

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HASTANESİ YOĞUN BAKIM VE CERRAHİ SERVİS
HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN MULTI-DRUG RESISTANT
(MDR) *Acinetobacter baumannii* İZOLATLARININ REPETATIVE
SEQUENCE BASED-PCR (rep-PCR) VE PULSED FIELD GEL
ELECTROPHORESIS (PFGE) YÖNTEMLERİ İLE
KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Osman KILINÇ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 1951-TU-09 proje numarası ile
desteklenmiştir.

ISPARTA - 2011

ÖNSÖZ

2007 yılında başlayan uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışma döneminde her türlü yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN başta olmak üzere, deneyimlerini ve ışığını bizlerle paylaşan Sayın Doç. Dr. Selçuk KAYA ve Sayın Doç.Dr. Emel SESLİ ÇETİN hocalarıma sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım.

Tez projemde yer alan PFGE çalışmaları sırasında, yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Alper TEKELİ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru US hocalarıma teşekkürlerimi sunarım

Tezimin bir parçası olan rep-PCR çalışmaları sırasındaki yardımlarından dolayı Sayın Dr. Ahmet Süel'e teşekkür ederim.

Dört yıllık asistanlığım boyunca acısıyla tatlısıyla birçok şey paylaştığımız ve dostluklarıyla hayatıma renk katan, eğitimini bitirmiş olan ve halen devam eden tüm asistan arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmaları sırasında güzel günler geçirdiğimiz tüm biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelene kadar her zaman sevgisini eksik etmeyen ve hep yanımda olan ailelerimize, yoğun çalışmalarım sırasında gösterdiği sabır, hoşgörü ve destek nedeniyle biricik eşim Gülistan'a ve annesinin karnından bana verdiği sonsuz güç ile sevgili kızım Zeynep'e teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Osman KILINÇ

Isparta-2011

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Acinetobacter</i> Genusu	4
2.1.1. <i>Acinetobacter</i> Genusu Tarihçesi	4
2.1.2. Güncel Taksonomi	5
2.1.3. Tür İdentifikasyonu.....	7
2.1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i>	8
2.1.5. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de Direnç Mekanizmaları.....	9
2.1.6. <i>A.baumannii</i> 'de Tedavi	11
2.2. MDR <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
2.2.1. MDR Tanımı ve Epidemiyolojisi.....	13
2.2.2. Türkiye'de MDR <i>A.baumannii</i>	13
2.2.3. Avrupa'da MDR <i>A.baumannii</i>	14
2.3. Klinik Durum	14
2.3.1. Hastane Kaynaklı <i>A.baumannii</i> Enfeksiyonları.....	14
2.3.2. Solunum Yolu Enfeksiyonları.....	15
2.3.3. Bakteriyemi.....	16
2.3.4. Üriner Sistem Enfeksiyonları.....	16
2.3.5. Menejit	16
2.3.6. Yara Enfeksiyonları	17
2.4. Salgın Suşlarının Tiplendirilmesi.....	17
2.4.1. Moleküler Epidemiyolojik Teknikler.....	17
2.4.1.1. PCR Temelli Tiplendirme Metotları	17
2.4.1.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analizi.....	18
2.4.1.3. Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	18
2.4.1.4. Ribotiplendirme	18

2.4.1.5. Plazmid Analizi	18
2.4.1.6. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	19
2.4.1.7. Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction: rep-PCR.	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1. Suşlar	25
3.1.2. Besiyerleri	25
3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Testler	25
3.1.4. Araçlar	26
3.2. Yöntemler.....	27
3.2.1. Klinik Örneklerin Toplanması	27
3.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması.....	27
3.2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	28
3.2.4. rep-PCR DiversiLab (Bacterial Barcodes Inc, BioMerieux ABD).....	29
3.2.4.1. Bakteri Kültürü ve DNA Ekstraksiyonu:	30
3.2.4.2. Çoğaltma	31
3.2.4.3. Otomatize rep-PCR DNA Fingerprinting Yöntemi	32
3.2.4.4. rep-PCR Fngerprinting ve <i>Acinetobacter baumannii</i> İzolatlarının DiversiLab Software ile Analizi	32
3.2.5. PFGE Yöntemi ile <i>A.baumannii</i> Suşlarının Tiplendirilmesi ve Dendogramların Analizi.....	33
3.2.5.1. DNA Ekstraksiyonu	33
3.2.5.2. Plugların Hazırlanması.....	33
3.2.5.3. Yıkama	34
3.2.5.4. <i>ApaI</i> Resriksiyon Enzimi ile Kesim.....	34
3.2.5.5. %1,3'lük Plus Agarozun Hazırlanması	35
3.2.5.6. Bantların Analizi	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. PFGE Bulguları.....	38
4.1.1. 2009 Yılına Ait Suşların PFGE Bulguları.....	38
4.1.2. 2010 Yılına Ait Suşların PFGE Bulguları.....	41
4.2. rep-PCR Bulguları.....	47
4.2.1. 2009 Yılına Ait Suşların rep-PCR DiversiLab Bulguları	47
4.2.1.1. 2009 Yılına Ait Suşların rep-PCR DiversiLab Sonuçları	47

4.2.2. 2010 Yılına Ait Suşların rep-PCR DiversiLab Bulguları	51
4.2.2.1. 2010 Yılına Ait Suşların rep-PCR DiversiLab Sonuçları	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
ÖZET.....	66
SUMMARY	67
KAYNAKLAR	68

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AYB	: Anestezi Yoğun Bakım
BD	: Becton Dickinson
BIMP	: Bacterial Integral Membrane Proteins
BJ	: Bouvet-Jeanjean
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CHEF	: Counter-Clamped Homogeneous Electric Fields
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	: Deoksiribo-Nükleik Asit
cDNA	: Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FIGE	: Field Inversion Gel Electrophoresis
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
kb	: Kilo Base-Pair
ICU	: Intensive Care Unit
KBB	: Kulak Burun Boğaz
KVC	: Kardiyoloji Vasküler Cerrahi
KYB	: Koroner Yoğun Bakım
LB	: Luria Bertani
LMP	: Low Melting Point
MATE	: Multidrug and Toxic Compound Extrusion
MDR	: Multi Drug Resistant
MFS	: Majör Fasilitatör Süperailisi
MHA	: Mueller Hinton Agar
MLEE	: Multi Locus Enzyme Electrophoresis
MLST	: Multi Locus Sequence Typing
MYSTIC	: Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
NYB	: Nöroloji Yoğun Bakım
OFAGE	: Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis
OMP	: Outer Membrane Protein

