artar. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu hastane kökenli pnömonilerde mortalite oranları oldukça yüksektir. Hastane dışında etken olduğu pnömonilerde ise hastaların altta yatan ciddi bir hastalığı, kronik akciğer hastalığı gibi predispozan faktörler vardır. Genetik bir hastalık olan kistik fibroziste solunum sisteminde anormal sekresyonların olması ve opsonizasyon, fagositoz ve bakterisidal mekanizmaların bozukluğu nedeniyle pseudomonasa bağlı solunum sistemi enfeksiyonu riski artmıştır (44, 45).

Bakteriyemi: *P. aeruginosa* hastane kaynaklı bakteriyemilerin en sık nedenlerinden biridir. Bakteriyemiler oldukça ağır ve özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda mortalitesi yüksek seyretmektedir (15, 37, 46). Bu hastalarda bazı predispozan faktörler vardır. Bunlardan bazıları hematolojik malignite, immünglobulin eksikliği, hipokomplementemi, nötropeni, diabetes mellitus, organ transplantasyonu, ağır yanıklar, diffüz dermatitler ve ARDS (erişkin solunum stres sendromu) dir. Ektima gangrenozum tarzındaki deri lezyonlarının görülmesi *P. aeruginosa* bakteriyemisi için ayırt ettiricidir (44).

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları: Genellikle immün sistemin baskılandığı ve lokal savunma mekanizmalarının bozulduğu durumlarda gelişir. *P. aeruginosa*, santral sinir sistemine malign eksternal otit veya sinuzit gibi lokal bir odaktan, direkt kafa travmaları ve cerrahi sırasında direkt inokulasyon ile ya da endokardit gibi uzak bir odaktan hematogen yol ile ulaşabilir. Enfeksiyon menenjit ya da beyin apsesine neden olabilir (44).

Kulak Enfeksiyonları: *P. aeruginosa*, çok nadir olarak sağlıklı insanların kulağında bulunabilir. Buna karşın yaralanma, maserasyon, inflamasyon ve nem varsa eksternal kulak yoluna sıklıkla yerleşir. Akut enfeksiyonlara ve malign eksternal otit gibi kronik ciddi enfeksiyonlara da neden olabilir. Malign eksternal otit ağırlıklı olarak yaşlı diyabetik kişilerde, kısmen de uzun süreli küçük damar hastalığı gibi

predispozan faktörü olanlarda görülür. *P. aeruginosa*, kronik süperatif otitis medialı çocuk ve yetişkinlerin orta ve dış kulak yolundan sıklıkla izole edilen bakteriyel patojendir (31).

Göz Enfeksiyonları: *P. aeruginosa*, bakteriyel keratitin en sık nedenlerinden biridir. Bunun dışında endoftalmit, oftalmia neonatarum, blefarokonjonktivit, skleral apse ve orbital sellülit gibi göz hastalıklarına neden olmaktadır. Keratit oluşumundaki risk faktörleri, kontakt lens kullananlar, önceden göze radyasyon alanlar, yoğun bakımda yatanlar ve ARDS hastalardır (44).

Kemik ve Eklem Enfeksiyonları: Enfeksiyon doğrudan kemik ve eklemlerde başlar ya da hematogen yolla yayılım olur. Hematogen kaynaklı enfeksiyonlar ilaç bağımlılarında sık görülür. İlaç bağımlılarında gelişen enfeksiyonlar üriner ve pelvik kaynaklıdır. Delici travma, cerrahi uygulamalar ve yumuşak doku enfeksiyonları sonrasında da sıklıkla *P. aeruginosa* kemik ve eklem enfeksiyonlarına neden olur(41-44).

Üriner Sistem Enfeksiyonları: *P. aeruginosa* ile üriner sistem enfeksiyonları çoğunlukla kateterizasyon, sonda veya cerrahi girişime bağlı olarak hastane kökenli ve iyatrojeniktir. Kateterizasyon, sonda veya cerrahi girişime bağlı olarak ortaya çıkabilir. Üretradan komşulukla olabileceği gibi primer bir odaktan bakteriyemi ile de gelişebilir (47).

Gastrointestinal Enfeksiyonlar: *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal yolun herhangi bir yerinde enfeksiyon yapabilir. En sık yenidoğanlarda, hematolojik malignitesi olanlarda ve kemoterapiye sekonder nötropeni gelişen hastalarda ortaya çıkar. Çocuklarda orta şiddette diyare yapabilirken bebeklerde daha ağır tablolara, öldürücü nekrozlu enterokolite neden olabilir (44).

Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları: *Pseudomonas* bağlı deri enfeksiyonları lokal veya yaygın olabilir. Predispozan faktörler yanık, travma ve dermatitlerdir. *Pseudomonas* için tanı koyucu özellik mavi-yeşil püü ve ekşi meyve kokusudur(41-44). Bütünlüğü bozulmuş deride yanık, travma, dekübit ülseri veya dermatit gibi

lezyonlarda nem de varsa bakteriye ait deri enfeksiyonları gelişebilir. Ektima gangrenozum dışında subkütan nodüller, derin apseler, sellülit, veziküler ve püstüler lezyonlar, bül veya nekrotizan fasiit gibi çok çeşitli enfeksiyonlar oluşturabilir (44).

2.2.ACINETOBACTERLER VE ACINETOBACTER BAUMANNII

Acinetobacter türleri, 1939 yılında Debord'un gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesi ile tanımlanmıştır (48). *Acinetobacter* cinsi bakteriler üremenin logaritmik fazında kısa, iri, gram negatif, 1,0–1,5 µm uzunluğunda basil, üremenin duraklama fazında kok veya kokobasil şeklinde görülmektedir. Genellikle düzgün, bazen mukoid, renksiz koloniler oluşturur. Zorunlu aerop, DNaz ve oksidaz negatif, katalaz pozitif, nonfermantatif bakterilerdir. Fimbriaları vardır ve hareketsizdirler. Diğer nonfermantatif bakterilerden ayırmada kullanılacak ilk test oksidaz testidir (49). *Acinetobacter* türleri arasında en sık ve en önemli klinik tablolara yol açan etken *A. baumannii*'dir (49). Rutin laboratuvar koşullarında, biyokimyasal reaksiyonlara ve üreme özelliklerine göre *Acinetobacter* tür ayrımı yapılmaktadır. Glukozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 44 °C'de üreyebilen kökenler *A. baumannii*'dir (50).

Genel üretim besiyerlerinde 35-37°C' de kolayca ürerler. Kanlı agardaki kolonileri 24 saat sonunda 2-3 mm çapına ulaşırlar ve bazı türler hemolitik özellik gösterebilirler. MacConkey agarda ve Eozin Metilen Blue agar' da laktoz negatif koloniler oluştururlar. Enterobakterilerden daha küçük, opak, pigmentsiz, S tipi koloniler meydana getirirler. Bazı türler pigment oluşturabilir (51). Klinik örneklerden izole etmek için seçici–ayırtıcı besiyerleri geliştirilmiştir. Safra tuzları, şeker ve bromkrezol moru içeren Herelea agar, Holton's agar, Leeds *Acinetobacter* Medium gibibesiyerleri, üretilmesi için kullanılabilir. Bakterileri, dışkı gibi kontamine örneklerden izole etmek için tek bir karbon ve enerji kaynağı, nitrojen kaynağı olarak amonyum veya nitrat tuzları içeren pH 5,5- 6,0 olan sıvı mineral besiyerine inoküle ederek izole etmek mümkündür (2, 52).

Acinetobacter kökenleri klinik laboratuvarlara gelen örneklerden izole edilen en sık ikinci nonfermentatif Gram negatif bakterilerdir (53). Sağlıklı insanlar için patojen olmayan ancak bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyonlara

neden olabilen fırsatçı bakterilerdir (54). İnsanlardan en sık izole edilen türü *A. baumannii*'dir (55).

2.2.1. *Acinetobacter baumannii* Virülans Faktörleri

Acinetobacter cinsi bakteriler genel olarak virulansı düşük patojenlerdir. İmmun sistemi normal olan bireylerde enfeksiyon oluşturmaları oldukça güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (49, 56). Malignite, yanık, konağın immün sistemini baskılayan durumlar ve konağın yaşı enfeksiyon gelişimini kolaylaştıran bazı faktörlerdir. Ağır cerrahi girişim, uzun süre yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre mekanik ventilatöre bağlı kalma, uzun süreli antibiyotik kullanımı, damar içi kateterizasyon, enteral beslenme, idrar sondası, endotrakeal tüp ve trakeostomi başlıca risk faktörleridir. Son 30 yıldır hastane ortamında yeni, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanımı, hem *Acinetobacter* türleri ile gelişen hastane enfeksiyonu oranını arttırmış hem de bu bakterilerde birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmesine neden olmuştur. Antibiyotik kullanma alışkanlıkları ve çevresel faktörlerin katkısı ile antibiyotik direnci hastaneler, şehirler ve ülkeler arasında farklılık göstermektedir (49, 56).

Acinetobacter cinsi bakteriler genel olarak düşük virulanslı olarak kabul edilmelerine rağmen virulanstan sorumlu faktörler de vardır;

- 1- **Polisakkarit kapsül:** L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşup, bakteri yüzeyinin hidrofilik olmasını sağlar ve fagositozdan korur. Ek olarak intravenöz kateter, trakeal kanül gibi yüzeylere tutunmayı kolaylaştırır.
- 2- **Fimbria ve/veya kapsüller polisakkarit:** İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar.
- 3- **Lipopolisakkarit ve lipid A:** Hücre duvarında bulunan lipid A potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırır.
- 4- **Enzimler:** Dokulardaki lipidleri yıkan enzimler üretirler.
- 5- **Aerobaktin ve siderofor:** Aerobaktin ve siderofor gibi demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilmektedir.

Yapılan çalışmalarda antibiyotik direncine neden olan PER-1 enziminin virölansı arttırdığı ve klinik olarak daha ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (49, 57, 58).

2.2.2. *Acinetobacter baumannii*'nin Epidemiyoloji

Acinetobacter türleri kuruluğa dayanıklıdırlar. Farklı ısı ve pH derecelerinde yaşayabilmelerinden dolayı cansız yüzeylerde günlerce canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler (2, 59).

Sağlıklı insanların %25' inde normal cilt florasında *Acinetobacter* türlerini taşıdığı düşünülmektedir. %7'inde faringeal kolonizasyon görülmektedir. Ayrıca sağlıklı insanların ağız florasında, üst solunum yollarında, genitoüriner sistem ve alt gastrointestinal sistemlerinde de bulunduğu gösterilmiştir (2, 59, 60). Hastaneye yatırılmış bireylerde salgın dönemlerinde %7-18 oranında boğaz taşıyıcılığı görülmektedir. Trakeostomi sürüntülerinde bu oran %45' dir (2). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların dışkılarında çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir (51).

Acinetobacter türleri hastane ortamında, buhar makinesi, musluklar, yatak kenarları, tansiyon aletleri, anjiyografi kateterleri, mekanik ventilasyon cihazlarından izole edilmiştir (2, 6). Hastane personelinin normal cilt florasında sürekli taşınan en yaygın gram negatif bakterilerdir. Sağlık personeli, rezervuar insanlar ve cansız materyaller, hastalar arasında geçiş için uygun bir ortam oluşturmaktadır (2). *A. baumannii*' nin özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların %71' ini birinci haftanın sonunda kolonize ettiği ve bu hastalarda *A. baumannii* ile ilişkili enfeksiyonların arttığı gösterilmiştir (61). Özellikle yoğun bakım ünitesinde değişik risk faktörleri bu duruma etkili olmaktadır. Uzun süre hastanede yatmak, cerrahiye takiben endotrakeal tüp takılması, intravasküler, ventriküler veya üriner kateter uygulaması, invaziv alet varlığı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, parenteral beslenme ve mekanik ventilasyon gibi işlemler *Acinetobacter* enfeksiyonları için risk faktörü oluşturmaktadır (59).

2.2.3. *Acinetobacter baumannii*'nin Neden Olduğu Hastalıklar

Acinetobacter türleri genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olurlar. Toplumdan kazanılmış enfeksiyonları nadirdir. Tüm organlarda süpüratif enfeksiyonlara neden olabilirler. *Acinetobacter* türleri arasında en sık ve en ciddi klinik tablolara neden olan etken *A. baumannii*' dir. Pnömoni, sepsis, menenjit, bakteriyemi, üriner sistem ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olurlar (59).

Solunum Yolu Enfeksiyonları: *Acinetobacter* türlerinin en sık neden olduğu hastane kaynaklı enfeksiyon pnömonidir (55, 62, 63). Yoğun bakım ünitelerinde meydana gelen pnömonilerin %10'unun nedeni *Acinetobacter*'lerdir (64). Pnömoni sıklıkla mekanik ventilasyonun bir komplikasyonu olarak ortaya çıkmaktadır (55, 64, 65). Ventilatörle ilişkili pnömoni sıklıkla subglottik bölgede kolonize olan bakterilerin mikroaspirasyonlarla trakeobronşial ağaca ve alt solunum yollarına ulaşmaları sonucu oluşmaktadır ve %13-49'unda etken *A. baumannii*'dir (66-68). Yoğun bakım ünitesinde yatış, ileri yaş, kronik akciğer hastalığı, immünsupresif tedavi, cerrahi, antibiyotik kullanımı, endotrakeal tüp ve gastrik tüp gibi invaziv alet varlığı, solunum ekipmanının tipi *Acinetobacter* ile alt solunum yollarının kolonizasyonunu veya pnömoni riskini arttıran faktörler olarak tanımlanmıştır (65, 69). Hastane kaynaklı oluşan pnömoniler için %70'in üzerinde mortalite oranı rapor edilmiştir (55).

Bakteriyemi: *Acinetobacter* türleri içinde bakteriyemilerde en sık izole edilen *A. baumannii* 'dir (65). Bakteriyemilerin en önemli kaynakları solunum yolu ve intravenöz kateterlerdir (70). Daha az sıklıkla karşılaşılan kaynaklar ise cerrahi alan, yanık ve idrar yolu enfeksiyonlarıdır (55). İmmün yetmezlikli hastalar yetişkin hastalar içerisinde en büyük grubu oluşturmaktadır (71-74). İkinci önemli hasta grubu ise yenidoğanlardır. En önemli risk faktörleri düşük doğum ağırlığı, antibiyotik tedavisi, mekanik ventilasyon ve yenidoğan konvülsiyonlarıdır (70). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere mortalite oranı %17-46'dır (55, 72).

Menenjit: Primer menenjit hastaları bildirilmesine rağmen *Acinetobacter* menenjitinin baskın formu sekonder menenjittir ve genellikle kafa travması sonrası

veya invaziv nöroşirürji işlemlerini takiben ortaya çıkmaktadır (65, 75). En önemli risk faktörleri ventrikülostomi, serebrospinal sıvı fistüllerinin olması, beş günden uzun süre kalan ventriküler kateter varlığıdır (65). *Acinetobacter* 'lerin neden olduğu menenjitlerde mortalite oranı %20–27 kadardır (76, 77).

Üriner Sistem Enfeksiyonları: İdrar yollarında enfeksiyon oluşturmaksızın kolonize olabilirler. Nadiren invazyon yaparak enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkabilirler (55). Çoğunlukla çok yaşlı düşük hastalarda, devamlı yoğun bakımda kalan hastalarda ve kalıcı olmayan üriner kateterli hastalarda enfeksiyona neden olmaktadır (69, 78).

Yumuşak Doku Enfeksiyonları: *Acinetobacter* 'ler venöz kateterle ilişkili sellülide neden olabilirler (55). Travmatik yara, yanık ve postoperatif insizyon yerinde kolonizasyon veya enfeksiyona yolaçabilirler (55, 65, 79).

Diğer Enfeksiyonlar: Endoftalmit, protez kalp kapağı endokarditi, periton diyalizi ile ilişkili peritonit, perkütan transhepatik kolanjiografi ve perkütan safra drenajıyla ilişkili kolanjit, pankreas ve karaciğer apseleri, otolog kemik iliği transplantasyonundan sonra gelişen osteomyelit, septik artrit bildirilen diğer nadir olgulardır. Başlıca risk faktörleri travmatik yaralar, cerrahi insizyon bölgeleri, yanık, venöz kateter uygulaması, bağışıklık sisteminin baskılanmasıdır (49, 59).

2.3. ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ MEKANİZMALARI

Direnç bir mikroorganizmanın antimikrobiyal ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme gücüdür. Antibiyotik direncinin gelişimi genellikle gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak, 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin kullanılmadığı bazı adalarda, toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakteriler bulunduğu, antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucunda değil, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için de kullandığı savunma mekanizmalarının bir parçası olduğu belirtilmektedir. Antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanılması ile birlikte yıllar içinde birçok antibiyotiğe dirençli

bakteriler ortaya çıkmıştır. Tarihteki ilk direnç mekanizması, *E.coli* suşlarında penisilini parçalayan bir enzimin varlığını gösteren Abraham ve Chain tarafından 1940 yılında bildirilmiştir. 1944 yılında Kirby, *S.aureus* suşlarından benzer özelliklerde bir başka enzim elde etmiştir. Tüm dünyada yeni ilaçlar geliştirilmekte iken diğer tarafta bunlara hızlı bir şekilde direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşmuş enfeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutları giderek artmaktadır (80, 81).

Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesinde çeşitli mekanizmalar rol oynamaktadır. Bu mekanizmaları dört başlıkta toplayabiliriz:

İlacın hedefine ulaşamaması: İlacın hücre içine alınmasındaki azalmadan veya dışarı atılmasını hızlandıran aktif pompa sistemlerinden kaynaklanmaktadır. İlacın hücre içine girmesi ile ilgili engeller genelde doğal direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır. Antimikrobiyal ajana geçirgenliğin sonradan azalması genellikle membran porin proteinlerindeki değişimlerden kaynaklanır. Dış zar geçirgenliğindeki değişiklikler florokinolon ve aminoglikozit direncinde etkilidir (82). Aktif pompalama sistemi; tetrasiklin, makrolidler, kinolonlar, kloramfenikol ve beta-laktamların hedefine etkin yoğunlukta ulaşmasını engelleyerek bakteri hücrelerinde direnç gelişimine neden olmaktadır (82, 83).

İlaç etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerin üretimi: Birçok antibiyotik sınıfına dirençte önde gelen mekanizmadır. Örneğin penisilin gibi antibiyotikleri kapsayan beta-laktam ajanları hidrolize ederek direnç gelişimine yol açan beta-laktamazlar bu enzimlerdendir. Bir diğer örnek de asetilasyon, adenilasyon ve fosforilasyon ile aminoglikozid yapısını değiştiren enzimlerdir. Bunların yanı sıra makrolid grubu ajanlara ve kloramfenikole dirence yol açan enzimler de bulunmaktadır (84).

İlacın bakteri hücreindeki hedefinin değiştirilmesi: İlaçların bağlandığı hedef hücrelerden olan, ribozomlar ve çeşitli enzimlerdeki, tek bir mutasyona bağlı olarak, ilaca bağlanma özelliği düşük yeni bir hedef oluşur. Tek basamakta gerçekleşen bu değişime bağlı direnç gelişimi hem hızlıdır hem de çabuk yayılır. Buna örnek olarak, RNA polimeraz yapısındaki değişiklikler ile stafilokok ve streptokok suşlarında

rifampin direncinin gelişmesi verilebilir (85). Diğer hedef değişimleri ise, bir dizi mutasyon sonucunda veya bir başka türden gelen yabancı DNA' nın kromozoma girmesi ile oluşur(84).

İlacın hedefinin dışında yeni bir metabolik yolun kullanımı: Bazı bakteriler, hedef değişimlerinden farklı olarak, ilaca duyarlı hedefe gereksinimi ortadan kaldıracak yeni bir metabolik yol geliştirirler. Örneğin sulfonamid ve trimetoprim direncinde böyle mekanizma mevcuttur. Bakteriler folat sentez etme yerine, ortamdan hazır folat alma özelliği kazanabilir (86).

Antibiyotik direnci intrinsik (doğal), çevre ve şartlara bağlı direnç ve kazanılmış direnç olarak üç kısımda tanımlanabilir (84).

