

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

*ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARININ MOLEKÜLER  
TİPLENDİRİLMESİ

Rabia ÇALI

HAZİRAN 2011

**Biyoloji Anabilim Dalında** Rabia ÇALI tarafından hazırlanan *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Leyla AÇIK \_\_\_\_\_

Üye(Danışman) : Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN \_\_\_\_\_

Üye : Doç. Dr. Perihan GÜLER \_\_\_\_\_

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. İhsan ULUER

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARININ MOLEKÜLER

#### TİPLENDİRİLMESİ

ÇALI, Rabia

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Haziran 2011, 96 sayfa

*Acinetobacter baumannii* hastane infeksiyonlarından sorumlu önemli bir fırsatçı patojendir. Hastalarda antibiyotik ve özellikle solunum yolu kateteri gibi yabancı madde kullanımının artması *Acinetobacter* türlerinin yoğun bakım ünitelerinde infeksiyon etkeni olarak daha fazla izole edilmesine sebep olmaktadır. Öyle ki, *Acinetobacter* spp. artık ülkemizde yoğun bakım servislerinde en sık rastlanan gram negatif infeksiyon etkenleri arasında yer almaktadır ve maalesef bu izolatlar antibiyotiklere yüksek oranda dirençli olarak bulunmaktadır.

Bu çalışmada Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi' nde 2009-2010 yılları arasında imipenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PZR) yöntemi kullanılarak tiplendirilmesi ve OXA-23 ve OXA-51 türevi enzimlerinin karbapeneme dirençli *A. baumannii*

populasyonlarındaki sıklığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Toplam 105 adet izolat çalışmaya alınmıştır.

105 izolatın hepsinde OXA-23 enzimi pozitif sonuç verirken, OXA-51 enzimi sadece 42, 87 ve 101 no'lu izolatlarda varlığı tespit edilememiş olup, diğer bütün izolatlarda pozitif sonuç vermiştir. İmipenem dirençli 105 adet *A. baumannii* izolatı arasındaki genetik uzaklıklar RAPD-PZR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *A. baumannii* izolatlarının RAPD-PZR işlemleri sayıları 2 ila 8 arasında değişen 100-2000 bp büyüklüğünde DNA fragmentleri içeren yedi farklı grup ortaya çıkarmıştır.

Bu bulgular, hastane infeksiyonlarından sorumlu imipenem dirençli *A. baumannii* izolatlarında OXA-23 ve OXA-51 karbapenemazların geniş yayılım gösterdiğini ve RAPD-PZR tekniğinin *Acinetobacter* infeksiyonlarının epidemiyolojik araştırmalarında, *A.baumannii* genomik identifikasyonlarında ve bakteriyel taksonomilerinde faydalı bir araç olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, RAPD-PZR, moleküler tiplendirme, OXA-23, OXA-51, karbapenemaz.

## ABSTRACT

### MOLECULAR TYPING OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLATES

ÇALI, Rabia

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

June 2011, 96 pages

*Acinetobacter baumannii* is an important opportunistic pathogen responsible for nosocomial infections. Usage of antibiotics and foreign materials such as respiratory tract catheters in intensive care units resulted to increased isolation this microorganism as the cause of infections. Accordingly, *Acinetobacter* are now among the top pathogens in Turkish intensive care units and moreover they are highly resistant to antibiotics.

In this study, it was aimed to genotyped the imipenem-resistant *A. baumannii* isolates by using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) method and to determined the prevalence of OXA-23 and OXA-51 types enzymes in the carbapenem-resistant *A. baumannii* populations between 2009 and 2010 in Ankara Training and Research Hospital. A total of 105 isolates were studied. All of 105 isolates were positive for the presence of OXA-23 enzyme while OXA-51 enzyme were not detected only the number of 42, 87 and 101

isolates. All other isolates gave positive results. In this study, the genetic distances between the isolates of the imipenem-resistant 105 *A. baumannii* were identified by using RAPD-PCR method. RAPD-PCR assay of *A. baumannii* isolates revealed seven different groups comprising of 2 to 8 DNA fragments of 100 to 2000 bp. RAPD-PCR fingerprinting technique may be useful tool for epidemiological investigation of *Acinetobacter* infections and in *A. baumannii* genomic identification and bacterial taxonomy.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, RAPD-PCR, molecular typing, OXA-23, OXA-51, carbapenemase.

## TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen, tez çalıŐmalarımın titizlikle yürütölmesini sağlayan tez danıŐmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN' e teşekkür ederim.

Tez konumun belirlenmesinde, kullanılan örneklerin elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ali Kudret ADİLOğLU' na ve Sayın Doç. Dr. A. Esra KARAKOÇ' a teşekkür ederim.

Tezimin deney aşamasında karşılaŐtıęım zorlukları gidermemi sağlayan, labarotuvuarlarını kullanımıma sunan, bilgi ve deneyimleri ile desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Gazi Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK' a çok teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanmasında bana destek olan arkadaşım Elif AYDOğDU' ya, tezimin birçok aşamasında yardım gördüğüm M. Zekai ERDAŐ' a ve son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Taksonomi ve Tarihçe .....	3
2.2. Morfolojik Özellikler .....	6
2.3. Virülans Özellikleri .....	7
2.4. Patogenez ve Yayılım.....	8
2.5. <i>Acinetobacter</i> Nedenli Hastane İnfeksiyonları .....	9
2.5.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları .....	9
2.5.2. Bakteriyemi .....	10
2.5.3. Menenjit.....	12



2.5.4. Üriner Sistem İnfeksiyonları.....	12
2.5.5. Diğer İnfeksiyonlar.....	13
2.6. Tedavi.....	14
2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	14
2.7.1. $\beta$ -Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizması.....	16
2.8. Tiplendirme Yöntemleri.....	18
2.8.1. Fenotiplendirme.....	19
2.8.1.1. Biyotiplendirme.....	19
2.8.1.2. Serotiplendirme.....	20
2.8.1.3. Bakteriyofaj Tiplendirme.....	20
2.8.1.4. Antibiyotik Duyarlılık Özellikleri (Antibiyogram).....	20
2.8.1.5. Protein Profilleri.....	21
2.8.2. Genotipik Yöntemler (Moleküler Yöntemler).....	22
2.8.2.1. Plazmid Profili.....	22
2.8.2.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	23
2.8.2.3. Ribotiplendirme.....	23
2.8.2.4 Pulse Field Jel Elektrofrezisi (PFGE).....	25
2.8.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( PZR).....	26
2.8.2.6. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD).....	27

<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Materyal</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.1. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Toplanması</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.2. Kimyasal Maddeler</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.3. Mikroorganizmaların İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri</b> ....	<b>30</b>
<b>3.1.4. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Çözeltiler</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve</b> <b>Çözeltiler</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.6. Agaroz Jel Elektforezi İçin Kullanılan Çözeltiler</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1.7. Sterilizasyon</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2. Yöntem</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2.1. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının İzolasyonu ve Tanımlanması</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2.2. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının DNA İzolasyonu</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir</b> <b>Reaksiyonu</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2.4. OXA-23 ve OXA-51 <math>\beta</math>-Laktamaz Enzimlerinin Polimeraz Zincir</b> <b>Reaksiyonu</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2.5. Agaroz Jel Elektforezi</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2.6. Genetik Uzaklık Tayini</b> .....	<b>37</b>

<b>4. SONUÇLAR.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1. <i>A.baumannii</i> İzolatlarının RAPD-PZR Yöntemi İle Elde Edilen</b>	
<b>Sonuçları ve Türlerin Birbirlerine Göre Genetik Uzaklıklarının</b>	
<b>Belirlenmesi .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının OXA-23 ve OXA-51 <math>\beta</math>-Laktamaz</b>	
<b>Enzimlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları.....</b>	<b>53</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>55</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>65</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Acinetobacter</i> ' lerin Sınıflandırılması.....	5
3.1. İmipenem Dirençli <i>A. baumannii</i> Türünün Kliniklerde Yatan Hastalara Göre Dağılımı.....	29
3.2. Çalışmada Kullanılan Primerler.....	32
4.1. İzole Edilen <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Kliniklere ve Örneklerle Göre Dağılımı.....	38
4.2. Bakteri Örneklerinin İzole Edildikleri Klinikler.....	40
4.3. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Genetik Uzaklıkları (%).....	50
4.3. (Devam) <i>A. baumannii</i> İzolatlarının Genetik Uzaklıkları (%).....	51

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. a. <i>A. baumannii</i> ' nin Elektron Mikroskopundaki Görüntüsü. b. <i>A. baumannii</i> ' nin Gram Boyanması. c. <i>A. baumannii</i> ' nin Kanlı Agardaki Görünümü.....	6
4.1. İmipenem Dirençli <i>A. baumannii</i> Türünün Kliniklerde Yatan Hastalara Göre Dağılımının Daire Grafikte Gösterilmesi.....	39
4.2. Hastalardan Elde Edilen Örneklerin Oranları.....	39
4.3. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının (1-52 arası) OPA11 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	42
4.3. (Devam) <i>A. baumannii</i> İzolatlarının (53-105 arası) OPA11 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	43
4.4. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının (1-52 arası) OPA14 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	44
4.4. (Devam) <i>A. baumannii</i> İzolatlarının (53-105 arası) OPA14 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	45
4.5. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının (1-52 arası) OPB05 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi .....	46
4.5. (Devam) <i>A. baumannii</i> İzolatlarının (53-105 arası) OPB05 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	47
4.6. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının (1-52 arası) M13 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	48
4.6. (Devam) <i>A. baumannii</i> İzolatlarının (53-105arası) M13 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	49

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam ediyor)

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
4.7. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının RAPD-PZR Sonuçlarına Göre Elde Edilen Genetik Uzaklık Dendrogramı.....	52
4.8. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının OXA-23 Primeri İle Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi.....	53
4.9. <i>A. baumannii</i> İzolatlarının OXA-51 Primeri İle Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi.....	54

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER DİZİNİ

$\beta$	Beta
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ m	Mikrometre

### KISALTMALAR DİZİNİ

Antibiyogram	Antibiyotik Duyarlılık Özellikleri
bp	Baz Çifti
BOS	Beyin-Omurilik Sıvısı
ÇAD	Çoğul Antibiyotik Direnci
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin-tetra-asetik Asit
EMB	Eosin-Metilen Blue
HCl	Hidroklorik asit
kb	Kilobaz
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
PBP	Penisilin Bağlayan Proteinler
PFGE	Pulse Field Jel Elektroforezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

## KISALTMALAR DİZİNİ (Devam ediyor)

rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris Asetat Tamponu
TSI	Üç Şekerli Demirli Besiyeri
YB	Yoğun Bakım



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son 20 yıl içinde gelişmiş ülkelerde çoklu antibiyotik direnci gösteren gram negatif basillerin hastane infeksiyonlarının kontrol edilmesinde önemli bir sorun oluşturduğu kanıtlanmıştır. *Acinetobacter* spp., *Maltophilia*, *Stenotrophomonas (Xanthomonas)*, *Pseudomonas aerogenosa*' yı da içine alan gram negatif basillerde geniş spektrumlu antibiyotiklerle yapılan tedavi girişimi 1970' li yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesinde dirençli üyelerin görülme sıklığında artışa yol açmıştır [1].

Hastaneye başvuran hastalarda infeksiyon ve kolonizasyonda *Acinetobacter* spp. önemli rol oynamaktadır. Yoğun bakım hastalarında, özellikle ventilatör ilişkili pnömonide baskın rol oynarken sekonder menenjit, üriner sistem infeksiyonları, bakteriyemi gibi hastane infeksiyonlarından da sorumludur [1]. Hastane infeksiyonları hastanede kalış süresini uzatmakta, ek maliyet oluşturmakta ve ölümlere yol açmaktadır [2].

*Acinetobacter* türleri içinde hastane infeksiyonuna neden olan en önemli etken *A. baumannii*' dir [3]. Hastane infeksiyonunda *Acinetobacter* türlerinin sık rastlanmasının nedeni dış ortamda canlılıklarını uzun süre koruması ve antibiyotiklere çoğul direnç kazanabilmesidir [1,4]. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanımı sonucunda antibiyotiklerin çoğuna dirençli *Acinetobacter* türlerinin oluşabileceği ve tedavisinin güçleşebileceği düşünülmektedir [5, 6].

Yoğun bakım ünitesinde bulunan ve solunum desteği alan, bağışıklık sistemi zayıf, uzun süre antibiyotik tedavisi gören hastalarda *Acinetobacter*' lerin hastane infeksiyonu oluşturması dikkati çekmektedir [7].

*Acinetobacter*' ler doğada toprak, su ve insan derisinden izole edilebilir. Genellikle aksilla (koltuk altı), kasık gibi nemli bölgelerde kolonize olup sağlıklı bireylerin de normal deri florasında bulunan gram negatif bakterilerdir. Uzun süre cansız ortamda hayatta kalması salgınlar oluşturmasında önemli bir faktördür. *Acinetobacter* türlerinin dış ortamda, deri ve mukozalarda bulunması epidemiyolojik çalışma yapılmasını güçleştirmektedir [8-10].

Çalışmanın amacı; Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi' nde 2009-2010 yılları arasında nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak izole edilmiş imipenem dirençli *A. baumannii* izolatlarının, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PZR) yöntemi kullanılarak tiplendirilmesi ve *Acinetobacter* türlerinde beta-laktam direncinin temel sebebi olan OXA türü beta-laktamaz enzimlerinden OXA-23 ve OXA-51 türevi enzimlerini tarayarak karbapeneme dirençli *A. baumannii* populasyonlarının sıklığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Acinetobacter* türlerinin canlılıklarını sürdürebilmesi için gereksinimlerini minimum düzeyde tutması gerekir. Ayrıca değişik karbon kaynaklarını kullanabilmesi dış ortamda saprofit olarak bulunmasına yardımcı olmaktadır [11-13]. Koltuk altı, kasık gibi nemli bölgelerin yanı sıra derinin normal florasında da bulunmaktadır [1]. Çevresel ortamlar dikkate alındığında *Acinetobacter* türleri hastane havası, tansiyon aleti, yatak, kateter, ventilasyon cihazından da izole edilmiştir [1,14]. Hastane personelinin derisinde devamlı olarak bulunan en yaygın gram negatif mikroorganizma *Acinetobacter* türleridir [1]. Bakterinin uzun süre canlı kalması kuruluğa olan dayanıklılığındandır. 21 gün ile 30 gün kuru ortamda canlılıklarını korurlar [15]. Değişik sıcaklık ve pH' larda da yaşayabilmesi dayanıklılığının göstergesidir [16].

*Acinetobacter* infeksiyonları her bölgede bulunabilmekle birlikte solunum sistemi, deri ve yarada fazlaca görülür. Solunum yolundan izole edilenlerin büyük bir kısmı infeksiyon değil kolonizasyon olarak düşünülür [1,17]. Hasta bakımı sırasında deri taşıyıcılığı olanlar sağlık personelinin kontamine olmasına ve etkenin devamlı yayılmasına olanak sağlar [18].

### 2.1. Taksonomi ve Tarihçe

Günümüzde *Acinetobacter* cinsinin üyeleri pek çok taksonomik değişikliğe uğramıştır. İlk kez 1911 yılında, Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck tarafından

topraktan izole edilmiş olup *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırılan *Acinetobacter*' ler bu güne kadar en az 15 farklı isimle anılmıştır [19].

*Diplococcus mucosus* dahil [20], *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans* [21], *Mima polymorpha* [22], *Moraxella lwoffii* [23] , *Herellea vaginicola* [24], *Bacterium anitratum* [25], *Neisseria winogradskyi* [26], *Achromobacter anitratum* [27] ve *Achromobacter mucosus* [28] en bilinen örnekleridir. Baumann ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmaya göre, yukarıda listelenen farklı türlerin *Acinetobacter* olarak tek bir cins olduğu sonucuna varılmıştır ve fenotipik özelliklerine göre farklı türler içinde alt sınıflara ayırmanın mümkün olmadığı görülmüştür [29]. Bu bulgulara dayanarak, 1971 yılında *Moraxella* ve benzer bakterilerin sınıflandırılmasında *Acinetobacter* cinsi, resmi olarak kabul edilmiştir [30].

Bergey' in Sistematik Bakteriyoloji Kılavuzu (Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology)' nun 1974 yılı baskısında, *Acinetobacter* cinsi, *Acinetobacter calcoaceticus* türü ile incelenmiştir [31]. Daha yeni taksonomik verilere dayanarak, *Acinetobacter* cinsi *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilgili diğer mikroorganizmalarla birlikte Gammaproteobacteria sınıfında Moraxellaceae ailesi içinde yer almaktadır [32] (Çizelge 2.1).

Cinsin uzun ve karmaşık tarihinde Bouvet ve Grimont tarafından 1986 yılında yeni bir atılım yapılmış ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına dayanarak, 12 genetik tür tanımlanmıştır. Bunlardan, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* ve *A. lwoffii* türleri daha önce tanımlanan türlerdir [33-36].

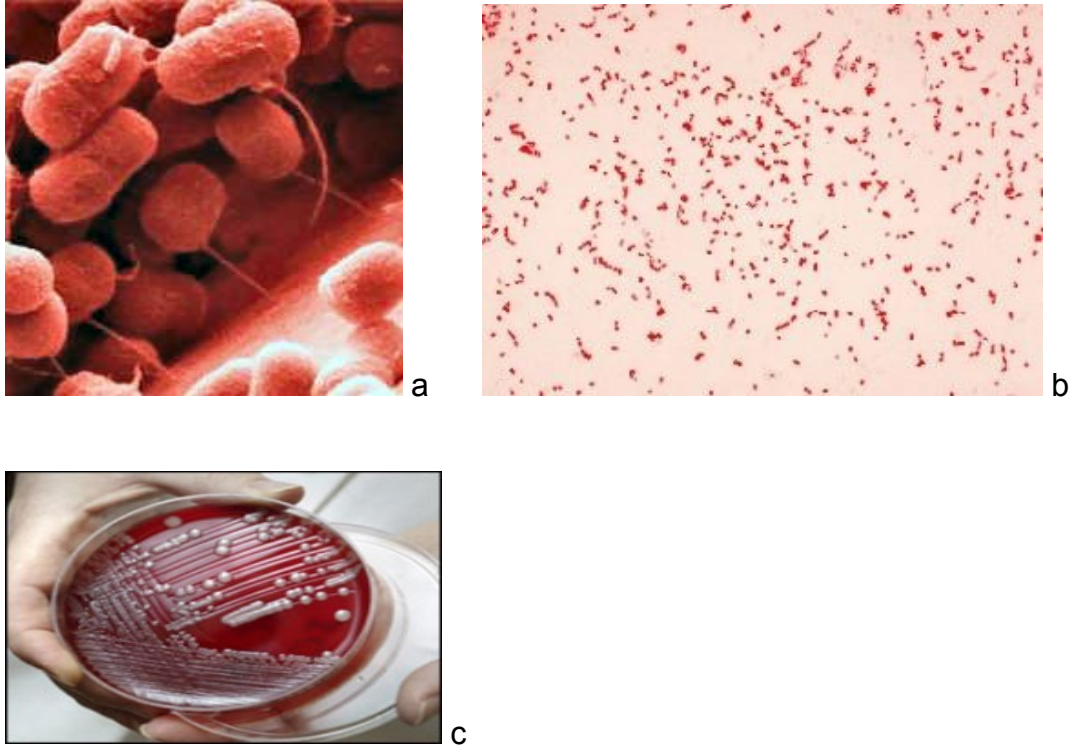
Yakın zamanda ise insan kaynaklı 3 tür, *A. parvus*, *A. schindleri*, *A. ursingii* [37,38] ve aktif çamurdan izole edilen 7 tür *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. towneri*, *A. tandoii* ve *A. gernerii* olmak üzere 10 *Acinetobacter* türü tanımlanmıştır [39].