PACE	: Programmable Autonomously Controlled Electrodes
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PHOGE	: Pulsed Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis
RE	: Restriksiyon Enzimi
Rep-PCR	: Repetitive SequenceBased- PCR
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RGE	: Rotating Gel Electrophoresis
RND	: Resistance Nodulation Cell Division
rRNA	: Ribozomal Ribo-Nükleik Asit
SE	: 75mM NaCl- 25mM EDTA
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
TAFE	: Transverse Alternating Field Gel Electrophoresis
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
TAFE	: Transverse Alternating Field Gel Electrophoresis
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TE	: Tris EDTA
TU	: Tjernberg-Ursing
UPGMA	: Unweighted Pair Group Methode with Arithmetic Mean
UV	: Ultra Viyole
VİP	: Ventilatör İlişkili Pnömoni

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Acinetobacter</i> genusunda yer alan isimlendirilmiş türler ve karşılığı olan bazı genomik türlerin ve kaynaklarının listesi	6
Tablo 2. PFGE’de kullanılan bazı Restriksiyon Enzimleri	21
Tablo 3. PFGE bant profillerinin değerlendirilmesi.....	22
Tablo 4. Manuel ve DiversiLab rep-PCR sistemlerinin başlıca özelliklerinin karşılaştırılması	24
Tablo 5. Disk difüzyon yöntemiyle <i>A.baumannii</i> ’de kullanılan zon çapları	29
Tablo 6. <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarının elde edildiği klinik örneklerin servislere ve yıllara göre dağılımı.	37
Tablo 7. 2009 yılına ait suşlar ve PFGE model grupları.	39
Tablo 8. 2009 yılı suşlarının, PFGE model gruplarına ait antibiyotik direnç oranları ve hasta bilgileri.....	41
Tablo 9. 2010 yılına ait suşlar ve PFGE model grupları.	43
Tablo 10. PFGE yöntem ile elde edilen paternler ve bantların ilişkisi.....	44
Tablo 11. 2010 yılı suşlarının, PFGE model gruplarına ait antibiyotik direnç oranları ve hasta bilgileri.....	45
Tablo 12. 2009 yılına ait suşlar ve rep-PCR çip numaraları.	47
Tablo 13. 2009 yılına ait suşlar ile DiversiLab sisteminde oluşan paternler.....	49
Tablo 14. 2009 yılına ait suşların PFGE ve DiversiLab sistemi ile oluşan bant paternleri.	51
Tablo 15. 2010 yılına ait suşlar ve rep-PCR çip numaraları.	52
Tablo 16. 2010 yılına ait suşlar ile DiversiLab sisteminde oluşan paternler.....	53
Tablo 17. 2010 yılına ait suşların PFGE ve DiversiLab sistemlerindeki oluşan paternleri.	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Genom içindeki tekrarlayan dizilere primerlerin tutunması ve çoğaltılması	23
Şekil 2. Fragmanların floresan yoğunluğuna göre oluşan grafikler	24
Şekil 3. 2009 yılı suşlarına ait dendogramlar.....	38
Şekil 4. 2010 yılı suşlarına ait dendogramlar.....	42
Şekil 5. 2009 Yılına ait suşların rep-PCR DiversiLab Sistemi ile elde edilen Dendogramları.	48
Şekil 6. 2009 Yılına ait suşların DiversiLab sistemi ile elde edilen benzerlik matrisi.....	49
Şekil 7. 2009 Yılına ait suşların DiversiLab sistemi ile elde edilen scatter plot'ları.	50
Şekil 8. 2010 yılına ait suşların rep-PCR DiversiLab sistemi ile elde edilen dendogramları	54
Şekil 9. 2010 yılına ait suşların DiversiLab sistemi ile elde edilen benzerlik matrisi.....	55
Şekil 10. 2010 yılına ait izolatların DiversiLab sistemi ile elde edilen scatter plot'ları.....	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Mueller Hinton Agar'da <i>A.baumannii</i> kolonileri.....	28
Resim 2. 48 <i>A.baumannii</i> izolatının PFGE ile agaroz jelde elde edilen DNA bant paternleri.....	46

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fleming ile başlayan antibiyotik çağında mikroorganizmalara karşı çok cepheli ve uzun sürecek bir savaş başlatılmıştır. Antibiyotiklerin tedavi amaçlı kullanılmaya başlandığı 1900'lerin ortalarından itibaren, bu savaşta insanoğlu adına önemli aşamalar kaydedilmiş ve birçok cephede başarı sağlanmıştır. Öyle ki, binlerce yıl hiçbir karşı koyma ile karşılaşmadan tüm insanlığı esir alan mikroorganizmalar, bir anda neye uğradıklarını anlayamadılar. İnsanoğlu, ele geçirdiği bu yeni antibiyotik silahını, zaman içinde rastgele ve çok hatalı biçimde kullanmaya başladı. Mikroorganizmaların bu kadar çabuk pes etmeyeceklerinin farkında olan bilim adamlarının uyarıları tüm bu antibiyotik çılgınlığı içinde çok cılız bir ses olarak kaldı.

Ancak; 1980'lerden itibaren bu cılız ses giderek kuvvetlenmeye ve daha fazla kişinin dikkatini çekmeye başladı. Çünkü mikroorganizmalar antibiyotik silahına karşı, direnç kozlarını devreye soktular.