1. İntrinsik (Doğal Direnç): Bir bakteri türünün genetik özelliği olan direnci tanımlamaktadır. Doğal direnç kalıtsal değildir ve ilaç kullanımıyla ilgisi yoktur. Doğal direnç, mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı buldurmamalarının veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşamamasının bir sonucudur. Bu bakteriler ya ilacın hedefi olan yapıyı içermez ya da kendine özgü hücre özelliklerinden dolayı ilaç etki göstermez. Örneğin ilacın dış memrandan geçememesinden dolayı gram negatif bakteriler doğal olarak vankomisine dirençlidir (82, 87).

2. Çevre ve Şartlara Bağlı Direnç: Çevre ve şartlara bağlı direnç antimikrobiyal ajanın in vitro ve invivo etkinliği arasındaki farkı gösteren bir deyimdir. Laboratuvarında mikroorganizmaya etkili olarak değerlendirilen antimikrobiyal ajan; dokudaki oksijen basıncı ve pH değişiklikleri veya enfeksiyon bölgesine ulaşamaması gibi nedenlerle in vivo olarak etki göstermeyebilir. Örneğin, birinci kuşak sefolosporinler kan-beyin bariyerini geçemedikleri için, etken mikroorganizmaya etkili bulunsalar da menenjit tedavisinde kullanılamaz. Benzer şekilde, düşük pH veya anaerobik koşullar aminoglikozidlerin in vivo etkinliklerini kısıtlar (84).

3. Kazanılmış Direnç: Sonradan kazanılan bir direnç tipidir. Burada bakteri popülasyonu antimikrobik madde ile ilk temasa geldiğinde ilaç mikroorganizma üzerine etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antimikrobik maddeye karşı direnç gelişir. Bu direnç deoksiribonükleik asitteki (DNA) mutasyonlarla veya yeni bir DNA'nın elde edilmesiyle ortaya çıkmaktadır. Mutasyonlar genellikle kromozomal DNA'da oluşmaktadır; ancak plazmid veya transpozonlardaki genlerde de olabileceği bilinmektedir (82).

a) Kromozomal Direnç: Bakteri kromozomunda kendiliğinden oluşan mutasyonlar sonucunda gelişmektedir. Bu dirençte hücrenin ilaca permeabilitesinde azalma veya hücre içinde ilacın hedefinde değişiklikler olabilir. Streptomisin, eritromisin, linkomisin ve rifampisine karşı bu tür direnç görülebilir. Kromozomal direnç oluşma sıklığı azdır ve nadiren sorun oluşturur (88). Kromozomal mutasyonla gelişip klinik öneme sahip direnç örnekleri şunlardır: Rifampin, izoniazid, kinolon direnci ile stafilokoklarda metisilin direnci (88).

b) Plazmidlere Bağlı Direnç: Plazmidler, kromozomlardan bağımsız olarak çoğalabilen, çift iplikçikli, çember şeklinde kromozom dışı genetik yapılardır. Klinikte daha çok plazmidlere bağlı direnç görülmektedir. Bir hücrede 10-40 kadar plazmid bulunabilir. R-plazmid adı verilen direnç plazmidleri, farklı antibiyotiklere karşı direnç genleri taşımaktadır. Plazmidlere bağlı direnç bulaşıcıdır ve genellikle antibiyotiği inaktive eden veya bakterinin geçirgenliğini değiştiren enzimler ile oluşmaktadır. (82, 89). Direnç genlerini taşıyan genetik materyal ve plazmidler bir bakteriden diğerine transdüksiyon, transformasyon, konjugasyon ve transpozisyon mekanizmalarıyla aktarılır (86). Transdüksiyon ise direnç genlerinin bakteriyofaj aracılığı ile transferi olup, genelde laboratuvar koşullarındaki direnç aktarımı için uygulanmaktadır. Transformasyonda, bakterilerin lizisiyle ortama dökülen plazmidler veya DNA kırıntıları duyarlı başka bakteriler tarafından alınır. Konjugasyon, iki bakteri hücrelerinin teması sonucunda genetik eleman aktarımıdır ve türler arası plazmid aktarımının in vivo koşullarda da oluşabilmesi için önemlidir. Transpozisyon ile transpozon veya transpozabl elementler diye bilinen kısa DNA sekansları aktarılabilir. Özellikle Gram-olumlu bakterilerde bulunan konjugatif transpozonlar, plazmid olmaksızın gen aktarımını sağlayabilir (86, 88, 90)

c) Transpozonlara Bağlı Direnç: Transpozonlar, bir DNA içinde ya da DNA-plazmid, plazmid-plazmid arasında birinden diğerine geçebilen DNA parçalarıdır. Transpozonlar bağımsız olarak replike olamazlar bu özellikleri plazmidlerden farklıdır. Bu küçük DNA parçaları kromozom veya plazmid içinde bulunmakta, bunlar arasında yer değiştirebilmektedir. Ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklinler ve trimetoprime karşı direnç gelişiminden sorumludurlar. Son yıllarda bazı transpozon veya plazmidlerde "integron" adı verilen ve yeni genlerin kazanılmasını sağlayan genetik yapılar bulunduğu gösterilmiştir. Hastane enfeksiyonlarında sorun olan bir bakterinin birçok antibiyotige birden "çoğul dirençli" duruma gelişinde transpozonların rolü olduğu anlaşılmıştır (82, 89). Transpozonların etkisiyle şu mekanizmalarla direnç gelişir:

1. Antimikrobik maddeyi parçalayan enzim oluşturulması (beta-laktamazlar, kloramfenikol asetil transferaz, aminoglikozitleri asetilasyona, nukleotidilasyona ve fosforilasyona uğratan enzimler).

2. Hücre çeperi geçirgenliğinin bozulması: Gram-negatif bakterilerde lipoprotein dış tabaka nedeniyle bunlarda daha sık görülür. Dirençli kökenlerde porusları oluşturan porin proteinlerin sentezi bozulmuştur.

3. İlacın hücreden dışarı atılması yani pompalanması (efflux) hızlanabilir (tetrasiklinlere direnç gelişiminin bir yolu da budur)

4. İlacın ortamdan alınışı (uptake) azalır.

5. İlacın hücre içindeki etki yerine bağlanması azalır (82, 89).

d) Çapraz Direnç: Bir ilaca karşı dirençli olan mikroorganizmaların aynı veya benzer mekanizma ile etki eden başka ilaçlara karşı da dirençli olmasıdır. Kromozomal veya ekstrakromozomal kaynaklı olabilir. Bu direnç yapıları benzer ilaçlar arasında olabileceği gibi hiç benzemeyen ilaçlar arasında da olabilir. Eritromisin, oleandomisin, neomisin, kanamisin gibi yapıları benzeyen ilaçlar ya da Eritromisin ve linkomisin arasındaki yapıları benzer olmayan iki ilaç arasındaki çapraz direnç örnek olarak verilebilir (91).

2.3.1. Betalaktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Betalaktam antibiyotiklerin etki gösterebilmeleri için Penisilin bağlayan proteinlere (PBP) yeterli miktarda ulaşması ve bağlanması gerekir bunun içinde dış

zardan ve periplazmik aralıktan geçmelidir. Bakterilerin direnç geliştirebilmesi için, bu basamakların herhangi birinde bir engel oluşturması gereklidir.

Bakterilerde betalaktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç 3 yolla gelişebilmektedir.

- 1) İlacın hedef bölgesi olan PBP' de meydana gelen değişiklikler
- 2) Dış membran geçirgenliğinin bozulması
- 3) Betalaktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi

1) İlacın hedef bölgesinde gelişen değişiklikler: Hedef yapısındaki değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanamaması beta laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir mekanizmadır. Betalaktam antibiyotiklerin hedef bölgeleri membrana bağlı proteinler olan PBP' lerdir. Bu bölgedeki değişiklikler; kromozomal mutasyonlar sonucu PBP' nin betalaktam antibiyotiğe afinitesinin azalması veya düşük afinite gösteren yeni PBP' lerin sentezlenmesi ya da PBP sayısında azalma olması sonucu oluşabilmektedir (92, 93). Bu tür direnç gram pozitif bakterilerde daha çok görülmektedir. Örneğin *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* ve *S. pneumoniae*' da gözlenen penisilin direnci ve metisiline dirençli *S. aureus*' da gözlenen direnç PBP' lerdeki değişiklikler sonucu oluşmaktadır (94).

2) Dış membran geçirgenliğinin bozulması: Bu tür dirençten geçirgenliğin (permeabilite) azalması (porin kaybı) veya aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması sorumludur. Beta laktam antibiyotikler gram negatif bakterilerin dış membranındaki 'outer mebrane protein' (OMP) adı verilen porları kullanarak hücreye girmektedir. Betalaktam antibiyotikler başlıca 2 kanaldan geçerler bunlar porin F ve porin C adı verilen porlardır. Bununla beraber diğer bir betalaktam olan İmipenem dış membrandan ayrıca D2 proteini adı verilen özel bir porini kullanarak da geçebilirler. Porin kaybına bağlı direnc genellikle *P.aeruginosa* kökenlerinde bildirilmiştir. Özellikle enzimatik dirençle birlikte ise önemli düzeyde bir dirence yol açmaktadır. Buna örnek olarak *P.aeruginosa*'da imipenem direncinin kromozomal beta-laktamaz aktivitesi ve D2 porin (Opr D kanalı) kaybına bağlı olması verilebilir. Bir antibiyotiğin gücünü belirleyen faktörlerden biri bakterinin periplazmik boşluğunda kısa sürede etkin konsantrasyonlara ulaşabilmesidir (95). Bunu da porinlerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin özellikleri (yük, çözünürlük, büyüklük)

belirlemektedir (94). İmipenem, diğer betalaktam antibiyotiklere kıyasla daha düşük moleküler ağırlıkta olduğundan porinlerden daha hızlı bir geçiş göstermektedir buna karşın çoğu sefalosporin ve geniş spektrumlu penisilinler moleküler yapılarındaki uzun yan zincirler nedeniyle porinlerden nispeten yavaş geçerler (95).

3) Betalaktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi: Beta laktamazlar, penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta laktam antibiyotikleri hidrolize eden ve bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan, kromozomal ya da plazmid kaynaklı olan enzimlerdir. Bu enzimler beta laktam halkasındaki siklik amid bağı parçalayarak etki gösterirler (96, 97). Penisilinaz 1940'lı yıllarda Abraham ve Chain tarafından bulunmuştur. İlerleyen zamanlarda bu enzimlerin sayısı artmıştır yaklaşık 400 civarında betalaktamaz enzimi tanımlanmıştır. Betalaktamazların sayı ve çeşitlerindeki artış bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu kılmıştır. 1973 yılında Richmand ve Sykes tarafından betalaktamazlar sınıflandırılmış bu sınıflandırma 1976 yılında ise Sykes ve Matthew tarafından genişletilmiştir (97, 98). Betalaktamazların sınıflandırılmasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırmaları kullanılmaktadır. 1980 yılında Ambler, betalaktamazları A, B, C ve D olmak üzere 4 grupta toplamıştır. Ambler bu sınıflandırmayı enzimlerin aminoasit ve nükleotid dizilerindeki (moleküler yapısındaki) benzerliklerini dikkate alarak düzenlemiştir (99).

Sınıf A: Bu grup betalaktamazlar aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyarak penisilinleri hidroliz ederler. GN bakterilerde bulunan TEM-1 enzimi bu gruba iyi bir örnektir.

Sınıf B: Metallobetalaktamaz olarak da adlandırılırlar ve bu gruptaki enzimler aktivite gösterebilmek için çinkoya bağlı tiyol grupları ihtiyaç duyarlar.

Sınıf C: Amp C enzimler olarak da adlandırılırlar ve bu adlandırmanın sebebi kromozomal Amp C geni tarafından kodlanmasıdır. Bu grubun enzimler öncelikle sefalosporinazlardan oluşurlar.

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden enzimleri kapsamaktadır, aktif bölgelerinde serin aminoasiti taşırlar.

Betalaktamazların en yeni sınıflandırma şeması, 1995 yılında Bush, Jacoby ve Mederios tarafından yapılan ve betalaktamazları 4 gruba ayırdıkları sınıflamadır bu

sınıflamada enzimler biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre sınıflandırılmışlardır. Bu grupların genel özellikleri tablo 2 'de görülmektedir.

Grup 1: Klavulanik asit ile inhibe edilemeyen sefalosporinazlar bu grup içinde bulunurlar. birçoğu kromozomal enzimlerdir ancak plazmid konturollü betalaktamazlarda bu grup içinde yer alırlar. Bu enzimler Amp^rler sınıflamasında sınıf C'de yer alırlar. Kromozomal ya da plazmid kontrolündedirler. Plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1, CMY betalaktamazları ve kromozomal Amp^r enzimleri bu grupta yer almaktadır. Bu grup enzimler klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler (100). Salmonella dışında hemen tüm GN bakterilerde kromozomal grup 1 betalaktamazlar bulunur. Grup 1 enzimlerini kodlayan genler plazmidlerde de görülebilmekte ve Enterobacteriaceae arasında transmisyon yoluyla aktarılabilmektedir (101).

Grup 2: Tümü Ampler sınıflamasına göre grup A ve D' de yer almaktadır. Bu grup substrat profilindeki farklılık nedeniyle altı alt gruba ayrılmaktadır. Sıkça karşılaşılan türlerde fazla olmaları ve plazmidlerce aktarılmaları nedeniyle 2b ve alt gruplarında bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, klinik açıdan önem taşımaktadırlar (101-103).

2a: Bu alt grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır. GP bakterilerde bulunan penisilinazlardan birçoğu özellikle *S.aureus*'un enzimleri bu gruptadır (101, 104, 105).

2b: Bu grupta yer alan enzimler klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi betalaktamaz inhibitörlerine duyarlı betalaktamazları içerirler ve hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize ederler (102). Yaygın olarak bulunan ve plazmid kontrolünde olan "geniş spektrumlu" TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 betalaktamazları Enterobacteriaceae ailesinde yaygın olarak bulunur (103, 106).

2b:ESBL(extended-spectrum beta-lactamase=genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar) bu grupta yer almaktadır. Bu betalaktamazlarda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1- 4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu betalaktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM ve SHV enzimleri gelişmiştir (103).

2br: Klavulanik asitten etkilenmeyen, ESBL'ler bu gruba alınmıştır. İnhibitörlere rezistans TEM (IRT) olarak adlandırılır (104).

2c: Karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite gibi betalaktamaza duyarlı enzimlerdir. PSE-1, PSE-3, PSE-4 betalaktamazları, *Aeromonas hydrophilia*'nın AER-1 enzimi, *M. catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *V. cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır (104).

2d: Kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden betalaktamazları içermektedir. OXA enzimleri bu gruptadır. Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler (107).

2e: Bu betalaktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *B. fragilis*'in CepA enzimi, *B. uniformis* ve *B. vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA, *E. coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S. maltophilia*'nın L2 ve *Y. enterocolitica*'dan izole edilen Bla-1 enzimleri bu grupta yer almaktadır (104).

2f: Karbapenem antibiyotiklerine etkili, serin betalaktamazları bu grup içindedir. Klavulanik asit ile inhibe olmaktadır. Aztreonama direnç sağlarlar ancak üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolize edemezler (104, 108).

Grup 3: Bu grup, moleküler sınıf B'de yer alan metallo betalaktamaz (MBL) enzimlerinden oluşur. etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ile inhibe olurlar. Aktiviteleri için Zn (çinko) iyonlarına gereksinimleri vardır.

3a: Bu enzimler maksimum aktivite için Zn² (çinko) eklenmesini gerektirirler (110). Bu grup içerisinde *B. cepacia*'nın PCM-1, *S. maltophilia*'nın L1, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, gibi değişik türlerde saptanan IMP-1-18 ve VIM-1-13 enzimleri yer almaktadır (109).

3b: *Aeromonas* türlerinin metallo enzimlerini kapsar ve bunlara "gerçek karbapenemazlar" da denir. 3b enzimlerinden en az 3 tanesi düşük çinko iyonları varlığında inhibe olurlar. Diğer MBL' ların ise aktif bölgelerinde çinko bulunduğu ve enzimin katalitik aktivitesi için bu iyonun mutlaka ortamda bulunması gerektiği kabul edilmektedir (109). Grup 3b'deki bütün enzimler EDTA ile inhibe olur. EDTA eklenmesinden sonra çinko eklemenin enzimlerin çoğunun aktivitesini geri kazandırdığı gösterilmiştir (110).

3c: Bu grubun özelliği diğer betalaktamlara göre karbapenemler üzerine zayıf etki göstermeleridir. Bu grupta sadece *Legionella gormanii*' nin ürettiği MBL'ler yer almaktadır (109). Bu enzim, geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler de dahil sefalosporinleri çok yüksek oranda hidroliz etmesiyle ayrılır yani güçlü sefalosporinaz aktivitesine sahiptir.

Grup 4: Yapıları henüz tam olarak saptanamamıştır ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiş penisilinazlar bu gruba toplanmıştır. *A. faecalis*, *B. fragilis*, *C. jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenabilen enzimi, *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 betalaktamazı bu gruba sokulmuştur. Grup1'deki kromozomal indüklenbilir betalaktamazlar, Grup 2'deki ESBL enzimler ve Grup 3'deki metallo betalaktamazlar hastane enfeksiyonlarında sıkça karşımıza çıkar ve önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır (111, 112).

Tablo 2: Betalaktamaz Grupları ve Özellikleri

Beta-laktamaz grubu	Alt grup	Molekül sınıfı	Özellik
1		C	Çoğunlukla gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (ancak plazmidde de kodlanabilir) Klavulanik asitle inhibe olmaz.
2		A, D	Birçoğu klavulanik asitle inhibe olur.
	2a	A	Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar
	2b	A	Çoğunlukla gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1)
	2be	A	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL)
	2br	A	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) beta-laktamazlar bir tane SHV türevidir
	2c	A	Karbenisilini hidroliz eden enzimler
	2d	D	Oksasilini hidroliz eden enzimler Klavulanik asit ile az inhibe olurlar.
	2e	A	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar
	2f	A	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo-beta-laktamazlar. Klavulanik asit ile inhibe olmazlar.
4		?	Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş

2.3.2. Aminoglikozidlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Aminoglikozidler özellikle aerop gram negatif basil ve gram pozitif kok türlerine etkili antibiyotiklerdir. Bu ajanlara karşı doğal ve kazanılmış direnç mekanizmaları şunlardır:

Aminoglikozid yapısını değiştiren enzimler: Aminoglikozidlere karşı kazanılmış dirençte plazmid veya transpozon kökenli enzimlerin üretimi en sık görülen mekanizmadır. Aminoglikozidlerin yapısını değiştiren enzimler, Asetil transferazlar (AAC), Adenil transferazlar (ANT) ve Fosfotransferazlardır. Aminoglikozidlerin yapısının değiştirilmesi, hücre içine taşınmasını ve protein sentezini engellemesini bozmaktadır (82, 113).

Ribozomlardaki hedef değişiklikleri: Aminoglikozidlerin bakteri hücreindeki hedefi olan ribozomlarda mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Streptomisine direnç bu yolla oluşur (113).

Antibiyotiğin hücre içine alınımının bozulması: Aminoglikozidlerin hücre içine taşınmasının engellenmesi tüm ajanlara çapraz direnç gelişmesine neden olmaktadır. Aminoglikozidler pozitif yüklü bileşiklerdir. Pozitif yüklü (katyonik) olan bu bileşikler, Gram-olumsuz bakterilerin dış zarındaki lipopolisakkarit (LPS) tabakasındaki divalan katyonlarla (örn: Mg⁺²) yer değiştirip, membran bütünlüğünün bozulması sonucu hücre içine girerler. Zardaki LPS, dış membran proteinleri, porinler veya fosfolipitlerin yapısındaki değişiklikler aminoglikozidlerin hücre içine girişini engeller. Anaerop bakteriler aminoglikozidlerin hücre içine girmesini sağlayan elektron transport sistemine sahip olmadıklarından doğal olarak aminoglikozidlere dirençlidirler (82, 86, 114).

2.3.3. Tetrasiklin'e Karşı Direnç Mekanizmaları

Bu direnç doğada en sık karşılaşılan antibiyotik direncidir. Daha çok iki mekanizma ile meydana gelir.