**Çizelge 2.1.** *Acinetobacter*'lerin Sınıflandırılması

Bilimsel sınıflandırma	
Alem	Bacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Gammaprobacteria
Takım	Pseudomonadales
Aile	Moraxellaceae
Cins	<i>Acinetobacter</i> (DNA G+C oranı 39-47mol%)
Önemli Klinik Türler	<i>A. baumannii</i> <i>A. haemolyticus</i> <i>A. calcoaceticus</i> <i>A. Iwoffii</i>

## 2.2. Morfolojik Özellikler

*Acinetobacter*' ler Proteobacteria şubesine ait gram negatif bakteri cinsidir. *Acinetobacter*' ler hareketsiz, fermantasyon yapmayan, oksidaz negatif, katalaz pozitif, sitrat pozitif, kesinlikle aerob şartlarda büyüyen bakterilerdir. Seçici olmayan besiyerine ekildiği zaman kokobasil morfolojisi gösterirler. Kanlı agarda beyaz veya krem renkli pigmentli düz ya da mukoid (kapsül varlığında), opak, 1-2 mm çapında tipik bir morfolojiye sahiptirler. Diğer mikroorganizmaların büyümesini engellemek için seçici besiyeri kullanımı önerilmektedir [40,41] (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1. a.** *A. baumannii*' nin Elektron Mikroskobundaki Görüntüsü [42]. **b.** *A. baumannii*' nin Gram Boyanması [43]. **c.** *A. baumannii*' nin Kanlı Agardaki Görünümü [44].

Nonfermentatif bakterilerden ayrılması oksidaz testi ile yapılır [45]. Kamçıları (flagella) yoktur, saçak (fibrilla) mevcut iken üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit meydana getirmezler [1,12,46].

Kolay üreyen bir bakteri olup antiseptik şartlarda da canlılığını sürdürür. Plazmid ve kromozomal enzimleri olması onun birden fazla antibiyotiğe karşı direnç kazanmasına olanak sağlamaktadır [7].

### **2.3. Virülans Özellikleri**

*Acinetobacter'* ler virülansı düşük bakterilerdir. Bağışıklık sistemi güçlü bireylerde infeksiyon oluşturması zordur. Çoğunlukla hastane kökenli infeksiyonlarda en önemli fırsatçı patojenlerdendir. Kansere, yanık, yaş ve bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar infeksiyona zemin hazırlar. Ameliyat, yoğun bakımda kalma, ventilatöre bağlanma, uzun süreli antibiyotik kullanma, katater kullanımı, sonda kullanımı risk oluşturan faktörlerdir [45,47].

*Acinetobacter* spp. düşük virülanslı patojenler olarak kabul edilir, fakat bazen bu organizmaların bazı özellikleri virülans özelliklerini artırabilir. Bu özellikleri arasında şunlar yer alır [48-50].

- 1-D-glikoz, D-mannoz, L-ramnoz ve D-glukronik asitten oluşan bir polisakkarit kapsül varlığı bakteriyi dış etkenlerden korur. Damar içi katater, sonda gibi aletlere tutunmayı kolaylaştırır.
- 2-Fimbria veya/ve kapsüler polisakkarit varlığı epitel hücrelere yapışmayı kolaylaştırır.
- 3-Dokudaki lipitlerin yıkımına sebep olan enzimleri oluşturur.
- 4-Hücre duvarının lipopolisakkarit bileşeni ve lipid A varlığı potansiyel olarak toksik rol oynar.
- 5-Demir bağlayıcı dış zar reseptör proteinlerinin bulunması ile bakterinin ihtiyaç duyduğu demirin sağlanmasına imkan verilmektedir [45,51,52].

#### **2.4. Patogenez ve Yayılım**

Klinikte *Acinetobacter* infeksiyonları ile cerrahi aletlerinin kullanılması arasında ilişki olduğu saptanmıştır. İlk önceleri kolonize olan bakteri daha sonra infeksiyon oluşturabilir. Cerrahi girişim sonrası trakeal tüp, sonda, katater gibi tıbbi malzemelerinin kullanılması *Acinetobacter'* lerde kolonizasyona neden olmakta, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımında *Acinetobacter* infeksiyonu için risk faktörü oluşturmaktadır [14,53]. Hastane personelinin ellerinde %15-%33 oranında *Acinetobacter* türleri kolonize olup diğer hasta ve aletlere bulaştığı gösterilmiştir [47].



## 2.5. *Acinetobacter* Nedenli Hastane İnfeksiyonları

### 2.5.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları

Yoğun bakım ünitesinde hastane kaynaklı akciğer infeksiyonu salgınlarının *Acinetobacter* spp. kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Ventilatör ilişkili pnömonide *Acinetobacter* spp. büyük rol oynamaktadır. Pnömoni nedenini tanımlamak için kullanılan bakteriyolojik yöntem ne olursa olsun, hastane kaynaklı pnömonilerin yaklaşık %3-5' ine *Acinetobacter* spp.' nin neden olduğu çeşitli çalışmalar bildirilmiştir [54,55].

Ulusal Hastane İnfeksiyon çalışmalarındaki pnömoni olgularında bu organizmanın 1990 – 1992 yılları arasında akciğer infeksiyonlarının %4' ünü oluşturduğu belirlenmiştir [56]. Spesifik tanı yöntemleri kullanarak, birçok araştırmacı *Acinetobacter* spp.' nin mekanik ventilasyon gerektiren yoğun bakım hastalarındaki pnömonide artan rolünü ortaya koymuştur. Mekanik ventilasyona bağlı hastalardan bronkoskopik yöntemlerle sınırlı sayıda saf örnekler elde edilmiştir [57,58]. Pnömonili hastalardan elde edilen örneklerde %15-24 *Acinetobacter* spp.' nin sorumlu olduğu görülmüştür. Diğer çalışmalarda %3-5 daha düşük infeksiyon sıklığı olduğu bildirilirken, bu veriler hastane kaynaklı pnömoniye, *Acinetobacter* spp.' nin neden olduğunu açıkça göstermektedir [54,55].

Ventilatör bağımlı hastaların solunum cihazlarını dezenfekte etmek için rutin kullanımda etkili prosedürler uygulanmasına ve çok büyük gelişmeler olmasına rağmen orandaki bu artış ilginç bir durum ortaya koymaktadır.

Yoğun bakımdaki 159 hastada 13 aylık bir dönemde 72 saat mekanik ventilasyon cihazına bağlı kalan hastalarda ventilator kullanımı ve *Acinetobacter* kaynaklı pnömoni oluşumu ortaya konulmaya çalışılmıştır [59]. Bu çalışmada 159 hastada %12 *A. baumannii* ile doğrudan ilişkili nozokomiyal pnömoni görülürken, vakalarının %27' sinde ventilatör ilişkili pnömoni oluşmaktadır. Ölüm oranları *Acinetobacter spp.*' den kaynaklanan nozokomiyal pnömoni için %30-75 olarak bildirilmiştir. En yüksek oranları ventilatör bağımlı hastalar olarak rapor edilmiştir. Her ne kadar istatistikler hastane kaynaklı pnömonide ventilatör bağımlı hastaların oranının yüksek olduğunu belirtse de ölüm sebebinde asıl kaynak *Acinetobacter spp.*' dir [57,58,60].

### **2.5.2. Bakteriyemi**

Bu hastalarda bakteriyemi nedeni solunum yolu infeksiyonudur. Travma ve yanıklarda tetikleyici etkiye sebeptir [1]. *Acinetobacter* türleri tek bir patojen olarak veya polimikrobiyal bakteriyeminin bir parçası olarak da bulunabilir. Bağışıklık sistemi zayıf hastalarda *Acinetobacter* türlerinin bakteriyemi oluşturma potansiyeli yüksektir. Bu hastalarda bakteriyemi kaynağı solunum yolu infeksiyonudur. Malign hastalıklar, travma, yanıklar, bakteriyemi kaynağını oluşturmada solunum yolu infeksiyonlarına eşlik eder.

Bakteriyemide ki ikinci önemli grup yenidoğanlardır. Japonya' da 30 aylık bir süre içinde yenidoğan yoğun bakım ünitesinde *Acinetobacter* septisemisi ile 19 yenidoğan rapor edilmiştir. Tüm olguların %11' inde [61] ölüm görülürken uzun süre yatan bebeklerde sepsis gözlenmiştir. Septiseminin nedeninin düşük doğum ağırlığı, antibiyotik tedavisi, mekanik ventilasyon ve neonatal konvülsiyonların varlığı olduğu belirtilmiştir. Tüm bebekler ciddi klinik belirtileri ve septik şok belirtileri gösterirken, gerekli solunum desteği ve uygun antibiyotiklerle sorunsuz bir şekilde tedavisi yapılmıştır. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde 31 aylık bir sürede *Acinetobacter* sepsisi dokuz olgu da izlenmiştir. Böylece *Acinetobacter* spp. yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde ciddi hastane infeksiyonlarına neden olanlar listesine eklenmiştir [62].

Cerrahi yara infeksiyonları *Acinetobacter* spp.' den kaynaklanır ve yetişkinler için risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Böyle yara infeksiyonları bakteriyemiye yol açabilir. Yanıklı hastalarda *Acinetobacter* kaynaklı bakteriyemiye tanımlayan raporlar da mevcuttur [63,64].

Çeşitli çalışmalarda vasküler kataterizasyon ve *Acinetobacter* infeksiyonu arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir [65,66]. Kırksekiz saatte bir katater değişimi *Acinetobacter* infeksiyon riskini azaltabilir [67].

Genel olarak altta yatan hastalık, hastanın prognozunu belirlemede etkili görülmektedir. Malign hastalığı olan ve yanıkları bulunan hastaların prognozu daha kötü iken, travmalı hastalar daha iyi bir prognoza sahiptir [68].

### 2.5.3. Menenjit

Mortalite oranı %20 ile %27 arasında değişirken hastaların büyük kısmını yetişkin erkekler ile nöroşurujik müdahale geçiren hastalar meydana getirmektedir.

Ventrikülostomi, aşırı antibiyotik kullanımı, 5 günden fazla ventriküler katater kullanımı menenjit gelişiminde önem oluşturmaktadır. 1967 yılına kadar yaklaşık 60 civarında toplum kökenli *Acinetobacter* menenjit vakaları rapor edilmiştir. Ancak 1979 yılından bu yana, vakaların büyük çoğunluğunu, hastane infeksiyonları oluşturmaktadır [60,69,70].

*Acinetobacter* türleri ile meydana gelen nozokomiyal menenjit vakalarında beyin omurilik sıvısı pürülan menenjit özelliği gösterir. Klinik bulgu olarak genellikle bayılma ve genel durumda bozulma göze çarparken, ense sertliği nadiren görülen bir bulgudur [1,71,72].

Birincil menenjit sporadik vakalar arasında bildirilmesine rağmen özellikle beyin cerrahisi veya kafa travması ardından, ikincil menenjit ortaya çıkmaktadır [73].

### 2.5.4. Üriner Sistem İnfeksiyonları

*Acinetobacter* spp. nadiren hastane kaynaklı idrar yolu infeksiyonuna neden olmaktadır. Yoğun bakım hastalarında, yaşlı, bakıma muhtaç hastalarda ve sürekli idrar katateri olan hastalarda sık olarak görülmektedir.

Erkeklerde prostat büyümesinde kataterin tercih edilmesi infeksiyonda erkeklerin büyük çoğunlukta olmasına yol açmaktadır. Sürekli idrar sondası kullanan hastalarda gelişen idrar yolu infeksiyonu ile *Acinetobacter* spp.'nin neden olduğu infeksiyon arasındaki ayrımın iyi yapılması gereklidir [60,74,75,76] .

### 2.5.5. Diğer İnfeksiyonlar

Çene ile ilgili cerrahi girişimlerde, açık kalp cerrahisi sonrası enfektif endokardite nadir de olsa *Acinetobacter* spp.'nin neden olduğu bildirilmiştir [77]. *Acinetobacter* kaynaklı enfektif endokarditi ile diğer mikroorganizmaların neden olduğu enfektif endokarditi klinik olarak birbirinden ayırmak oldukça güçtür.

*Acinetobacter* spp. sürekli ayaktan periton diyalizi uygulanan hastalarda peritonite neden olabilmektedir. Hastanede uygulanan tekniklerdeki yetersizlik ve diyabet altta yatan risk faktörleridir. En sık görülen belirtiler karın ağrısı veya bulanık diyalizat ve bazı hastalarda ateş görülmesidir. Çoğu hastada periton diyalizi bırakmadan antibiyotik tedavisine yanıt vermektedir [78-80].

*Acinetobacter'* ler kolanjit, malign hastalığı veya koledokolitiazis kaynaklanan tıkanma sarılığı olan yaşlı hastalarda, septik komplikasyonlarda öncelikle yer alan patojenler içinde bildirilmiştir.

Travma sonrası göz infeksiyonlarında kontakt lens kullanılması ve korneanın değiştirilmesi sonrasında gelişen göz infeksiyonlarında en büyük neden olarak *Acinetobacter* spp. yer almaktadır [81-84].

## 2.6. Tedavi

Antibiyotiklere duyarlı olan *A. baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde geniş spektrumlu sefalosporin, beta laktamlar, aminoglikozid ile birlikte kullanılan karbapenemler yer alır. *A. baumannii*' de çoğul antibiyotik direnci olması nedeniyle infeksiyonun tedavisi oldukça zordur.

Çoğul antibiyotik direnci gösteren izolatların yol açtığı infeksiyonlarda antibiyotik kullanma seçeneği sınırlanırken karbapenem, sulbaktam ve kolistin etkisi yüksek olan antibiyotikler arasında yer almaktadır [85-87,88]. Son zamanlarda *Acinetobacter*' lerin oluşturduğu infeksiyonlarda imipeneme direncin arttığı da gözlenmektedir [89,90].

## 2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Tıbbi ve bilimsel araştırmalar, *Acinetobacter* spp.' de bulunan antibiyotik direnç oranlarının yüksek olduğunu bildirmektedir [91-95]. Yoğun bakım ünitesindeki hastane infeksiyonları ile hastaların tedavisi sırasında çıkan problemler çoğul antibiyotik direnci oluşması nedeniyledir.

1970' lere kadar *Acinetobacter* nedenli hastane infeksiyonlarında gentamisin, minosiklin, nalidiksik asit, ampisilin veya karbenisilin ve antibiyotik kombinasyonları ile başarılı sonuçlar alınırken 1971 ve 1974 yılları arasında gelişen antibiyotik direnci ile başarı oranı azalmıştır. 1975 yılından bu yana, *Acinetobacter* spp.' nin klinik direncinde artış görülmektedir [96-99].

İzolatlar yüksek oranlarda antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmiştir. *Acinetobacter'* ler klinikte kullanılan birçok antibakteriyel ilaçlara aminopenisilinlere, ureidopenisilinlere, dar spektrumlu (sefalotine) ve genişletilmiş spektrumlu (sefamandole) sefalosporinler [98,100], sefoksitin sefamisin [96], kloramfenikol, tetrasiklinlere dayanıklı hale gelmiştir [101].

Yakın zamana kadar, imipenem izolatların %100' ün de etkinken ne yazık ki, hastane salgınlarında son zamanda kapsamlı analizlerle imipenem dirençli izolatların ortaya çıktığı bildirilmektedir [102,103]. Bu durum *Acinetobacter'* lerde tedavi sürecindeki başarıyı tehdit etmektedir.

*Acinetobacter'* ler toprak ortamında uzun süre canlı kalabilen hızlı antibiyotik direnç geliştirme eğiliminde olan bir cinstir. Antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile hastane ortamında *Acinetobacter* spp. patojen olarak ortaya çıkmaktadır. Kromozomal gen transferi *Acinetobacter* spp.' de de gösterilmiştir [104-106]. Konjugasyon bu cinsin üyeleri arasında antibiyotik direnç genlerinin transferinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir [107,108]. Plazmid ve transpozonlar, *Acinetobacter'* ler ve prokaryotik organizmaların biyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır [109].

*Acinetobacter*' lerin %80' inde farklı moleküler büyüklüğüne sahip plazmidler bildirilmiştir [109-111]. Klinik örneklerdeki *A. baumannii* izolatlarının antibiyotik direncinde plazmid aracılı transferin rol aldığı öne sürülmüştür. Birden fazla antibiyotik direnç geni taşıyan transpozonlar *Acinetobacter* spp.' den izole edilmiştir [109].

### 2.7.1. $\beta$ -Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizması

$\beta$ -laktamlar beta laktam halkası içeren bakteri hücre duvarının sentezini durdurarak antibakteriyel aktivitesi olan antibiyotik grubudur [112]. Penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemleri içeren  $\beta$ -laktam antibiyotikler, peptidoglikan transpeptidazı geri dönüşümsüz olarak aktifliğini gidererek bakteride hücre bölünmesini engeller. Transpeptidazlar bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan polimerlerin çapraz bağlarını parçalar. Bu polimerizasyonun engellenmesi hücre ölümüne yol açar [113,114].

Beta laktamazlar ise tamamiyle bakteriyel kökenli enzimlerdir ve beta laktam antibiyotiklerini etkisiz hale getirirler ve beta laktam antibiyotiklerinin ölümcül etkisine karşı organizmayı korurlar. Bu enzimler beta laktam antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin birincil sebebidir [115,116].  $\beta$ -laktamazlar,  $\beta$ -laktamların etkisini siklik amid bağını parçalayarak yok eden enzimlerdir. Enzim faaliyeti ile beta laktam halkası hidrolize edilerek parçalanır ve ilaç etkisiz hale getirilir. Hidroliz siklik amid ( $=C-N$ ) bağına bir  $H_2O$  molekülü eklenmesi ile gerçekleşir.



Beta laktamazlar aminosit dizisine göre A, B, C, D olmak üzere 4 farklı moleküler sınıf olarak gruplandırılırlar [117,118]. Sınıf A, C ve D  $\beta$ -laktamazlar,  $\beta$ -laktam ilaçlarını etkisiz hale getirmek için aktif serin kökünü kullanırlar [119]. Moleküler sınıf B olarak gösterilen enzimler katalitik aktiviteleri için çinko gerektiren metallo enzimlerdir ve tamamen farklı bir mekanizma ile çalışırlar [120,121]. Her dört sınıfında kromozomal ve plazmid kökenli temsilcileri vardır [122]. Sınıf A serin penisilinazlar, Sınıf B metallo-enzimler, Sınıf C serin sefalosporinazlar ve Sınıf D oksasilini hidrolize eden serin beta laktamazları içermektedir [123,124].

*Acinetobacter* türlerinde beta laktamlara 3 şekilde direnç gelişmektedir [1,125].

- 1- Penisilin bağlayan proteinlerde oluşan değişiklikler ile gelişen direnç
- 2- Dış geçirgenliğinde azalma
- 3- Plazmid ve kromozomal kaynaklı beta laktamaz üretimi

Penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) oluşan değişikliklerle gelişen direnç kromozomal mutasyon sonucu meydana gelir. Bu ya PBP' nin beta laktamlara ilgisinin azalması ile ya PBP sayısına eksilmesi yada beta laktamlara ilgisi az olan yeni PBP sentezlenmesi ile gerçekleşir (126). Bakterilerde 2 grup penisilin bağlayan proteinler saptanmıştır. Bunlar düşük molekül ağırlıklı PBP (D-D-Karboksipeptidaz) ve yüksek molekül ağırlıklı PBP (transpeptidaz ve transglikolizaz)' dir [127].

Dış zar proteinleri ya da PBP' lerdeki değişiklik geçirgenliğin azalmasına bu da karbapenem direncinin oluşmasına yol açar. Karbapenemazlar *A. baumannii*' de direnç oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır [128-130].

*Acinetobacter* spp.' de Sınıf D karbapenemazlar dört alt gruba ayrılmıştır. OXA-23, OXA-27 ve OXA-49 birinci alt grubu, OXA-24, OXA-25, OXA-26 ve OXA-40 ikinci alt grubu, OXA-51 üçüncü alt grubu, OXA-58 dördüncü alt grubu oluşturmaktadır.