Savaş, karşılıklı hamleler şeklinde geçmeye başladı. Yeni bir ilaç geliştiriliyor ve bir süre sonra bu ilaca karşı mikroorganizmalar tarafından direnç geliştiriliyordu. Mikroorganizmaların karşı hamleleri o kadar hızlı hale gelmeye başladı ki, ilacın geliştirilmesi ve piyasaya çıkmasıyla birlikte direnç haberleri duyulmaya başlanırdı. Direnç demek, tedavide başarısızlık demektir. Tedavide başarısızlık ise, yer yer kendini gösteren ve ölümlere neden olabilen salgınlar demektir. Stafilokoklar, enterokoklar, pseudomonaslar ve *Enterobacteriaceae* üyeleri farklı zamanlarda ve farklı yerlerde bu savaşın öne çıkan galipleri olmuşlardır (1).

Son yıllarda, *Acinetobacter* olarak bilinen genus, dünya çapında artan bir hızla hastane enfeksiyonlarının önemli bir aktörü haline gelmiştir (2). Özellikle son 15 yılda ise bu genusun en önemli temsilcisi olan *Acinetobacter baumannii*, antibiyotiklere karşı kolay ve hızlı direnç geliştirmesi nedeniyle insanoğlunun en çok uğraştığı patojenlerden birisi haline gelmiştir (3). Hastanelerdeki yaygın ve gereksiz geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının, bu hızlı yükselişte katkısı olduğu herkes tarafından kabul edilmektedir (4).

Acinetobacter baumannii ile özellikle immün sistemi zayıf kişilerde mekanik ventilasyon, katater kullanımı gibi invaziv işlemler sonrası enfeksiyon gelişimi daha siktir (5). Antibiyotik kullanımının yoğun olduğu ve genelde bağışıklık sistemi zayıflamış birçok hastanın mekanik ventilatörlerle desteklendiği yoğun bakım ünitelerinde, *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının çok sık olması şaşırtıcı değildir (6,7).

Acinetobacter türleri, insan deri florasının bir parçası olabilirler (8, 9). Yapılan epidemiyolojik bir çalışmada, sağlıklı bireylerin derilerinde ve mukozalarındaki kolonizasyon araştırılmış ve yaklaşık % 43'ünün derilerinde *Acinetobacter* türlerinin bulunduğu gösterilmiştir (10). Çapraz kontaminasyonun daha fazla görüldüğü ve *Acinetobacter* türleri için çevresel ortamın yoğun bir kaynak oluşturduğu hastanelerdeki yatarak tedavi edilen hastalarda, taşıyıcılık oranı daha yüksektir (11). Salgın dönemlerinde hastanede yatan hastalarda boğaz taşıyıcılığı %7-18 olarak bulunurken, trakeostomi sürüntülerinde ise taşıyıcılık oranı %45 bulunmuştur (12). Yapılan bir çalışmada, *A.baumannii*'nin Yoğun Bakım Ünitelerinde yatan hastalarda kolonizasyonu sağlıklı bireylere oranla daha yüksek bulunmuştur (13). Bir başka çalışmada ise sağlıklı bireylerde %25-40 oranında *Acinetobacter spp.* kolonizasyonu görülürken, yatan hastalarda bu oran %75 civarında bulunmuştur (14, 15, 16).

Özellikle Yoğun Bakım servislerinde yatan hastalardaki solunum sistemi enfeksiyonlarının üçüncü en sık etkeni *Acinetobacter ssp.* olup, *Acinetobacter baumannii* ise hastane kaynaklı enfeksiyonların %10'una kadarından sorumlu bulunmuştur (17,18).

Acinetobacter baumannii, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım ve cerrahi servislerinde giderek artan sayıda izole edilmeye başlanmıştır. Yapılan bir çalışmaya göre Tıp Fakültesi Hastanesindeki *A.baumannii* insidansı dönemsel olarak artış göstermekte ve salgınlara yol açmaktadır (19). Bu salgın dönemlerinde, enfeksiyonun varlığının tespiti kadar kaynağının da tespiti önemlidir. Yoğun Bakım Ünitelerinde ve cerrahi servislerde küçük çaplı salgınlara yol açabilen çoklu ilaç dirençli *A.baumannii*'nin kolonize olduğu hastaların tespiti ve farklı hastalardan izole edilen suşların genotiplendirme ile birbirleriyle olan

ilişkilerinin tayini, enfeksiyon kontrolü, salgınların önlenmesi ve salgına kısa sürede müdahale edilebilmesi açısından önemlidir (20).

Moleküler çalışmalar, enfeksiyon kaynağının aydınlatılması ve salgın suşlarının gösterilebilmesi için yapılması gereken işlemlerdir. Bu amaçla, aralarında; plazmid analizi, restriksiyon endonüleaz analizi, PCR (Polymerase Chain Reaction), MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis), MLST (Multilocus Sequence Typing), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), DNA (Deoksiribonükleik asit) dizi analizi, ribotyping, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve rep-PCR (Repetitive Sequence-Based PCR) bulunan birçok teknik, genetik benzerliklerin tayini için geliştirilmiştir (21). Her ne kadar benzer bantların ayırt edilmesinde, tekrar uygulanabilirliğinde sıkıntılar yaşansa ve uygulaması uzun sürse de moleküler teknikler içinde bugün için altın standart kabul edilen yöntem PFGE'dir (22,23).

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda; Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Anestezi Yoğun Bakım, Nöroloji Yoğun Bakım, Koroner Yoğun Bakım ve cerrahi servis hastalarından 05.02.2009–21.06.2010 tarihleri arasında laboratuvarımızda izole edilen 48 adet Çoklu İlaç Dirençli (MDR- Multi Drug Resistant) *Acinetobacter baumannii* suşunun, PFGE ve rep-PCR yöntemleri kullanılarak moleküler benzerliklerinin ve bu iki yöntemin aynı suşlardaki tutarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter* Genusu

2.1.1. *Acinetobacter* Genusu Tarihçesi

Acinetobacter genusunun geçmişi, 1911’de Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck’in topraktan *Micrococcus calcoaceticus* isimli bakteriyi tanımlamasıyla başlar (24, 25). Uzun yıllar benzer bakteriler tanımlanmış ve farklı isimlerdeki genus ve türlerde yer bulmuşlardır. Bugün için *Acinetobacter* genusunda yer alan türlere geçmişte verilen isimlerden bazıları şöyledir: *Bacterium anitratum* (26), *Herellea vaginicola* (27), *Mima polymorpha* (28), *Diplococcus mucosus* (29, 30), *Micrococcus calcoaceticus* (25), *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica* (31) ve *Achromobacter anitratus* (32) yer almaktadır.