Aktif pompa sistemi: Bu sistemde yer alan proteinler ,yapısal olarak transport proteinlerine benzer ve ATP'ye bağımlıdırlar. Hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde Tet A'dan Tet F'e kadar, Tet K ve Tet L olarak tanımlanmış pompa sistemleri görülmüştür (82, 113).

Ribozomal korunma: Bu dirençte sitoplazmik bir protein görev almaktadır. Bu protein tetrasiklinin ribozoma bağlanmasına engel olmaz. Fakat aminoasit t-RNA'nın da işlevini sürdürebilecek şekilde bağlanmasını sağladığı düşünülmektedir.

2.3.4. Makrolid, linkozamid ve streptogramin B'ye Karşı Direnç Mekanizmaları

Bu grup antibiyotikler kimyasal olarak birbirinden farklı etki mekanizmaları aynıdır. gram negatif bakterilerin hücre duvarının hidrofobik bileşikleri geçirmemesi nedeniyle bu gruba doğal dirençlidirler. Diğer direnç mekanizmaları şunlardır.

Ribozomal hedefin değiştirilmesi: Bu antibiyotikler içindeki en önemli direnç mekanizması ribozomlara bağlanmanın engellenmesidir. Eritromisin rezistans metilazı olarak bilinen metilaz enzimleri ile 23S RNA değişikliğe uğrattılır ve sonuçta bu antibiyotikler ribozoma bağlanamaz. Metilasyon, ribozomal bağlanma bölgesinin özelliklerini değiştirdiğinden, antibiyotiklere karşı çapraz direnç oluşur. *S.aureus* ve *B.fragilis* gibi birçok mikroorganizmada bu tip direnç görülebilir (82, 86, 113).

Enzimatik inaktivasyon: Antibiyotiklerin enzimatik olarak değiştirilmesi söz konusudur. Eritromisin esterazlar gram negatif bakterilerde görülürken, linkozamidleri ve streptograminleri inaktive eden enzimler ise stafilokoklarda görülmektedir (82, 86, 113).

Aktif pompa sistemi: *S.epidermidis*'te eritromisin ve streptograminlere direnç oluşturan pompa mekanizması varken, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* ve *Acinetobacter*' de de geçirgenliğin azalmasına bağlı direnç görülmüştür.

2.3.5. Kloramfenikole Karşı Direnç Mekanizmaları

Temel mekanizma ilacın etkinliğini yitirmesine yol açan kloramfenikol asetil transferaz enzimidir. Bu enzimce yapısı değiştirilen antibiyotik 50S ribozomal alt üniteye bağlanamaz. 12' den fazla, farklı enzim tanımlanmış olup bunlar; plazmid veya transpozonlar aracılığıyla aktarılabilmektedir. *P.aeruginosa*'da kloramfenikole karşı aktif pompa ile oluşan direnç de bildirilmiştir (82, 86, 113).

2.3.6. Sulfonamidler ve trimetoprim Karşı Direnç Mekanizmaları

Bu antibiyotiklere doğal direnç, dış membran geçirgenliğinin düşük olmasıyla oluşur. Trimetoprim kazanılmış direnç ise en sık plazmid kökenli dihidrofolat redüktaz enzimlerinin sentezi sonucunda oluşur. *S.aureus* ve *Neisseria spp.* türlerinde kromozomal mutasyona bağlı olarak yüksek düzeyde PABA üretimi sulfonamid direncine yol açar. Dihidropteroat sentaz (DHPS) enzimindeki plazmid veya kromozomal kökenli değişiklikler sulfonamide direnç oluşturur (115).

2.3.7. Kinolonlara Karşı Direnç Mekanizmaları

Kinolon direnci genellikle DNA giraz enziminin A alt ünitesinde değişime yol açan gyr A mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bunun dışında dış zar değişiklikleri ile antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi de kinolon direncindeki bir diğer mekanizmadır (82).

2.3.8. Glikopeptidlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Gram negatif bakteriler dış membranları nedeniyle bu grup antibiyotiklere doğal olarak dirençlidirler. *Lactobacillus* ve *Enterococcus gallinarum*'da glikopeptidlere doğal dirençlidir. Glikopeptidlere kazanılmış direnç, daha çok *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'te tanımlanmıştır. Enterokoklarda 4 tip glikopeptid direnci bildirilmiştir. Bunlar VanA, VanB, VanC ve VanD'dir. Van A

tipi dirençte hem vankomisin hem de teikoplanine indüklenebilen direnç varken, Van B, Van C ve Van D tipinde ise teikoplanine direnç yoktur. Stafilokoklarda, enterokoklardan daha az olmakla beraber, glikopeptid direnci görülmektedir (82, 113).

2.3.9. Rifampin'e Karşı Direnç Mekanizmaları

RNA polimerazın B alt ünitesindeki aminoasit değişikliklerine yol açan kromozomal mutasyonlar direnç gelişimine neden olmaktadır. Bunun dışında rifampin hidrofobik bir bileşik olduğu ve dış zardan geçemediği için gram negatif bakterilerin çoğu bu antibiyotiğe doğal dirençlidir (82).

2.4. TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ

2.4.1. Fenotipik yöntemler

Patojen bakterilerin çoğu tanımlanmış ve bunların identifikasyonunda anahtar olabilecek fenotipik özellikler belirlenmiştir. Fenotipik yöntemler genetik özellikleri yansıtır ve oldukça spesifiktir. Bir patojen kökeninde belirli bir fenotip nadir olarak bulunuyorsa, bu fenotip tek başına kökenin yayılma yolu hakkında fikir verebilir. Aynı fenotipik özelliklere sahip kökenler söz konusu olduğunda ise, ek olarak alt tiplendirme yapılmalıdır (116). Fenotipik farklılıkları ortaya koyan tiplendirme yöntemlerinin dezavantajı mikroorganizmaların bu özelliklerinin değişebilir olmasıdır. Bu değişiklikler önceden tahmin edilemez veya değişen çevre koşullarına bir cevap olarak oluşabilirler. Fenotipik olarak alt tiplendirme için sıklıkla kullanılan yöntemler; antibiyotiplendirme, serotiplendirme, biyotiplendirme, faj tiplendirme, bakteriosin tiplendirme, multilokus enzim elektroforezi ve hücresel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezidir (117).

2.4.2. Genotipik yöntemler

Genotipik yöntemler epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyarlar. Bu yöntemlerin temeli, mikroorganizmaların kromozomal ve ekstrakromozomal genetik elementleri arasındaki farklılığa dayanır. Pek çok yöntemde DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemi ya da nükleik asit amplifikasyon işlemi vardır (118, 119). Genotiplendirme yöntemleri fenotiplendirmeye göre; tiplendirebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırıcı güç yönünden daha üstündür (116).

Moleküler tekniklere ilgi ve enfeksiyonların epidemiyolojik araştırmalarına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (120, 121). Çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiş olmasına karşın bakteriyel türlerin çoğunda kullanılacak en uygun metod PFGE olarak görülmektedir (122).

Tablo 3: Tiplendirme yöntemleri (Kaynak:60, 107, 120, 121, 123, 124, 125'den derlenmiştir).

Fenotipik yöntemler

- .Antibiyotiplendirme
- .Serotiplendirme
- .Biyotiplendirme
- .Bakteriyofaj tiplendirme
- .Bakteriyosin tiplendirme
- .Multilokus enzim elektroforezi
- .Hüresel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi

Genotipik yöntemler

I. Nükleik asit temelli yöntemler

- . Plasmid profileri
- . Restriction fragment length polymorphism (RFLP)
- . Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)
- . Segmented RNA gel electrophoresis
- . Ribosomal RNA gel electrophoresis
- . Multilocus sequence typing (MLST)

II. PCR temelli yöntemler

- . Hedefi bilinen tekrarlayan sekanslar
Enterobacterial Repetitive İntergenic Consensus Sequences
(ERIC)
Repetitive Extragenic Palindromic Sequences (REP)
Double Repetitive Element (DRE)
İnsertional Sequence (IS)
Polymorphic Guanine/Cytosine-Rich Repetitive Sequences
(PGRS)
 - . Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD),
 - . Arbitrary Primed PCR (AP-PCR))
 - . Amplified fragment length polymorphism (AFLP)
-

2.5. PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESİS (PFGE)

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ilk kez 1983 yılında tarif edilmiş ve kısa bir sürede moleküler epidemiyolojik analizler arasında "altın standart" haline gelmiştir (125). Geleneksel elektroforez teknikleri 50 kb üzerindeki DNA moleküllerinin jel içerisindeki elektroforetik göçüne izin vermemektedir (126). Kromozomal DNA'yı daha az kesen ve geleneksel agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilemeyecek kadar büyük DNA parçaları oluşturan restriksiyon enzimlerinin tanımlanması alternatif metodlara gereksinim doğurmuştur (127). Bu nedenle çeşitli elektroforetik teknikler tanımlanmıştır (Tablo 4). Bu teknikler, süresi ve yönleri değiştirilen bir elektriksel akım (pulse) ile 1000 kb uzunluğuna kadar olan DNA moleküllerinin çözümlenmesine izin vermektedir (123).

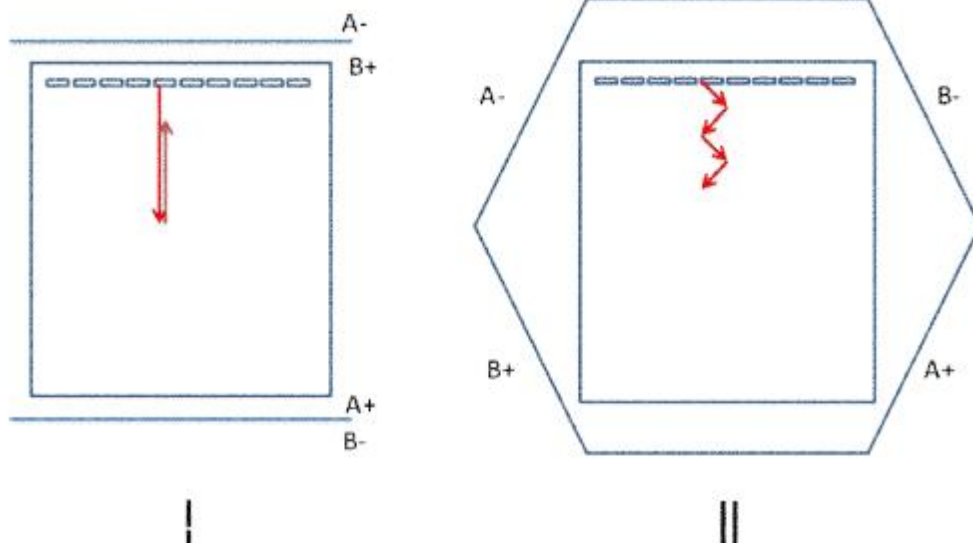
Tablo 4: Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tipleri (Kaynak 120, 123, 126, 127'den derlenmiştir)

- Rotating Gel Electrophoresis (**RGE**)
 - Programmable Autonomously Controlled Electrodes (**PACE**)
 - Pulse Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis (**PHOGE**)
 - Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis (**OFAGE**)
 - Transverse Alternating Field Electrophoresis (**TAFE**)
 - Field Inversion Gel Electrophoresis (**FIGE**)
 - Counter-damped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (**CHEF**)
-

Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE): PFGE'nin en basit tipidir. Elektrik akımı belirli sürelerle ve 180° açı ile (ileri ve geri) iki yönde verilmektedir (şekil 1-I). İleri yönde uygulanan akımın süresi daha uzundur (126, 128).

Counter-damped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF): PFGE'nin en yaygın kullanılan tipidir. Bu sistemde altıgen biçiminde yerleştirilen

çok sayıdaki elektrod yardımıyla 120° açı ile sabit hızda elektrik akımı verilmektedir. CHEF çeşitli antimikrobiyal-dirençli bakterilerin yayılımını değerlendirmede kullanılır (Şekil 1-II) (126, 128, 129).



Şekil 1: Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tipleri (128)

I: Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE)

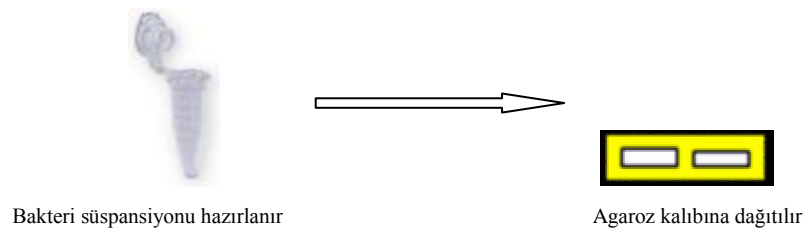
II: Counter-damped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF)

PFGE’de sağlam DNA elde etmek amacıyla bakteriler düşük erime ısıli agaroz ile karıştırılır (128, 130). DNA miktarının gözlenemeyecek kadar az veya fazla olmaması için hücre konsantrasyonu belli değerler arasında [1×10^9 - 5×10^9 CFU/ml (610 nm de yaklaşık 0,5-1 absorbans aralığında)] olmalıdır (127). Bu yöntemde, sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıli agarozla karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir (130). Agaroz kalıbı hazırlandıktan sonra bakteri hücreleri, enzim ve deterjanlarla parçalanır. Gram pozitif bakteriler için kullanılan enzimler lizozim, lizostafin ve mutanolizindir. Gram-negatif mikroorganizmaların lizisinde ise proteinaz-K/deterjan karışımı kullanılmaktadır (127). Bu işlemde sonra agaroz kalıbı 50-55°C’de distile su ve TE solüsyonu ile yıkanır. Böylece protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Hazırlanan agaroz kalıpları TE (10mM Tris, 1mM EDTA (pH 7,5)) tamponu içerisinde 4°C’de aylarca saklanabilmektedir (127). Agaroz içerisinde saf halinde kalan kromozomal DNA bir

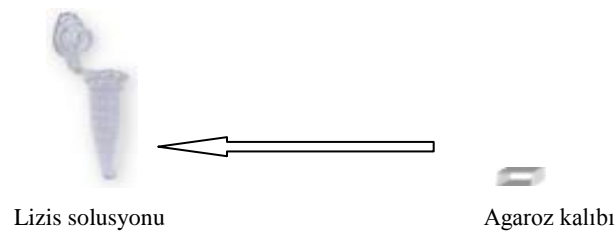
restriksiyon enzimi kullanılarak kesilir. DNA kabul edilebilir bir sayı (10'dan az 25-30'dan fazla olmamalı) ve büyüklükte kesilmelidir (122, 130). GC'den zengin bakteriyel genomda AT bölgeleri, AT'den zengin bakteriyel genomda ise GC bölgeleri daha az bulunmaktadır. Bu nedenle XbaI, SpeI gibi AT içeren enzimler GC'den zengin bakterilerin kromozomlarını daha az keserler, SmaI gibi GC içeren enzimler ise AT'den zengin bakterilerin kromozomlarını daha az kesmektedir (127, 128, 130).

Kesilen agaroz dilimleri tarak dişine yerleştirildikten sonra çevresine jel dökülebilir. Böylece daha sıkı bir ilişki sağlanarak, kırılma riski en aza indirilir, dolayısıyla daha keskin bant paternleri elde edilebilir. Hazırlanan elektroforez jeli belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutularak 10-800 kb uzunluğundaki DNA parçalarının ayrımı sağlanır. Elektroforez işleminden sonra jel etidyum bromürle boyanarak, bant profilleri görünür hale getirilmektedir (127). Büyük DNA parçalarının agarozda ayrıştırılmasına etki eden çeşitli faktörler vardır. Bunları başlıcaları; agaroz konsantrasyonu, tampon konsantrasyonu, sıcaklık, pulse süresi, voltaj ve toplam elektroforez süresidir (131).

1. Bakteri içeren agaroz kalıbı hazırlanır.



2. Lizis solusyonu I ve II kullanılarak bakteri hücresi parçalanır (DNA izolasyonu)

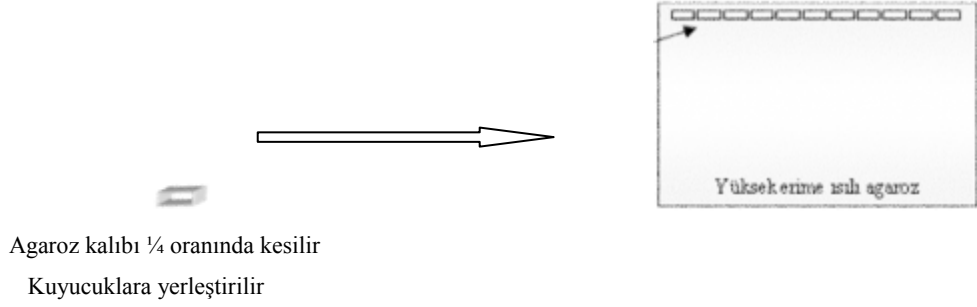


3.Yıkama ile protein ve karbonhidrat gibi kontaminantlar uzaklaştırılır

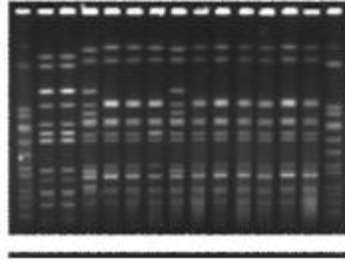
4.DNA bir RE kullanılarak kesilir



5.Elektroforez işlemi uygulanır



6.Etidyum bromürle boyanarak incelenir



Şekil 2: PFGE yapılış aşamaları (130)

2.5.1.PFGE’de Kullanılan Kontroller

Test edilecek izolatlar dışında restriksiyon profilleri çok iyi bilinen bakteriler de kontrol amacıyla kullanılır. Bu sayede hücre parçalanması, yıkama ve

endonükleaz basamaklarının uygunluğu, jel ve elektroforez koşulları ve sonuçların tekrarlanabilirliği kontrol edilmiş olur. Jeldeki en az bir çukurda ama ideali jelin başında ve ortasında olmak üzere molekül ağırlık standardı kullanılmalıdır. Bu standartlar delesyon, insersiyon ya da mutasyonlar gibi tek bir genetik olaydan kaynaklanabilecek değişikliklerin yorumlanmasına yarar sağlar (130).

2.5.2. Restriksiyon Profillerinin Analizi ve İzolatların Yakınlık Derecelerine Göre Sınıflandırılması

Restriksiyon profili analizi ve yakınlık derecelerinin belirlenmesi amacıyla öncelikli olarak, ortak ya da salgın profili belirlenir. Ortak profil yoksa büyük olasılıkla izolatlar birbirleriyle ilişkisizdir. Ortak suşun profili belirlendikten sonra buradaki bantların sayısı ve boyutları diğer izolatlarınkı ile karşılaştırılır. Her bir izolatin profili, ortak suşla olan ilişkisine göre sınıflandırılır. Tenover ve ark.; PFGE sonuçlarının yorumlanması için belirli bir sistem önermişlerdir. Bu sistemde bant profillerine bakılarak izolatların birbirleriyle ilişkilerinin derecelendirilmesi yapılabilmektedir (119).

- **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.

2.5.3. Sonuçların Rapor Edilmesi

Salgın suşlarına ait olduğu düşünülen DNA restriksiyon profilleri tip A, yakın ya da muhtemel ilişkili profiller tip A1, tip A2, ilişkisiz profil sergileyenler ise tip B, tip C ... olarak isimlendirilir ve rapor edilir (122, 132).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Süleyman Demirel Uygulama ve Araştırma hastanesi yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli örneklerinden (idrar, balgam ve yara sürüntüsü vs) 2009-2010 yıllarında izole edilen 33 adet *Pseudomonas aeruginosa* ve 48 adet *Acinetobacter baumannii* suşu çalışma kapsamına alındı.