*Acinetobacter* türlerinde en sık OXA-51, OXA-58 ve OXA-23 bulunmaktadır [131,132]. OXA-51 enzimi zayıf bir enzim olup az salgılanması nedeniyle direnç oluşturmayabilir. Fakat iyi bir promotor ile desteklendiğinde salgılanma oranı yükselir ve direnç meydana getirir. OXA-51 ilk defa klinik *A.baumannii* izolatlarında Arjantin' de belirlenmiş ve OXA-51 geninin kromozom kaynaklı olduğu ileri sürülmüştür [133].

$\beta$ -laktamazlar direnç oluşumunda tek sebep olmayıp hücre duvarının geçirgenliğindeki azalmada direncin oluşumuna neden olmaktadır [45,134].

## **2.8. Tiplendirme Yöntemleri**

Salgınlara değerlendirilmesinde olgular arasındaki ilişkinin doğru biçimde ortaya konulması önemlidir. Yeterli epidemiyolojik veri varlığında seçilecek en uygun alt tiplendirme yöntemiyle salgına neden olan izolatların birbiriyle ilişkileri araştırılmalıdır. Alt tiplendirme veya izolat sınıflandırılması olarak ifade edilen tiplendirmede bazı fenotipik ve genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır [135,136].

Tiplendirme yöntemleri standartize edilmiş, duyarlı ve özgül olmalı ayrıca tüm tiplendirme sistemlerinin tekrar edilebilirliği, ayırım gücü, uygulama ve değerlendirme kolaylığı belirlenmiş olmalıdır. Fenotipik yöntemler moleküler yöntemlerle kıyaslandığında, ayırım gücünün daha yüksek olduğu ve birçok türe uygulanabilir olduğu görülmüştür [137,138].

### **2.8.1. Fenotiplendirme**

Fenotipik tiplendirme yöntemlerinin başlıcaları; biyotiplendirme, serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirme, antibiyotik duyarlılık özellikleri (antibiyogram), ve protein profillerine dayalı sistemleri içine alan tekniklerin kapsamlı bir incelemesidir [1].

#### **2.8.1.1. Biyotiplendirme**

Bakterilerin üreme yetenekleri ve biyokimyasal özelliklerinin kullanıldığı tiplendirme metodudur. Mutasyonların biyokimyasal özellikler üzerindeki etkisi bu yöntemin dezavantajıdır. Bu durum bu yöntemin ayırım gücünü zayıflatmaktadır [138].

İkili özellikleri içeren biyokimyasal profiller, izolatların karşılaştırmalı tiplendirilmesi için kullanılır (sonuç pozitif veya negatif olarak belirtilir) [139]. Towner ve ark. [139] API 20NE sistemini kullanarak 122 farklı *Acinetobacter* izolatını 31 farklı biyotipe ayırmışlardır [139]. Fakat bu sistemin duyarlılık ve tekrarlanabilirliği bazen sorun yaratabilmektedir [140].

### **2.8.1.2. Serotiplendirme**

Bakteri yüzeyinde yer alan antijene özgü antikorları kullanma esasına dayanan bir yöntemdir [137,138]. Serotiplendirme yöntemine göre *Acinetobacter* izolatları için çok sayıda çalışma yapılmış, ancak sınırlı sayıda başarı elde edilmiştir. Bu nedenle epidemiyolojik olarak tanımlanan türlerin DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile desteklenmesi yararlı olmaktadır [21,141,142].

### **2.8.1.3. Bakteriyofaj Tiplendirme**

Fransa ve diğer Avrupa ülkelerinden elde edilen epidemiyolojik çalışmalarda çok sayıda farklı *Acinetobacter* fajları tanımlanmıştır. Bazı salgınlarda 17 ve 124 numaralı predominant faj tipleri tespit edilmiştir.

Ancak, bu sistem yalnızca Paris' te Pasteur Enstitüsünde faj fiplendirme merkezinde yapılmaktadır. Bu yöntem zaman alıcı olsada diğer yöntemlerle birlikte kullanıldığında etkili bir yöntem haline getirilebilir [91,143-147].

### **2.8.1.4. Antibiyotik Duyarlılık Özellikleri (Antibiyogram)**

Antibiyotik duyarlılık özellikleri, izolatların benzerliklerine göre gruplandırmak ve direnç gelişimini tespit etmek için kullanılmaktadır. Genellikle minimal inhibitör konsantrasyon (MIK), breakpoint (kesme noktası) ve disk difüzyon zon değerleri kullanılmaktadır. Tiplendirme için antibiyogram sonuçlarının

diğer yöntemlerle ve epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bazen benzer olmayan izolatlar aynı antibiyogram profilini gösterirken, bazen de infeksiyon atakları sırasında duyarlılık profilleri değişmektedir [9,95,148-151].

#### **2.8.1.5. Protein Profilleri**

*Acinetobacter* türleri ile ilgili epidemiyolojik ve taksonomik çalışmalarda hem hücre duvarı proteini hem de total hücre proteinleri kullanılmıştır. Hücre duvarı proteinlerinin sodyum dodezil sülfat poliakrilamid jel elektroforezindeki analizinde epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlarda benzer profiller bulunurken, ilişkisiz izolatlarda farklılıklar gözlenmiştir. Bu yöntem hastane salgınlarında ve endemik ataklarda başarı ile uygulanabilmektedir.

Tüm hücre proteinlerinin elektroforetik analizi örnek hazırlama aşamasında hücre duvarı proteinlerine kıyasla daha basit olması nedeniyle daha avantajlıdır. Bazı çalışmalarda *Acinetobacter* salgın izolatları arasında benzerlik saptanırken, ilişkisiz kontrol izolatlarında uyumsuzluk olduğu gösterilmiştir. Fakat diğer fenotipik temelli yöntemlerde olduğu gibi farklı kaynaklardan gelen izolatlardaki farklılıklar açısından dikkatli olunması gerekmektedir [152,153].

## 2.8.2. Genotipik Yöntemler (Moleküler Yöntemler)

Farklı kaynaklardan köken alan genomik olarak ilişkisiz örneklerin ayrılmasında, infeksiyon halkasının bir parçası olarak ortak atadan köken alan örnekler arasındaki ilişkiyi açıklamak için genotipik yöntemlere başvurulmaktadır [154].

Moleküler tiplendirme yöntemleri; plazmid profili, Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), ribotiplendirme, pulse field jel elektroforezi (PFGE), Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli yöntemler.

### 2.8.2.1. Plazmid Profili

Plazmid profili analizi, bakterilerde bulunan plazmidlerin sayı ve molekül ağırlıklarındaki benzerlikleri ortaya koyan ve *Acinetobacter* izolatlarının epidemiyolojik tiplendirilmesinde başarıyla kullanılan hızlı ve basit bir yöntemdir [155].

*Acinetobacter* türlerinde bulunan plazmidler hem moleküler ağırlık hem de sayıca farklılık göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* türlerine ait 13 izolatta 1-4 adet 2.1 - 100 kb büyüklüğünde plazmide rastlanmıştır [156].

Plazmid profilleri analizi *Acinetobacter* infeksiyonu salgınlarının belirlenmesinde yararlı olmaktadır [67,140,150,157].

İyi bir yöntem olmasına rağmen bir çok plazmidin kazanılıp kaybedilmesi bu yöntemin dezavantajıdır. *Acinetobacter*' lerin epidemiyolojik çalışmalarında diğer moleküler yöntemlerle desteklenmesi halinde daha faydalı bir yöntem haline gelmektedir [158].

#### **2.8.2.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

Yöntemde mikroorganizmaların yoğun kültürlerinden elde edilen veya moleküler yöntemlerle çoğaltılan kromozomal DNA, uygun restriksiyon enzimiyle kesildikten sonra agaroz elektroforeziyle DNA parçalarının ayrıştırılması sağlanmaktadır. Yöntem, tekrarlanabilirliği yüksek, kolay, hızlı ve ucuzdur. Fakat restriksiyon enziminin kromozomal DNA' da çok sayıda kesim yapması sonucu oluşan fazla sayıdaki bantlarının değerlendirilmesinde sıkıntılar vardır. Bu sıkıntılar aşmak için oluşan bantların belirli bir kısmıyla hibridizasyona girebilecek problardan yararlanılmaktadır. Bunun için agarozdaki DNA parçalarının denatüre edilmesi, naylon membrana aktarılması ve işaretli problarla hibridizasyonu yapılmaktadır. Probla hibridize olan DNA parçalarının oluşturduğu bant profili değerlendirilmektedir [135,155,159].

#### **2.8.2.3. Ribotiplendirme**

Bakteriyel genom polimorfizminin Southern-blot analizi ile gösterilmesinin en yaygın kullanım şeklidir. Tekrarlanabilirlik ve stabilitesi iyi olan bir yöntemdir. Ayrım gücü orta seviyededir. Her tür için uygun enzimler seçilmeli ve iki ya da

üç enzimin kullanılmasıyla ayırt edicilik arttırılmalıdır. Zaman alıcı ve oyalayıcıdır.16S ve 23S rRNA' yı kodlayan genleri kısmen ya da tamamen içeren genomik DNA restriksiyon fragmentlerinin analizidir. Türler arasında ribozomal RNA' nın alt birimlerini kodlayan genler bakteri kromozomu boyunca dağılmaktadır ve bunların arasındaki DNA dizilimleri farklı uzunluklarda olabilmektedir.

Endonükleaz enzimlerle kromozomal DNA' nın kesilmesi sonucunda oluşan parçalar ribozomal RNA probuyla hibridizasyona sokulduğunda, kökene özgü DNA bant profilleri elde edilmektedir.

rRNA' yı kodlayan genler çok korunmuş olduğundan tek bir proba (16S ve 23S rRNA *Escherichia coli* - universal prob) tüm bakterilerin alt tiplenebilirliği yapılabilmektedir.

Ayrıca, bakterilerin çoğu çok sayıda ribozomal operon içerdiğinden elde edilen fragmentler türler içi ve türler arası ayırma yetecek sayıdadır. Bu yöntem yaygın olarak *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Neisseria meningitidis* ve Enterobacteriaceae üyeleri gibi birçok gram negatif bakterinin tiplendirilmesinde kullanılmakla birlikte, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* gibi gram pozitif bakteriler için de kullanılmaktadır [135,155,160].



#### **2.8.2.4 Pulse Field Jel Elektroforezi (PFGE)**

Agaroz içine gömülü haldeki bakteri ve ökaryotik hücrelerden yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen kromozomun, restriksiyon enzim profilinin belirlenmesi esasına dayanır. Geleneksel agaroz jel elektroforezinde 40-50 kilobaz (kb)' dan daha büyük DNA parçaları ayırt edilememektedir.

Büyük parçaların yürütülmesi, akım yönünün periyodik bir şekilde değiştirilmesiyle mümkün olabilmektedir. PFGE' de belirli aralıklarla elektrik akımının yönü değiştirilerek restriksiyon enzimiyle kesilmiş kromozomal DNA' dan oluşan 10-800 kb arasında uzunluğa sahip parçalar, etkin bir şekilde ayrılmakta ve bunun neticesinde yaklaşık 5-20 kadar, farklı büyüklükte DNA bant profili ortaya çıkmaktadır [155].

Yöntemde; DNA izolasyonu ve restriksiyon enzimi ile kesim işlemleri agaroz kalıpları içinde yapılmakta, daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak agaroz içindeki uygun çukurlara yerleştirilerek belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tutulmaktadır.

Halen birçok gram pozitif ve gram negatif bakteri ile mayaların tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında zaman alıcı ve laboratuvarlarının kurulması pahalıdır. Laboratuvarda sonuçların bir kaç gün sonra çıkması ve kalifiye elemana gerek duyulması bakımından zahmetli bir yöntemdir.

Ancak üstün adaptasyon kolaylığı, tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü nedenleriyle majör nozokomiyal patojenlerin ve bazı toplum kaynaklı patojenlerin tiplendirilmesinde geçerli olan bir tiplendirme yöntemidir [161].

#### **2.8.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), özel bir DNA segmentinin hücreden ayrı ortamlarda milyonlarca kopyasının enzimatik sentezini içerir. İlk kez 1985 yılında Mullis tarafından geliştirilen PZR' nin bulunması hem araştırma hem de klinik laboratuvarlarda sürdürülen DNA analiz yöntemlerini değiştirmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu; DNA' nın denatüre olması, iki oligonükleotid primerinin DNA' daki hedef bölgeye bağlanması ve zincir uzaması olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. DNA' nın denatürasyonundan sonra her bir primer denatüre olmuş zincirlerin birine bağlanır ve zincir uzaması 5'→3' yönünde devam eder. Zincir uzaması DNA polimeraz ile gerçekleşir.

DNA' nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve DNA' nın sentezinden oluşan bu üç aşama bir tek PZR döngüsünü teşkil eder. Denatürasyon 94°C-96°C, primerlerin bağlanması 37°C-65°C, DNA' nın sentezi ise 72°C sıcaklıklarda gerçekleşir. Bu döngü yaklaşık 45 kez tekrarlanır.

Sonuç olarak tekrarlanan denatürasyon, primer bağlanması ve zincir uzaması reaksiyonları ile istenilen bölgenin milyon kez çoğaltılması sağlanır. PZR ürününün uzunluğu iki primerin ve hedef DNA bölgesinin uzunluğunun toplamına eşit uzunluktadır [162-164].

Moleküler seviyedeki genetik araştırmalarda genel problem fenotipik varyasyonların temelini teşkil eden özel DNA dizi farklılıklarının belirlenmesidir. Bu amaçla geliştirilen PZR çok hassas bir yöntemdir.

PZR' nin gelişimi ile birlikte genetik farklılıkların belirlenmesi ve tanımlanması için pek çok moleküler teknik geliştirilmektedir [165].

Sistemik problemlerin çözümünde farklı DNA temelli sistemlerle genotipin doğrudan ya da dolaylı olarak belirlenmesi hedeflenmiştir. DNA temelli analizler, sorun çözümünde umut verici bir yol olarak ön plana çıkmaktadır. PZR, bu analizlerin temelini oluşturmaktadır [163,166,167].

#### **2.8.2.6. Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)**

1990 yılında Williams ve arkadaşları [168], Welsh ve McClelland [169], DNA dizilerinin bilinmesine gerek duyulmayan polimorfizmin belirlenmesi için PZR' a dayalı bir yöntem tanımlamışlardır.

Rastgele oğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) belirleyicileri tek, kısa ve rastgele oligonükleotid primerler kullanarak bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılmasına dayanır. Bu yöntem duyarlı, hızlı ve çok sayıdaki örneğe uygulanabilen bir tekniktir. Bu primerler genetik belirleyici olarak ve zgn nükleotid dizi bilgilerinin olmadığı zamanlarda polimorfizmi belirler ve genetik haritaların oluşturulmasında kullanılabilir.

RAPD yöntemi RFLP' nin teknik olarak pek çok sınırlayıcı özelliğini ortadan kaldırmıştır. Bu teknik cinslerdeki populasyon genetiği çalışmalarını içeren pek çok genetik analizlerde de kullanılır [170-173].

RAPD işleminin bazı örneklerde genomik DNA' daki tek bir baz değişikliğini bile belirleyebileceğine inanılmaktadır. Aynı uzunluktaki bir DNA segmenti bir bireyde çoğalma yaparken diğerinde yapamayacağından dolayı hemen hemen bütün RAPD belirleyicileri dominanttır [174].

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. *A.baumannii* İzolatlarının Toplanması

Bu çalışmada, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 2009-2010 yılları arasındaki çeşitli kliniklerde yatan 105 hastadan imipenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastadan tek bir materyal olacak şekilde örnek alınmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** İmipenem Dirençli *A. baumannii* Türünün Kliniklerde Yatan Hastalara Göre Dağılımı.

Klinikler	Hasta Sayısı	Yüzde (%)
Anestezi Reanimasyon YB	43	41
Beyin Cerrahi YB	11	10
Nöroloji YB	26	25
Dahiliye Servisi	10	9
Plastik Cerrahi	5	5
Ortopedi Servisi	3	3
Dermatoloji servisi	1	1
Göz hastalıklar servisi	1	1
Acil Servis	5	5
<b>T O P L A M</b>	<b>105</b>	<b>100</b>

YB : Yoğun Bakım

### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

Bu alışmada, Tris, EDTA, sodyum dodesil sülfat (SDS), kloroform, hidroklorikasit (HCl) gibi maddeler Merck, etidyum bromür, bromofenol mavisi Carlo ERBA, agaroz Sigma-Aldrich Chemie GmbH firmalarından elde edilmiştir.

Taq polimeraz tamponu ve Taq polimeraz MBI Fermentas, Fermantas Ltd., Vilnius, Lithuania firmasından alınmıştır. Çalışmada kullanılan primerler, Operon dizilerinden seçilmiş ve Heliks firması tarafından Ella Biotec GmbH' de sentezlettirilmif ve liyofilize formda teslim alınmıştır.

### 3.1.3. Mikroorganizmaların İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

**Kanlı Agar:** 37 gr Plasmatec marka blood agar base tartılarak hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda karıştırılarak, 121 °C' de 15 dakika steril edilmiş ve steril petrilere dökülerek kulanıma hazır hale getirilmiştir.

**Eosin-Metilen Blue Agar (EMB):** Toz EMB (Oxoid, İngiltere)' den 37,5 gr tartılarak hacim distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda karıştırılarak, 121 °C' de 15 dakika steril edilmiş ve steril petrilere dökülerek kulanıma hazır hale getirilmiştir.

### 3.1.4. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Çözeltiler

- Stok Tris çözeltisi: 500 mM Tris ( pH 8).
- Stok EDTA çözeltisi: 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra-asetik asit disodyum tuzu) (pH 8).
- Ekstraksiyon tamponu (PK çözeltisi): 1 mg/ml proteinaz K, 0.2 M EDTA, 0.1 M Tris HCl ( pH 8.0), %1 SDS (sodyum dodesil sülfat)
- Fenol
- Kloroform
- Sodyum Asetat: 3M Sodyum Asetat
- %90 Etanol
- %70' lik Alkol
- TE tamponu: 10mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA (pH 8).

### 3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- Taq polimeraz tamponu 10x: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 1 mg/ml jelatin
- MgCl<sub>2</sub>: 25 mM
- Nükleotit Karışımı: 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- Taq polimeraz: 5 u/ µl
- Primerler: Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.2' de verilmiştir.

- **Çizelge 3.2.** Çalışmada Kullanılan Primerler.

Primer adı	Primer dizisi 5'→3'
OPA11	CAATCGCCGT
OPA14	TCTGTGCTGG
OPB05	TGCGCCCTTC
M13	GAGGGTGGCGGTTCT
OXA23F	CCCGAGTCAGATTGTTC
OXA23R	TCCATCTGGCTGCTCAA
OXA51F	ATGAACATTAACACTCTTACT
OXA51R	TATAAAATACCTAATTGTTC

**3.1.6. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler**

- Agaroz: %2' lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.
- Tris asetat (TAE) tamponu (x50) (pH 8): 242 g Tris base, 57,1 ml Glisial asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8), saf su.
- Yükleme tamponu: %40 sukroz, %0,025 bromofenol mavisi, %0,25 ksilen siyanol.
- Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

**3.1.7. Sterilizasyon**

Steril kullanılması gereken tüm tampon, çözelti ve besiyerleri, 121 °C' de 15 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur.



## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. *A. baumannii* İzolatlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Çeşitli kliniklerde yatan hastalardan gelen örnekler kanlı agar ve EMB besiyerlerine ekilerek bir gece 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen koloniler, aerobik, gram negatif, hareketsiz, diblokok veya kokobasil morfolojisinde, katalaz pozitif, oksidaz negatif bakteriler *Acinetobacter* şüphesiyle ileri tanımlama (identifikasyon) testlerine alınmıştır. *Acinetobacter* izolatları, VITEK 2 KOMPACT 60 (bioMerieux, Fransa) cihazında izolatların tür düzeyinde tanımlanmaları ve antibiyogram duyarlılık testleri yapılmıştır.