Acinetobacter genusu bugünkü haline uzun yıllar süren bir taksonomik süreç sonunda gelmiştir (12, 33). Hareketsiz anlamına gelen Yunanca ακίνητος (akinetos) kelimesinden geliştirilen *Acinetobacter* Genusunun güncel tanımlanması, 1954 yılında Brisou ve Prevot tarafından *Achromobacter* genusundaki hareketsiz mikroorganizmaları hareketlilerden ayırt edebilmek amacıyla önerilmiştir (33). Baumann ve arkadaşları 1968 yılında farklı türlerin *Acinetobacter* genusu altında toplanmasını önermiştir (34). 1971 yılında Moraxella ve ilişkili bakterilerin taksonomisi ile ilgilenen alt komite, *Acinetobacter* genusunun sadece oksidaz negatif suşları içermesini önerdi (35). 1974 yılındaki Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology basımında *Acinetobacter* genusu, tek türü olan *Acinetobacter calcoaceticus*’u içerecek şekilde yer almıştır. Ancak “Approved List of Bacterial Names” listesinde *A.calcoaceticus* ve *A.lwoffii*’yi içeren iki farklı tür yer almıştır. Bunun nedeni bazı *Acinetobacter*’lerin glukozu kullanabilirken bazılarının kullanamamasıydı (33). 1986’da Bouvet ve Grimont genomik çalışmalara (DNA-DNA hibridizasyonuna) göre, genusu 12 farklı gruba ayırdılar (36). 1989’da Tjernberg ve Ursing 13-14-15 diye kodlanan üç yeni grup daha tanımladılar (37).

2.1.2. Güncel Taksonomi

Geleneksel olarak mikrobiyal türler, fenotipik özellikleri yüksek oranda benzerlik gösteren bir grup suş olarak kabul edilir. Ancak güncel tür tanımlamasında ve farklı organizmaların birbirleri arasındaki ilişkinin tespitinde nükleik asit hibridizasyon ve dizi çalışmaları genel kabul gören metotlardır. Tür için kabul edilen resmi moleküler tanıma göre; türü oluşturan suşlar $>70\%$ DNA-DNA ilişkisi ve $<5^\circ\text{C}$ Divergence Value (ΔT_m) içermelidir (12).

Günümüzde kullanılan taksonomik sınıflamaya göre; *Moraxellaceae* Ailesinde Gammaproteobacteria Sınıfında yer alan *Acinetobacter* genusu (38) birçok laboratuvar tarafından genus seviyesine kadar tanımlanabilmektedir. *Acinetobacter* genusu üyeleri, gram negatif, zorunlu aerob, nonfermenter, hareketsiz, pigmentsiz, katalaz pozitif ve oksidaz negatiftir (39). Genus üyelerinin DNA'larının Guanin+Cytosine içeriği $\%39-47$ arasındadır (12).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan rutin agar temelli katı besiyerlerinde 37°C 'de kolaylıkla üreyebilirler (40). Yaklaşık $1-1,5\ \mu\text{m} \times 1,5-2,5\ \mu\text{m}$ boyutlarında olan *Acinetobacter*'ler, sabit büyüme fazında ve selektif olmayan agarlarda yuvarlak görünen basillerdir. İlk izolasyonda ve taze kültürlerde kokobasil formunda olup, subkültürlerde ve hücre duvarına etkili antimikrobiyal içeren plaklarda ise basil formları ön plandadır (41).

Moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucu *Acinetobacter* genusunda 33 farklı tür tanımlanmıştır (24). Bu tanımlanan türlerin 18 tanesi resmi tür adını almıştır. Diğerleri hala resmi bir isimlendirme yapılmamış olan genomik türlerdir. *Acinetobacter* genusunda yer alan türlerin ve izole edildikleri kaynaklar Tablo. 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Acinetobacter* genusunda yer alan isimlendirilmiş türler ve karşılığı olan bazı genomik türlerin ve kaynaklarının listesi. (Kaynak: 24, 42)

GENOMİK TÜRLER	TÜRLER	KAYNAK
1	<i>A.calcoaceticus</i>	Toprak, su
2	<i>A.baumannii</i>	İnsan patojeni
3		İnsan patojeni
4	<i>A.haemolyticus</i>	İnsan patojeni
5	<i>A.junii</i>	İnsan patojeni
6		İnsan patojeni
7	<i>A.johnsonii</i>	İnsan patojeni
8/9	<i>A.lwoffii</i>	İnsan patojeni
10		İnsan patojeni
11		Atık sular
12	<i>A.radioresistens</i>	İnsan patojeni
13TU		İnsan patojeni
13BJ,14TU		İnsan patojeni
14BJ		İnsan patojeni
15TU		Toprak, su
15BJ		Atık su
16		İnsan patojeni
17		İnsan patojeni
	<i>A.baylyi</i>	Atık su
	<i>A.bouvetii</i>	Atık su
	<i>A.gernerii</i>	Atık su
	<i>A.parvus</i>	İnsan patojeni
	<i>A. schindleri</i>	Çevre
	<i>A.tandoii</i>	Atık su
	<i>A.tjernbergiae</i>	Atık su
	<i>A.towneri</i>	Atık su
	<i>A.ursungii</i>	İnsan patojeni
	<i>A.beijerinckii</i>	
	<i>A.gyllenbergii</i>	