Başlangıçta 2009-2013 arası yoğun bakım ünitesinden izole edilen tüm suşlar hedeflenmiş, ancak suş sayısının çokluğu ve projenin 100 suşa göre hazırlanmış olması nedeniyle epidemiyolojik verilerine en iyi ulaşabildiğimiz 2009-2010 yıllarına ait suşlar çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1. Bakterilerin İzolasyonu:

Hastanemizde balgam, idrar, yara, BOS ve kan örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşları değerlendirildi. Bu örneklerden balgam, idrar, bos örnekleri 10 mikrolitrelik standart öze ile yara örnekleri ise eküvyon çubuk ile %5 koyun kanlı agar ve Eosin Methylene Blue Agar (EMB) besiyerine ekildi. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Kan örnekleri ise Bact/Alert 3D 60 (biomerieux) cihazında kendi şişelerine 5 ml kan konularak, bir hafta içinde üreme olan şişelerden standart öze ile %5 koyun kanlı agar ve EMB besiyerine ekildi ve plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Tüm üreme olan plaklar koloni morfolojisine bakılarak saflaştırılmış ve iğne öze ile alınan koloniler üç şekerli demirli agar, sitrat agar, üre agar ve SİM (sulfide-indole-motility) besiyerlerine ekildi 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Nonfermanter olduğu saptanan suşlar Mueller-Hinton agar besiyerine ekildi. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının tanısı için Mueller-Hinton agar besiyerindeki pigmentasyonu kullanıldı ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının tanısı için ise Mueller-Hinton agar besiyerinden alınacak sürüntünün oksidaz testinin negatif olması ve hareket besiyerinde hareketsiz olma özelliği kullanıldı. Daha iyi identifikasyon için API 20NE (Biomerieux) kiti kullanıldı.

Kullanılan besi yerleri:

Eosin Methylene Blue Agar (EMB): Hazırlanışı: EMB agar (HİMEDİA) kullanıldı. 37,5 g'ı 1000 ml'lik distile su içerisinde çözüldü. 1 atmosfer basınç altında 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Uygun ısıda soğutularak petri kutularına 4 mm kalınlığında döküldü. Plaklar kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

%5 koyun kanlı agar: Hazır olarak alınan koyun kanlı agar (OR-BAK) kullanıldı.

Üç şekerli demirli agar (TSİ): TSİ agar (BBL) kullanıldı. 59,4 g'ı 1000 ml'lik distile su içerisinde çözüldü. 1 atmosfer basınç altında 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Tüplere yatık olarak döküldü ve soğutuldu. Plaklar kullanılıncaya kadar +4 °C' de buzdolabında saklandı.

Üre agar: Üre agar besiyeri (HİMEDİA) kullanıldı. 24 g'ı 950 ml'lik distile su içerisinde çözüldü. 1 atmosfer basınç altında 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Uygun ısıda soğutularak tüplere yatık olarak döküldü. Plaklar kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Sitrat agar: Sitrat agar besiyeri (BBL) kullanıldı. 24,2 g'ı 1000 ml'lik distile su içerisinde çözüldü. 1 atmosfer basınç altında 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Uygun ısıda soğutularak tüplere yatık olarak döküldü. Plaklar kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Sim besiyeri: Sim (MERCK) kullanıldı. 30 g'ı 1000 ml'lik distile su içerisinde çözüldü. 1 atmosfer basınç altında 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Uygun ısıda soğutularak tüplere dik olarak döküldü. Plaklar kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Mueler-Hinton agar besiyeri: Mueller-Hinton agar besiyeri (Oxoid) kullanıldı. 38 g'ı 1000 ml'lik distile su içerisinde çözüldü. 1 atmosfer basınç altında 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Uygun ısıda soğutularak 90 mm çaplı petri kutularına 4 mm

kalınlığında döküldü. Plaklar kullanılmaya kadar +4 °C’de buzdolabında saklandı. Bu hazırlanan besiyeri disk difüzyon duyarlılık testlerinde kullanıldı.

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri:

Antibiyotik duyarlılık testleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antimicrobial susceptibility testing standards M2-A9 and M7-A7 kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıp değerlendirildi. 18-20 saatlik taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri deneylerde kullanıldı. Bu kolonilerden elde edilen bakterilerden Mueller Hinton buyyonunda 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. En fazla 30 dakika içerisinde duyarlılıkları belirlenecek antibiyotik diskleri yerleştirildi. Amikasin 30 µg, Seftazidim 30 µg, Gentamisin 10 µg, İmipenem 10 µg, Sefepime 30 µg, Piperasillin/Tazobaktam 100/10 µg, Aztreonam 30 mcg, Meropenem 10 mcg diskleri yerleştirildi ve 35°C- 37°C’lik etüvde 18-20 saat inkübe edildi. Antibiyogramlar 18-20 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları CLSI standartlarına göre ölçülerek dirençlilik, orta derecede duyarlılık ve duyarlılık durumları kaydedildi.

3.3. *Pseudomonas aeruginosa*’nın PFGE İle Moleküler Tiplendirilmesi

3.3.1. İzolatların hazırlanması

Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış olan bakterilerden kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi. Buradaki tek koloniden tekrar triptikaz soy agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakıldı. 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 süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, 2500 x g’de, 4°C’de, 15 dakika (alternatif olarak 13.000 x g’de, 4°C’de, 2 dakika) santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı. Peletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu,

spektrofotometre (Beckman Coulter DU 730) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agaroz gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletildi (133, 134)

3.3.2. İzolatların agaroz gömülmesi

HST içerisinde % 2'lik düşük erime ısılı agaroz (Bio-Rad Laboratories) hazırlandı. 0.50 g agaroz, 100 ml'lik balona kondu. Üzerine 9 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırında tutuldu. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna kondu. % 10'luk sodyum dodezil sülfattan (SDS) (50°C'de ısıtılmış) 1 ml eklenerek iyice karıştırıldı. Agaroz-SDS karışımından 200 µl ependorf tüplere dağıtıldı ve 45-50°C'deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bekletildi. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtuldu. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime ısılı agaroz- SDS bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı. Bekletilmeden, hücre-agaroz-SDS karışımından -hava kabarcığı olmayacak şekilde- agaroz kalıbına 100 µl dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletildi. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlanmaktadır (133, 134).

3.3.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

Beş ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre liziz solüsyon I (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konuldu. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak liziz solüsyonuna yerleştirildi. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi (Not: Tüp su banyosuna hafif yatık pozisyonda yerleştirilir). Liziz solüsyon I dökülerek, yerine 0,5 ml hücre liziz solüsyon II (0,5 M EDTA, % 1 sarkozil, 400 µg/ml proteinaz K) konuldu. 55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi (134).

3.3.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildi. Dikkatlice lizis solüsyonu II aspire edildi. 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 bekletildi (su ile yıkama işlemi). Su tamamen aspire edildi. Belirtilen su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Su tamamen aspire edildi. 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 yıkandı (Not: Yıkama sonrası agaroz kalıplar şeffaflaşır). Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu (133, 134).

3.3.5. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın RE ile Kesilmesi

P. aeruginosa için etkinliği daha önce araştırılmış olan XbaI 20 Ü/µl (MBI Fermantas Hanover MD) enzimi kullanılmıştır (135).

3.3.6. *P. Aeruginosa* DNA'sını İçeren Kalıpların XbaI RE ile kesimi

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla 1/4 oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1xXbal tamponu içine konarak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletildi (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklanır). Sonra sıvı aspire edildi. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı:

10 µl 10x Xbal tamponu

3 µl Xbal enzimi (20 U/µl) (MBI Fermantas Hanover MD)

1 µl BSA (10 µg/µl)

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

Toplam hacim 100 µl.

Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 2 saat inkübe edildi (136). İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi. Kalıplar elektroforez için hazırdır.

3.3.7. Elektroforez Jelinin Hazırlanması 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 (Agarose III Amresco) hazırlandı. 1 gr “pulsed-field certified agarose” 200 ml’lik balona konuldu. Üzerine 100 ml 0,5 x TBE eklenip, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulup, çıkarılarak hafifçe karıştırılıp, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45–50 °C’lik su banyosuna konuldu. Agaroz dökülecek kaset hazırlanıp, sızdırmaması için etrafı bantlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol süşuna ait kalıplar yüklendi. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA’nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı. 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 yerleştirildi (133).

3.3.8. Elektroforez

Her bakteri için elektroforez koşulları farklıdır. *P. aeruginosa* için CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları: Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 25 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 11 °C, süre 30 saattir (TBE tamponu pH=8,0) (135).

3.3.9. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alındı. Yirmi dakika boyandı. UV ışığa altında görüntüledi. Gel logic 2200 imaging system (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi. GelCompar II yazılım sistemi (version 3,0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin, dendogramı oluşturulup ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %1– 1.5 olarak alındı (125, 137). Tenover ve arkadaşları (119) tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi.

- **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.

3.4. *Acinetobacter baumannii*'nin PFGE İle Moleküler Tiplendirilmesi

3.4.1. İzolatların hazırlanması

Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış olan bakterilerden kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi. Buradaki tek koloniden tekrar triptikaz soy agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak

şekilde, pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakıldı. 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 edildi. Bakteri süspansiyonu, spektrofotometre (Beckman Coulter DU 730) yardımıyla 590 nm’de yaklaşık McFarland 1 bulanıklığı olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan bu süspansiyondan her bir ependorf tüpüne 100µl konur ve üzerine proteinaz K (20 mg/ml) 5µl eklendi.

3.4.2. İzolatların agaroz gömülmesi

HST içerisinde % 1’lik seakem gold agaroz (Combrex Bio Science Rockland Inc) hazırlanıp 0.05 g agaroz, 100 ml’lik balona konuldu. Üzerine 5 ml HST eklenip, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulup, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırında tutuldu. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C’lik su banyosuna konup % 1’lik sodyum dodezil sülfattan (50°C’de ısıtılmış) her bir ependorf için 100µl eklendi. Agaroz-SDS karışımından 200 µl ependorf tüplere dağıtılıp ve 45-50°C’deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bekletildi. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtuldu. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonu+proteinaz K karışımından 100 µl alınarak, 50°C’de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime ısılu agaroz- SDS bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı. Bekletilmeden, hücre-agaroz-SDS karışımından -hava kabarcığı olmayacak şekilde- agaroz kalıbına 100 µl dağıtılıp kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C’de, 10 dakika bekletildi. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlanmaktadır.

3.4.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

Beş ml’lik steril kapaklı tüplere, 1 ml hücre liziz solüsyonu (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA, % 1 sarkozil, 20 mg/ml proteinaz K) konuldu. İçerisinde

bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirilip 55°C’de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi (139).

3.4.4. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildi. Dikkatlice lizis solüsyonu aspire edildi. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 55°C’ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4 ml eklenerek, 55°C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi (su ile yıkama işlemi). Su tamamen aspire edildi. Belirtilen su ile yıkama işlemi bir defa daha tekrarlandı. Su tamamen aspire edildi. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 55°C’de 15 dakika olmak üzere), 4 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) tamponuyla yıkandı (Not: Yıkama sonrası agaroz kalıplar şeffaflaşır). Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

3.4.5. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA’nın RE ile Kesilmesi

A.baumannii için etkinliği daha önce araştırılmış olan ApaI 10 Ü/µl (MBI Fermantas Hanover MD) enzimi kullanılmıştır (136, 138).

3.4.6. *A.baumannii* DNA’sını İçeren Kalıpların ApaI RE ile kesimi

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla 1/4 oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1xApal tamponu içine konarak çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 10 dakika bekletildi (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklanır). Sonra sıvı aspire edildi. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı:

10 µl 10x Apal tamponu

3 µl Apal enzimi (10 U/µl) (MBI Fermantas Hanover MD)

1 µl BSA (10 µg/µl)

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

Toplam hacim 100 µl.

Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 2 saat inkübe edildi (136). İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi. Kalıplar elektroforez için hazırıldı.

3.4.7. Elektroforez Jelinin Hazırlanması 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 skeam gold agaroz (Combrex Bio Science Rockland Inc) hazırlandı (139). 1 gr agaroz 200 ml’lik balona konuldu. Üzerine 100 ml 0,5 x TBE eklenip, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulup, çıkarılarak hafifçe karıştırılarak, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45–50 °C’lik su banyosuna konuldu. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, sızdırmaması için etrafı bantlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol süşuna ait kalıplar yüklendi. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA’nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı. İstenirse çukurlar %1’lik agarozla doldurulabilir. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılıp, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0,5 x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

3.4.8. Elektroforez

Her bakteri için elektroforez koşulları farklıdır. *A.baumannii* için CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları: Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 20 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14 °C, süre 19 saattir (TBE tamponu pH=8,0) (139).

3.4.9. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınıp 20 dakika boyandı. UV ışığa altında görüntüledi. Gel logic 2200 imaging system (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi. GelCompar II yazılım sistemi (version 3,0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin, dendogramı oluşturulup ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %1– 1.5 olarak alındı (125, 137). Tenover ve arkadaşları (119) tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi.

- **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.

3.5. İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel değerlendirme, Statistical Package for Social Scienses (SPSS) 15 (Inc., Chicago, Illinois, USA) istatistiksel analiz yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Tek örneklem Kolmogorov-Smirnov Testi ile incelendi. Niteliksel değişkenlerin karşılaştırmasında Ki-kare ve Fisher testi kullanıldı. Analiz sonuçları; niteliksel değişkenler için yüzde ve frekans olarak, sürekli değişkenler için ortalama \pm standart sapma (Ort \pm SS) olarak ifade edildi. Tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi.

3.6. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 10.05.2012 tarih ve 2012/05 sayılı etik kurul onayı almıştır.

4. BULGULAR

4.1. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

İncelemeye alınan 81 nonfermenter bakterinin 33 (%40,7) adeti *P. aeruginosa* ve 48 (%59,3) adeti *A. baumannii* idi. Bu bakterilerin 15 (%19,5) idrar, 15 (%19,5) yara, 13 (%16) kan, 29 (%35,8) balgam, 5 (%6,1) BOS ve 4 (%4,9)'ü diğer örneklerden izole edildi. *P. aeruginosa* örneklerden en çok idrardan 11 (%33,3) izole edilirken, *A. baumannii* ise en çok balgamdan 22 (%45,8) izole edildi (Tablo-5).

Tablo 5: Örnek türü ve izole edildiği bakteriler (p=0.003 Ki-kare testi)

Örnek Türü	<i>P. aeruginosa</i> n(%)	<i>A. baumannii</i> n(%)
Balgam	7 (%21,2)	22 (%45,8)
İdrar	11 (%33,3)	4 (%8,3)
Yara	9 (%27,3)	6 (%12,5)
Kan	3 (%9,1)	10 (%21)
BOS	–	5 (%10,4)
Diğer	3 (%9,1)	1 (%2)

Çalışmaya dahil edilen 81 adet bakterinin izole edildiği hastaların 39 (%48.1)'u erkek, 42 (%51.9)'ü kadındı (Tablo-6).

Tablo 6: İzole edilen bakterilerin kadın erkek dağılımı (p=0.299 Ki-kare testi)

Cinsiyet	<i>P. aeruginosa</i> n(%)	<i>A. baumannii</i> n(%)
Erkek	18 (%54,5)	21 (%43,7)
Kadın	15 (%45,5)	27 (%56,3)

P. Aeruginosa 33 (%40,7) ve *A. baumannii* 48 (%59,3) suşlarının yıllara göre dağılımı aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 7: *P. Aeruginosa* ve *A. Baumannii* enfeksiyonlarının 2009-2010 dağılımı (p=0.006 Ki-kare testi)

Bakteri	2009 n(%)	2010 n(%)	Total n(%)
<i>P. Aeruginosa</i>	13(%39,4)	20(%60,6)	33(%40,7)
<i>A. Baumannii</i>	31(%64,5)	17(%35,5)	48(%59,3)

P. aeruginosa'nın % 30,3'ü imipenem, % 39,4'ü aztreonama, % 30,3'ü amikasin, % 36,4'ü seftazidim, % 33,3'ü meropenem, % 30,3'ü sefepim, % 27,3'ü gentamisin, % 30,3'ü piperasilin-tazobaktama dirençli bulunmuştur (Tablo 8). *P. aeruginosa* izolatlarının %40'i çoklu antibiyotik direncine sahipti (Üç ve daha fazla antibiyotiğe direnç). Suşların %60'ı tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. En duyarlı oldukları antibiyotik ise %70 duyarlılık oranıyla gentamisin, piperasilin/tazobaktam ve amikasin olarak saptandı.

İzole edilen 48 adet *A. baumannii* suşlarının %93,8'i piperasilin-tazobaktama, %77,1'i amikasine, %47,9'u gentamisine, %83,3'ü sefepime, %72,9'u imipeneme, %72,9'u meropeneme, %87,5'i seftazidime, %91,7'i aztreonama dirençli bulunmuştur (Tablo 8). Bunların %91,6 (44 suş) çoklu antibiyotik direncine sahipti (Üç ya da daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli). Suşların 21'i (%43) tüm antibiyotiklere dirençli bulundu. İkisi az duyarlı olmak üzere 13 suş (%27) sadece gentamisine duyarlıydı. En sık direnç ise piperasilin-tazobaktama görüldü (%91,8). Biri piperasilin-tazobaktama az duyarlı olmak üzere 4 suş (%8) tüm antibiyotiklere duyarlıydı. Altı aylık süre içerisinde toplam 48 *A. baumannii* suşu izole edilmiştir. Bunların 22'si (%46) balgam örneği idi. Solunum enfeksiyonlarının (balgam örnekleri) hepsinin mekanik ventilasyona bağlı olarak geliştiği saptanmıştır. En dirençli *A. baumannii* suşları kan ve BOS kültürlerinden izole edildi. Kan izolatlarını biri CN' e duyarlı 9'u (%90) tüm ilaçlara dirençli bulundu. İkinci sırada yüksek direnç oranları balgam izolatlarında saptandı. Bunların 4' ü (%18) tüm ilaçlara

dirençliydi biri az duyarlı olmak üzere 7'si (%39) sadece CN' e duyarlı bulundu. Antibiyotik dirençleri tablo 8' de yer almaktadır

Tablo 8: Bakteri türüne göre antibiyotik dirençleri (Ki-kare testi)

Antiyotik	<i>P. aeruginosa</i>			<i>A. Baumannii</i>			P
	S n(%)	I n(%)	R n(%)	S n(%)	I n(%)	R n(%)	
TPZ	23(69,7)	–	10(30,3)	2(4,1)	1(2,1)	45(93,8)	□0.001
AK	23(69,7)	–	10(30,3)	9(18,4)	2(4,1)	37(77,1)	□0.001
CN	23(69,7)	1(3)	9(27,3)	22(44,9)	3(6,3)	23(47,9)	=0.081
FEP	18(54,5)	5(15,2)	10(30,3)	7(14,6)	1(2,1)	40(83,3)	□0.001
IMP	22(66,7)	1(3)	10(30,3)	13(27,1)	–	35(72,9)	=0.001
MEM	22(66,7)	–	11(33,3)	13(27,1)	–	35(72,9)	=0.001
CAZ	20(60,6)	1(3)	12(36,4)	5(10,4)	1(2,1)	42(87,5)	□0.001
AZT	20(60,6)	–	13(39,4)	4(8,3)	–	44(91,7)	□0.001

IMP: İmipenem, AK: Amikasin, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim, CN: Gentamisin, TPZ: Piperasilin-Tazobaktam, MEM: Meropenem, AZT: Aztreonam.

İzole edilen suşların, numunelere, örnek alınma zamanlarına ve antibiyotik dirençlerine göre dağılımı tablo 9'da yer almaktadır.