### 3.2.2. *A. baumannii* İzolatlarının DNA İzolasyonu

*Acinetobacter baumannii* izolatlarının DNA izolasyonu Welsh ve arkadaşları [175]' na göre yapılmıştır.

1-(-)20 °C' de muhafaza edilen saf kültür bakteri örneklerinin sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır ve etüvde McFarland 0.5 oluncaya kadar inkübasyona tabi tutulmuştur.

2-Daha sonra kanlı agara ekimi yapılarak bir gece etüv de bekletilmiştir. Saf kültür olarak kanlı agarda üreyen koloniler DNA izolasyonu için steril suda toplanmıştır.

3-DNA izolasyonu için steril su içerisinde toplanan bakteriler 7000 rpm' de 10 dk. santrüfj edilmiştir ve dikkatlice üst sıvı içinde dezenfektan bulunan kaba dökülmüştür.

- 4-Pellet üzerine 3 ml TE tamponu eklenerek karıştırılmış ve tekrar santrüfj edilerek üst sıvı dökülmüştür.
- 5-Pellete 200 µl TE tamponu eklenerek süspanse edilmiştir. Üzerine 200 µl PK (Proteinaz K solüsyonu) ve 10 µl proteinaz K eklenip dikkatlice karıştırılmıştır.
- 6-Karışım 50 °C' de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 7-Solüsyona 3 ml TE ekleyip iyice karıştırıldıktan sonra 400 µl si 1,5 ml' lik santrüfj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 400 µl fenol konulmuştur. Karışım vortekslenedikten sonra 12.000xg' de 5 dk. santrüfj edilmiştir.
- 8-Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak, üzerine 400 µl kloroform eklenip vortekslenmiş ve 12.000xg' de 5 dk. santrüfj edilmiştir.
- 9-Üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine toplanan sıvı hacminin 1/10 kadar 3 M Sodyum asetat ve iki katı kadar %90' lık alkol eklenip karıştırılmıştır.
- 10-Bu karışım -20 °C' de 30-60 dakika bekletilmiş ve 14.000xg' de 10 dk. santrüfj edilerek DNA çöktürülmüştür.
- 11-Üst kısmı atılarak DNA pelleti üzerine 1000 µl %70' lik etanol eklenerek 14.000xg' de 10 dk. santrüfj edilmiş ve üst kısmındaki alkol atılmıştır.
- 12-DNA pelleti oda ısısında kurutulup 50 µl steril TE tamponu ilave edilmiştir.
- 13-DNA konsantrasyonu 50 ng/ µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

### 3.2.3. Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAPD-PZR uygulamaları için Açık ve arkadaşları [176] tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Çizelge 3.2' de baz dizimleri verilen rastgele seçilmiş primerlerin her biri ile hedef DNA' nın herhangi bir bölümü rastgele çoğaltılmıştır.

Uygulanan PZR programı aşamaları aşağıdaki gibidir;

- Denatürasyon aşaması; 96 °C' de 40 saniye
- Bağlanma aşaması; 30 °C' de 40 saniye
- Uzama aşaması; 72 °C' de 40 saniye olarak uygulanmıştır.

Denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları 45 döngü olarak tekrarlanmıştır. Elde edilen PZR ürünleri –20 °C' de saklanmış ve agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir.

### 3.2.4. OXA-23 ve OXA-51 β-Laktamaz Enzimlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çalışmada izole edilen *A. baumannii* izolatlarında OXA-23 ve OXA-51 β-laktamaz enzimlerinin varlığı Zong ve Valenzuela [177,178] tarafından uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Enzimlerin belirlenmesinde kullanılan primerler Çizelge 3.2.' de belirtilmiştir. Uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu aşamaları aşağıdaki gibidir;

OXA-23  $\beta$ -laktamaz enzimi için uygulanan PZR programı [177]

- Başlangıç denatürasyonu; 94 °C' de 5 dakika
- İleri denatürasyon aşaması; 94 °C' de 30 saniye
- Bağlanma aşaması; 46 °C' de 45 saniye
- Uzama aşaması; 72 °C' de 1 dakika olarak uygulanmıştır.

İleri denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları 35 döngü olarak tekrarlanmıştır.

OXA-51  $\beta$ -laktamaz enzimi için uygulanan PZR programı [178]

- Başlangıç denatürasyonu; 94 °C' de 5 dakika
- İleri denatürasyon aşaması; 94 °C' de 30 saniye
- Bağlanma aşaması; 48 °C' de 45 saniye
- Uzama aşaması; 72 °C' de 1 dakika olarak uygulanmıştır.

İleri denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları 35 döngü olarak tekrarlanmıştır.

### **3.2.5. Agaroz jel elektroforezi**

Kullanılan elektroforez (BIORAD) yatay konumda olup jel plaklarının büyüklüğü 20x 20 cm' dir. %2 (w/v) agaroz, TAE (Tris + Asetik Asit + EDTA) tamponu içine eklenmiş ve mikrodalgada homojen bir çözelti haline getirilmiştir. DNA' nın UV altında görünür hale gelmesini sağlamak için jel çözeltisine 1  $\mu$ l etidyum bromür eklenmiş ve plağa dökülmüştür [179].

Jel polimerleştikten sonra 10 µl PZR ürünü ile yükleme tamponu karıştırılarak jelde oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir ve 90 V serbest akımda DNA Ladder (Fermentas, Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, ready-to use SM 0321) ile birlikte yürütölmüştür. Jeller UV translüminatör (BioDoc) üzerinde göröntölenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

### **3.2.6. Genetik uzaklık tayini**

Bu çalışma boyunca *A. baumannii* izolatlarına ait agaroz jeller üzerinde her bir izolatın bant örneklerinin varlığı (1) ve yokluğu (0) sayılmıştır. İzolatlar arasındaki genetik benzerlikler Bio1D++ bilgisayar programı kullanılarak Nei'nin homolojisine göre hesaplanmıştır. Kümeleme analizi UPGMA kullanılarak yapılmıştır.

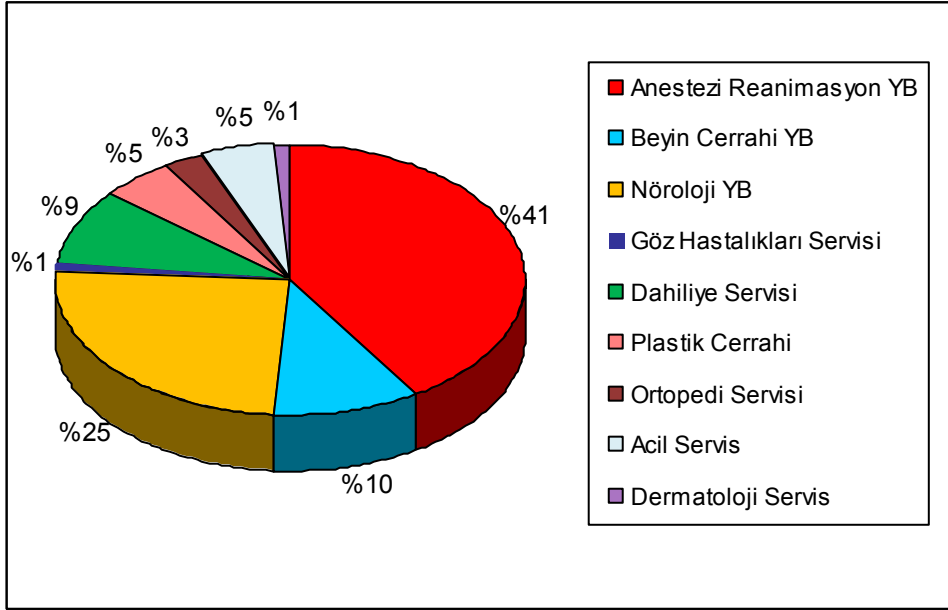
#### 4. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 2009-2010 yılları arasındaki çeşitli kliniklerde yatan 105 adet hastadan elde edilen imipenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.1.** İzole Edilen *A. baumannii* İzolatlarının Kliniklere ve Örneklerle Göre Dağılımı

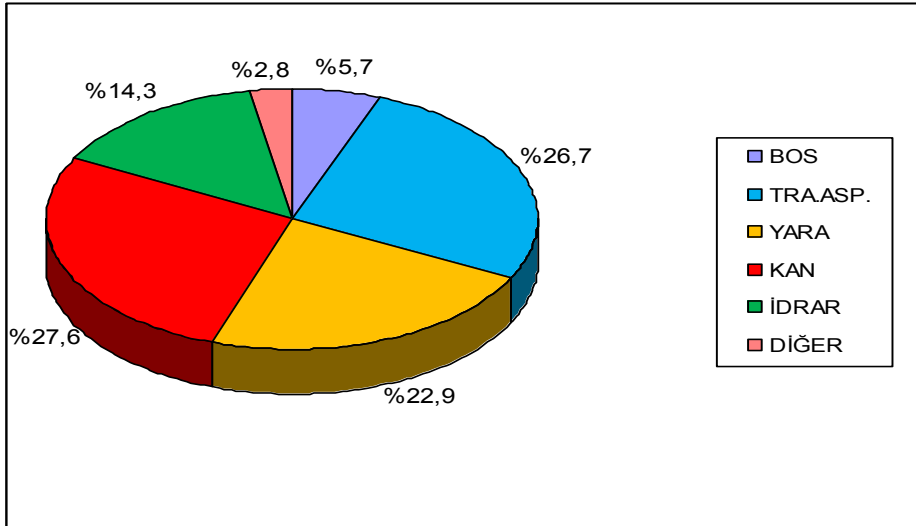
Klinik	ÖRNEK						Toplam Örnek sayısı
	Kan	Trakeal aspirat	Yara	İdrar	Bos	Diğer materyal	
Anestezi Reanimasyon YB	14	19	5	4	-	1	43
Nöroloji YB	10	5	5	6	-	-	26
Dahiliye Servisi	2	3	1	3	-	1	10
Dermatoloji Servisi	-	-	1	-	-	-	1
Beyin Cerrahisi YB	2	1	1	1	6	-	11
Plastik Cerrahi Servisi	-	-	5	-	-	-	5
Acil Servis	1	-	3	1	-	-	5
Ortopedi	-	-	3	-	-	-	3
Göz Hast. Servisi	-	-	-	-	-	1	1
<b>Toplam</b>	<b>29</b>	<b>28</b>	<b>24</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>105</b>

(Diğer materyaller: Konjunktiva, Balgam, Anaerob kültür)



**Şekil 4.1.** İmipenem Dirençli *A. baumannii* Türünün Kliniklerde Yatan Hastalara Göre Dağılımının Daire Grafikte Gösterilmesi.

Hastalardan elde edilen örneklerden %27.6 kan ilk sırayı alırken, %26.7 trakeal aspirat, %22.9 yara, , %14.3 idrar, %5.7 bos, %2.8 diğer materyaller oluşturmaktadır. Çalışılan örneklerin yüzdeleri Şekil 4.2.' de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** Hastalardan Elde Edilen Örneklerin Oranları

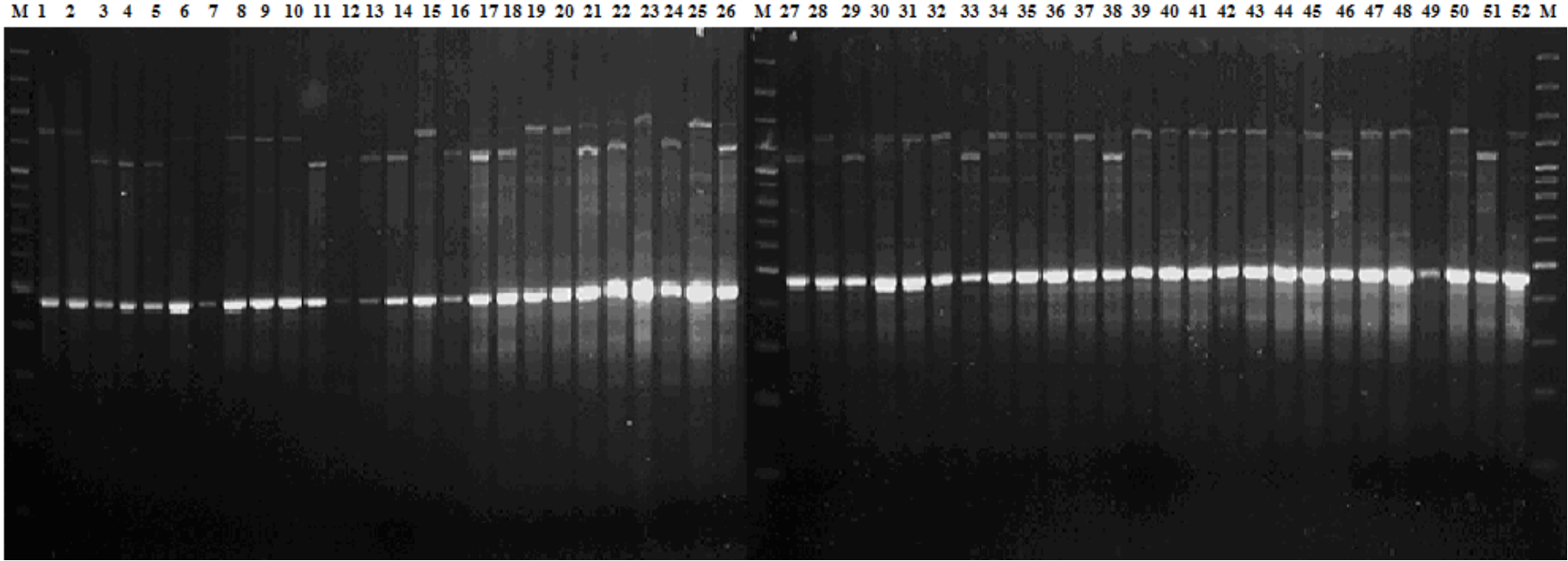
**Çizelge 4.2.** Bakteri Örneklerinin İzole Edildikleri Klinikler

<b>Bakterinin İzole Edildiği Klinikler</b>	<b>Kliniklerden İzole Edilen Bakteri Örnek Numaraları</b>
Anestezi Reanimasyon YB	9, 10, 12, 14, 15, 22, 23, 24, 25, 26, 32, 34, 38, 40, 41, 42, 46, 50, 53, 55, 57, 58, 59, 61, 65, 68, 70, 72, 73, 76, 78, 80, 86, 88, 89, 91, 92, 96, 97, 98, 99, 102, 104
Nöroloji YB	2, 3, 4, 8, 11, 18, 20, 31, 33, 35, 36, 37, 44, 45, 47, 52, 60, 64, 66, 71, 74, 77, 79, 82, 84, 94
Dahiliye Servisi	5, 16, 27, 28, 30, 43, 51, 62, 67, 95
Dermatoloji Servisi	83
Beyin Cerrahi YB	1, 19, 29, 39, 48, 69, 75, 81, 100, 103, 105
Plastik Cerrahi Servisi	13, 63, 85, 87, 93
Acil Servis	6, 17, 21, 54, 56
Göz Hastalıkları Servisi	7
Ortopedi	49, 90, 101



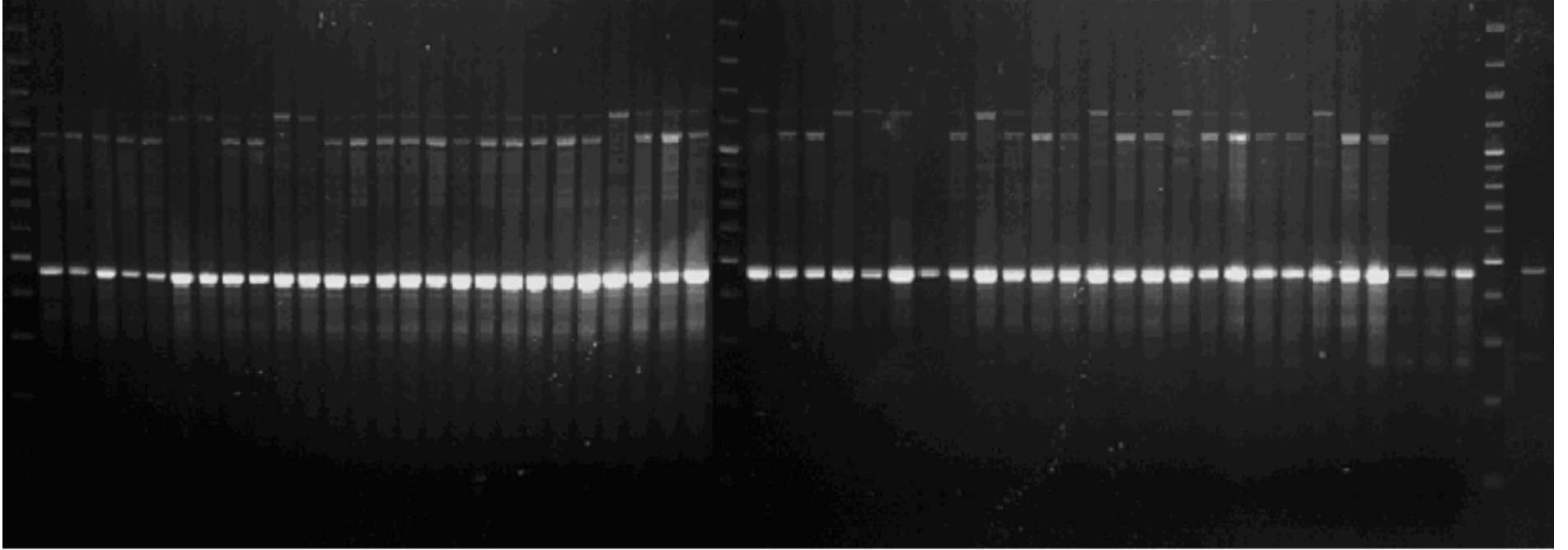
#### **4.1. *A.baumannii* İzolatlarının RAPD-PZR Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçları ve Türlerin Birbirlerine Göre Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi**

Bu çalışmada kullanılan 105 adet *A.baumannii* izolatının genomik DNA izolasyonları yapılarak, rastgele seçilmiş dört primer (OPA11, OPA14, OPB05, M13) ile yapılan RAPD-PZR işlemlerinin sonucunda izolatların hepsi pozitif reaksiyon vermiştir. Bu primerler ile elde edilen RAPD-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile elde edilen görüntüleri Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6' de verilmiştir. Dört primer ile yapılan PZR ile ortaya çıkan DNA bantları birbirleri ile karşılaştırılarak türlerin genetik uzaklıkları (Çizelge 4.3) POPGEN bilgisayar programı ile hesaplanmış ve genetik benzerliği gösteren dendrogram çıkarılmıştır (Şekil 4.7).