Acinetobacter Genotür 1 (*A. calcoaceticus*), Genotür 2 (*A.baumannii*) ile isimlendirme yapılmamış olan Genotür 3 ve Genotür 13TU (Tjernberg- Ursing), fenotipik olarak benzer olup, *A.calcoaceticus*-*A.baumannii* kompleks olarak adlandırılır (43, 44). Pek çok mikrobiyoloji laboratuvarında *A.calcoaceticus*-*A.baumannii* kompleksini oluşturan türler, standart laboratuvar teknikleri ve

fenotipik testlere dayalı tiplendirme sistemleri ile ayırt edilemezken, yapılan moleküler temelli çalışmalarda bu türlerin patojeniteleri ve antibiyotiklere olan direnç profillerinde farklılıklar görülmüştür (45). *A.calcoaceticus-A.baumannii* kompleksini oluşturan türler, fenotipik olarak benzemelerine karşın genetik olarak farklılıklar içerir. Özellikle *Acinetobacter baumannii*'nin diğer üç türden ayrımı için moleküler tekniklerin kullanılmadığı çalışmalarda, epidemiyolojik olarak yanlış yorumlar yapılabilmektedir (46).

A.calcoaceticus-baumannii kompleksi, genus üyeleri içinde hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık karşılaşılan nedenidir (47). Ancak *A.calcoaceticus* çevresel bir tür olduğu ve bilinen ciddi bir klinik hastalığa neden olmadığı için, klinik vakalarda etken olarak kompleks isminin kullanılması yanıltıcı olabilir (33).

Genusun bugüne kadar yaşadığı gelişime bakıldığında, moleküler temelli çalışmaların dünya çapında artması ile taksonominin son şeklini alabilmesi için daha zamana ihtiyaç vardır.

2.1.3. Tür İdentifikasyonu

Acinetobacter türleri Gram boyamalarda, yanlışlıkla Gram pozitif kok olarak görülebilir ve özellikle kan kültürlerinde yanlış bilgilendirmelere neden olabilir (37). Kolonileri, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerininkilerden biraz daha küçük, dairesel, yumuşak ve opaklırlar (36). Birçok tür MacConkey agarda renksiz veya açık pembe renkli büyüme gösterirler. Bazı türleri ise kanlı agarda zor üreyen, benekli koloniler oluştururken, nutrient brothda üreyemezler (48).

A.baumannii sakkarolitik olup glukozdan asit üretimini gerçekleştirirken aksine *A.lwoffii* asakkarolitik olup glukozu kullanamaz. *A.baumannii* ayrıca %5-10 laktozu kısa sürede okside edebilir. Genotür 7 (*A.Johnsonii*)'de asakkarolitikdir ancak diğer türlerden 37°C'de üreyememesi ile ayırt edilebilir (37).

Kanlı agarda hemoliz özelliği Genotür 4 (*A.heamoliticus*), Genotür 6, Genotür 13BJ (Bouvet-Jeanjean), Genotür 14BJ (Bouvet-Jeanjean), Genotür 15BJ (Bouvet-Jeanjean), Genotür 16 ve Genotür 17'de görülebilirken, kompleks üyelerinde hemoliz görülmez (36, 33).

Acinetobacter türlerini diğer nonfermenter bakterilerden ayırabilen tek bir metabolik test yoktur. Karışık bakteriyel varlığın bulunduğu çevresel ve klinik örneklerden *Acinetobacter*'lerin elde edilmesinde Leeds *Acinetobacter* Medium kullanılabilir (49).

A.johnsonii, *A.lwoffii* ve *A.radioresistens*, asakkarolitik türler olup insan derisinde bulunabilirler. *Acinetobacter* spp. yatan hastalarda önemli bir kolonizasyon ve enfeksiyon kaynağı oluşturmaktadır. Neden oldukları çeşitli hastalıklar arasında, bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları, menenjit bulunmaktadır. Ancak bu türler asıl rolünü özellikle ventilatör ilişkili pnömonide (VIP) oynamaktadırlar. *Acinetobacter* türleri genelde çeşitli antibiyotiklere dirençli iken *A.lwoffii* diğerlerine göre daha duyarlıdır (36).

Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmaya göre, insan derisinde *Acinetobacter* spp. kolonizasyonu %40 olarak tespit edilmiş. Kolonizasyon, önkolda %51, alında %47 ve ayak parmağında %34 olarak bulunmuş (50). Aynı çalışmaya göre Genotür 8/9 (*A.lwoffii*) %61, Genotür 15BJ %12,5 ve Genotür 12 (*A.radioresistens*) %8 oranlarında izole edilirken, *A.calcoaceticus-baumannii* kompleks kolonizasyonu ise <%1 oranında kalmış.

2.1.4. *Acinetobacter baumannii*

Doğada çok yaygın halde bulunan *A.baumannii*, kuru ve nemli yüzeylerde uzun süre hayatta kalabilir (9). 1980'lere kadar *Acinetobacter*'ler etken bile kabul edilmezken son 30 yılda, özellikle *A.baumannii*, birçok antibiyotiğe karşı dirençli hale gelip salgınlara neden olmaktadır. Bu çoklu antibiyotik direnci ve kuru yüzeylerdeki dayanıklılığı *A.baumannii*'nin salgınlara neden olmasındaki ayırt edici özelliğidir (51).

Şüphesiz *Acinetobacter* genusunun klinik örneklerden en sık elde edilen ve en çok uğraşılan türü (genomik tür 2) *A.baumannii*'dir (52). *A.calcoaceticus-baumannii* kompleks üyelerinden birisi olan *A.baumannii*, diğer türler gibi laboratuvarında kullanılan standart katı besiyerlerinde rahatlıkla üreyebilir. Ancak kompleksin bir üyesi olan *A.baumannii* diğer türlerden 44°C'de üreyebilmesi ile ayrılmaktadır (53).

A.baumannii, hastane ortamında uzun süre hayatta kalabilme kapasitesi olan ve immün sistemi zayıflamış hastalarda ölümcül hastalıklara neden olabilen bir fırsatçı patojendir (54). Özellikle yoğun bakım servislerindeki ventilatör ilişkili pnömoni, yanıklar, yaralar ile katater kullanımının olduğu üriner sistem ve kan kültürlerinde ciddi fırsatçı enfeksiyonların artan nedenidir (55).