Tablo 9: Tüm suşların özellikleri

Bakteri	Suş No	Numune	Yıl	TPZ	CAZ	FEP	AZT	İMP	MEM	AK	CN
<i>P. aeruginosa</i>	7	Yara	2010-Şubat	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
	3	İdrar	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
	9	Kan	2010-Şubat	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
	2	İdrar	2009-Kasım	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU
	18	Balgam	2010-Şubat	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
	13	Diğer	2009-Kasım	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU
	14	İdrar	2009-Kasım	O-DU	Dİ	DU	Dİ	DU	Dİ	DU	DU
	15	İdrar	2009-Aralık	O-DU	Dİ	DU	Dİ	O-DU	DU	Dİ	Dİ
	17	İdrar	2010-Ocak	Dİ	O-DU	O-DU	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ

	20	Balgam	2010-Mart	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	O-DU	
	60	Balgam	2010-Haziran	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	61	Balgam	2010-Nisan	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	62	İdrar	2010-Mart	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	63	İdrar	2010-Ocak	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	65	Yara	2010-Ocak	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	66	Yara	2010-Şubat	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	67	İdrar	2010-Şubat	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	68	İdrar	2010-Nisan	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	69	Yara	2010-Nisan	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	70	Yara	2010-Mayıs	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	71	Yara	2010-Nisan	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
	72	Yara	2010-Mart	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	73	Balgam	2009-Kasım	O-DU	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU	Dİ	Dİ	
	75	Diğer	2009-Kasım	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	77	Yara	2009-Kasım	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	80	Balgam	2010-Mart	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
	81	İdrar	2010-Şubat	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	82	Yara	2009-Kasım	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	83	Kan	2009-Ekim	O-DU	DU	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	84	Balgam	2009-Kasım	O-DU	DU	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	85	Kan	2009-Aralık	O-DU	DU	O-DU	DU	DU	DU	DU	1DU	
	87	İdrar	2009-Ekim	O-DU	DU	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	88	Diğer	2010-Mart	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
	<i>A.baumannii</i>	26	Balgam	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	O-DU	DU
		40	BOS	2010-Şubat	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU
		43	Balgam	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
		50	Yara	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU
51		Yara	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
91		Balgam	2009-Kasım	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	
55		BOS	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
57		Yara	2010-Ocak	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU	Dİ	Dİ	
92		Balgam	2009-Kasım	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU	Dİ	Dİ	
41		Kan	2010-Şubat	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	
45		Kan	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
48		Kan	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
49		BOS	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
90		Balgam	2010-Ocak	Dİ	DU	DU	Dİ	DU	DU	DU	O-DU	
52		Kan	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
53		BOS	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	
54		Balgam	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	
23		İdrar	2010-Mart	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	O-DU	
42		Balgam	2010-Şubat	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	
44		Kan	2010-Ocak	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	

46	Balgam	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU
21	Balgam	2010-Mart	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU
22	Balgam	2010-Mart	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
24	Balgam	2010-Mart	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU
25	Balgam	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
47	BOS	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU
27	Kan	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
28	Yara	2010-Ocak	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
29	Kan	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
30	Balgam	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	O-DU	DU
31	Balgam	2009-Kasım	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU
32	Kan	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
33	Balgam	2009-Kasım	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU
34	Balgam	2009-Kasım	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU
35	Diğer	2010-Şubat	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU
36	Balgam	2009-Kasım	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	O-DU
38	Kan	2010-Ocak	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
39	Yara	2010-Mart	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU
89	Balgam	2009-Kasım	O-DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU
93	İdrar	2009-Kasım	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
37	Kan	2010-Ocak	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ
94	İdrar	2009-Kasım	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU	DU
96	Balgam	2010-Ocak	Dİ	Dİ	O-DU	Dİ	DU	DU	Dİ	Dİ
97	Balgam	2009-Aralık	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU	O-DU	DU
98	Balgam	2010-Ocak	Dİ	O-DU	DU	Dİ	DU	DU	Dİ	O-DU
99	Balgam	2009-Ekim	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU	Dİ	Dİ
100	Yara	2009-Ekim	Dİ	Dİ	Dİ	Dİ	DU	DU	DU	DU
101	İdrar	2009-Kasım	Dİ	O-DU	DU	Dİ	DU	DU	Dİ	DU

4.2. Moleküler Tiplendirme Sonuçları

PFGE yöntemiyle 33 adet *P. aeruginosa* ve 48 adet *A. baumannii* suşu tiplendirmeye alındı. Toplam 81 adet bakteri PFGE ile tiplendirildi. PFGE ile tiplendirilen 33 adet *P. aeruginosa* ve 48 adet *A. baumannii* izolatının dendogramı (Şekil 3 - 4) verildi.

PFGE yöntemiyle tiplendirilen 33 adet *P. aeruginosa* suşundan 18 (%54,5) genotip saptandı. Bu genotiplerden 5 adeti küme oluşturan suşları içermektedir. Her kümedeki suş sayısı 2-8 arasında değişmektedir. Toplam 17 (%51,5) suş küme oluşturmaktadır. Bu suşlardan 4 adeti yakın ilişkili olarak değerlendirildi. Üç veya

daha az bant farkı oluşturma kriteri dikkate alındığında suşların 21 (%63,6)'i klonal yönden ilişkili bulundu. İzolatların 12 adeti (%36,3) özgü PFGE profili gösterdi.

PFGE yöntemiyle tiplendirilen 48 adet *A. baumannii* suşundan ise 13 (%27,08) genotip saptandı. Genotiplerden 8 adeti küme oluşturan suşları içermektedir. Herbir kümedeki suş sayısı 2 ile 12 arasında değişmektedir. Toplam 41 (%85,4) suş küme oluşturmaktadır. Bu suşlardan 2 adeti yakın ilişkili olarak değerlendirildi. Üç ya da daha az bant farkı oluşturma kriteri dikkate alındığında suşların 43 (%89,5)'ü klonal yönden ilişkili olarak değerlendirildi. İzolatların 5 adeti (%10,4) özgü PFGE profili gösterdi.

4.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın PFGE profilleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları

Birinci Küme: (Genotip I). Aralarında PFGE' e göre bant farkı olmayan iki suşdan (18, 62 nolu suşlar) oluşmaktaydı (Şekil 3). Bir ay ara ile iki farklı hastadan izole edilen bu suşlardan biri (62 nolu suş) tüm antibiyotiklere duyarlıyken, diğeri (18 nolu suş) tüm antibiyotiklere dirençli bulundu.

İkinci Küme: Aynı PFGE gen dizilimine sahip iki suşu (82, 85 nolu suşlar) ve onlara %97 benzerlik gösteren 63, 65, 66, 67, 68, 81, 82, 85 nolu suşları içeren genotip 3 den oluşuyordu. Suşların tamamı test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu.

Üçüncü küme: Aynı hastadan izole edilen 3 suştan oluşmaktadır. Genotip X ve Xa' yı içerir. Genotip X, 70 ve 80 nolu suşları kapsamaktaydı (Şekil 3). Bunlar genetik olarak %96,6 benzerken antibiyotiklere dirençleri tamamen farklıydı. Yetmiş nolu suş tüm antibiyotiklere duyarlı 80 nolu suş tümüne dirençli bulundu. Genotip Xa (72 nolu suş) bunlarla %94,6 oranında genetik benzerliğe sahipti ve tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu.

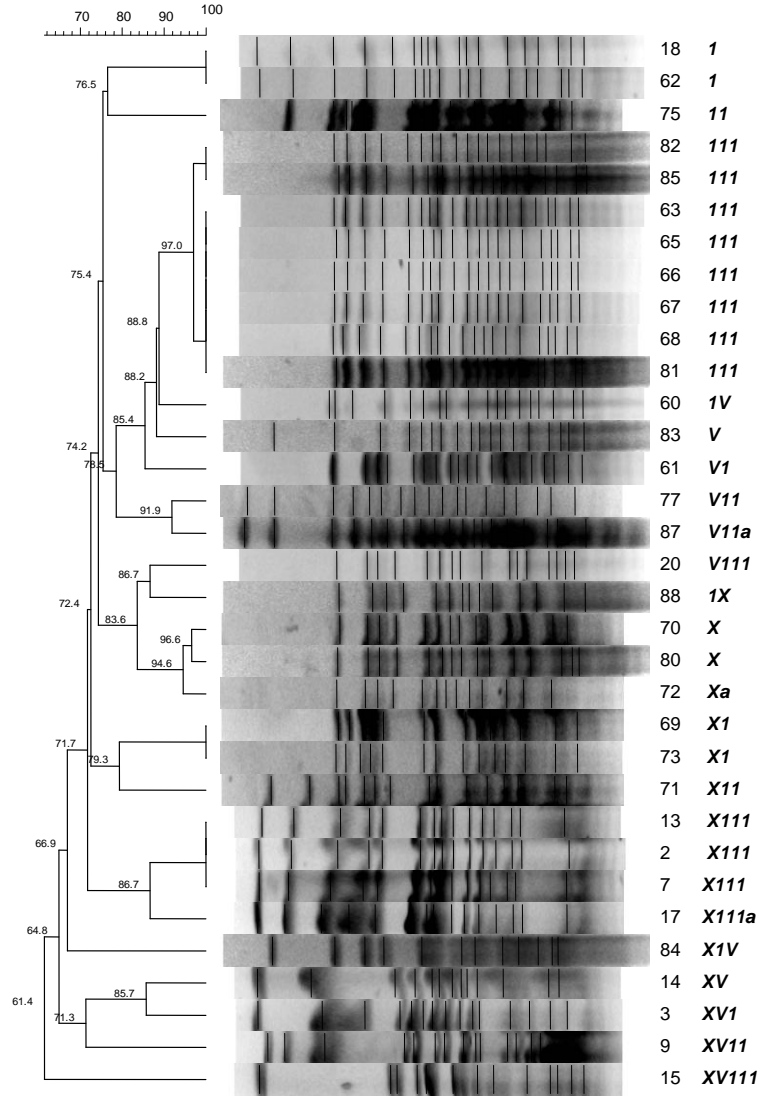
Dördüncü küme: (Genotip XI). PFGE profilleri aynı farklı antibiyotik profillerine sahip iki suştan oluşmaktadır (69, 73 nolu suşlar). Altmışdokuz nolu suş tüm antibiyotiklere duyarlıydı. 73 nolu suşun sadece İMP ve MEM' e duyarlı FEP' e ise az duyarlı olduğu gözlemlendi. Bunlar 6 ay ara (Kasım-Nisan) ile farklı hastalardan izole edilmiştir.

Beşinci küme: (Genotip XIII). İki aynı (2 ve 7 nolu şuşlar) biri farklı (13 nolu şuş) hastadan izole edilen aynı PFGE profiline sahip üç şuş içermektedir. 7 nolu şuş tüm antibiyotiklere dirençli bulundu. 2 nolu şuş CN'e, 13 nolu şuş ise hem CN'e ve hem de AK.'e duyarlıydı.

Küme içerisinde en fazla şuş sayısı (8 şuş) ikinci kümedeydi. İkinci kümede altı ay gibi en uzun süre bu klonun varlığı tespit edildi. Üçüncü kümede ise bir hafta ile en kısa süre klonun varlığı tespit edildi (Şekil 3).

pseudomonas

pseudomonas



Şekil 3: Tiplendirmesi yapılan 33 *P. aeruginosa* suşunun PFGE profillerinin dendogramı. Dendogramda %100 aynı profili gösteren suşlar (ör: 18 ile 62, 82 ile 85) ortak küme içerisinde gösterilmiştir.

4.2.2. *Acinetobacter baumannii*'nin PFGE profilleri ve ve antibiyotiklere duyarlılıkları

Birinci Küme: (Genotip I) Aynı PFGE genotipine sahip iki suştan oluşuyordu (93,55 nolu suşlar) (Şekil 4). Biri Kasım-2009' da idrar enfeksiyonununundan diğeri Aralık-2009' da başka hastanın BOS'undan izole edilmiştir. Her ikisi de tüm antibiyotiklere dirençli bulunmuştur.

İkinci Küme: (Genotip III) PFGE genotipleri aynı iki suştan oluşmaktadır (51, 96 nolu suşlar). Tüm antibiyotiklere dirençli olan 51 nolu suş Aralık-2009' da yaradan izole edilmiş. Diğeri FEP' e az duyarlı MEM, İMP' ye duyarlı bulunmuştur. Ocak-2010' da başka bir hastanın balgamından izole edilmiştir. Bu küme ile % 95,2 oranında benzer olan bir suş IIIa olarak değerlendirildi. Bu suş sadece CN' e duyarlıydı.

Üçüncü Küme: (Genotip IV) PFGE bantları aynı iki izolatu içerir. Bu suşlardan ilki (100 nolu suş). Ekim-2009' da yaradan izole edilmiş, İMP, MEM, AK ve CN'e duyarlı bulunmuştur. İkincisi (91 nolu suş) bundan bir ay sonra başka bir hastanın balgamında saptanmış ve tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur.

Dördüncü Küme:(Genotip V) Birbiri ile aynı PFGE bandına sahip 6 (21, 24, 30, 42, 98, 48 nolu suşlar) suş ve bunlara %97,7 oranında benzeyen 35 nolu suştan oluşmaktadır (Şekil 4). 48 nolu suş tüm antibiyotiklere dirençliydi. Yirmibir, 24 ve 42 nolu suşlar aynı antibiyotik direnç profiline sahipti ve sadece gentamisine duyarlıydı. 30 nolu suşun AK az duyarlı, CN' e duyarlı olduğu gözlemlendi. Otuzbeş nolu suş gentamisin ve amikasin duyarlıydı. Doksan sekiz nolu suş ise FEP, İMP ve MEM' e duyarlı CAZ' a az duyarlı bulundu. Yirmibir ve 42 nolu suşlar ayrı hastadan, 48 ve 35 nolu suşlar aynı hastadan, olmak üzere 5 farklı hastadan Aralık 2009-Mart 2010 arasında izole edildiler.

Beşinci Küme: (Genotip VIII) (41, 54, 31, 32, 36, 46 nolu suşlar) beşi Kasım ve Aralık 2009' da, biri Şubat 2010'da izole edilmiştir (41 nolu suş). Dört suş (46, 31, 36, 32 nolu suşlar) aynı yılda farklı hastalardan alınan üç balgam, bir kan kültüründen izole edildi ve aynı genotipe sahipti

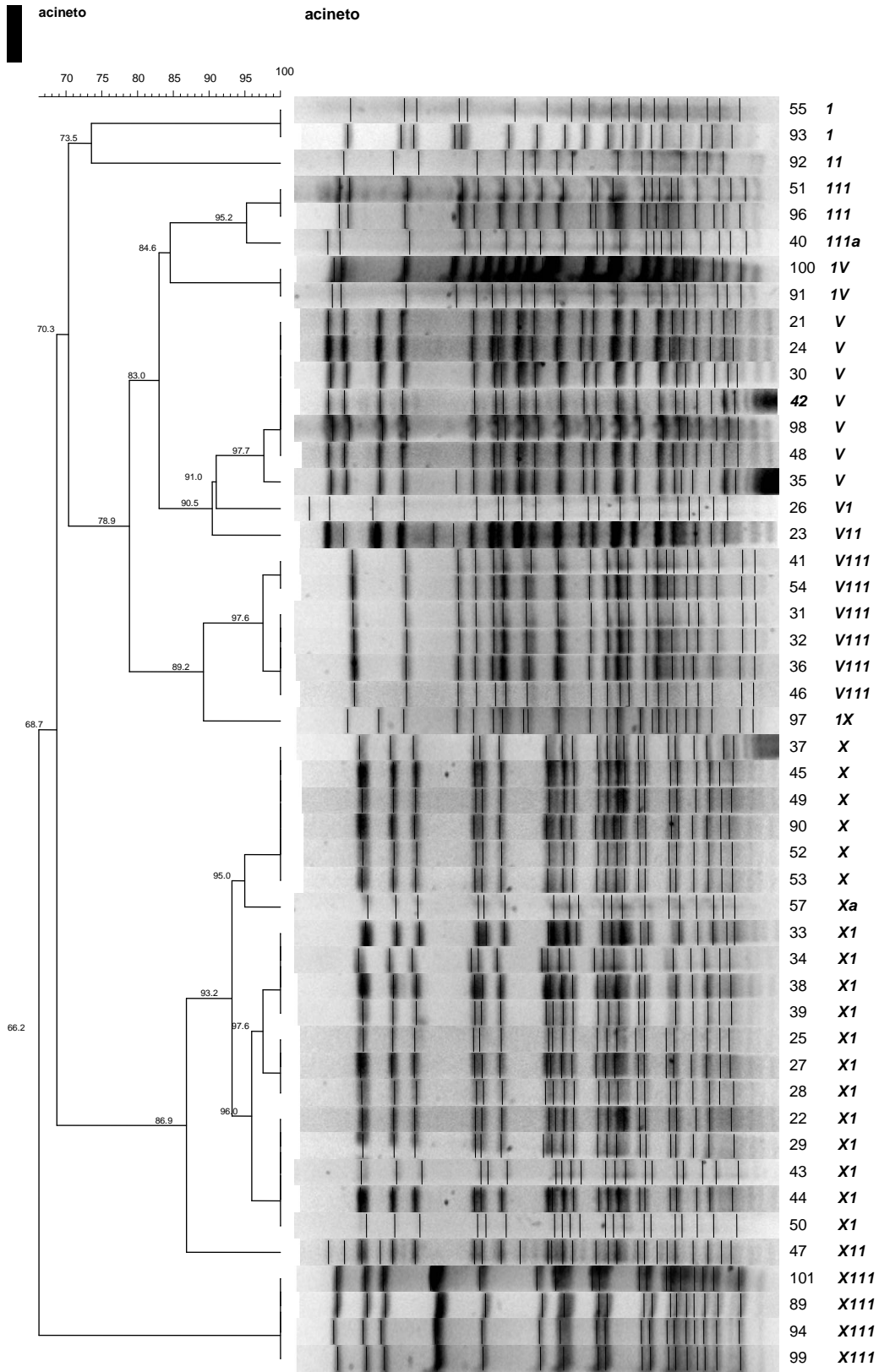
Altıncı Küme: (Genotip X) PFGE bantları aynı olan, altı suşu içeriyordu (suş numaraları: 37, 45, 49, 90, 52, 53). Doksan nolu suş TZP, AZT' ye dirençli diğerlerine duyarlı iken diğerleri tümüne dirençli bulundu.

Yedinci Küme: (Genotip XI) Birbiri ile % 97,6 ve % 96 PFGE gen benzerliğine sahip 3 gruptan oluşmaktadır (Şekil 4). Birincisi birbiri ile aynı olan 33, 34, 38, 39 nolu suşları içerir. Bunlar farklı hastaların balgam, kan ve yara kültürlerinde üremiştir. Yaradan izole edilen 39 nolu suş tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. Otuzüç ve 34 nolu suşlar sadece aminoglikozitlere (AK ve CN) duyarlıydılar. Otuzsekiz nolu suş tüm antibiyotiklere dirençliydi ve kandan izole edildi. İkinci grup birbiri ile aynı, birinci gruptaki suşlarla % 97,6 benzer genotipe sahip, tüm antibiyotiklere dirençli 25, 27, 28 nolu suşlardan oluşmaktadır. 25 ve 28 nolu suşlar aynı hastanın balgam ve yarasında sırasıyla Aralık-2009 ve Ocak-2010' da izole edildi. Diğeri Aralık 2009' da farklı bir hastanın kanından izole edildi. Üçüncü grup (22, 29, 43, 44 ve 50 nolu suşlar) birbiri ile aynı diğerleri ile % 96 benzer genotipe sahipti. Elli nolu suş sadece gentamisine duyarlı diğerleri tüm antibiyotiklere dirençli bulundu.

Sekizinci küme: (Genotip XIII) Genotip olarak birbirinin aynı antibiyotik direnç profili açısından farklı bulunan 4 suşu (101, 89, 94, 99 nolu suşlar) içeriyordu (Şekil 4). Farklı hastaların idrar ve balgamından izole edilmişlerdi. Doksandokuz ve 100 nolu suşlar aynı atadan köken alan farklı direnç profiline sahip suşlar olabilir. 100 nolu suş sadece TZP, AK ve AZT' ye dirençli 99 nolu suş ise sadece İMP ve MEM' e duyarlı bulundu. İki suş (89, 94 nolu suşlar) biri TPZ' ye az duyarlı olmak üzere tüm antibiyotiklere duyarlıydı.

48 adet *A. baumannii* suşu izole edilmiştir. Bunların 22 si (%45,8) balgam örneğiydi. Solunum yolu enfeksiyonlarının (balgam örnekleri) hepsinin mekanik ventilasyona bağlı olarak geliştiği saptanmıştır. En dirençli *A. baumannii* suşları kan ve BOS kültürlerinden izole edildi. Kan izolatlarının biri CN' e duyarlı 9'u (%90) tüm ilaçlara dirençli bulundu. İkinci sırada yüksek direnç oranları balgam izolatlarında saptandı. Bunların 4' ü (%18) tüm ilaçlara dirençliydi. Biri az duyarlı olmak üzere 7'si (%39) sadece CN' e duyarlı bulundu.