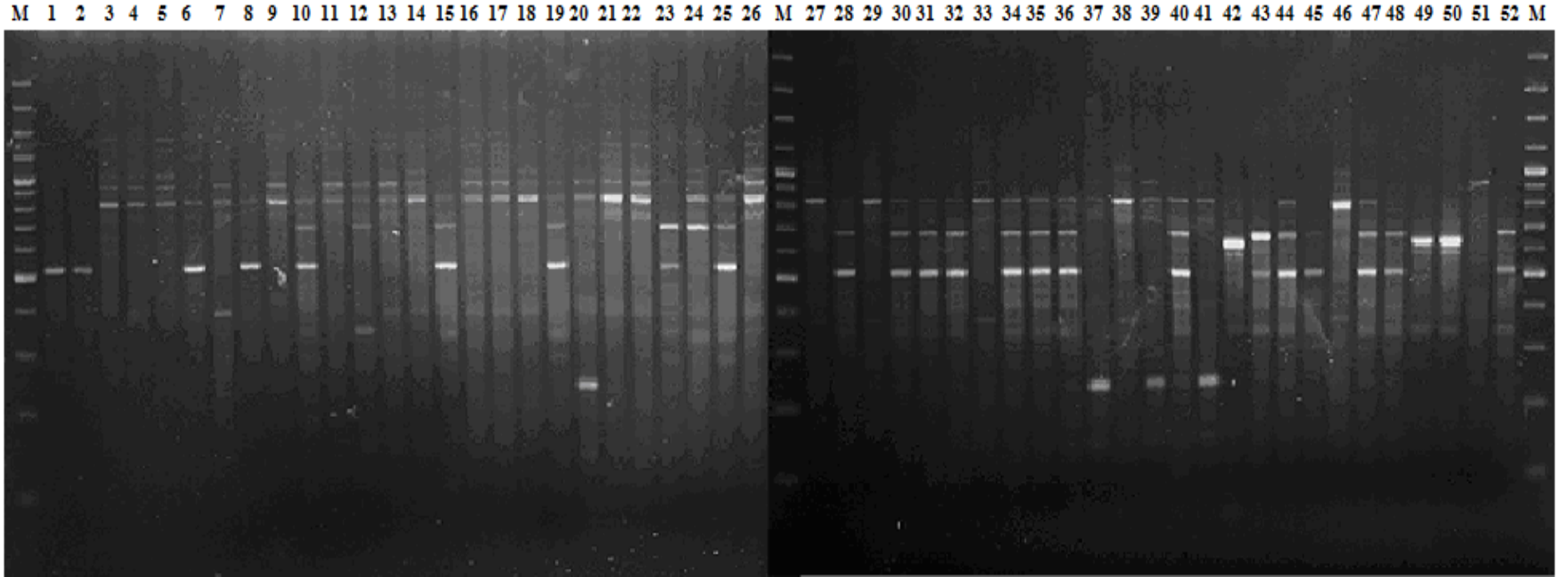


**Şekil 4.3.** *A. baumannii* İzolatlarının (1-52 arası) OPA11 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz jel Elektroforezi (**M: Marker**; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

M 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 M 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 M 105

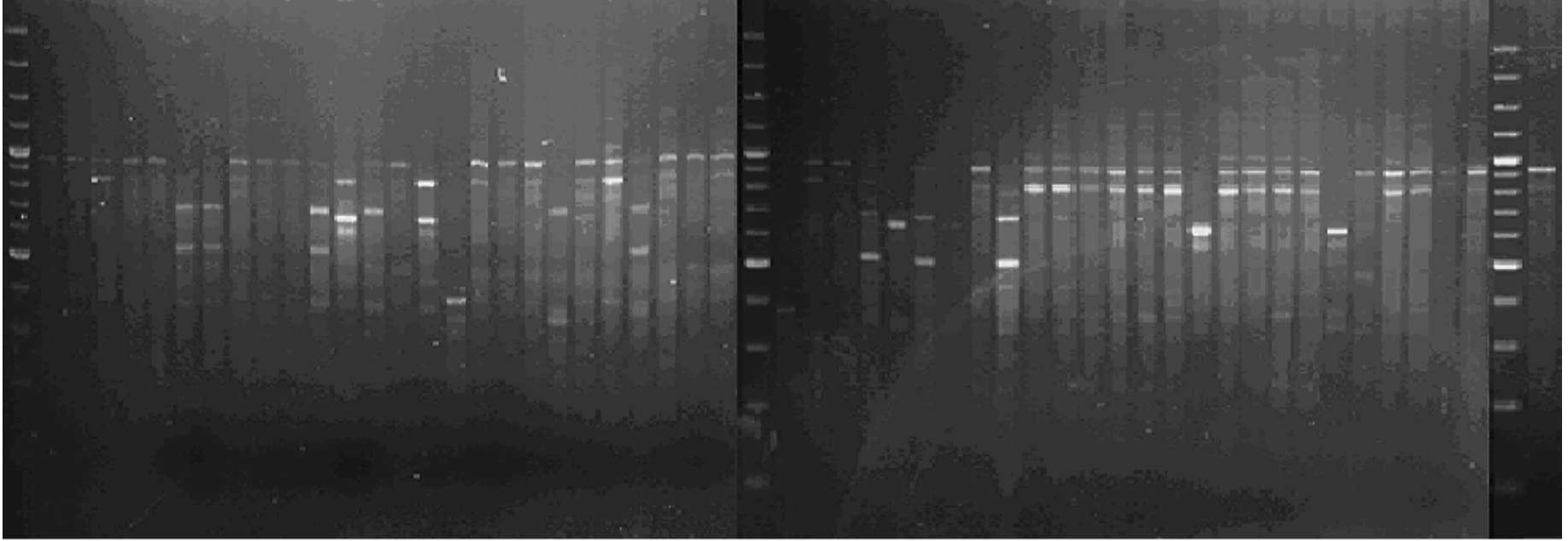


**Şekil 4.3. (Devam)** *A. baumannii* İzolatlarının (53-105 arası) OPA11 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi (**M: Marker**; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200,1000, 900, 800, 700, 600,500, 400, 300, 200, 100 bp).



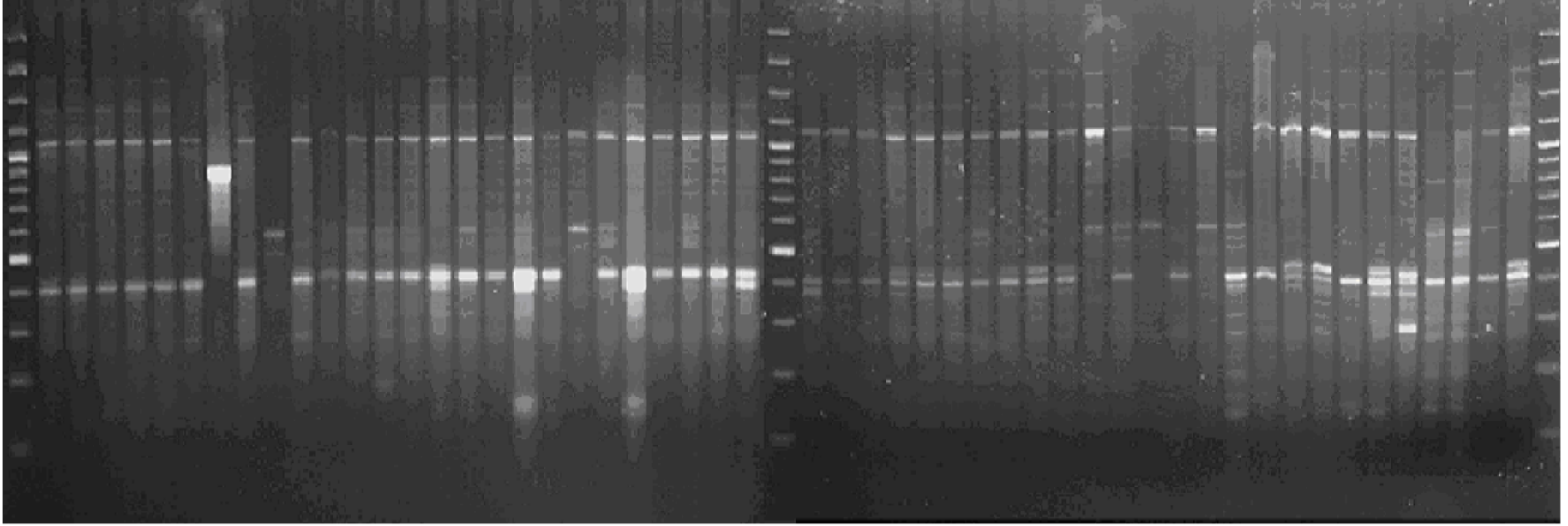
**Şekil 4.4.** *A. baumannii* İzolatlarının (1-52 arası) OPA14 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi (**M: Marker**; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200,1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp).

M 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 M 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 M 105

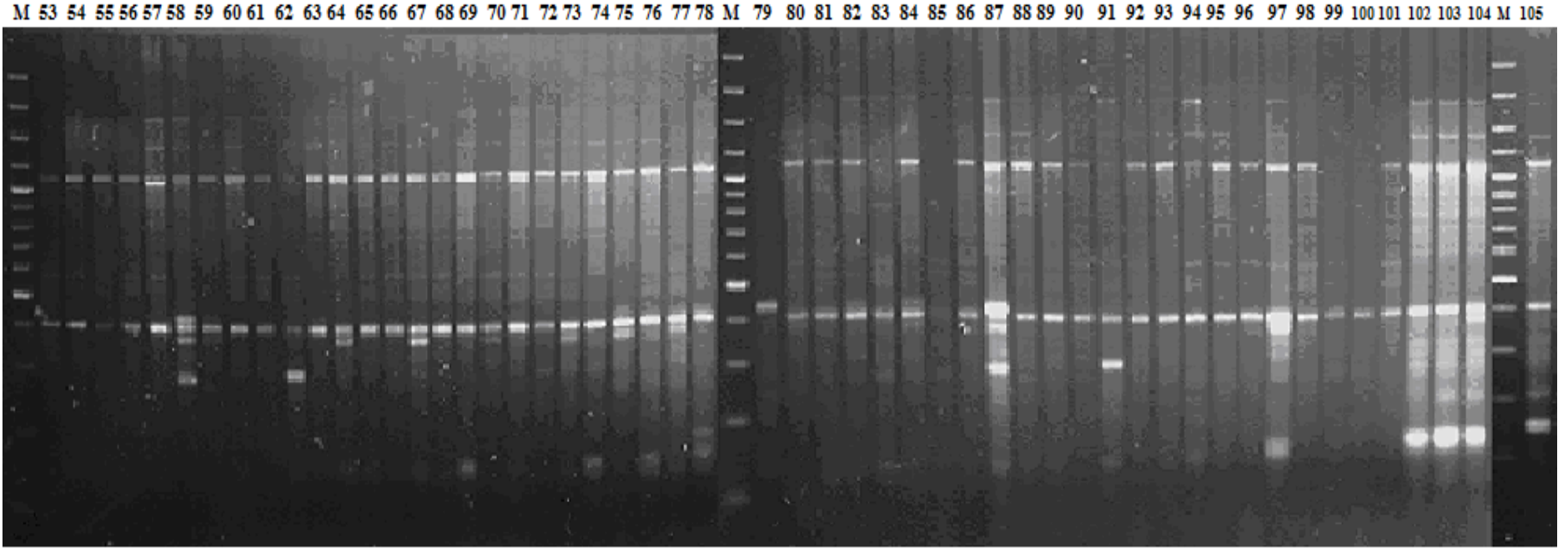


**Şekil 4.4. (Devam)** *A. baumannii* İzolatlarının (53-105 arası) OPA14 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi (**M: Marker**; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 M

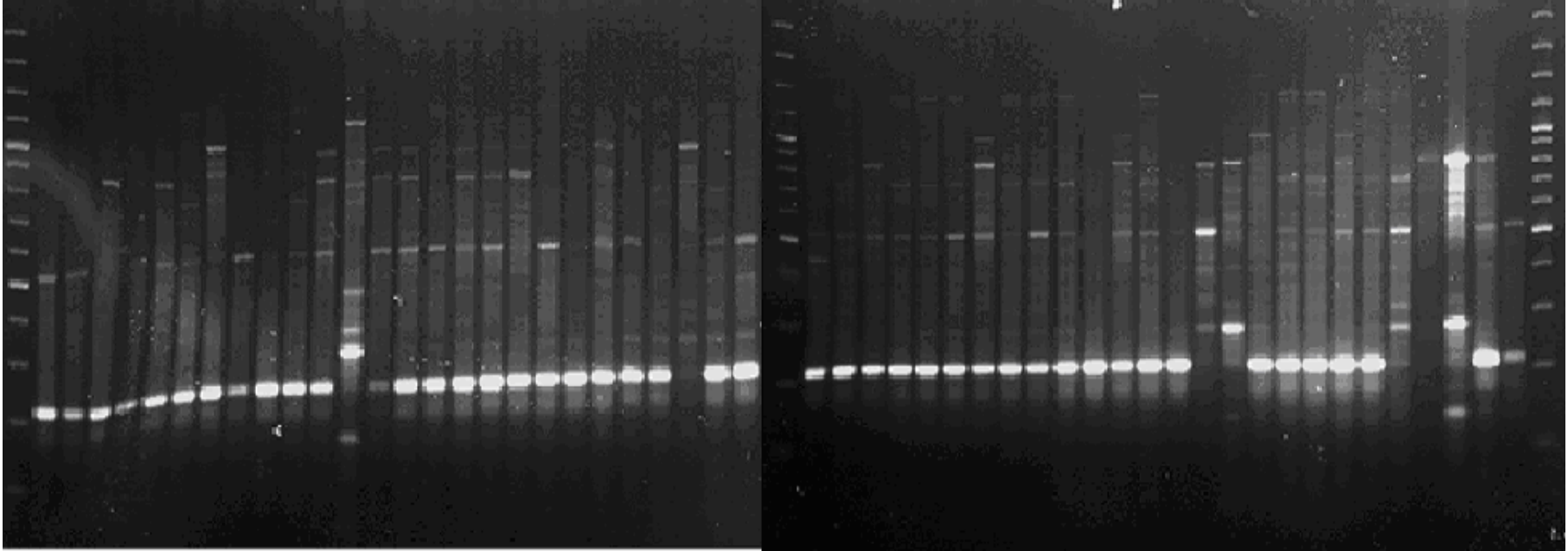


**Şekil 4.5.** *A. baumannii* İzolatlarının (1-52 arası) OPB05 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi (M: Marker; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100bp).



**Şekil 4.5. (Devam)** *A. baumannii* İzolatlarının (53-105 arası) OPB05 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi (**M: Marker**; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

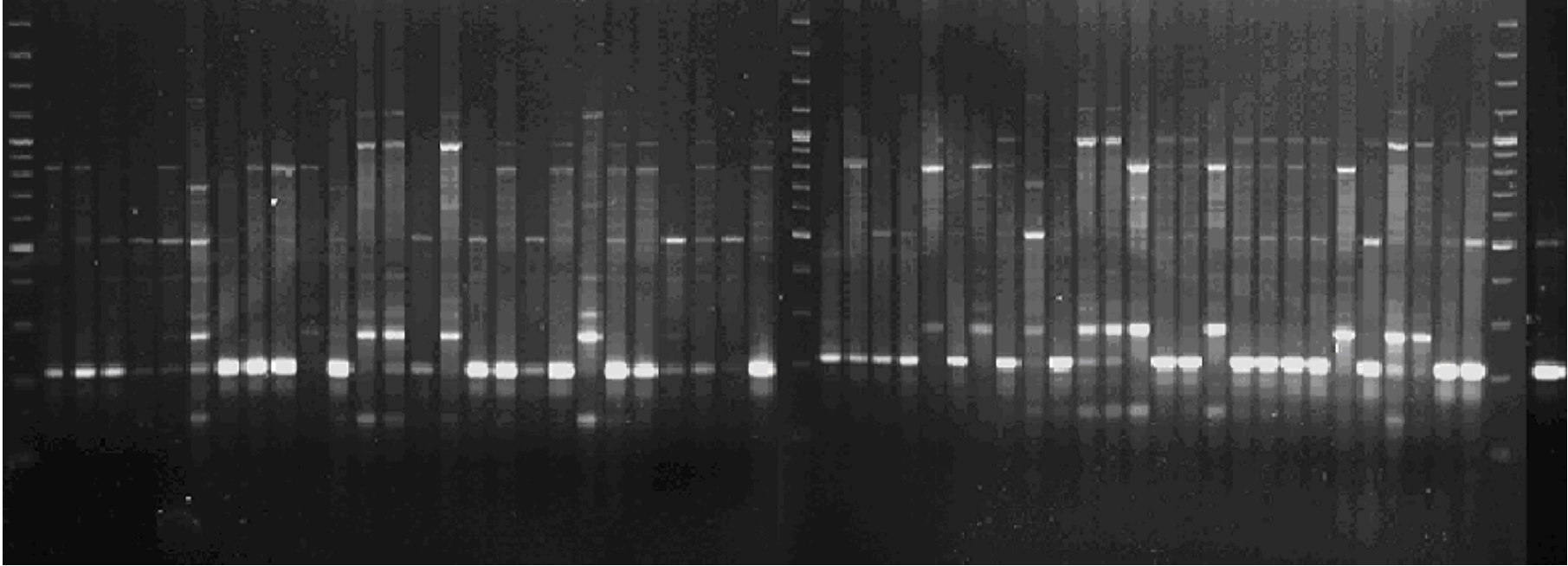
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 M



**Şekil 4.6.** *A. baumannii* İzolatlarının (1-52 arası) M13 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi (M: Marker; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200,1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).



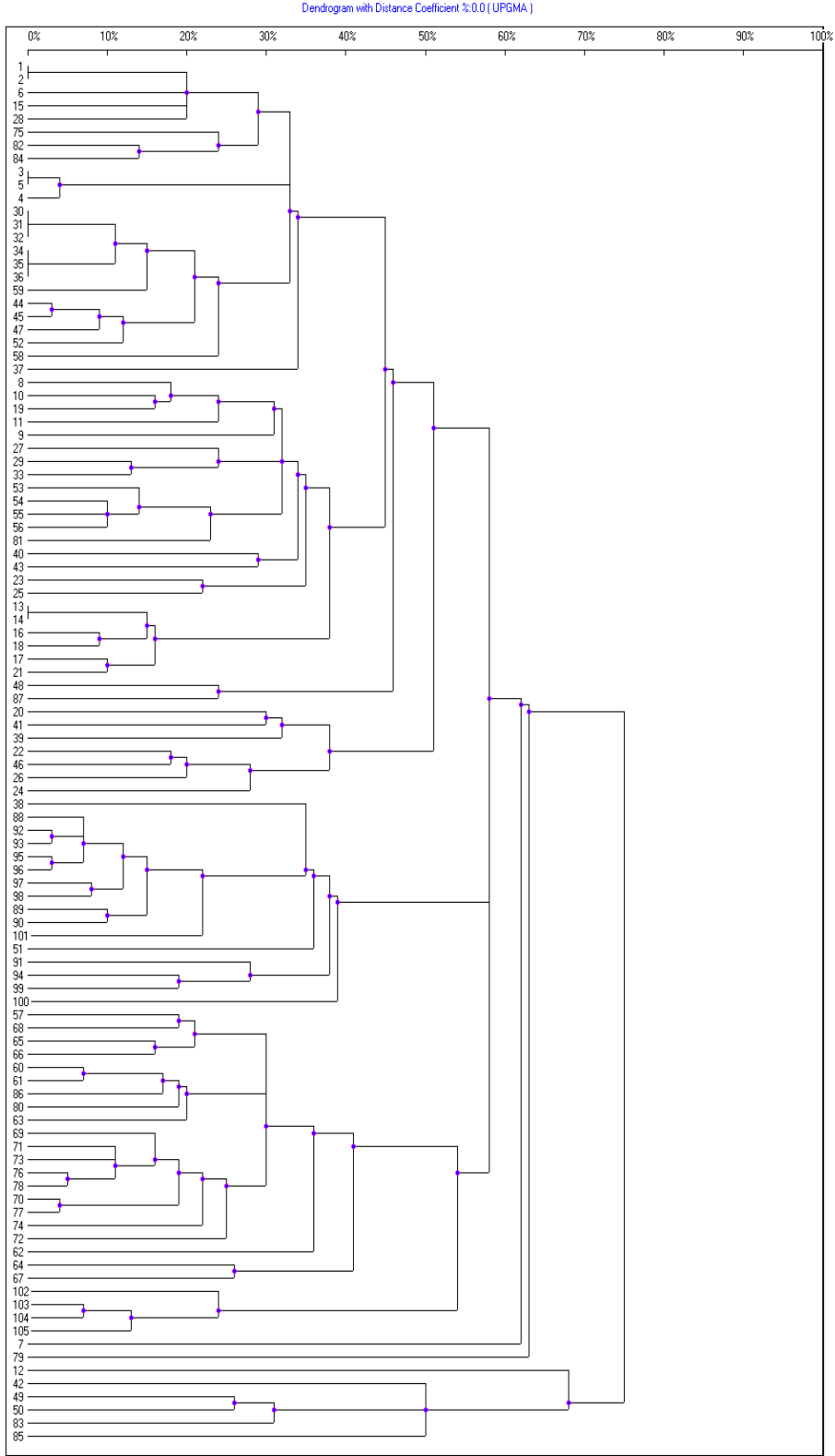
M 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 M 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 M 105



**Şekil 4.6. (Devam)** *A. baumannii* İzolatlarının (53-105 arası) M13 Primeri İle Elde Edilen RAPD-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi (**M: Marker**; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).