2.1.5. *Acinetobacter baumannii*'de Direnç Mekanizmaları

A.baumannii, plazmid, transpozon ve integronlarla antibiyotik direncinin kazanılıp, aktarıldığı ve çok hızlı direnç gelişiminin gözlemlendiği çok çeşitli direnç mekanizmalarını eksprese edebilir (56).

A.baumannii tedavisinde, rutinde Gram negatif bakterilerde sıkça kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişimi sık rastlanan bir problemdir (57). MDR izolatlarda yapılan genom dizi analizleri, diğer Gram negatif türlerden kazanıldığı düşünülen çoklu direnç genleri içeren büyük genomik adaların (AbaR1, R2, R3, R5) varlığını ortaya koymuştur (58, 59, 17).

B-laktamazlar: *A.baumannii* intrinsik D sınıfı oksasilinaz ve indüklenmeyen kromozomal AmpC sefalosporinaza sahiptir. *A.baumannii* oksasilinazları OXA-51-like enzim gruplarına aittir. *A.baumannii*'de bulunan OXA-51-like genlerinin yaygın halde bulunması, bu geni, organizmanın tür seviyesinde identifikasyonunda önemli bir genetik belirteç haline getirmiştir. OXA-51-like enzimleri penisilinleri (benzil penisilin, ampisilin, tikarsilin ve piperasilin) ve karbapenemleri (imipenem ve meropenem) hidroliz edebilir. Genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere karşı aktif değildir (60).

Karbapenem direncinin en yaygın enzimatik şekli, *blaOXA-23*, *blaOXA-40*, *blaOXA-58* genlerinin kodladığı oksasilinazların üretimi ile olur. Bunlar, plazmid veya kromozomal olarak kodlanır, klavulanik asit ile inhibe olmaz ve dünyada yaygın olarak bulunur (61). VIM, IMP ve SIM tipi sınıf B metallo-karbapenemazlar *A.baumannii*'de bulunur ve karbapenemlere ve aztreonam hariç β -laktamlara karşı yüksek düzeyde direnç kazandırır.

TEM, SHV, CTX-M, GES, SCO, PER ve VEB'i içeren büyük bir sınıf A genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) ailesi tanımlanmıştır. Genişlemiş

spektrumlu sefalosporinlere karşı bu enzimlerin üretimi ile direnç oluşumu, AmpC düzenlemesi ile direnç oluşumundan daha seyrek olmaktadır. Ancak başka direnç paternlerinin varlığında GSBL varlığının tespitindeki zorluklar, gerçek prevalansı yansıtmayabilir (62).

Aminoglikozid modifiye edici enzimler: Asetiltransferazlar, nükleotidiltransferazlar ve fosfotransferazların hepsi, sıklıkla kombinasyon şeklinde *A.baumannii*'de bulunmaktadır. Bunlar plazmidlerde, transpozonlarda veya sınıf I integronlarla ilişkili olarak taşınırlar (63). Avrupa'da yapılan bir çalışmada, *A.baumannii* suşlarının %95'i en az bir direnç geni, %84'ü iki ile beş arasında direnç geni taşıdığı bulunmuş (64). Bu genlerin ekspresyonu farklı aminoglikozidlere farklı değişken duyarlılıkların oluşmasına neden olur.

Geçirgenlik defektleri: Enzimatik direnç, maddelerin dış membrandan taşınmasında görevli olan OMP'lerin (Outer Membrane Protein) kaybıyla oluşan membran geçirgenliğindeki değişikliklerle daha da artabilir. *A.baumannii* diğer Gram negatif bakterilerle kıyaslandığında, intrinsik direncinin bir kısmını oluşturan daha az sayıda porine sahiptir (62). Porin kaybı çeşitli büyüklükte protein eksikliği ile birlikte en sık β -laktam direnciyle ilişkilidir (65).

Effluks sistemleri: Aktif effluks mekanizmaları ile ilaç atılımı çoklu ilaç direncine neden olur. Major fasilitatör süperailisinin (MFS) dar spektrumlu pompaları arasında tetrasiklin (TetA, TetB) ve minosiklin (TetB) direnci yanı sıra kloramfenikolü çıkaran CmlA sistemi vardır (62).

RND (Resistance-Nodulation-cell Division) tip pompalar, periplasmik, iç ve dış membrandan parçalar içeren ortak yapılara sahip geniş bir substrat spesifitesi olan pompalardır. *A.baumannii*'de AdeABC ve AdeIJK olmak üzere iki sistem tanımlanmıştır. Aminoglikozidlere, β -laktamlara, kloramfenikol, eritromisin ve tetrasiklinlere direnç adeABC'nin aşırı ekspresyonu ile oluşur (66). İkinci RND pompası olan AdeIJK ise AdeABC ile sinerjik etki ile tigesiklin direncine katkı sağlar (67).

MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) ailesine üye bir pompa olan AbeM'nin aşırı ekspresyonu kinolonlara, gentamisin, kanamisin, eritromisin, kloramfenikol ve trimetoprim karşı azalmış duyarlılığa neden olur (68).

Yakın dönemde tanımlanan BIMP (Bacterial Integral Membrane Proteins) ailesinin bir üyesi olan AbeS, kinolonlar, makrolidler ve kloramfenikole direnç gelişimine katkı sağlar (69).

2.1.6. *A.baumannii*'de Tedavi

A.baumannii enfeksiyonlarında kullanılma potansiyeli olan ilaç gruplarına karşı hızlı direnç gelişimi, uygun tedavi seçimini sınırlamaktadır. Tedavide kullanılabilen antibiyotik grupları şunlardır:

Karbapenemler: Antipsödomonal karbapenemler ciddi *A.baumannii* enfeksiyonlarında tercih edilen tedavi yöntemi olmuştur. Meropenem ve imipenem bu grupta en sık kullanılan ilaçlardır. Yapılan çalışmalarda karbapenem duyarlılıkları %60-90 arasında bulunmuştur (70).