48 adet *A. baumannii* izolatları PFGE ile 13 genotip oluşturdu. Kırkbir suşu içeren 8 küme oluştu ve 5 tane (%10,4) özgül suş saptandı. Üç ya da daha aşağı bant farkı oluşturma kriteri göz önüne alındığında 48 suşun 43'ü (%89,5) klonal açıdan ilişkili olarak değerlendirildi. Küme içerisinde en fazla suş sayısı (12 suş) yedinci kümedeydi. Yedinci kümede beş ay gibi en uzun süre klonun varlığı tespit edildi. Bir ve üçüncü kümede bir ay ile en kısa süre klonun varlığı tespit edildi.



Şekil 4: Tiplendirmesi yapılan 48 *A. baumannii* suşunun PFGE profillerinin dendogramı. Dendogramda %100 aynı profili gösteren suşlar (örneğin: 55 ile 93 nolu

suşlar genotip I, 51 ile 96 nolu suşlar genotip II içerisinde yer almıştır) ortak küme içerisinde gösterilmiştir

5. TARTIŞMA

Her geçen gün hastane kökenli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi güçleşmekte hatta bazen imkansız hale gelmektedir. Hastanelere kolonize olan bakteriler genellikle antibiyotiklere karşı toplumda kolonize olmuşlardan çok daha dirençli suşları içerir. Bunun nedeni kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç geliştirmesidir. Bu durum karşısında tıbbın yeni ilaçlar araması bulunan ilaçlara karşı yeni dirençlerin gelişimi ve son zamanlarda artan oranlarda gözlenen antimikrobiyal ilaçların hastanelerde bol miktarda kullanılıyor olmasıdır. Direnç oranları ve dirençten sorumlu olabilecek olası enzimler her ülke ve merkeze göre değişiklikler göstermekle birlikte her merkez için değişmeyen bir gerçek, bakterilerin direnç oranlarının gün geçtikçe artmakta olduğudur

P. aeruginosa, sınırlı sayıda antibiyotiğe hassasiyet gösteren, artan antibiyotik direnci ile önemli bir sorun haline gelmiştir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde hastane enfeksiyonlarına neden olmasından dolayı enfeksiyon hastalıkları alanında önemli bir yere sahip olan virulan bir mikroorganizmadır (140-142). Yüzeysel bir deri enfeksiyonundan fulminan sepsise kadar değişen çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir (143).

P. aeruginosa kökenleri Aydın ve ark. tarafından yapılan çalışmada; en sık idrardan (%33,8), ikinci sıklıkta püydenden (%23,8) ve üçüncü sıklıkta yanık örneklerinden (%20,6) tespit edilmiştir (144). Turgut ve ark'nın yapmış oldukları çalışmada, *P. aeruginosa* kökenleri %39,5 ile en sık idrardan ve %37,2 ile ikinci sıklıkta trakeal aspirattan, %20,6 ile üçüncü sıklıkta ise yara örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir (145). Akçay ve ark. ise çalışmalarında, *P. aeruginosa* kökenlerini %45 ile en sık trakeal aspirat örneklerinden, ikinci sıklıkta %23 ile idrar örneklerinden, üçüncü sıklıkta %21 ile yara örneklerinden elde etmişlerdir (146). Yaptığımız çalışmada; hastane enfeksiyonu etkeni olan *P. aeruginosa* suşları, en sık idrar örneklerinden (%33,3) izole edilmiştir. İkinci sıklıkta yara örnekleri (%27,3) ve üçüncü ise balgam örnekleri (%21,2) gelmektedir.

P. aeruginosa suşlarının servislere göre dağılımının incelendiği Bayramoğlu'nun çalışmasında; *P. aeruginosa* kökenleri en sık pediatri servisinden (%32,4), ikinci sıklıkta YBÜ'den (%9,9), üçüncü sıklıkta ise genel cerrahi

servisinden (%7) elde edilmiştir (147). Gündüz ve ark. ise, *P. aeruginosa* kökenlerini en sık YBÜ'den (%43.3), ikinci sıklıkta kulak burun boğaz servisinden (%18), üçüncü sıklıkta cerrahi servisinden (%8.6) saptadıklarını bildirmişlerdir (148). Yukarıda görüldüğü gibi *P. aeruginosa* en sık yoğun bakımlarda görülmekte ve ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle bizim çalışmamızda da 2009-2010 tarihleri arasında YBÜ'de meydana gelen *P. aeruginosa* enfeksiyonları değerlendirilmeye alınmıştır.

Palabıykoğlu ve arkadaşları tarafından 1996 yılında İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarında yapılan çalışmada; 110 *P. aeruginosa* suşunun 9 antibiyotiğe (gentamisin, amikasin, ofloksasin, siprofloksasin, sefotaksim, seftazidim, sefoperazon, piperasilin, imipenem) karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. En az etkili antibiyotiğin hastane kaynaklı suşlarda %5,5, hastane dışı suşlarda %29,1 duyarlılık oranları ile sefotaksim, en etkili antibiyotiğin ise sırasıyla %89,1 ve %98 duyarlılık oranları ile imipenem olduğu saptanmıştır (149). Özgenç ve arkadaşlarının SSK İzmir Eğitim Hastanesinde 1996 yılındaki çalışmasında *P. aeruginosa*'nın çeşitli antimikrobiklere karşı dirençlilik durumu; Amoksisilin-klavulanik asit %100, seftazidim %23, sefotaksim %81, aztreonam %44, imipenem %18, meropenem %17, gentamisin %64, netilmisin %42, amikasin %27, tobramisin %57, siprofloksasin %40, ofloksasin %55 ve norfloksasin %30 olarak saptanmıştır (150). Çalışmamızda ise seftazidim %36,4, imipenem %30,3, meropenem %33,3, aztreonam %39,4 olarak ortaya çıkmıştır. Yine bu çalışmada da ortaya çıkan karbapenemlere olan direncin yükseldiğini göstermektedir. Bunun nedeni karbapenemlere direncin yanlış antibiyotik kullanımına bağlı olarak artmış olması olabilir.

Akçay ve arkadaşları tarafından Haydarpaşa Numune Hastanesi'nde Mayıs 1998-Mayıs 1999 tarihleri arasında yapılan çalışmada; 100 tane *P. aeruginosa* suşunun %67'si imipeneme, %60'ı meropeneme duyarlı olarak bulunmuştur (151). Köroğlu ve arkadaşları tarafından İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nde *P. aeruginosa* üzerinde yapılan çalışmada; aminoglikozitlerden gentamisine %39, netilmisine %26 ve amikasine %15 direnç saptanmıştır (152). Şahin ve arkadaşları tarafından Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Hastanesi'nde *P. aeruginosa* ile yapılan çalışmada; imipeneme %12, siprofloksasine %13, piperasiline %14, amikasine %17, seftazidime %17, aztreonama %21, gentamisine %29 ve netilmisine %40 oranında direnç saptanmıştır (153).

Stratevo ve arkadaşları tarafından 2001-2006 yılları arasında Sofya'da (Bulgaristan) 5 üniversite hastanesinde *P. aeruginosa* ile yapılan çalışmada çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları; karbenisiline %93,1, azlosiline %91,6, tobramisine %89,6, piperasiline %86,2, siprofloksasine %80,3, gentamisine %79,7, netilmisine %69,6, amikasine %59,1, piperasilin/tazobaktama %56,8, aztreonama %49,8, seftazidime %45,8 ve imipeneme %42,3 olarak saptanmıştır (154). Brink ve arkadaşları tarafından Güney Afrikada yapılan çalışmada patojen bakteriler arasında *P. aeruginosa* karbepeneme %42-%45 arasında direnç göstermiştir (155). Çalışmamızda imipenem %30,3 ve meropenem %33,3 direnci ile yaklaşık aynı bulunmuştur. Verilerden de anlaşılacağı gibi antibiyotik direncimiz yurt dışı ile yaklaşık aynı oranlardadır.

Bu çalışmada izole ettiğimiz suşların %40'i çoklu antibiyotik direncine sahipti. Suşların %60'ı tüm antibiyotiklere duyarlı bulundu. En duyarlı oldukları antibiyotik ise %70 oranıyla CN olduğu saptandı. TPZ, AK, FEP, İMP, MEM, CAZ, AZT'ye direnç oranları %27 ile 39 arasında yer aldı. Brezilya, Hindistan ve Türkiye'den yoğun bakım ve Tunus'tan travma ve yanık ünitesi kökenli *P. aeruginosa* suşlarında bildirilen direnç oranları; FEP %54.5, AZT %36.4-88, MEM %45.4, CN %36.4-100, İMP %37- %50, TPZ %23,5 -56, AK %18.2-26, %29,6-59, CAZ %35-45,8, %54.5-96 (154, 156-159) Direnç oranlarımız bunlardan genellikle daha düşük olduğu (TPZ %30, AK %30, CN %27, FEP %30, İMP %30, MEM %33, CAZ %36, AZT %39) gözlenmektedir (Tablo. 10). Bu hastanemiz açısından sevindirici bir durumdur. Ancak 6 ayda 33 pseudomonas enfeksiyonu 200 yataklı bir hastanenin 20 yataklı yoğun bakım ünitesi için ciddi bir sorundur.

Acinetobacter'ler, doğada toprak ve sularda yaygın olarak bulunan fırsatçı patojenlerdir (160, 161). Birçok antibiyotiğe çoklu direnç göstermeleri, kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmeleri, farklı ısı ve pH değerlerinde yaşayabilmeleri nedeniyle günümüzde *Pseudomonas* cinsi bakterilerle birlikte hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralarda yer alır hale gelmişlerdir (162-164). Özellikle antibiyotiklerin aşırı ve kontrolsüz kullanıldığı, invaziv tanı ve tedavi prosedürlerinin sık uygulandığı YBÜ'de önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadırlar (63, 66, 165). Son 30 yılda pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu ve cerrahi yara enfeksiyonlarında görülme sıklığı artan tek gram negatif bakteri

oldukları ve ventilatörle ilişkili pnömoni ile kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık nedeni haline geldikleri gösterilmiştir (166-168).

Mekanik ventilasyonun bir komplikasyonu olarak sıklıkla ortaya çıkan hastane kaynaklı pnömoni enfeksiyonlarının en sık nedeni *Acinetobacter*'dir (55, 62-65). Ülkemizde Yoğun Bakım Ünitelerinde ventilatörle ilişkili pnömoni %18,9 oranında gelişmekte ve bunların %29,2'si *Acinetobacter*'lerle meydana gelmektedir (166). Çalışmamızda da *A.baumannii*'in neden olduğu enfeksiyonun en sık izole edildiği balgam örneklerinden 22 hasta (%44,9)'da görülen pnömoni olduğu ve bunların hepsinin mekanik ventilasyona bağlı olarak geliştiği belirlenmiştir.

Leblebicioğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Acinetobacter*'lerin Türkiye'de kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının da en sık (%23,2) nedeni oldukları tespit edilmiştir (166). Bakteriyemilerde en sık izole edilen *Acinetobacter* türü *A. baumannii*'dir ve en önemli kaynakları intravenöz ve solunum yolu kateterleridir (70, 169). Cerrahi yara, yanık ve idrar yolu enfeksiyonları bakteriyeminin daha az sıklıkla karşılaşılan kaynaklarıdır (55). Bakteriyemilerin %21-70 kadarında ise herhangi bir kaynak tespit edilememektedir (70). Çalışmamızda da *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonların en önemli kaynakları solunum yolu (%44,9) ve kan (%20,4) olduğu belirlenmiştir.

A. baumannii'nin antimikrobiyal duyarlılık oranları farklılıklar göstermektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D) 1998-2001 yılları arasında yapılan bir çalışmada; yoğun bakım hastası olmayanlar ve olanlarda sırasıyla amikasin duyarlılığı %92, %93,1, seftazidim duyarlılığı %86,6, %83,1, imipenem duyarlılığı %86,6, %80,3 olarak saptanmıştır (170). A.B.D.'de yapılan diğer bir çalışmada ise duyarlılık oranları imipenem için %24, seftazidim için %8, amikasin için %13, siprofloksasin için %7, tobramis için %15, gentamis için %32, sulbaktam ampisilin için %28 bulunmuştur (171). Ülkemizde Çaylan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Acinetobacter* türlerinde ilaç duyarlılıklarının her geçen yıl azaldığı görülmektedir. 1995- 2002 yılları arasında imipenem duyarlılığının %92'den %62'ye, siprofloksasin duyarlılığının %45'ten %25'e düştüğü tespit edilmiştir (172). Aksaray ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada imipenem %55,5 duyarlılık oranı ile en duyarlı antimikrobiyal olurken; amikasin %34,8 ile ikinci sırada yer almaktadır (173). Hacettepe Üniversitesi'nde 2000-2004 yılları arasında yapılan MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test

Information Collection) antimikrobiyal sürveyans programı dahilindeki çalışma sonuçlarına göre meropenem (%53), imipenem (%48) ve tobramisine (%44) duyarlılık oranları ile en duyarlı antibiyotikler olarak görülmektedir (174).

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *Acinetobacter* türlerinin piperasiline/ tazobaktama %78-98, ampiciline/ sulbaktama %42-95 ve sefoperazon/ sulbaktama %64,7-88 oranlarında dirence sahip olduğu gösterilmiştir (175, 176). Çalışmamızda piperasiline/ tazobaktama %93,8 saptanmasının sebebi ise suşların salgına ait olması düşünülebilir.

Alp ve ark' larının yaptıkları bir çalışmada amikasine %67,3, tobramisine %14,9 oranlarında direncin olduğunu bildirmişlerdir (177).

Otkun ve ark'nın 1995 yılında yaptığı çalışmada izole edilen *A. baumannii* kökenlerinde amikasine %28, gentamisine %73 direnç bulunmuştur (179). Tatman Otkun ve ark'nın çalışmasında 1994–2000 yıllarında izole edilen *A. baumannii* kökenlerinde ise amikasine %43, tobramisine %23 direnç bulunmuştur (180). Bizim alışmamızda ise aminoglikozidlere (amikasin ve gentamisin) direnç yakın değerlerde, %47,9-77,1 olarak bulunmuştur. Gazi ve ark. Ocak 2000-Aralık 2004 tarihlerinde yoğun bakım ünitesinden izole ettikleri 402 *A. baumannii* kökeninde meropeneme %36,3, imipeneme %40,5 dirençli bulmuşlardır (164). Yavuz ve ark. 2003–2004 yıllarında yaptıkları çalışmada 114 *A. baumannii* kökeninde imipeneme %17 dirençli bulmuşlardır (178). Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise direnç oranları %73-%92 arasında bildirilmiştir (178, 181, 182). Çalışmamızda imipenem ve meropenem direnci %72,9 olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalarla benzerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda yoğun bakım kökenli suşların antibiyotik direnç oranları Brezilya, Hindistan ve Türkiye'den FEP % 63,68, AZT %72,7, CAZ % 63,6, %85, %97, MEM % 63,6, GN %45,4, IMP %54,5-88,9, TZP %37-45,4, AK %27,3-92 (156, 158, 159) olarak bildirilmiştir. Bizim suşlarımızın %93,8'i TPZ'e, %77,1'i AK, %47,9'u CN, %83,3' FEP, %72,9'u İMP, %72,9'u MEM, %87,5'i CAZ, %91,7'i AZT'e dirençli bulunmuştur (Tablo 10). Yoğun bakım ünitemizde 6 ayda 48 enfeksiyonun görülmesi ve etken olarak izole edilen bu suşların antibiyotiklere direnç oranlarının bu kadar yüksek oluşu endişe verici bir sonuçtur. Farklılıklar bölgesel kaynaklı olabileceği gibi, çalışmamızın tamamının salgın suşu olması ile de ilişkili olabilir.

Bakteriyel patojenler için kullanılan moleküler epidemiyolojik analizler arasında “altın standart” olarak kabul edilen yöntem PFGE’dir (183). Bir enfeksiyöz ajanın değişik izolatları arasındaki muhtemel ilişkiyi ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (184). Epidemiyolojik analiz için bakteriyel izolatın tesadüfi olarak ya da kişiden kişiye geçişi üzerinde durulmaktadır. PFGE uygulamalarında diğer moleküler epidemiyolojik yöntemlerde olduğu gibi kromozomal benzerlikler karşılaştırılarak yorum yapılır (185).

Pagani ve arkadaşları İtalya’da farklı merkezlerde salgınlara neden olan 9 *P. aeruginosa* suşunun genetik yakınlığını PFGE yöntemiyle araştırdığı çalışmada, bu suşlardan ikisinin aynı paterne sahipken, diğerlerinin farklı klonlara ait oldukları ve böylelikle de farklı salgınlara farklı klonlarca oluşturulduğu sonucuna varılmıştır (186).

Luzzaro ve arkadaşlarının İtalya’da yaptıkları diğer bir çalışmada, bir hastanenin yoğun bakım ünitesinde salgına yol açmış *P. aeruginosa* suşlarının PFGE yöntemiyle klonal kaynaklı olduğu ve daha önce aynı hastanede sporadik olarak izole edilen *P. aeruginosa* suşlarıyla benzerlik göstermedikleri belirlenmiştir (187).

Nikbin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada iki farklı hastaneden izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının *DraI* restriksiyon enzimi ile gerçekleştirilen PFGE sonucunda toplam 84 farklı patern tespit etmişlerdir. Her iki hastanede de 14 izolatın bulunduğu ana patern ortak olarak saptanmıştır (188).

Hla ve arkadaşlarının 55 adet *P. aeruginosa* izolatının genotipik ilişkisinin araştırıldığı PFGE çalışmasında; *XbaI* restriksiyon endonükleaz ile %96-%100 benzerlik gösteren ve 8 izolatın yer aldığı major bir patern saptanmıştır (189).

Üner ve arkadaşlarının Malatya’da yaptıkları üroloji servisinde meydana gelen salgından izole edilen 14 adet *P. aeruginosa* suşunun klonal ilişkisini tespit etmek için PFGE yöntemini kullanmışlar. Sonuçta %78’den fazla benzerlik gösteren muhtemel ilişkili iki genotip bulmuşlardır (135).

Scott ve Pitt’in yaptığı bir araştırmada Londra’da dört farklı hastaneden kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının hastalar ve hastaneler arasında geçişleri incelenmiştir. *SpeI* restriksiyon enzimi ile gerçekleştirdikleri PFGE profillerinde dört ana patern saptamışlardır. İki farklı hastanede belirlenen iki ana genotip ortak olarak bulunmuş bu paternler arasında %80 benzerlik tespit edilmiştir (190).

Bütün bu yapılan çalışmaların ışığında hastanemizde 2009-2010 tarihleri arasında yoğun bakım servisindeki hastalardan çeşitli örneklerden izole edilen 33 adet *P. aeruginosa* suşu XbaI restriksiyon endonükleaz kullanılarak PFGE yöntemi ile aralarındaki benzerlik araştırılmıştır. Sonuçta 18 genotip saptanmış, 5 genotip küme oluşturan suşları içermektedir. Toplam 17 suş küme oluşturmuştur. Dört suş yakın ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Oniki suş özgü profil göstermiştir. Tüm bu sonuçlara göre üç ya da daha az bant farkı oluşturma kriteri dikkate alındığında suşların 21 (% 63,6)'i klonal yönden ilişkili bulunmuştur. Küme oluşturan genotipler aşağıdaki şekilde yorumlanabilir.

Genotip I'de yer alan iki suşun antibiyotik direnç profilleri tamamen zıttı (biri tüm antibiyotiklere duyarlıyken diğeri tümüne dirençli bulunmuştur) ve sadece bir ay ara ile izole edilmişti. Bu nedenle birinden diğere yayıldığı söylenemez. Ancak ortak atadan gelen, zaman içerisinde antibiyotiklere direnç kazanan aynı genotipe sahip iki farklı suş olarak değerlendirilebiliriz.

Genotip II'nin ilk izolatu (85 nolu suş) kan örneğinden Kasım-2009'da izole edildi. Aynı genotip (82 nolu suş) bir ay sonra başka hastanın yarasından izole edildi. Genotip III'ün iki suşu (63 ve 65 nolu izolatlar) aynı hastanın idrar ve yarasında eş zamanlı (Ocak-2010) saptandı. Aynı genotip, bir ay sonra başka bir hastanın (66 ve 81 nolu suşlar) idrar ve yarasından yine eş zamanlı izole edildi. Diğer üçü farklı hastalarda, yakın zamanlarda enfeksiyonlara neden oldu. Son izolat Nisan-2010' da gözlemlendi. Bu durum, aynı genotipin, personel aracılığıyla hastalar arasında 4 ay boyunca taşındığını göstermektedir.