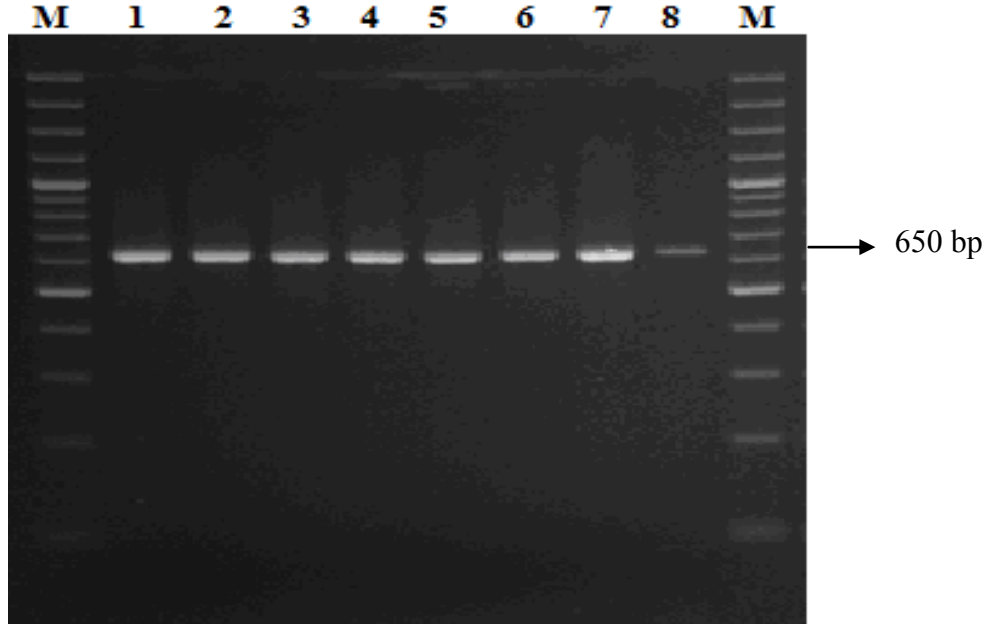


**Şekil 4.7** *A. baumannii* İzolatlarının RAPD-PZR Sonuçlarına Göre Elde Edilen Genetik Uzaklık Dendrogramı

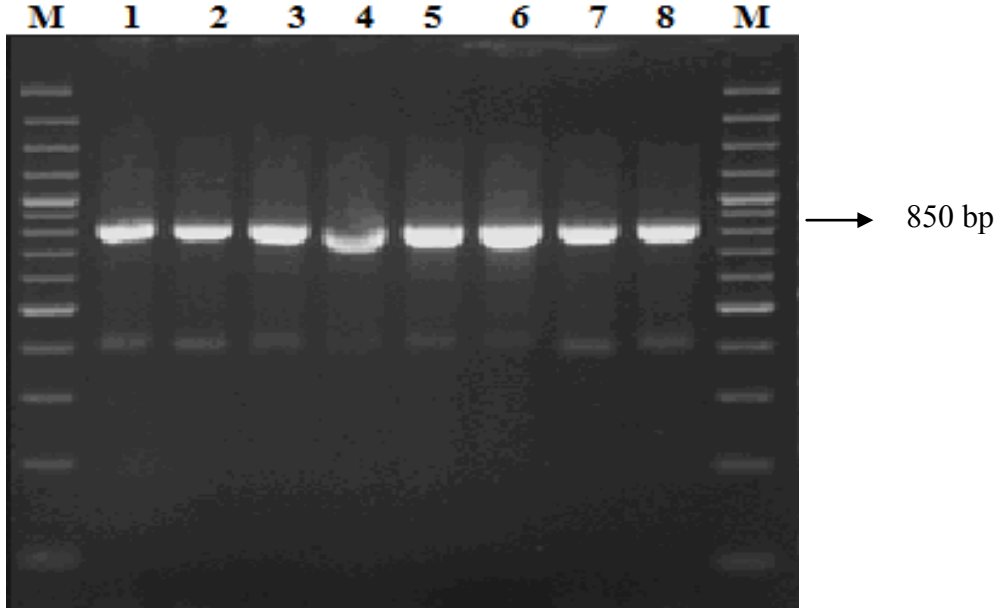
#### 4.2. *A. baumannii* İzolatlarının OXA-23 ve OXA-51 $\beta$ -Laktamaz Enzimlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

$\beta$ -laktam direncinin temel sebebi olan OXA türü  $\beta$ -laktamaz enzimlerinden OXA-23 ve OXA-51 enzimlerinin karbapenem direnci çalışmada kullanılan 105 adet *A. baumannii* izolatında spesifik primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. OXA-23 enzimi çalışılan bütün izolatlarda pozitif sonuç verirken, OXA-51 enzimi sadece 42, 87 ve 101 no' lu izolatlarda varlığı tespit edilememiş olup, diğer bütün izolatlarda pozitif sonuç vermiştir.

OXA-23 enzimi PZR amplifikasyonu sonucu 650 bp' lik bir fragment büyüklüğü gösterirken, OXA-51 enzimi, 800 bp' lik fragment büyüklüğü göstermiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9).



**Şekil 4.8.** *A. baumannii* İzolatlarının OXA-23 Primeri İle Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi (**M: Marker**; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200,1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). 1-83, 2-84, 3-85, 4-86, 5-90, 6-91, 7-93, 8-94



**Şekil 4.9.** *A. baumannii* İzolatlarının OXA-51 Primeri İle Elde Edilen Agaroz Jel Elektroforezi (**M: Marker**; En büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200,1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). 1-43, 2-44, 3-45, 4-46, 5-47, 6-48, 7-50, 8-51.

## 5. TARTIŞMA

Hastane ortamındaki infeksiyonlarda gram negatif bakteriler arasında yer alan *Acinetobacter* spp. farklı özelliklere sahip bir mikroorganizmadır. *Acinetobacter* spp. ile enfekte ya da kolonize olan hastaların buldukları ortamda, bu organizmaların yayılması oldukça kolay olduğu ve günlerce de canlı kalabildiği için salgınlara yol açmaktadır [180].

Daha çok sağlık personelinde bulunurken, sağlıklı insanların cildinde de rastlanabilmektedir. Birçok *Acinetobacter* türü bulunmaktadır, fakat insanlarda %80 oranında hastalıklara yol açan tür *A. baumannii* olarak belirlenmiştir [11].

*A. baumannii*' nin kolonizasyon ve infeksiyonlarının yayılımı yoğun bakım ünitelerinde yaygın bir sorun oluşturmaktadır ve buradaki hastaların ölümüne yol açabilmektedir [181,182]. Birden fazla antibiyotiğe direnç geliştirmesi, cansız nesnelere üzerinde canlılığını uzun süre yitirmemesi, hastane ortamında hayatta kalmasını ve yayılmasını sağlayan temel faktörlerdir [1,183]. Antibakteriyel ajanlara geniş bir direncin kazanılması hastanede kazanılmış infeksiyonların başlıca nedeni olarak dikkati çekmektedir [6,184].

*Acinetobacter*' ler toprak, içme suyu, kanalizasyon suyu ve çeşitli gıda maddeleri gibi klinik olmayan kaynaklardan da kolayca izole edilebilmektedir. Klinik örneklerdeki genomik türler ile diğer çevrelerdeki türler arasında önemli farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden *Acinetobacter*' lerin tür düzeyinde tanımlanmasında epidemiyolojik veriler büyük öneme sahiptir.

*A. baumannii* infeksiyonlarının yayılmasındaki artışı, olası bir yöntemle açıklamak gerekmektedir [185]. Mikroorganizmaların izolasyonu, tanımlanması ve kökenler arasındaki ilişkinin belirlenmesi infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisi, çevre ve endüstriyel mikrobiyoloji ve dolayısıyla mikrobiyal ekolojik çalışmalarda oldukça önemlidir. “DNA parmak izi” oluşturmayı hedefleyen moleküler tiplendirme yöntemleriyle epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. İzolatlar aynı mı, farklı mı sorusuna yanıt aranmaktadır [135].

Genel olarak epidemiyolojik yönden ilişkili izolatlar klonal olarak da ilişkili olup, ortak bir kaynaktan köken alır [186]. Klonal ilişkinin ortaya konulmasıyla epidemik izolatlar, sporadik veya endemik olanlardan ayrılmakta; salgınla ilişkili izolatlar belirlenmekte; salgının kapsamı, kaynak ve rezervuarı hakkında bilgi edinilebilmekte; halk sağlığı kontrolünde kullanmak üzere ulusal ve uluslararası salgınların veri bankaları oluşturulabilmekte, herhangi bir yer ve zaman içindeki infeksiyonun özellikleri tanımlanabilmektedir [187].

Bu bilgiler, hastanelerde ve toplumda infeksiyonun yayılmasını anlamak ve kontrol altına almada yararlı olmakta, bunun sonucu olarak infeksiyon kontrol stratejilerinin etkinliği artırılabilir [136,188].

Moleküler tiplendirme yöntemleriyle salgının özellikleri belirlenerek, kimin nerede, ne zaman, ne ile ve nasıl etkilendiği, bulaşma yolları, potansiyel kaynak ve vektörlerin tanımı yapılabilir [189,190].



Endojen ve ekzojen kaynaklı infeksiyonlar ayırt edilebilir. Moleküler tiplendirme yöntemleriyle patojen bakterilerin hastane ortamında yaygınlık dereceleri ve kalış süreleri araştırılabilir. Moleküler tiplendirme yöntemleriyle aynı klinikteki farklı hastaların izolatları veya birçok kliniği ilgilendiren salgın izolatları, hastane çevresi ve sağlık personellerinin ellerinden üretilen izolatların DNA parmak izleriyle karşılaştırılarak bulaşmanın kaynağı saptanabilir [191].

Moleküler tiplendirme sonucunda etkili infeksiyon kontrol programının uygulanabilmesi için laboratuvar, klinik ve hemşirelik başta olmak üzere birçok disiplinin iş birliği halinde çalışmasına gerek vardır.

PZR' a dayalı izolat tiplendirme teknikleri izolatlarda ki DNA' nın sadece küçük bir miktarına ihtiyaç duymaktadır. Spesifik ya da rastgele primerler kullanılarak DNA dizilerinin PZR amplifikasyonuna dayalı DNA parmakizi çıkartma yöntemi, mikroorganizmaların tiplendirilmesinde kullanımı giderek artan bir yöntemdir [140,156].

RAPD-PZR yöntemi de genetik polimorfizmi belirleyen PZR temelli bir tekniktir. Tekniğin en büyük avantajları genom dizisi hakkında ön bilgiye, yüksek saflıkta ve çok miktarda DNA' ya, Southern blot veya radyoaktif kimyasallara ihtiyaç duymamasıdır. Ayrıca hızlı ve düşük maliyetlidir. RAPD tekniği pek çok alanda olduğu gibi değişik mikroorganizma türlerinin genetik değişkenliğinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde başarıyla uygulanmaktadır. Bu tür analizler izolatlar arasında ilişki olup olmadığının belirlenmesi için, epidemiyolojik odaklı salgınları araştırmak için değişik şekilde kullanım alanları oluşturmaktadır [192].

Bu amaçla bu çalışmada, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 2009-2010 yılları arasındaki çeşitli kliniklerde yatan 105 adet farklı klinik materyallerden elde edilen imipenem dirençli *A. baumannii* izolatları, RAPD-PZR yöntemi kullanılarak izolatlar arasındaki genomik farklılıklar ortaya konulmaya çalışmıştır. POPGEN ile elde edilen sonuçlarla yapılan değerlendirmelere göre rastgele seçilmiş dört primer (OPA11, OPA14, OPB05, M13) ile *A. baumannii* izolatlarının RAPD-PZR işlemleri sayıları 2 ile 8 arasında değişen 100-2000 bp büyüklüğünde DNA fragmentleri içeren yedi farklı ana gruba, bu gruplarda kendi aralarında alt gruplara ayrılmıştır (Şekil 4.7). Buna göre 1, 2, 6, 15, 28, 75, 82, 84, 3, 54. izolatlar 1. grupta, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 59, 44, 45, 47, 52, 58, 37. izolatlar 2. grupta, 8, 10, 19, 11, 9, 27, 29, 33, 53, 54, 55, 56, 81, 40, 43, 23, 25, 13, 14, 16, 18, 17, 21, 48, 87. izolatlar, 3. grupta, 20, 41, 39, 22, 46, 26, 24. izolatlar 4. grupta, 38, 88, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 89, 90, 101, 51, 91, 94, 99, 100. izolatlar 5. grupta, 57, 68, 65, 66, 60, 61, 86, 80, 63, 69, 71, 73, 76, 78, 70, 77, 74, 72, 62, 64, 67, 102, 103, 104, 105. izolatlar 6. grupta, 12, 42, 49, 50, 83, 85. izolatlar 7. grupta yer almıştır. 7 ve 79. izolatlar ise bu gruplara uzak kalıp sonradan ilave olmuştur. 1. ve 2.; 3. ve 5.; 13. ve 14.; 30, 31, 32.; 34, 35, 36. izolatlar arasındaki genetik uzaklıklar sıfır (0) olup aynı DNA profilini sergilemişlerdir. 35 ve 36. izolatların nöroloji YB. birimine ait olduğu tespit edilmiştir. 103 ve 104. izolatlar arasındaki genetik uzaklık ise %7 olup, ikinci yakın izolatlar olmuştur.

Sadeghifard ve arkadaşları [193], 2003-2009 yılları arasında üç farklı hastaneden kan, idrar, yara, solunum sistemi salgılarından 66 *A. baumannii* izolatı elde etmişler ve bu izolatlarla yaptıkları RAPD-PZR işlemleri ile 6 farklı PZR grubunu (1-6) ortaya çıkarmışlardır. Çalışılan 66 izolatın, 24' ünün grup 6, 16' sının grup 3, 11' inin grup 2, 7' sinin grup 1, 5' inin grup 5 ve 3' ünün grup 4' e ait olduğunu göstermişlerdir. *Acinetobacter*' lerin epidemiyolojik tiplendirilmesinde RAPD-PZR yönteminin plazmid profil analizine nazaran ayırım gücünün daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Giordano ve arkadaşları [194]' nin yapmış oldukları RAPD-PZR çalışmasında ise, iki farklı hastaneden elde ettikleri 45 *A. baumannii* izolatını 4 farklı grupta toplamışlardır. 45 izolatın 35' i grup 1' de olup karbapenem dirençli izolatları içermiştir.

Akalın ve arkadaşları [195]' nin yaptıkları başka bir RAPD-PZR çalışmasında ise 120 adet *A. baumannii* izolatının 12 farklı genotip (A-B) profili sergilediği belirtilmiş olup şuşların çoğunun A, B, C ve D genotiplerine ait olduğu bulunmuştur.

Son yıllarda, hastalarda antibiyotik ve özellikle solunum yolu katateri gibi yabancı madde kullanımının artması özellikle yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere hastane infeksiyon etkeni olarak daha fazla *Acinetobacter* cinsi bakterilerin izole edilmesine sebep olmaktadır [196]. Bunlar içerisinde en sık izole edilen tür *A. baumannii* türü ülkemizde yoğun bakım servislerinde en sık rastlanan gram negatif infeksiyon etkenleri arasında yer almaktadır [197].

Bu patojenin tedavisinde en önemli problem çoğul dirençli izolat sayısındaki artış ve bunun sonucunda tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerindeki azalmadır [1,198].

*Acinetobacter* spp.' lerin penisilin ve sefalosporinlere olan antibiyotik dirençleri yüksek olduğu için *Acinetobacter* infeksiyonlarının tedavisinde karbapenemler sıklıkla kullanılmaktadır ve bu yüzden  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç gelişmektedir.

*Acinetobacter* infeksiyonunun tedavisinde  $\beta$ -laktamazları hidroliz eden karbapenem türü bu ilaçların seçilmesinden ve antimikrobiyal direncin gelişmesinden dolayı da infeksiyon sıklığı artmaktadır [132]. *Acinetobacter* izolatlarında  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direnç  $\beta$ -laktamaz üretimi,  $\beta$ -laktam antibiyotiğin dış membran porinlerinden girişinin azalması ve penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik sonucu meydana gelmektedir [199,200].

*Acinetobacter* türlerinde  $\beta$ -laktam direncinin temel sebebi OXA-tipi beta-laktamazlardır. 1985' de *A. baumannii* izolatlarında OXA tipi karbapenemazların ilk kez ortaya çıkmasından sonra, sınıf D  $\beta$ -laktamazlar yaygınlaşmış ve *A. baumannii* izolatlarında yüksek seviyede karbapenem direnci görülmüştür.

*Acinetobacter*' lerdeki sınıf D karbapenemazlar 4 alt gruba ayrılır. 1. altgrup OXA-23, OXA-27 ve OXA-49' u, 2. alt grup OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40' ı, 3. alt grup OXA-51' i ve 4. alt grup OXA-58' i içermektedir [132]. Özellikle OXA-23, OXA-51 ve OXA-58 sık bulunmaktadır [131,201,202].

Carvalho ve ark. [203]' nın Brezilya' da yaptıkları çalışmada 110 adet imipenem dirençli klinik *A. baumannii* izolatından 96' sında (%87.3) OXA-23 varlığı tespit edilmiştir.

Zong ve arkadaşları [177]' nın Çin de yaptıkları bir çalışmada 95 adet karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının hepsinde OXA-23 pozitif bulunmuştur.

Wang ve arkadaşları [202], 1999-2005 yılları arasında 11 farklı eğitim hastanesinden imipenem dirençli 221 adet klinik *Acinetobacter* spp. izolatını, karbapenamaz genleri OXA-23 ve OXA-51 için taramışlar ve 221 adet *Acinetobacter* spp.' nin 216' sında (%97.7) OXA-23, 187' sinde ise OXA-51 pozitif bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçları klonal yayılımın ana sebebinin farklı hastanelerdeki imipenem direncindeki artış olduğunu göstermiştir.

Ayrıca, hasta transferi ve hastane personeli ile bağlantının farklı servisler ve farklı hastaneler arasında imipenem dirençli *Acinetobacter* spp.' nin yayılmasını artırmış olabileceğini ve imipenem dirençli *Acinetobacter* spp. klonlarının varlığının erken tanısının hastane ortamında yayılmalarını engellemek için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Vahaboğlu ve arkadaşları [132], 72 adet *Acinetobacter* spp. izolatında, sınıf D karbapenamazların alt gruplarından olan OXA-51 ve OXA-58 enzimlerinin yaygınlığını belirlemek için spesifik primerler kullanarak PZR yöntemi ile çalışmışlardır. Çalıştıkları 72 izolatın 56 (%77.8)' sında OXA-51 enzimi pozitif sonuç vermiştir.

Son çalışmalarda çeşitli ülkelerdeki karbapenem dirençli klinik kaynaklı *Acinetobacter* spp.' lerde OXA-51 varlığı ortaya çıkarılmıştır [204-206]. Vahaboğlu ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada diğer çalışmalarda olduğu gibi, OXA-51 genini bütün izolatlarda belirleyememişlerdir. Bu yüzden bu direnç geninin *Acinetobacter*' lerde doğal olarak mı oluştuğu yoksa sonradan mı kazanıldığı tam olarak açık değildir [132].

OXA-51 türevi enzimler zayıf enzimlerdir ve normalde az salgılandđı için direnç fenotipi vermeyebilirler ancak iyi bir promotor tarafından desteklenirse yüksek oranda salgılanır ve direnç oluştururlar. Hem OXA-51-türevlerine hem de kromozomal AmpC türü enzimlere *Acinetobacter* için içsel olan ISAbal promotor sağlayabilir. ISAbal bu enzim genlerinin yanına atlar ve promotor sağlar ise yüksek dirence sebep olur [207,208]. Bu enzimlerin özellikle birden fazlasının bir arada olması çoklu antibiyotiğe dirençli (AD) fenotipe sebep olur ve AD *Acinetobacter* infeksiyonlarının tedavisi problemlidir [201].