Polimiksinler: Polimiksinler, Gram negatif bakterilerin lipopolisakkarid tabakasına etki eden katyonik polipeptidlerdir. Toksik etkiler nedeniyle 1980'lerden itibaren klinik kullanımı terk edilmişti. Polimiksin B ve Colistin (Polimiksin E) günümüzde kullanılan iki ajandır. *A.baumannii*'ye karşı bakterisidal aktiviteye sahip olan polimiksinler düşük direnç oranlarına sahiptirler (71, 72). Ancak polimiksinlerin artan şekilde kullanımı ile birlikte yakın dönemde direnç gelişimi gözlenebilir.

Sulbaktam: *A.baumannii*'ye karşı intrinsik aktiviteye sahip olan sulbaktam, β -laktamaz inhibitörleri içinde en aktif olanıdır. Penisilin bağlayan protein ile olan ilişkisine göre bakteriostatik veya bakterisidal aktiviteye sahip olabilir. *A.baumannii*'ye karşı, ampisilin, sefaperazon veya antipsödomonal penisilinlerle yapılan kombinasyonlar, sulbaktamın antimikrobiyal aktivitesinde artışa neden olmamaktadır. Başlarda yüksek in-vitro duyarlılıkları bulunmuş olsa da, yakın dönemdeki çalışmalarda sulbaktamın *A.baumannii*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi düşmüştür (71). İnsan çalışmalarında sulbaktam/ β -laktam kombinasyon tedavisinin MDR *A.baumannii* kaynaklı VIP ve bakteriyemide benzer etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (73, 74).

Tetrasiklinler ve Glisiklinler: Minosiklin, doksisisiklin ve tetrasiklinin *A.baumannii*'ye karşı antimikrobiyal etkisi vardır. Minosiklinin, doksisisiklin ve tetrasikline dirençli suşlara karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Buna neden olarak,

tetrasiklin spesifik effluks pompasını kodlayan *tet(A)* direnç belirleyicisinin minosikline karşı direnç geliştirememesi gösterilmiştir. Çok merkezli bir çalışmada >%90 *A.baumannii* izolatı minosikline duyarlı bulunurken imipeneme duyarlılık daha düşük bulunmuş (70). Minosiklinin semi-sentetik bir benzeri olan tigesiklin yeni kullanılmaya başlayan bir antibiyotiktir. *A.baumannii*'ye karşı bakteriyostatik etki gösterir. İlk çalışmalarda tigesikline karşı yüksek duyarlılık oranları bildirilmesine rağmen, zaman içinde daha düşük duyarlılıklar rapor eden çalışmalar yayınlanmaya başlamıştır (75).

Aminoglikozidler: *A.baumannii*'ye karşı aminoglikozidler orta seviyede antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Çok merkezli çalışmalarda, amikasinin *Acinetobacter* spp.'ye karşı %60 oranında duyarlılığa sahip olduğu anlaşılmıştır (76). Aminoglikozidlerin MDR *A.baumannii* izolatlarında aktivitesi duyarlı izolatlara göre daha düşüktür.

Florokinolonlar: *A.baumannii*'ye karşı florokinolonların orta derece antimikrobiyal aktivitesi vardır. Özellikle *Acinetobacter* spp.'ye karşı siprofloksasinin duyarlılık oranı %44 civarında bulunmuştur. Ancak florokinolonların MDR izolatlara karşı aktivitesi düşük olarak rapor edilmiştir (76).

Kombinasyon tedavileri: MDR *A.baumannii* enfeksiyonlarına karşı kombinasyon tedavileri, ilaçlar arası sinerjizmi yakalayabilmek veya tedavi sırasında direnç gelişimini önlemek amacıyla klinisyenler tarafından kullanılır. Her ne kadar in-vitro etkinliği gösterilse bile klinik yanıtların bu bulgularla uyumlu olmayabileceği unutulmamalıdır.

A.baumannii'de karbapenem direncini aşmak için, karbapenemlerin diğer antibiyotiklerle kombinasyonları çalışılmıştır. Özellikle imipenemin sulbaktam ile kombinasyonu in-vitro sinerjik aktivite göstermiş, ancak imipenemin dirençli izolatlar ile enfekte hastalarda klinik faydası çok net değildir (75). Karbapenem ve polimiksin kombinasyonunun MDR izolatlarda in-vitro etkinliği için çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. İmipenemin rifampisin ile in-vitro görülebilen sinerjik etkisi klinik etkisi ile uyumlu bulunmamış (77). MDR *A.baumannii* için polimiksin temelli kombinasyonların en çok çalışılanı ve in-vitro sinerjizmi gösterilene rifampisindir.

Pek çok in-vitro çalışmada sulbaktamın, karbapenem veya sefepim ile kombinasyonlarının, MDR *A.baumannii*'ye karşı başarılı etkisi rapor edilmiştir (78).

2.2. MDR *Acinetobacter baumannii*

2.2.1. MDR Tanımı ve Epidemiyolojisi

Hastanelerde enfeksiyon kontrolü amacıyla, MDR veya Pandrug-rezistan *A.baumannii* ile kolonize hastaların tespit edilmesi önemlidir. MDR *A.baumannii* tanımı; şu beş ilaç grubundan üç veya daha fazla gruba direnç varlığında geçerlidir: Antipsödomonal sefalosporinler (Seftazidim veya Sefepim), Antipsödomonal karbapenemler (İmipenem veya Meropenem), Ampisilin-sulbaktam, Florokinolonlar (Siprofloksasin veya Levofloksasin) ve Aminoglikozidler (Gentamisin, Tobramisin veya Amikasin). Her ne kadar Pan terimi “Hepsi” anlamında olsa da, Pandrug-rezistan *A.baumannii* tanımı; genelde *A.baumannii* için terapötik potansiyeli olan ilk sıra ilaçların hepsine karşı direnç varlığında geçerlidir. Bunlar arasında tüm beta-laktamlar, florokinolonlar ve aminoglikozidler bulunmaktadır (33).