Genotip X (70 ve 80 nolu suşlar) ve Xa (72 nolu suş)'yı içeren üçüncü küme oldukça ilginçti. Bu kümedeki tüm suşlar aynı hastadan izole edildi. Genotip X'un 80 nolu suşu hastanın balgamından 15 Mart'ta saptandı. Aynı tarihte yarasından Genotip Xa (72 nolu suş) izole edildi. Yetmiş nolu suş Mayıs' da aynı hastanın yara kültüründen izole edildi. Bu tarihte hastanın kateterinden küme dışı özgü bir suş olan genotip IX' da izole edildi. Yetmiş ve 80 nolu suşlar %96,6 oranında genotip benzerliğine sahipti ve 70 nolu suş tüm ilaçlara duyarlıyken 80 nolu suş tümüne dirençli bulundu. Genotip Xa' bunlarla %94,5 oranında genetik benzerliğe sahipti ve tüm ilaçlara duyarlı bulundu. Küme dışı olan Genotip IX yine tüm ilaçlara duyarlıydı. Aynı hasta yoğun bakımda 2 farklı *A. baumannii* suşu ile enfekte olmuştur. Bu kümede yer alan 70, 80 ve 72 nolu suşlar arasında %94'ün üzerinde

klonal benzerlik vardır. Bu nedenle bu üç suşun ortak kaynaktan geldikleri söylenebilir. Ancak genotip IX farklı bir suş olarak değerlendirilebilir.

Dördüncü küme aynı gen dizilimine, farklı antibiyotik duyarlılığına sahip iki suşu içerir(69 ve 73 nolu suşlar). Genotip XI Kasım-2009 ve Nisan-2010' da iki farklı hastada yara ve solunum yolu enfeksiyonu yaptı.

Beşinci küme genotip XIII' ün Kasım-2009' da izole edilen 13 nolu suşu CN ve AK' e duyarlıydı ve 2 nolu suş eş zamanlı olarak farklı bir hastanın idrarından izole edildi. Sadece CN duyarlıydı. Bu suş muhtemelen hastanede var olan genotip XIII' ün AK' e direnç kazanması ile oluşmuştu. Üç ay sonra aynı genotip (13 nolu suş) hastanın yarasından tekrar izole edildi. Bu süre içerisinde CN' e de direnç kazanmıştı. Muhtemelen bu suşlar hastanemizde var olan ortak kökenden gelip zamanla direnç kazanarak hastalar arasında yayılmıştır.

Tiplendirme çalışmalarında amaç, soyutlanmış ve genotiplendirilmiş olan kökenlerin epidemiyolojik olarak birbirleri ile ilişkili olup olmadıklarını ortaya koymak ve ilişkili ise bu ilişkiyi derecelendirmektir (191). Mikroorganizmaların moleküler tiplendirilmesinde tekrarlanabilirliği ve yüksek ayırt edici gücü PFGE'yi tüm dezavantajlarına rağmen en iyi alternatif yapmaktadır ve birçok araştırmacı tarafından moleküler yöntemler içinde altın standart olarak kabul edilmiştir (116, 122). Seifert ve ark. *A. baumannii* ile yaptıkları PFGE standardizasyonunda ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik çalışmasında *Apal* restriksiyon enzimini kullanmışlar ve epidemiyolojik olarak ilişkili bakterilerin ayrımının laboratuvarlar arasında uyumlu olarak yapılabildiğini göstermişlerdir (125).

Prashanth ve arkadaşları; yaptıkları çalışmada yoğun bakımlarda üreyen 71 *Acinetobacter* izolatını PFGE ile tiplendirmişler, 59 (%83) farklı patern belirlemişlerdir (192).

Isparta şehrinde Süleyman Demirel Üniversitesine Sesli Çetin ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada genotip analizi yapılan 66 *A. baumannii* izolatında 36 PFGE paterni, on iki küme oluşturmaktadır. Epidemiyolojik ilişki oranını %80,3 olarak bulmuşlardır (193)

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. Ayrıca bir klonun hastane çevresinde 6 yıl

varlığını sürdürmüş olduğu tespit edilmiştir. Ancak klonal yayılım olan hastaneler arasındaki, hasta transferlerine rastlanmamıştır (194).

Bizim yaptığımız çalışmada hastanemizdeki yoğun bakım servisinden çeşitli örneklerden izole edilen 48 adet *A. baumannii* suşu XbaI restriksiyon endonükleaz kullanılarak PFGE yöntemiyle aralarındaki benzerlik araştırılmıştır. Sonuç olarak 13 (%27.08) genotip saptandı. Genotiplerden 8 adeti küme oluşturan suşları içermektedir. Toplam 41 (%85,4) suş küme oluşturmuştur. Bu suşlardan 2 adeti yakın ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Üç ya da daha az bant farkı oluşturma kriteri dikkate alındığında suşların 43 (%89,5)'ü klonal yönden ilişkili olarak değerlendirildi. İzolatların 5 adeti (%10,4) özgü PFGE profili gösterdi. Sonuç olarak hastanemiz yoğun bakımındaki hasta örneklerinden izole edilen *A. baumannii* suşlarının çapraz geçiş gösterdiği ortaya çıkmıştır.

Tüm antibiyotiklere dirençli olan Genotip I bir ay ara ile iki farklı hastada, biri ciddi olmak üzere iki enfeksiyona neden olmuştur.

Genotip III ve IV kendi aralarında aynı PFGE bantlarına sahip, ikişer suş içeriyordu ve tüm suşların antibiyotik direnç profilleri farklıydı. Genotip III'ün suşları (51 ve 96 nolu suşlar) muhtemelen zaman içinde farklı antibiyotiklere direnç oluşturmuş ortak ata kaynaklı ve hastane kökenli suşlardı. Genotip IIIa da bunlara yakın benzerliğe (%95,2) sahip olması nedeni ile hastane kökenli bir suş olabilir. Genotip IV'ün 100 ve 91 nolu suşları da yine hastanede ortak bir atadan köken alan farklı antibiyotik direnç profillerine sahip suşlar olmalıdır.

Genotip V'in iki suşu (21 ve 42 nolu suşlar) aynı hastanın balgamından bir ay ara ile saptandı, aynı genotipe sahiptiler ve sadece CN'e duyarlıydılar. Muhtemelen aynı hastanın devam eden solunum yolu enfeksiyonundan alınmış iki ayrı örnekten üremiştir.

Genotip V' in PFGE de bir bant farkına sahip olan iki farklı suşu (48 ve 35 nolu suşlar) iki ay içinde aynı hastada gözlemlendi. İlki (48 nolu suş) kandan izole edildi tüm antibiyotiklere dirençliydi. İkincisi kateter enfeksiyonundan izole edildi. AK ve CN' e duyarlıydı. Genotip V'in diğer suşları (24, 98, 30 nolu suşlar) farklı hastaların balgam örneğinden izole edilmişti. Otuz nolu suş Aralık'ta izole edildi ve AK az duyarlı CN' e duyarlı bulundu. Yirmidört nolu suş Mart'da izole edildi ve sadece CN'e duyarlıydı. Bu suş 30 nolu suşun zaman içerisinde AK' ne direnç kazanmasıyla oluşmuş olabilir. Genotip V'in yaptığı enfeksiyonların tümü muhtemelen aynı

genotipin zaman içerisinde antibiyotiklere direnç kazanmasıyla oluşan, hastanemize ait suşlarla gelişmişti.

Genotip VIII'in aynı hastanın balgam ve kanından iki ay ara ile izole edilen 54 ve 41 nolu suşlarının PFGE bantları aynıydı. İkiside sadece CN' e duyarlı bulundular. Hasta ya solunum yolu enfeksiyonu ardından sepsise girmişti ya da başından beri sepsisliydi. Bu iki suş genotip VIII' in diğer dört suşuna %97,6 oranında benzerdi. Aynı hasta ayrıca genotip VII (23 nolu suş) ile Mart ayında idrar yolu enfeksiyonu geçirmişti.

Genotip VIII' in diğer dört suşu (31, 36, 32, 46 nolu suşlar) PFGE' de aynı genotipe sahipti ve bunlar farklı kişilerden izole edilmişti. Otuzbir, 46 nolu suşlar sadece CN'e duyarlı 36 nolu suş CN'e orta duyarlı, 32 nolu suş hepsine dirençli bulundu. Bu grup genotip VIII' in zaman içinde CN'ne direnç kazanması ile oluşmuş suşlar olmalıdır.

Genotip X' un iki suşu (45 ve 49 nolu suşlar) aynı hastaya aitti. Aralık-2009 ve Ocak- 2010' da kan ve BOS'dan izole edilmişti. Hasta muhtemelen sepsisliydi ve enfeksiyon devam ediyordu. Bu genotipin daha duyarlı olan suşu (90 nolu suş) bir hastanın balgamında izole edildi. Diğer 5 suşunun üçü kan, ikisi BOS' dan izole edildi ve bunlar tüm antibiyotiklere dirençli suşlardı. Doksan nolu suş hariç tümü aynı bakterinin dört farklı hastaya yayılarak oluşturduğu hastane enfeksiyonları olmalıdır.

Genotip XI'in 33 ve 34 nolu suşları Kasım ayında iki farklı hastada solunum yolu enfeksiyonu yapmıştı. Aynı PFGE bantlarına sahipti ve sadece aminoglikozitlere duyarlıydı. Bu iki suş birinden diğerine taşınmış aynı etken olabilir. Otuzsekiz nolu suş Ocak-2010' da farklı bir hastanın kanında görüldü. Bu suşun 33 ve 34 nolu suşların bu süre içinde aminoglikozitlere direnç kazanmasıyla oluşmuş hastanemize ait bir suş olduğu düşünülebilir.

Haziran 2010' da izole edilen tüm antibiyotiklere duyarlı bulunan 39 nolu yara izolatu, 33, 34, 38 nolu suşlarla aynı PFGE bantlarına sahip olması nedeniyle hastanemiz kökenli bu suşların duyarlı bir formu olabilir.

Genotip XI'in ikinci grubunda yer alan 25, 27, 28 nolu suşlar hastanemizde var olan ve hastalar arası personel aracılığıyla taşınan suşlar olmalıdır. Bunların öncekilerle benzerliği %97,6 olarak gözlemlendi.

Genotip XI'in üçüncü grubunu oluşturan önceki suşlarla %96 benzerliğe sahip olan 5 suştan 43 ve 44 nolu iki suş aynı hastanın Aralık-2009 ve Ocak-2010' da balgam ve kanından izole edildi. Muhtemelen bunlar hastada devam eden bir enfeksiyonun iki farklı kültüründen izole edilmiş aynı suşlardı. Diğer üç suşun ikisi Aralık-2009 ve Ocak-2010 izolatydı. Farklı hastalardan izole edilmişti. Yirmiiki, 29, 43 ve 44 nolu suşlar hastalar arasında personel tarafından taşınan hastane suşları olmalıdır. Bunlarla aynı PFGE tipine sahip sadece CN duyarlı olan 50 nolu suş ise aynı atadan köken alan yine hastanemize ait bir suş olmalıdır.

Genotip XI'in tüm ilaçlara duyarlı bulunan 39 nolu suşu hariç, diğer 11 suşu hastanemize aitti ve muhtemelen kendi personelimiz aracılığıyla taşınan hastane enfeksiyonu etkenleriydi.

Genotip XIII'ü oluşturan 4 suşun ikisi (89 ve 94 nolu suşlar) aynı suşun hastane içi yayılımı olmalıdır. Diğer ikisi ise (99 ve 100 nolu suşlar) aynı kökenin hastane içerisinde zamanla bazı ilaçlara direnç kazanması ile oluşmuş yeni suşlar olmalıdır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak yoğun bakım ünitesinden izole edilen 33 *P. aeruginosa* ve 48 *A. baumannii* suşunun çapraz geçişi gösterilmiştir. Bazen bir hasta bir iki ay ara ile aynı tür bakterinin farklı genotipiyle, bazende farklı hastalar aynı genotiple enfekte olmuştur. Çapraz bulaşın yüksek derecede saptanması ve özellikle *A. baumannii* suşlarının birçok ilaca karşı yüksek direnç oranları göstermesi yoğun bakım ünitelerinde acil önlemler alınması gerektiğini göstermektedir.

Yoğun bakım ünitelerinde salgınları zamanında fark edebilmek için sürveyans çalışmaları yapılmalı, hastalardan ve çevreden tarama kültürleri alınmalıdır. Aynı zamanda sık aralıklarla personeli eğitilmeli, hastalar arasında ortak kullanılan malzemeler azaltılmalı, el hijyenine ve eldiven kullanımına gereken özen gösterilmelidir. Ayrıca uygun sürede ve antibiyogram sonucuna göre antibiyotik kullanımının yararı olacağı da düşünülmelidir. Böylece gereksiz ilaç kullanımının ve direnç gelişiminin önüne geçilebilir. Her hastanenin kontrol önlemleri ve antibiyotik politikası değişiklik göstermektedir (195). Her hastane sürveyans sonuçlarına göre kendi önlemlerini ve prosedürlerini belirlemelidir.

7.KAYNAKLAR

1. Yüce A. : Hastane İnfeksiyonlarının önemi ‘ A. Yüce, N. Çakır (eds) : Hastane İnfeksiyonları ‘ kitabı, Güven Kitapevi, İzmir, 2003: 3.
2. Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148–65.
3. Peterson DL. Serious infections in the intensive care unit: *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 2006;43 (suppl 2):41–2.
4. Ardıç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T. Yatan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının karbapenemlere ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Ankem derg* 2004;18:145–8.
5. Javad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 1998:1938–41.
6. D’Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 588- 591.
7. Villegas MV, Hartstein Al. *Acinetobacter* outbreaks,1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:284–295.
8. Beck-Sague CM, Jarvis WR, Brook JH, et al. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care unit. *Am J Epidemiol* 1990;132:723–733.
9. Lortholary O, Fagon J-Y, Hoi AB, et al. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 1995;20:790–796.
10. Siegman-Igra Y, Bar-Yosef S, Gorea A et al. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedues: report of 25 cases and review. *Clin Infect Dis* 1993;17:843–849.

11. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* 2004;38:1449–1459.
12. 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.
13. Pollack M. *P. aeruginosa*: Mandell GL, Douglas RL, Bennett JE, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. New York:Churchill Livingstone; 1995; p:1980-2003.
14. Yalçın N. Nozokomiyal Gram-negatif çomak infeksiyonları. *Klimik Derg* 2000 özel sayı: 23-25.
15. Stephen H, Gillespie and Peter M. Hawkey. *Principles and Practice of clinical bacteriology* second edition, John Wiley-Sons, ltd; 2006.427-435
16. Bonten M, Weinstein R. Transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units don't go near the water. *Critical Care Medicine* 2002; 30:10-12.
17. Çiftçi İH, Çetinkaya Z. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005;35(2):98-102.
18. Aparajita, Richard V. Goering, Shabbir S, Steven L. Foley,5, Marcus J. Zervos. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol* 2006;19:512- 530.
19. Jarvis WR. Usefulness of molecular epidemiology for outbreak investigations. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1994;15:500–503.
20. Aber CR, Mackel DC. Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. *Am. J. Med.* 1981;70.898–905.
21. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.1995;p:190-208.
22. Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1993;14:595–600.

23. Aydın F. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıklarının araştırılması. Uzmanlık Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi;2001.
24. Bilgehan H. Non-fermentatif Gram olumsuz basiller. Klinik Mikrobiyoloji. İzmir: Barış Kitabevi; 1995; s: 161-178.
25. Kayse F. H., Bienz K. A., Eckert J. Tıbbi Mikrobiyoloji. Çev: Küçükler M. A., Tümbay E., Anđ Ö. : Pseudomonadaceae., Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1997; 8 :230.
26. Konemann EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn W J, editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997; p:253-309.
27. Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology; 2004; p: 3.3.2-3.3.2:13 (sınıflandırma için).
28. Erdem B.: Pseudomonaslar, " Ustaçelebi Ş. (ed):Temel ve Klinik Mikrobiyoloji" kitabı, Gündeş Kitabevi, Ankara, 1999: 551-557.
29. Gür D. Hastane infeksiyonu etkeni çoklu dirençli Gram negatif mikroorganizmalar. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2003;7 (3): 111-117.
30. Koneman E, Stephan DA, William MJ, Schreckenberger PC, Winn CW Jr. The nonfermentative Gram-negative bacilli. Koneman's Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Ed. Philadelphia, Lippincott 2006: 303-391.
31. Vahaboğlu H, Akhan SÇ: *Pseudomonas aeruginosa* ve Diğer *Pseudomonas* türleri. In: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Edited by Topçu A.W, Söyletir G, Doğanay M, vol. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2002: 1608-1616.
32. Bergagne E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram negative bacilli. In: Colman J, Powerdyly GW eds. Infectious Diseases. Second ed., Toronto, 2004: 1733-48.
33. Baron E., Finegold S., Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 7th ed. Mosby Co, St Louis, 1986: 422-424.

34. Denton M., Wilcox M.H.: Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1997; 40:468-474.
35. Dinwiddie R. Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67:3-8.
36. Christopher A. Ohl, Matthew Pollack. *Infections Due to Pseudomonas Species and Related Organisms. Harrison's Principles of Internal Medicine.* 16th ed.
37. Wilson W, Sande M. *Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi.* İstanbul: Nobel tıp kitabevi; 2004:567-578.
38. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 1999; 284: 1322-28.
39. Wilson, S. G. and Miles, A. A. *Principles of Bacteriology and Immunity.* Edward Arnold (Publishers) Ltd. London. 1964:636-643.
40. Pier GB, Ramphal R: *Pseudomonas aeruginosa.* In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Edited by Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R, 6th ed. edn. Philadelphia, Pa.: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005; 46-45:2587-2617.
41. Bilgehan H: *Klinik Mikrobiyoloji Tanı.* Barıs Yayınları, İzmir, 4. baskı, 2004; s:466-467.
42. Kılıçturgay K: *Klinik Mikrobiyoloji.* Onur Yayıncılık, Bursa, 1. baskı, 1993; s:76-79.
43. Unat E.K: *Tıp Mikrobiyolojisi ve Virolojisi.* Dergah Tıp Yayınları, İstanbul, 1982; s:661-666.
44. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Mete Ö: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji,* vol. 1. İstanbul: Güneş Kitabevi; 1999; s: 551-558.
45. Macia MD, Borrell N, Perez JL, Oliver A: Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the E test and disk diffusion. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(7):2665-2672.
46. Akalın H. XIII. *Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı,* 2007.
47. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF: Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of

- Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(5):1681-1688.
48. Schreckenberger PC, Von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*. In: Baron EJ, Pfaller MA; Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press; 2000:749–60.
 49. Speller DCE, Humphreys H. Hospital-acquired infection. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.). *Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections*. 9th ed. London: Arnold; 1998;p:187–229.
 50. Bonomo R.A, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006;43:49–56.
 51. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology* 9th ed. Washington ASM Press 2007: 770- 802.
 52. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp. and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 2353- 58.
 53. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram negative rods, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 8. baski kitabinda, ASM Press, Washington, DC.2003;s:750-1.
 54. Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Popolo A.D, Triassi M, Villari P. Molecular Epidemiology of Sequential Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit Shows the Emergence of Carbapenem Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2004; s: 946-953.

55. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5. Baskı kitabında. Philadelphia: Lippincott; 1997;s:253-320.
56. Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH. Nozokomiyal Acinetobacter infeksiyonları. Flora 1999;4:170–6.
57. Goel KV, Kapil A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of Acinetobacter baumannii are bactericidal. BMC Microbiology 2001;1:16–23.
58. Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksal I et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER–1-type) producing Acinetobacter spp. and Pseudomonas aeruginosa strains. J Med Microbiol 2001;50:642–5.
59. Allen DM., Hartman BJ: Acinetobacter species. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Edited by Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R, 6th ed. edn. Philadelphia, Pa.: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005: 2339-2344.
60. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical, and epidemiological characteristics of hospital acquired Acinetobacter baumannii infection in a teaching hospital. J Hosp Infect 2003; 54: 39–45.
61. Dy ME, Nord JA, LaBombardi VJ, Kislak JW. The emergence of resistant strains of Acinetobacter baumannii: clinical and infection control implications. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20: 565- 67.
62. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States, Infect Control Hosp Epidemiol 2000; 21: 510-515.
63. Prashanth K, Badrinath S. Nosocomial infections due to Acinetobacter species: clinical findings, risk and prognostic factors. Indian Journal of Medical Microbiology, 2006;24 (1):39-44.
64. Gales A. C, R. Jones N, Forward K. R, Linares J, Sader H. S, Verhoef J. Emerging Importance of Multidrug-Resistant Acinetobacter Species and Stenotrophomonas maltophilia as Pathogens in Seriously Ill Patients: Geographic Patterns, Epidemiological Features, and Trends in the

- SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). *Acinetobacter* and *S. maltophilia* in SENTRY, CID 2001;32 (Suppl 2) s:104-13.
65. Bergogne-Berezin E, Towner K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 1996; 9: 148-165.
 66. Park D.R. The Microbiology of Ventilator-Associated Pneumonia. Respiratory Care June 2005 ;Vol 50 No 6: 742-765.
 67. Ferrara A.M. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. International Journal of Antimicrobial Agents , 2006;27: 183–195.
 68. Crnich CJ, Safdar N, Maki DG. The Role of the Intensive Care Unit Environment in the Pathogenesis and Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia, Respiratory Care June 2005; vol: 50: No: 6.
 69. Bergogne-Berezin E., Joly-Guillou M.L. Hospital infection with *Acinetobacter* spp: an increasing problem. J Hosp Infect 1991; 18:250-255.
 70. Cisneros J. M, Rodriguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2002; 8: 687-693.
 71. Wei-feng S, Jian-ping J, Tu-huang M. Relationship between antimicrobial resistance and aminoglycoside-modifying enzyme gene expression in *Acinetobacter baumannii*. Chinese Medical Journal 2005; 118 (2): 141-145.
 72. Alp E, Ese D, Yildiz O, Andreas Voss A, Melchers W, Doganay M. Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream infection isolates in a Turkish university hospital. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2006; 38: 335-340.
 73. Bou G, Cervero G, Dominguez M.A, Quereda C, Martinez-Beltra J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2000; s: 3299-3305.

74. Bou G, Cervero G, Dominguez M.A, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 635-643.
75. Chen H.P, Lai C.H, Chan Y.J, Chen T.L, Liu C.Y, Fung C.P, Liu C.Y. Clinical significance of *Acinetobacter* species isolated from cerebrospinal fluid. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2005; 37: 669- 675.
76. Katragkou A, Roilides E. Successful Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Central Nervous System Infections with Colistin. *Journal Of Clinical Microbiology*, Sept. 2005; s: 4916–4917.
77. Gleeson T, Petersen K, Mascola J. Successful treatment of *Acinetobacter meningitis* with meropenem and rifampicin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* July 2005; s: 602-603.
78. Ahmad S. Urinary tract infection at a specialist hospital in Saudi Arabia. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 1995; 21: 95-98.
79. Simor AE, Lee M, Vearncombe M, Jones-Paul L, Barry C, Gomez M, Fish JS, Cartotto RC, Palmer R, Louie M. An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: Risk factors for acquisition and management, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23: 261-267.
80. Tenover FC, Hugles JM. The challenges of emerging infectious diseases development and spread of multiply resistant bacterial pathogens. *JAMA* 1996; 275: 300-304.
81. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. *Science* 1992; 257:1050-1055.
82. Gülay Z. Genel Bakteriyoloji: Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. “İçinde” Ustaçelebi Ş (yazar). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 91-108.
83. Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klinik Derg* 2001; 14: 47-56.
84. Erdem B, Ustaçelebi Ş: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. In. Ankara; 1999: 91.

85. Barry MF. Rifamycins. İn: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet's. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill and Livingstone, 2000: 349-361.
86. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klimik Derg , 2001;14: 41-46.
87. Tanır G, Göl N. Antibiyotik Direnci. Klimik Derg 1999;12: 47-54.
88. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA (eds). Medical Microbiology. East Norwalk CT: Appleton & Lange, 1995:137-167.
89. Poole K: Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(9): 2233-2241.
90. Eliopoulos GM. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs. İn: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow N (eds). Infectious Diseases. Philadelphia: WB Saunders Co, 1992: 280-286.
91. Martinez JL, Baquero F: Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(7): 1771-1777.
92. Malouin F, Bryan LE: Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 1986;30(1):1-5.
93. Spratt BG: Resistance to beta-lactam antibiotics mediated by alterations of penicillin-binding proteins. İn: Handbook of Experimental Pharmacology. Edited by Bryan LE, Heffter A, Heubner W. Berlin: Springer; 1989: 77-100.
94. Livermore DM: Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. Scand J Infect Dis Suppl 1991; 78:7-16.
95. Sanders CC, Sanders WE, Jr.: beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin Infect Dis 1992; 15(5):824-839.
96. Akalın H: Çoğul Dirençli Gram Negatif Bakteriler. İn: Hastane İnfeksiyonları. Edited by Doğanay M, Ünal S. Ankara: Ankara Bilim Tıp Yayınevi; 2003: 269–289.
97. Bradford PA: What's New in beta-lactamases? Curr Infect Dis Rep 2001; 3(1):13-19.
98. Gür D: Beta-laktamazların sınıflandırılması. Flora Dergisi 1996;(1):80-86.

99. Ambler RP: The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289(1036):321-331.
100. Wiedemann B, Dietz H, Pfeifle D: Induction of beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Clin Infect Dis* 1998; 27 Suppl 1:S42-47.
101. Livermore DM: beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):557-584.
102. Gür D: Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1997; 1:38-45.
103. Yuluğ N: Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. *ANKEM Derg* 1997; 11:205-207.
104. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6):1211-1233.
105. Medeiros AA: beta-Lactamases: quality and resistance. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3 Suppl 4:s:2-9.
106. Livermore DM: Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 Suppl D:25-41.
107. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE: OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(8):1637-1644.
108. Quiroga MI, Franceschini N, Rossolini GM, Gutkind G, Bonfiglio G, Franchino L, Amicosante G: Interaction of cefotetan and the metallo-beta-lactamases produced in *Aeromonas* spp. and in vitro activity. *Chemotherapy* 2000; 46(3):177-183.
109. Bush K: Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998; 27 Suppl 1:S48-53.
110. Rasmussen BA, Bush K: Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(2):223-232.
111. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS: Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med* 1985; 78(6A):3-21.

112. Neu HC: Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am J Med* 1985; 79(2A):2-13.
113. Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. “İçinde” Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (yazarlar). *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 31-41.
114. Töreci K. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları. “İçinde” Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (yazarlar). *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 15-30.
115. Akbulut A. Sülfonamidler, Trimetoprim, Trimetoprim-Sülfametoksazol. “İçinde” Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (yazarlar). *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 381-392.
116. Derbentli Ş. Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisinde moleküler yöntemlerin yeri. Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S (Editörler). *İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler’inde*. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın; 2002;s:6–13.
117. Arbeit, RD.: Laboratory procedures for epidemiologic analysis. In: Crossley K.B.Archer, GL.(eds): *The Stapylococci in Human Disease* Churchill Livingstone, NewYork,1997: 253- 283.
118. Olive, DM., Bean, P.: Principles and applications of methods DNA-based typing of microbial organisms, *J. Clin. Microbiol.*1999; 37: 1661-1669.
119. 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.
120. Andrei A, Zervos M.J. The Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130: 662-668
121. Foxman B, Riley L. Molecular Epidemiology: Focus on Infection. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 1135-41.
122. Tenover, F.C, Arbeit R. D, Goering R. V, Mickelsen P. A, Murray B. E, Persing D. H, 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.

123. Singh A, Goering R.V, Simjee S, Foley S.L, Zervos M.J. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2006; s: 512–530.
124. Pfaller M.A. Molecular Epidemiology in the Care of Patients. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123: 1007-1010.
125. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2005; s: 4328-4335.
126. Basim E, Basim H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turk J Biol* 2001; 25: 405-418.
127. Goring R.V, ç. Alper Tekeli, Pulsed Field Gel Electroforesis Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ. (eds). *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamaları*. Palme Yayıncılık, Ankara 2006.
128. Sambrook, J, Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory. Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.1989.
129. Kudaka J, Itokazu K, Taira K, Iwai K, Kondo M, Susa T, Iwanaga M. Characterization of *Salmonella* Isolated in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006;59: 15- 19.
130. Durmaz B, Durmaz R. Pulsed Field Gel Electrophoresis, Durmaz R. (ed) *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevi, Çapa, İstanbul. s:161-168.
131. Maslow jn, Slutsky AM, Arbeit RD. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecularepidemiology. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ.(eds). *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM Press, Washington DC 1993:563-72.
132. Goering R.V, Tenover F.C. Epidemiological Interpretation of Chromosomal Macro-Restriction Fragment Patterns Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 1997; s: 2432-2433.

133. Centers for Disease Control and Prevention: Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli,salmonella,shigella,protocols.pdf>.
134. Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A: Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci, *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4242-5.
135. Kayabaş Ü, Bayraktar M, Oflu B, Uğraş M, Ersoy Y, Bayındır Y and Durmaz R, : An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unit: A pulsedfield gel electrophoresis-based epidemiologic study: *Am J Infect Control* 2008;36:33-8.
136. Güdücüoğlu H, Durmaz R, Yaman G, Çizmeci Z, Berktaş M, Durmaz B: Spread of a single clone *Acinetobacter baumannii* strain in an intensive care unit of a teaching hospital in Turkey, *New Microbiol* 2005;28(4):337-43.
137. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A et al: Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy, *Clin Microbiol Infect* 2007;13(5):481-9.
138. Maslow JN, Glaze T, Adams P, Lataillade M: Concurrent outbreak of multidrug-resistant and susceptible subclones of *Acinetobacter baumannii* affecting different wards of a single hospital, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26(1):69-75.
139. Harald Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L: Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*: *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2005; p: 4328–4335.
140. Güner SK. *Pseudomonas aeruginosa*'da porin direncinin saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul;2003.

141. Fidan I, Gürelik FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg.* 2005; 19: 68-70.
142. Haris A, Viera CT, Venkatamaran L, DeGirolami P, Samore M, Carmeli Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 1999; 28: 1128-1133.
143. Kıska DL. and Gilligan PH. *Pseudomonas*. *Manual of Clinical Microbiology.* Eight Ed., In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. 2003; ASM press: 719-728.
144. Aydın K, Çaylan R, Köksal İ, Volkan S, Öksüz R. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı. *Hastane İnfek Derg.*2000; 4: 92-96.
145. Turgut H, Turhanoğlu M, Çetin ÇB, Yalçın AN. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının bazı antibiyotiklere direnci. *İnfek Derg.* 2002;16, 63-66.
146. Akçay SS, Topkaya A, Oğuzoğlu N. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem duyarlılığı. *İnfek Derg.* 2003;17: 465- 469.
147. Bayramoğlu G. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinin Meropenem Duyarlılıklarının Değişik Yöntemlerle Araştırılması. Samsun. Uzmanlık Tezi.2004.
148. Gündüz T, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, Algün Ü, Özbakkaloğlu B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının isepamisin ve amikasine duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*2003; 33: 232-235.
149. Palabıyıkoglu İ, Bengisun J.S: Hastanede Yatan ve Ayakta Başvuran Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere İn Vitro Duyarlılıklarının Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bült Antalya*,1997; 31:363-367.
150. Özgenç O, Urbarlı A, Erdenizmenli M, Fidan N, Arı A: *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinin Çeşitli Antimikrobiklere Direnç Oranlarının Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*,2002; 16(2):179-182.

151. Ünlü V.G, Ünlü M: Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinin Levofloksasin, Siplorofloksasin ve Ofloksasine Karşı İn Vitro Duyarlılığı. *İnfeksiyon Derg*, 2001; 15(3):311-314.
152. Köroğlu M, Durmaz B, Tekeroğlu M.S: Turgut Özal Tıp Merkezi'nde İzole Edilen *Pseudomonas* Türlerinin Aminoglikozitlere ve Antipseudomonal Sefalosporinlere Karşı Direnç Durumu. *İnfeksiyon Derg*, 1999;13(3):371-374.
153. Şahin İ, Kaya D, Öztürk E, Öksüz S, Gülcan A: Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Bazı Antibiyotiklere İn Vitro Duyarlılıkları. *ANKEM Derg*,2002; 16(4):474-476.
154. Stratevo T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, Todorrova A, Mortava-Proevski Y, Mitov I: Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *J Med Microbiol*. 2007 Jul;56(Pt7):9:56-63.
155. Brink A, Moolman J, da Silva MC, Botha M; National Antibiotic Surveillance Forum: Antimicrobial susceptibility profile of selected bacteraemic pathogens from private institutions in South Africa. *S Afr Med J*. 2007 Apr;97(4):273-9.
156. Resende M.M, Monteiro S.G, Callegari B, Figueiredo P.M.S, Monteiro C. R. A. V, and Monteiro-Neto V. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in northern Brazil an analytical descriptive cohort study. *BMC Infect Dis*. 2013;13: 119.
157. Zoghalmi A, Kanzari L, Boukadida J, Messadi A.A, Ghanem A. Epidemiological profile and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in burn and Traumatology Center in Tunisia over a three-year period. *La tunisia Medica*,2012; Vol 90(no:011): 803-806.
158. Goel V, Hogade A.S and Karadesai S.G. Ventilator associated pneumonia in a medical intensive care unit: Microbial aetiology, susceptibility patterns of isolated microorganisms and outcome. *Indian J Anaesth*,2012 Nov-Dec;56(6):558-562.
159. İnan A, Özgültekin A, Akçay Şenbayrak S, Engin Öztürk D. Alterations in Bacterial Spectrum and Increasing Resistance Rates in

- Isolated Microorganisms from Device-Associated Infections in an Intensive Care Unit of a Teaching Hospital in İstanbul. *Jpn J Infect Dis*, 2012;65:146-151.
160. Biendo M, Laurans G, Lefebvre J. F, Daoudi F, Eb F. Epidemiological Study of an *Acinetobacter baumannii* Outbreak by Using a Combination of Antibiotyping and Ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, July 1999; s: 2170-2175.
161. Sesli Çetin E, Kaya S, Tetik T, Cicioğlu Aridoğan B. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Örneklere Göre Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2006;20(4):202-205.
162. Levin AS, Gobara S, Mendes C.M.F, Cursino R, Sinto S. Environmental Contamination by Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22: 717-720.
163. Ardiç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T. Yatan Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* Suşlarının Karbapenemlere ve Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2004;18(3):145-148.
164. Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, İnmez E, Dinç G, Özbakkaloğlu B. Yoğun Bakım Ünitesi ve Diğer Ünitelerde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında İn-vitro Antibiyotik Direnci. *Ankem Derg* 2005;19(3):115-118.
165. Falagas ME, Karveli EA. The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications, *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 117–119
166. Leblebicioğlu H, Rosenthal V.D, Arıkan A, Özgültekin A, Yalçın A.N, Koksall I, Usluer G, Sardan Y.C, Ulusoy S. Device-associated hospital-acquired infection rates in Turkish intensive care units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC), *Journal of Hospital Infection* (2007); 65: 251-257
167. Shaw M.J, Ventilator-associated pneumonia, Lippincott Williams & Wilkins. 2005:1070-5287
168. Gaynes R, Edwards J.R, Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:848–54

169. Moreno CA, Rosenthal VD, Olarte N, Gomez WV, Sussmann O, Agudelo JG, Rojas C, Osorio L, Linares C, Valderrama A, Mercado PG, Bernate PHA, Vergara GR, Pertuz AM, Mojica BE, Navarrete MPT, Romero ASA, Henriquez D. Device Associated Infection Rate and Mortality in Intensive Care Units of Colombian Hospitals: Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006; 27: 349-356
170. Brito D.D., Oliveira E.J, Abdallah V.O.S., Darini A.L.C., Filho P.P.G. An outbreak of *Acinetobacter baumannii* septicemia in a neonatal intensive care unit of a university hospital in Brazil. *The Brazilian Journal of infectious Diseases* 2005; 9(3):301-309
171. Bernards A.T, Harinck H.I. Dijkshoorn L, van der Reijden T.J.K., van den Broek P.J. Persistent *Acinetobacter baumannii* Look inside your medical equipment. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2004; 25: 1002-1004
172. Çaylan R. Çok ilaca dirençli hastane kökenli Gram negatif nonfermentatif bakteriler: Ülkemizdeki durum, tedavi ve kontrol politikaları. *Klinik Dergisi* 2003; 16 (Özel sayı): 18-20
173. Gulati S, Kapil A, Das B, Dwivedi S.N, Mahapatra A.K. Nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ICU. *Neurol India* 2000; 49: 134-137
174. Zarakolu P, Hasçelik G, Ünal S. Antimicrobial susceptibility pattern of nosocomial gram negative pathogens: results from MYSTIC study in Hacettepe University Adult Hospital (2000-2004) *Mikrobiyoloji Bülteni* 2006; 40: 147-154
175. Köseoğlu-Eser Ö, Kocagöz S, Ergin A, Altun B. Yoğun bakım ünitelerinde infeksiyon etkeni olan gram-negatif basillerin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2005; 19(1): 75- 80.
176. Kaya I, Göker G, Bal Kayacan Ç, Gürler N. Yoğun bakım izolatu Gram negatif bakterilerde tigesiklin duyarlılığı. *ANKEM Dergisi* 2007; 21(3): 142- 5.

177. Alp E, Muhammet G, Orhan Y ve ark. Yoğun bakım ünitelerimizde nozokomiyal pnömoni insidansı, etkenleri ve antibiyotik direnci. *Flora* 2004; 9(2): 125- 31.
178. Yavuz MT, Sahin D, Behçet M, Öztürk E, Kaya D. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi* 2006; 20(2): 107- 110.
179. Otkun M, Akata F, Teker B, Aka F, Tatman-Otkun M, Tuğrul M ve ark. Trakya Üniversitesi Hastanesi'nde Hastane infeksiyonları: 1995 yılı sonuçları. *İnfeks Derg* 1997; 11(1): 23-7.
180. Tatman-Otkun M, Gürcan Ş, Özer B, Türe M. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde 1994'den 2000'e yıllık antibiyotik direnç değişimi. *Ankem derg* 2003;17:1-6.
181. Gülhan B, Özekinci T, Atmaca S, Bilek H. 2004-2006 yıllarında izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnci. *Ankem derg* 2007;21:32-6.
182. Aygün G, Dikmen Y, Mete B, Utku T, Murtezaoğlu A, Demirkıran O ve ark. Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin antibiyotik duyarlılığı. *Ankem derg* 2002;16:85-8.
183. Persing DH (2004). Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: *Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*. Eds, Tekeli A, Ustaçelebi S. Palme Yayıncılık (2006); Ankara. 15: 185-196.
184. Goering RV. The molecular epidemiology of nosocomial infection: an overview of principles, application, and interpretation. In: *Rapid Detection of Infectious Agents*. Eds, Specter S, Bendinelli M, Friedman H. Plenum press, New York. 1998:131- 157.
185. Goering RV. The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Rev Med Microbiol.*2000; 11: 145-152.
186. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, Daturi R, Romero E, Rossolini GM. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol.*2004; 42: 2523-2529.

187. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase. *J Clin. Microbiol.* 2001; 39: 1865-1870.
188. Nikbin VS, Abdi-Ali A, Feizabadi MM, Gharavi S. Pulsed field electrophoresis & plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran. *Indian J Med Res.* 2007: 146-151.
189. Hla SW, Kok PH, Tan WC, Ho B. Genome macrorestriction analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bronchiectasis patient without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 575-578.
190. Scoot FW and Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol.* 2004;53: 609-615.
191. Saraçlı MA. Hastane infeksiyonlarının tanısında moleküler epidemiyoloji. <http://www.gata.edu.tr/kitap/1.BÖLÜM/9.MOLEKÜLER.EPİDEMİYOLOJİ.son.D.pdf>
192. 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
193. Sesli Çetin E, Durmaz R, Tetik T, Otlu B, Kaya S, and Çalışkan A. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *American Journal of Infection Control* 2009;37:1:56-64
194. 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
195. Rello J. *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. *Chest* 1999;115:1226–9.
196. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical, and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2003; 54: 39–45.