Bizim alışmamızda da çalışılan toplam 105 adet *Acinetobacter* izolatında yalnızca 3 izolatta (42, 87 ve 101 no' lu izolatlar) OXA-51 enzimi belirlenememiştir. OXA-23 enzimi ise çalışılan tüm izolatlarda pozitif sonuç vermiştir. Bu bizim ülkemizde de karbapenemaz üreten *A. baumannii* izolatlarının oranının yüksek olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, karbapenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarının artması ve yeni tedavi seçenekleri sorunu, ayrıca infeksiyonun ciddi mortalitesi nedenleri ile salgınları kontrol etmek hayati öneme sahiptir. -laktam antibiyotiklerin ve bunların inhibitör kombinasyonlarının çok sık kullanımı, hem var olan direnç

mekanizmalarının artması, hem de yeni direnç mekanizmalarının ortaya çıkması nedeniyle gittikçe artan bir tedavi sorununu gündeme getirmektedir.

Bunun için her merkezde, bakterilerin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı duyarlılıkları hızlı, kolay, ucuz ve güvenilir yöntemlerle araştırılmalı, direnç oranları bölgesel ve ülke çapında saptanmalıdır.

Geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz oluşturan izolatların genellikle hastane infeksiyonları epidemileri yaptığı göz önünde bulundurularak, geniş spektrumlu beta laktamaz (ESBL) üreten izolatların saptanması halinde gerekli epidemiyolojik çalışmalar başlatılmalıdır.  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmalarının üstesinden gelebilmek için çok az sayıda yeni  $\beta$ -laktam antibiyotikler geliştirilmektedir. Direncin kontrol altına alınabilmesi için, var olan bileşiklerin son derece tedbirli bir şekilde kullanılması gereklidir.

Ülkemizde yaygın olarak görülen ve başta *Acinetobacter* türleri olmak üzere diğer enterik bakterilerde de giderek artış gösteren karbapenemaz aktivitelerinin, fenotipik ve genotipik araştırmalarının yapılmasının önemli olduğu görülmüştür.

Bu amaçla ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeniyle bakteriyel popülasyonların filogenetik yapıları ve taksonomik farklılıklarını belirlemede ve patojen bakterilerin hastane ortamında yaygınlık dereceleri ve kalış sürelerini tespit etmek için moleküler tipleme yöntemlerinin kullanılmasının faydalı olacağını ve böylece direnç yayılımını kontrol altına almaya yönelik önemli bir adım olabileceğine inanıyoruz.

Ayrıca hastane infeksiyonları için çok yüksek riskli yerler olarak tanımlanan yoğun bakım ünitelerinin sık ve etkin temizliğinin yapılması, hastalara zorunlu olmadıkça aletli girişimlerin (sonda, katater ve benzeri) uygulanması, eğer uygulanacaksa steril şartlarda yapılması, kullanım sürelerinin kısa tutulması, bakımlarının iyi yapılması ve girişimlerin deneyimli kişiler tarafından yapılması önemlidir.



## KAYNAKLAR

- [1] Bergogne-Berezin, E. and Towner, K.J., *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological and Epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*. 148-165, 1996.
- [2] Çalangu, S., Hastane enfeksiyonlarının Önemi. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon ve Hastane enfeksiyonları. 193-198, 2002.
- [3] Roberts, S.A., Findlay, R., Lang, S.D.R., Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. *Journal of Hospital Infection*. 48: 228-232, 2001.
- [4] Ardiç, 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.* 18:145–8, 2004.
- [5] Von-Graevenitz, A., *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella* and other nonfermentatives. In: Murray, P.,(ed.) *Manual of Clinical Microbiology* ASM Pres, Washington. 520-532, 6th ed. 1995.
- [6] Hanlon, G.W., The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. *Letters in applied Microbiology*. 41: 375-378, 2005.

- [7] Chastre, J., Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 24: number 1: 69-77, 2003.
- [8] Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol*. 35:2819–2825, 1997.
- [9] Allen, K.D., Green, H.T., Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread ? *J Hosp Infect* 9:110–119, 1987.
- [10] Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkey, P.M., Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 36:1938–1941, 1998.
- [11] Allen, D.M., Hartman, J.B., *Acinetobacter* species In: Mandel G. L., Bennet J. E., Dolin R., ed(s). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2339-2342, 5 th ed. 2000.
- [12] Towner, Collier L., Balows, A., Susman, M., (Eds) *Acinetobacter*. In: *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*.; 1229-1239, 9 th ed. 1998.
- [13] Towner, K.J., Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol*. 46:721-722, 1997.

- [14] D'Agata, E.M.C., Thayer, V., Schaffner, W., An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 21: 588-591, 2000.
- [15] Javad, A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkwy, P.M., Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1938-1941, 1998.
- [16] Karslıgil, T., Balcı, İ., Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarında antibiyotik direnci. *İnfeksiyon Dergisi* 14: 511-514, 2000.
- [17] Gulati, S., Kapil, A., Das, B., Dwivedi, S.N., Mahapatra, A.K., Nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ICU. *Neurol India* 49: 134-137, 2000.
- [18] Kaul, R., Burt, J., Cork, L., Dedier, H., Garcia, M., Kennedy, C., Brunton, J., Kraiden, M., Conly, J., Investigation of a multiyear multiple critical care unit outbreak due to relatively drug-sensitive *Acinetobacter baumannii*: risk factors and attributable mortality. *J Infect Dis* 174: 1279-1287, 1996.
- [19] Beijerinck, M., Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Versl. Koninklijke Akad. Wetensch. Amsterdam* 19:1092–1103, 1911.

- [20] Von Lingelsheim, W., Beitrage zur Epidemiologie der epidemischen Genickstarre nach den Ergebnissen der letzten Jahre. Z. Hyg. Infektkrankh. 59:457–460, 1908.
- [21] Henriksen, S.D., *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. Bacteriol. Rev. 37:522–561, 1973.
- [22] DeBord, G., Organisms invalidating the diagnosis of gonorrhoeae by the smear method J. Bacteriol. 38:119–120, 1939.
- [23] Audureau, A., Etude du genre *Moraxella*. Ann. Inst. Pasteur 64:126–166, 1940.
- [24] DeBord, G., Descriptions of Mimeae trib. nov. with three genera and three species and two new species of Neisseria from conjunctivitis and vaginitis. Iowa State Coll. J. Sci. 16:471–480, 1942.
- [25] Schaub, I.G. and Hauber F.D., A biochemical and serological study of a group of identical unidentifiable gram-negative bacilli from human sources. J.Bacteriol. 56:379–385, 1948.
- [26] Lemoigne, M., Girard, H., and Jacobelli, G., Soil bacteria easily utilizing 2- 3, butanediol. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 82:389–398, 1952.
- [27] Brisou, J., Essay on the system of the genus *Achromobacter*. Ann.Inst. Pasteur (Paris) 84:812–814, 1953.

- [28] Mannheim, W., and Stenzel, W., Zur Systematik der obligat aeroben gram-negativen Diplobakterien des Menschen. Zentralbl. Bakteriol. 198:55–83, 1962.
- [29] Baumann, P., Doudoroff, M. and Stanier, R.Y., A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J.Bacteriol. 95:1520–1541, 1968.
- [30] Lessel, E.F., Subcommittee on nomenclature of *Moraxella* and allied bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 21:213–214, 1971.
- [31] Lautrop, H., Williams & Wilkins, Co., Baltimore, M.D., Bergey's manual of determinative bacteriology. 1974.
- [32] Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M. and. Ley de, J., Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. Int. J.Syst. Bacteriol. 41:310–319, 1991.
- [33] Nishimura, Y., Ino, T. and Lizuka, H., *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:209–211,1988.
- [34] Bouvet, P.J. and Jeanjean, S., Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res. Microbiol. 140:291–299, 1989.
- [35] Tjernberg, I. and Ursing, J., Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS 97:595–605, 1989.

- [36] Bouvet, P.J. and Grimont, P.A., Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:228–240, 1986.
- [37] Nemeč, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., Van Der Reijden, T. J. and Dijkshoorn, L., *Acinetobacter ursingii* sp. nov., and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1891–1899, 2001.
- [38] Nemeč, A., Dijkshoorn, L., Cleenwerck, I., De Baere, T., Janssens, D., Van Der Reijden, T.J., Jezek, P. and Vaneechoutte, M., *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1563–1567, 2003.
- [39] Carr, E.L., Kampfer, P., Patel, B.K., Gurtler, V. and Seviour, R.J., Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:953–963, 2003.
- [40] Dijkshoorn, L., Van Aken, E., Shunburne, L., Van Der Reijden, T.J.K., Bernards, A.T., Nemes, A., Towner, K.J., Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. Clin. Microbiol Infect. 11:329-332, 2005.
- [41] Mandel, A.D., Wright, K., McKinnon, M., Selective medium for isolation of Mima and Herellea organisms. J Bacteriol. 88:1524-1525, 1964.

- [42] Anonim, [http://www. cyberspaceorbit. com](http://www.cyberspaceorbit.com) 18.04.2011 (Erişim tarihi).
- [43] Anonim, [http://www. Acinetobacter. net](http://www.Acinetobacter.net) 18 04 2011 (Erişim tarihi).
- [44] Anonim, [http://www. Acinetobacter. org](http://www.Acinetobacter.org) 18 04 2011 (Erişim tarihi).
- [45] Speller, D.C.E., Humphreys, H., Hospital-acquired infection. In: Collier, L., Balows, A., Sussman, M., (Eds.) Topley&Wilson's Microbiology and microbial infections. London: Arnold; p.187–229, 9th ed.1998.
- [46] Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A., Wisplinghoff, H., Rodriguez-Valera, F., Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 43 (9):4382-4390, 2005.
- [47] Taşova, Y., Akgün, Y., Saltoğlu, N., Yılmaz, G., Kara, O., Dündar, İ.H., Nozokomiyal *Acinetobacter* infeksiyonları. Flora 4:170–6, 1999.
- [48] Juni, E., Genetics and physiology of *Acinetobacter*. Annu. Rev. Microbiol. 32:349–371, 1978.
- [49] Pedersen, M.M., Marso, E. and Pickett, M.J., Non-fermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. Am. J. Clin. Pathol. 54:178–192, 1970.
- [50] Smego, R.A., Endemic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* bacteremia. Clinical significance, treatment and prognosis. Arch. Intern. Med.145:2174–2179, 1985.

- [51] Goel, K.V., Kapil, A., Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. BMC Microbiology 1:16–23, 2001.
- [52] Vahaboglu, H., Coskuncan, F., Tansel, O., Ozturk, R., Sahin, N., Koksai, I., et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER–1-type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Med Microbiol 50:642–5, 2001.
- [53] Das, I., Lambert, P., Hill, D., Noy, M., Bion, J., Elliot, T. Carbapenem-resistant *Acinetobacter* and role of curtains in an outbreak in intensive care units. Journal of Hospital Infection 50: 110-114, 2002.
- [54] Centers for Disease Control 1987. Nosocomial infection surveillance 1984. CDC Summ. 35:17SS–29SS.
- [55] Craven, D.E., Barber, T.W., Steger, K.A. and Montecalvo, M.A., Nosocomial pneumonia in the 1990s: update of epidemiology and risk factors. Semin. Respir. Infect. 5:157–172, 1990.
- [56] Schaberg, D.S., Culver, D. and Gaynes, R., Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections. Am. J. Med. 91:72S–75S, 1991.
- [57] Fagon, J.Y., Chastre, J., Domart, Y., Trouillet, J.L., Pierre, J., Darne, C. and Gibert, C., Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. Am. Rev. Respir. Dis. 139:877–884, 1989.



- [58] Torres, A., Aznar, R., Gatell, J.M., Jiminez, P., Gonzalez, J., Ferrer, A., Celis, R. and Rodriguez-Roisin, R., Incidence risk and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:522–528, 1990.
- [59] Trouillet, J.L., Vuagnat, A., Calvat, S., Joly-Guillou, M.L., Dombret, M. C., Clavier H., Gibert, C. and Chastre, J., Ventilator-associated pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*: prospective analysis of 22 episodes, abstr. A474. *In Abstracts of the American Thoracic Society International Conference.* 1995.
- [60] Bergogne-Berezin, E. and Joly-Guillou, M.L., Hospital infection with *Acinetobacter* spp. an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* 18(Suppl. A): 250–255, 1991.
- [61] Sakata, H., Fujita, K., Maruyama, S., Kakehashi, H., Mori, Y. and Yoshioka, H., *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* septicaemia in a neonatal intensive care unit: epidemiology and control. *J. Hosp. Infect.* 14:15–22, 1989.
- [62] Regev, R., Dolfin, T., Zelig, T., Givoni, S. and Wolach, B., *Acinetobacter* septicemia: a threat to neonates? Special aspects in a neonatal intensive care unit. *Infection* 21:394–396, 1993.
- [63] Graber, C.D., Rabin, E.R., Mason, M.D. and Vogel, E., Increasing incidence of nosocomial *Herellea vaginicola* infections in burned patients. *Surg. Gynecol. Obstet.* 114:109–112, 1962.

- [64] Green, A.R. and Milling, M.A.P., Infection with *Acinetobacter* in a burns unit. *Burns* 9:292–294, 1983.
- [65] Rolston, K., Guan, Z., Bodey, P.G. and Elting, L., *Acinetobacter calcoaceticus* septicemia in patients with cancer. *South. Med. J.* 78:647–651, 1985.
- [66] Seifert, H., Strate, A., Schulze, A. and Pulverer, G., Vascular catheter related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*): report of 13 cases. *Clin. Infect. Dis.* 17:632–636, 1993.
- [67] Beck-Sague, C.M., Jarvis, W.R., Brook, J.H., Culver, D.H, Potts, A., Gay, E., Shotts, B.W, Hill, B., Anderson, R.L. and Weinstein, M.P., Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *Am.J. Epidemiol.* 132:723–733, 1990.
- [68] Tilley, P.A.G. and Roberts, F.J., Bacteremia with *Acinetobacter* species: risk factors and prognosis in different clinical settings. *Clin. Infect. Dis.* 18:896–900, 1994.
- [69] Siegman-Igra, Y., Bar-Yosef, S., Gorea, A., Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *J Clin Infect Dis* 17: 843-849, 1993.
- [70] Seifert, H., Richter, W., Pulverer, G., Clinical and bacteriological features of relapsing shunt-associated meningitis due to *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14: 130-134, 1995.

- [71] Allen, D.M., Hartman, B.J., *Acinetobacter* species. In: Mandel, G.L., Bennet, J.E., Dolin, R., eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2:2632-2636, 6 th ed. 2005.
- [72] Gantz, N.M., Tkatch, L.S., Nosocomial central nervous system infections. In: Mayhall, C.G., (eds.) Hospital Epidemiology and Infection Control. Philadelphia: Williams &Wilkins; 301-322, 2 th ed. 1999.
- [73] Berk, S.L. and McCabe, W.R., Meningitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: a specific hazard in neurosurgical patients. Arch. Neurol. 38:95–98, 1981.
- [74] Schreckenberger, P.C., Daneshvar, M.I., Weyant, R.S., Hollis, D.G., *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C, Yolken, R.H. (Eds.). Manuel of Clinical Microbiology. Washington ASM Pres: 749-775, 7 th ed. 2002.
- [75] Ahmad, S., Urinary tract infection at a specialist hospital in saudi Arabia. Bangladesh Med Res Counc Bull 21: 95-98, 1995.
- [76] Hoffmann, S., Mabeck, C.E. and Vejsgaard, R., Bacteriuria caused by *Acinetobacter calcoaceticus* biovars in a normal population and in general practice. J. Clin. Microbiol. 16:443–451, 1982.

- [77] Gradon, D.J., Chapnick, E.K. and Lutwick, L.I., Infective endocarditis due to *Acinetobacter*: case report and review. Clin. Infect. Dis. 14:1145–1148, 1992.
- [78] Galvao, C., Swartz, R., Rocher, L., Reynolds, J., Starmann, B. and Wilson, D., *Acinetobacter* peritonitis during chronic peritoneal dialysis. Am. J. Kidney Dis. 14:101–104, 1989.
- [79] Lye, W.C., Lee, E.J. and Ang, K.K., *Acinetobacter* peritonitis in patients on CAPD: characteristics and outcome. Adv. Peritoneal Dialysis 7: 176–179, 1991.
- [80] Valdez, J.M., Asperilla, M.O. and Smego, R.A., *Acinetobacter* peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. South. Med. J. 4:607–610, 1991.
- [81] Melki, T.S. and Sramek, S.J., Trauma induced *Acinetobacter lwoffii* endophthalmitis. Am. J. Ophthalmol. 113:598–599, 1992.
- [82] Mark, D.B. and Gaynon, M.W., Trauma induced endophthalmitis caused by *Acinetobacter anitratus*. Br. J. Ophthalmol. 67:124–126, 1983.
- [83] Zabel, R.W., Winegarden, T., Holland, E.J. and Doughman, D.J., *Acinetobacter* corneal ulcer after penetrating keratoplasty. Am. J. Ophthalmol. 107:677–678, 1989.
- [84] Barre, M.E. and Cook, M.L., Microbial factors in contact lens fitting. Am. J. Optom. Physiol. Opt. 61:389–396, 1984.

- [85] Towner, K.J., Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. J Med Microbiol 46:721-726, 1997.
- [86] Levin, A.S., Barone, A.A., Penco, J., et al. Intravenous colistin therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis 28:1008-1011, 1999.
- [87] Akalın, H., Nozokomiyal Pnömoni-II: Tedavisi ve Önleme. Hastane İnfeksiyonları Derg 8:215-224, 2004.
- [88] Akalın, H., Çoğul dirençli gram negatif bakteriler. Doğanay, M., Ünal, S., (Editörler). Hastane infeksiyonları'nda. 1. baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; s. 269–89, 2003.
- [89] Aksaray, S., Dokuzoguz, B., Güvener, E., et al. Surveillance study of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 45: 695-699, 2000.
- [90] Günseren, F., Mamıkoglu, L., Öztürk, S., et al. Surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 43: 373-378, 1999.

- [91] Buisson, Y., Tran Van Nhieu, G., Ginot, L., Bouvet, P., Schill, H., Driot L. and Meyran, M., Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant tobramycin-sensitive *Acinetobacter* species: correlation with amikacin usage. *J. Hosp. Infect.* 15:83–93, 1990.
- [92] French, G.L., Casewell, M.W., Roncoroni, A.J., Knight, S. and Phillips, I., A hospital outbreak of antibiotic-resistant *Acinetobacter anitratus*: epidemiology and control. *J. Hosp. Infect.* 1:125–131, 1980.
- [93] Joly-Guillou, M.L., Decre, D. and Bergogne-Berezin, E., Infections nosocomiales a *Acinetobacter* surveillance epidemiologique hospitaliere. *Bull. Epidemiol. Hebd.* vi: 211–212, 1992.
- [94] Larson, E.A., Decade of nosocomial *Acinetobacter*. *Am. J. Infect. Control* 12:14–18, 1984.
- [95] Struelens, M.J., Carlier, E., Maes, N., Serruys, E., Quint, W.G.V. and Van Belkum, A., Nosocomial colonisation and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J. Hosp. Infect.* 25:15–32, 1993.
- [96] Garcia, I., Fainstein, V., Leblanc, B. and Bodey, G.P., In vitro activities of new beta-lactam antibiotics against *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24:297–299, 1983.

- [97] Godineau-Gauthey, N., Lesage, D., Tessier, F., Kollia, D. and Daguet, G.L., *Acinetobacter calcoaceticus* variete *anitratu*s ou *Acinetobacter baumannii*. Etude de la sensibilite' aux antibiotiques chez 65 souches hospitalie res. Med. Mal. Infect. ii:124, 1988.
- [98] Joly-Guillou, M.L. and Bergogne-Berezin, E., Evolution ' *Acinetobacter calcoaceticus*, en milieu hospitalier, de 1971 a 1984. Presse Med. 14:2331–2335, 1985.
- [99] Obana, Y., Nishino, T. and Tanino, T., *In vitro* and *in vivo* activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Antimicrob. Chemother. 15:441–448, 1985.
- [100] Morohoshi, T. and Saito, T., Beta-lactamase and beta-lactam antibiotic resistance in *Acinetobacter anitratu*s (syn. *A. calcoaceticus*). J. Antibiot. 30:969–973, 1977.
- [101] Echenique, J.R., Arienti, H., Tolmasky, M.E., Read, R.R., Staneloni, R.J., Crosa, J.H. and Actis, L.A., Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 174:7670–7679, 1992.
- [102] Go, S.E., Urban, C., Burns, J., Kreiswirth, B., Eisner, W., Mariano, N., Mosinka-Snipas, K. and Rahal, J.J., Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. Lancet 344:1329–1332, 1994.

- [103]Tankovic, J., Legrand, P., De Gatines, G., Chemineau, V., Brun-Buisson, C. and Duval, J., Characterization of a hospital outbreak of imipenemresistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic methods. J.Clin. Microbiol. 32:2677–2681, 1994.
- [104]Herman, N.J. and Juni E., Isolation and characterization of a generalized transducing bacteriophage for *Acinetobacter*. J. Virol. 13:46–52, 1974.
- [105]Juni, E. and Janik A., Transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* (*Bacterium anitratum*). J. Bacteriol. 98:281–288, 1969.
- [106]Towner, K.J. and Vivian, A., RP4-mediated conjugation in *Acinetobacter calcoaceticus*. J.Gen. Microbiol. 93:355–360, 1976.
- [107]Towner, K.J. and Vivian, A., Plasmids capable of transfer and chromosome mobilization in *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Gen. Microbiol. 101: 167–171, 1977.
- [108]Chopade, B.A., Wise, P.J. and Towner, K.J., Plasmid transfer and behaviour in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65. J. Gen. Microbiol. 131: 2805–2811, 1985.
- [109]Towner, K.J., Plasmid and transposon behaviour in *Acinetobacter*, p.149–167. In K.J. Towner, Bergogne-Berezin E., and Fewson, C.A. (ed.), The biology of *Acinetobacter*. Plenum Publishing Corp., New York, 1991.



- [110]Seifert, H., Schulze, A., Baginsky, R. and Pulverer, G., Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii* J. Clin. Microbiol. 32: 82–86, 1994.
- [111]Gerner-Smidt, P., Frequency of plasmids in strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Hosp. Infect. 14: 23–28, 1989.
- [112]Meriç, M., Wilke, A., Çaglayan, Ç., Toker, K., intensive care unit-acquired infections: incidence, risk factors and associated mortality in a Turkish University Hospital. Jpn. J. Infect. Dis.; 58: 297-302, 2005.
- [113]Lee, W, McDonough, M.A., Kotra, L., et al. A 1.2 Å snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis. Proc Nat Acad Sci USA; 13: 1427–31, 2001.
- [114]Green, D.W., The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. Exp Opin Ther Targets; 6: 1–19, 2002.
- [115]Medeiros, A.A., Evolution and dissemination of b-lactamases accelerated by generations of b-lactam antibiotics. Clin Infect Dis; 24 Suppl 1: 19–45, 1997.
- [116]Davies, J., Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science; 264: 375–82, 1994.
- [117]Ambler, R.P., The structure of b-lactamases. Phil Trans R Soc London B: Biol Sci; 289: 321–31, 1980.

- [118]Jaurin, B., Grundstrom, T., AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of  $\beta$ -lactamases of the penicillinase type. *Proc Nat Acad Sci USA*; 78; 4897-901, 1981.
- [119]Lamotte-Brasseur, J., Knox, J., Kelly, J.A., et al. The structures and catalytic mechanisms of active-site serine  $\beta$ -lactamases. *Biotech Genet Eng Rev*; 12: 189–230, 1994.
- [120]Majiduddin, F.K., Materon, I.C., Palzkill, T.G., Molecular analysis of  $\beta$ -lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol*; 292: 127–37, 2002.
- [121]Wang, Z., Fast, W., Valentine, A.M., et al. Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism. *Cur Opin Chem Biol*; 3: 614–22, 1999.
- [122]Livermore, D.M., Beta-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob Chemother* 41, Suppl. D, 24-41, 1998.
- [123]Bush, K., Characterization of beta-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 33:259, 1989.
- [124]Philippon, A., Arlet, G., Lagrange, P.H., Origin and impact of plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamases, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13(suppl 1): 17, 1994.

- [125]Nerad, J.L., Seville, M.T., Snyderman, D.R., Miscellaneous Gram-negative bacilli: *Acinetobacter*, *Cardiobacterium*, *Actinobacillus*, *Chromobacterium*, *Capnocytophaga* and others. In: Gorbach, SL, Barlett, J.G, Blacklow, N.R, ed(s). Infectious diseases. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company 1998: 1876-1880.
- [126]Gür, D., Hastane enfeksiyonlarında önem kazanan Gram olumsuz bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane enfeksiyonları Dergisi; 1: 38-45, 1997.
- [127]Masova, I., Mobasheny, S., Kindship and diversification of bacterial penicillin binding proteins and beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother Jan; 1-17, 1998.
- [128]Bou, G., Cervero, G., Dominguez, M.A., Quereda, C. And Martinez-Beltran, J., Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: highlevel carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. J. Clin. Microbiol.; 38: 3299-3305, 2000.
- [129]Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M.C., Ayala, J. A., Perea, E.J. and Pascual A., Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother.; 51: 565-574, 2003.

- [130] Lolans, K., Rice, T.W., Silvia Munoz-Price, L., Quinn, J.P., Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 50: 2941-2945, 2006.
- [131] Chang, H.C., Wei Y.F., Dijkshoorn, L., et al: Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region, *J Clin Microbiol*; 43(4): 1632-9, 2005.
- [132] Vahaboglu, H., Budak, F., Kasap, M., et al: High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres, *J Antimicrob Chemother*; 58(3): 537-42, 2006.
- [133] Brown, S., Young H.K., Amyes, S.G., Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect*; 11: 15–23, 2005.
- [134] Rice, L.B., Sahm D., Bonomo, R.A., Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.C., Tenover, M.A., (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press; p. 1074–101, 2003.

- [135]Durmaz, R., Hastane infeksiyonu salgınında Moleküler Biyolojik Yöntemler. Hastane infeksiyonları dergisi; 9: 196-202, 2005.
- [136]Tompkins, L.C., Molecular epidemiology in infectious diseases. In: Gorbach, S.L., Bartlett, J.G., Blacklow, N.R., (eds) Infectious Diseases. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 28-35, 1998.
- [137]Andrei, A., Zervos, M.J., The Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. Arch Pathol Lab Med. ;130: 662-668, 2006.
- [138]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, s. 512–530, 2006.
- [139]Towner, K.J. and Chopade B.A., Biotyping of *Acinetobacter calcoaceticus* using the API20NE system. J. Hosp. Infect. 10: 145–151, 1987.
- [140]Kropec, A., Hubner, J. and Daschner F.D., Comparison of three typing methods in hospital outbreaks of *Acinetobacter calcoaceticus* infection. J. Hosp. Infect. 23: 133–141, 1993.
- [141]Adam, M.M., Classification antigenique des “*Acinetobacter.*” Ann.Inst. Pasteur Microbiol. 130A: 404–405, 1979.
- [142]Das, B.C. and Ayliffe G. A. J., Serotyping of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Clin. Pathol. 37: 1388–1391, 1984.

- [143]Bouvet, P.J.M., Jeanjean S., Vieu J.F. and Dijkshoorn, L., Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. J. Clin. Microbiol. 28: 170–176, 1990.
- [144]Giammanco, A., Vieu J.F., Bouvet, P. J. M., Sarzana, A. and Sinatra, A., A comparative assay for epidemiological markers for *Acinetobacter* strains isolated in a hospital. Zentralbl. Bakteriologie. 272: 231–241, 1989.
- [145]Joly-Guillou, M. L., Bergogne-Berezin, E. and Vieu J.F., A study of the relationships between antibiotic resistance phenotypes, phage-typing and biotyping of 117 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. J. Hosp. Infect. 16: 49–58, 1990.
- [146]Santos Ferreira, M.O., Vieu J.F. and Klein B., Phage-types and susceptibility to 26 antibiotics of nosocomial strains of *Acinetobacter* isolated from Portugal. J. Int. Med. Res. 12: 364–368, 1984.
- [147]Vieu, J.F., Minck, R. and Bergogne-Berezin, E., Bacteriophages et lysotypie de *Acinetobacter*. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 130A: 405–406, 1979.
- [148]Dijkshoorn, L., Aucken, H.M., Gerner-Smidt, P., Kaufmann, M.E., Ursing, J. and Pitt T.L., Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. J. Clin. Microbiol. 31: 702–705, 1993.

- [149]Joly-Guillou, M.L., Bergogne-Berezin, E. and Vieu J.F., Epidemiology of *Acinetobacter* strains isolated from nosocomial infections in France, p. 63–68. In K.J. Towner, E. Bergogne-Berezin, and C.A. Fewson (ed.), *The biology of Acinetobacter*. Plenum Publishing Corp., New York., 1991.
- [150]Vila, J., Almela, M. and Jimenez de Anta, M.T., Laboratory investigation of hospital outbreak caused by two different multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1086–1089, 1989.
- [151]Bergogne-Berezin, E. and Joly-Guillou, M.L., An underestimated nosocomial pathogen, *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 16: 535–538, 1985.
- [152]Dijkshoorn, L., Michel, M.F. and Degener, J.E., Cell envelope protein profiles of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated in hospitals. *J. Med. Microbiol.* 23: 313–319, 1987.
- [153]Dijkshoorn, L., Van Vianen, W., Degener, J.E. and Michel, M.F., Typing of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated from hospital patients by cell envelope protein profiles. *Epidemiol. Infect.* 99: 659–667, 1987.
- [154]Gülay, Z., Moleküler tiplendirme yöntemleri ve hastane infeksiyonlarındaki yeri. *ESGEM Guidelines Clin Microbiol Infect*; 2: 2-11, 1996.

- [155]Zaidi, N., Konstantinou, K., The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. Arch Pathol Lab Med 27: 1098-105, 2003.
- [156]Gerner-Smidt, P. and Tjernberg, I., *Acinetobacter* in Denmark. II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 101: 826–832, 1993.
- [157]Hartstein, A.I., Rashad, A.L., Liebler, J.M., Actis, L.A., Freeman, J., Rourke, J.W., Stibolt, T.B., Tomarsky, M.E., Ellis, G.R. and Croser, J.H., Multiple intensive care unit outbreak of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratus* respiratory infection and colonisation associated with contaminated, reusable ventilator circuits and resuscitation bags. Am. J. Med. 85: 624–631, 1988.
- [158]Peleg, Y.A., Seifert, H. and Paterson D.L., *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen Clinical Microbiology Reviews, p. 538–582, July 2008.
- [159]Yağcı, A., Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ve polimeraz zincir reaksiyon (PZR) bazlı tiplendirme yöntemleri. Durmaz, R., (editör) Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri: 149-60, 2001.



- [160]Pfaller, M.A., Hollis, R.J., Automated ribotyping. In: Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y.W., Unger, E.R., Relman, D.A., White, T.J., (eds) *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Washington DC: ASM Press,,: 245-58.3ey.2004.
- [161]Durmaz B., Durmaz, R., Pulsed-field gel electrophoresis. Durmaz, R (editör). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri: 161-8, 2001.
- [162]Scharf, S.J., Horn, G.T., Erlich H.A., "Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences", *Science*, 233, 1076-1078, 1986.
- [163]Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Cold Spring Harbor Simp. Quant. Biol.*, 51, 263-273, 1986.
- [164]Higuchi, R., "In PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Erlich H., *Stockton*, New York, 61-70, 1989.
- [165]Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. and Rao, V.R., "Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies", *IPGRI Technical Bulletin*, 2, 10 1997.
- [166]Crawford, D. J., "Plant Macromolecular Systematics In The Past 50 Years: One View", *Taxon*, 49, 81-103, 2000.

- [167]Doyle, J.J. and Doyle J.L., DNA And higher plant systematics: Principles And Results: Molecular technics in taxonomy, ed.Hewitt et all., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1991.
- [168]Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, R.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., "DNA polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucl. Acids. Res.*, 18, 6531-6535,1990.
- [169]Welsh, J. and McClelland M., "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers", *Nucl. Acids. Res.*, 18, 7213-7218, 1990.
- [170]Gauer, L. and Cavalli-Molina S., "Genetic variation in natural populations of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers", *Heredity*, 84, 647-656, 2000.
- [171]Chalmers, K., Waugh, J.R., Sprent, J.I., Simons, A.J., Powell, W., "Detection of genetic variation between- and within- population of *Gliricidia sepium* and *G. Maculata* using RAPD markers", *Heredity*, 69, 465-472, 1992.
- [172]Ashburner, G.R., Thompson, W.K., Halloran, G.M., "RAPD analysis of South Pacific coconut palm population", *Crop, Sci*, 37, 992-997, 1997.
- [173]Gallois, A., Audran, J.C., Burrus, M., "Assessment of genetic relationships and population discrimination among *Fagus sylvatica* L. by RAPD", *Theor Appl Genet*, 97, 211-219, 1998.

- [174]Kwok, S. and Sninsky, J.J., "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Erlich, H., *Stockton*, New York, 235-244, 1989.
- [175]Welsh, J., McClelland, M., Characterization of pathogenetic microorganisms by genomic fingerprinting used arbitrarily primed PCR. In: Percing, H.D., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J., (eds) *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM, Washington, DC 595-602, 1993.
- [176]Açık, L., Samancı, B., Duman, H., Ünal, F., "Polymorphism and phylogenetic relations among Turkish species in the genus *Sternbergia* as determined RAPD-PCR", *Tr J of Botany*, 21, 265-268, 1997.
- [177]Zong, Z., Xiaoju L., Valenzuela, J.K., Partridge S.R., Iredell J., An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OA-23 carbapenemase in western China. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31: 50-54, 2008.
- [178]Valenzuela, J.K., Lee T., Partridge, S.R., Van Der Reijden, T., Dijkshoorn, L. and Iredell, J., Horizontal Gene Transfer in a Polyclonal Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 453-460, Feb. 2007.
- [179]Maniatis, T., Fritsh, E.F. and Sambrook, J., In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, *Cold Spring Harbor*, New York 1989.

- [180]Karlowsky, J.A., Draghi, D.C., Jones, M.E., Thornsberry, C., Friedland, I.R. and Sahm, D., Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aerogenosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998-2001. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 1681-1688, 2003.
- [181]Aygün, G., Demirkiran, O., Utku, T., Mete, B., Urkmez, S., Yılmaz, M., Yaşar, H., Dikmen, Y. and Öztürk, R., Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.*, 52: 259-262, 2002.
- [182]Zarrilli, R., Crispino, M., Baggattini, M., Baretta, E., Di Popolo, A., Triassi M. and Villari P., Molecular epidemiology of sequential outbreaks *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance *J. Clin. Microbiol.*, 42: 946-953, 2004.
- [183]Denton, M., Todd, N.J., Kerr, K.G., Hawkey, P.M. and Littlewood, J.M., Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from Clinical Specimens from Patients with Cystic Fibrosis and Associated Environmental Samples. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 1953-1958, 1998.
- [184]Danes C., Navia, M.M., Ruiz, J., Marco, F., Jurado, A., Jimenez de Anta, M.T. and Vila J., Distribution of  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 ( AmpC inhibitor) on the MICs of different  $\beta$ - lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50: 261-264, 2002.

- [185]Rungruanghiranya, S., Somboonwit, C. and Kanchanapoom, T., *Acinetobacter* infection in the Intensive Care Unit. J. Infect. Dis. Antimicrob. Agents, 2005.
- [186]Durmaz, R., Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. Durmaz R (editör). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri: 139-47, 2001.
- [187]Wu, F., Della-Latta, P., Molecular typing strategies. Semin Perinatol; 26: 357-66, 2002.
- [188]Pfaller, M.A., Molecular approaches to diagnosis and managing infectious diseases: Practicality and costs. Emerg Infect Dis; 7: 312-8, 2001.
- [189]Pfaller, M.A., Herwaldt, L.A., The clinical microbiology laboratory and infection control: Emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. Clin Infect Dis; 25: 858-70, 1997.
- [190]Tassios, P.T., Integration of molecular typing in nosocomial infection control-a Greek experience. Uzun, M., Erturan, Z., Anđ, Ö., (editörler) Microbiologica Balcanica 2003, Proceedings and Abstract Book. İstanbul: Balkan Society for Microbiology and Turkish Microbiological Society: 202, 2003.

- [191]Soll, D.R., Lockhart, S.R., Pujol, C., Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.C., Tenover, R.H. (eds) Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press: 139-61. Mikrobiyoloji. 8th ed. 2003.
- [192]Öz Aydın, S., RAPD (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA ) belirleyicileri ve bitki sistemeatiği. Dumlupınar üniversitesi fen bilimleri enstitüsü dergisi sayı 6, 2004.
- [193]Sadeghifarda, N., Ranjbar, R., Zaeimic, J., Alikhani, M.Y., Ghafouryana S., Raftarie, M., Abdulamir, A.S., Delpisheha, A., Mohebi, R., Bakar, F.A., Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles, and RAPD-PCR typing of *Acinetobacter* bacteria. Asian Biomedicine Vol. 4 No. 901-911, 6 December 2010.
- [194]Giordano, A., Varesi, P., Bertini, A., Villa, L., Dionisi, A.M., Venditti, M., Carfagna, P., Luzzi, I., Mancini, C. and Carattoli, A., Outbreak of *Acinetobacter baumannii* Producing the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. MICROBIAL DRUG RESISTANCE Volume 13, Number 1, 2007.
- [195]Akalin, H., Özakin, C., Gedikoğlu, S., Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Turkey infection control and hospital epidemiology, vol. 27, no. 4, april 2006.
- [196]Akalin H., Kolistin. ANKEM; 21: 26-8, 2007.

- [197]Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram negative bacterial infections. Clin Infect Dis; 40: 1333-41, 2005.
- [198]Towner K., The genus *Acinetobacter*. Prokaryotes; 6: 746-58, 2006.
- [199]Joly-Guillo, M.L., Vallee, E., Bergogne-Berezin, E., Philippon, A., Distribution of beta-lactamases and phenotype analysis in clinical strains of *Acinetobacter calcoaceticus*, J Antimicrob Chemother; 22(5): 597-604, 1988.
- [200]Balçı M., Bitirgen M., Kandemir, B., Arıbaş Türk, E., Eryaman, İ., Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılığı. ANKEM Derg.; 24 (1): 28-33, 2010.
- [201]Vahaboglu, H., *Acinetobacter* infeksiyonları. ANKEM Derg.; 22 (Ek 2): 44-45, 2008.
- [202]Wang, H., Guo, P., Sun, H., et al: Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from chinese hospitals, Antimicrob Agents Chemother; 51 (11): 4022-8, 2007.
- [203]Carvalho, K.R., Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef, G.Peirano et al: Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro. International Journal of Antimicrobial Agents 34: 25–28, 2009.

- [204]Brown, S., Amyes, S.G., The sequences of seven class D b-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. Clin Microbiol Infect; 11: 326–9, 2005.
- [205]Lopez-Otsoa, F., Gallego, L., Towner, K.J., et al. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. J Clin Microbiol; 40: 4741–3, 2002.
- [206]Coelho, J., Woodford, N., Afzal-Shah, M., et al. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. Antimicrob Agents Chemother 50: 756–8, 2006.
- [207]Heritier, C., Poirel, L., Nordmann, P., Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*, Clin Microbiol Infect;12 (2): 123-30, 2006.
- [208]Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., et al: The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*, Fems Microbiol Lett 258 (1): 72-7, 2006.