MDR *A.baumannii*'de direnç gelişimi için risk faktörleri arasında antibiyotik kullanımı, mekanik ventilasyon, yoğun bakım ve hastanede uzamış kalma süresi ve invazif işlemler vardır (79). Hastadan hastaya bulaşmada ise, sağlık çalışanlarının elleri, hasta bakımında kullanılan araç-gerecin kontamine olması gelmektedir (80).

2.2.2. Türkiye’de MDR *A.baumannii*

Giderek artan direnç gelişimi, Türkiye’de de gözleri *A.baumannii* üzerine çevirmiş, bu konuda daha fazla çalışma yapılmaya başlanmıştır. Uluslar arası bağlantılı ve çok merkezli bir çalışma olan MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) ile Türkiye’deki *A.baumannii* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumları araştırılmıştır. Bu çalışmanın 1997-2000 yılları arasındaki verilere göre, birçok ülkede meropenem direnci %10’un altında iken, İngiltere ve İtalya’da %30 civarı bulunmuş. Türkiye ise %35 ile en fazla direncin görüldüğü ülkelere birisi olmuştur (81). Aynı çalışmanın 2000-2003 arası yapılan Türkiye ayağında ise meropenem direnci %42, imipenem direnci ise %48 bulunmuştur. Bu direnç artışının nedeni olarak ülkemizdeki enfeksiyon kontrol

önlemlerinin yeterince uygulanamaması ve buna bağlı dirençli suşların yayılımı olabileceği belirtilmiştir (82).

Çelebi ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmaya göre, *Acinetobacter* suşlarında MDR izolat oranı %33,6 bulunmuş. MDR *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarında mortalite oranı %50 iken, MDR olmayan izolatlarla gerçekleşen enfeksiyonlara bağlı mortalite oranı %11 bulunmuş (83).

2.2.3. Avrupa’da MDR *A.baumannii*

MDR *A.baumannii* dünyanın birçok bölgesinde olduğu gibi Avrupa’da da gerçek bir sorun haline gelmiştir. 1980’lerden beri özellikle İngiltere, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya ve Hollanda’da *A.baumannii*’nin neden olduğu hastane salgınları moleküler yöntemlerle araştırılmaktadır (12, 84). Çalışmalarda tespit edilen epidemik suşların hastaneler arasında taşınması kolonize hastaların taşınması yoluyla gerçekleşmektedir (85). Bazen MDR *A.baumannii* dağılımı İngiltere, Fransa ve Portekiz’de olduğu gibi tüm ülkeyi kapsayacak şekilde olabilmektedir (86, 87).

Avrupa klon I, II ve III diye isimlendirilen, üç uluslar arası *A.baumannii*, Avrupa çapında birçok ülkede rapor edilmiştir. Karbapenem direnci birçok Avrupa ülkesinin güncel sorunudur. Her ne kadar bu konuda bilgi toplamak zor olsa da, Türkiye, Yunanistan, İtalya, İspanya ve İngiltere’de karbapenem direnci diğer ülkelere göre daha yüksek bulunmuştur (33). Karbapenem direnci Doğu Avrupa’da artarken, İskandinavya’da en düşük oranda bulunmuştur. Avrupa’da 2002-2004 arası yapılan MYSTIC çalışmasına göre, izolatların % 73,1’i meropeneme duyarlı, %69,8’i imipeneme, %32,4’ü seftazidime, %34’ü siprofloksasine ve %47,6’sı gentamisine duyarlı bulunmuştur (88).

2.3. Klinik Durum

2.3.1. Hastane Kaynaklı *A.baumannii* Enfeksiyonları

İmmünesi baskılanmış hastalarda, altta ciddi sorunu olanlar, invaziv işlemlere maruz kalanlar ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan kişilerde MDR *A.baumannii* enfeksiyonları görülme olasılığı daha yüksektir (89). Bu nedenle *A.baumannii* enfeksiyonları, yoğun bakım ünitelerinde sıklıkla görülür.

Genellikle *A.baumannii* enfeksiyonu ve kolonizasyonu arasında ayırım yapmak zordur (90). Buna rağmen klinisyenler, yatan bir hastada *A.baumannii* izole edilmesi durumunda bunun yaklaşık %30 mortalite ile seyreden ciddi bir enfeksiyon olduğunu bilirler (91).

A.baumannii'nin izole edildiği enfeksiyonların çoğunluğu, solunum yolu, peritoneal sıvı ve üriner sistem gibi yüksek sıvı içeriği olan organ sistemlerini içerir ve sıklıkla katater ilişkilidir. Patolojik değişiklikler enfeksiyonun görüldüğü organa göre değişir ve diğer aerobik gram negatif bakterilerin neden olduğu değişikliklerden farklı değildir (84).

Farklı tipteki enfeksiyonların dağılımı hastaneler arasında değişiklik gösterir ve bu değişiklik muhtemelen hastanenin yatak sayısı ile izolasyon sürecindeki prosedür farklılıklarından kaynaklanır. İspanya'da yapılan bir prospektif çalışmaya göre, *A.baumannii* enfeksiyonlarının >% 90'ı hastane kaynaklı olup, sadece %4'ü toplum kaynaklı bulunmuş (92). Fransa'da yapılan bir başka çalışmaya göre, üç yıllık bir dönem incelendiğinde *A.baumannii* enfeksiyonları Haziran-Eylül döneminde mevsimsel bir artış göstermiştir (84).

Acinetobacter'ler tarafından hastanelerde gelişen esas sorun, yoğun bakımdaki kritik durumdaki hastalar, mekanik ventilasyon ihtiyacı olanlar ve travma sonrası yanık veya yara gelişen hastalardır. *Acinetobacter* ile gelişen enfeksiyonlar; ventilatör ilişkili pnömoni, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, menenjit ve dolaşım sistemi enfeksiyonlarıdır (12, 33). Bu tip enfeksiyonlar genelde *A.baumannii* kompleks tarafından meydana gelir. *Acinetobacter* genusunun diğer üyeleri ile gelişen enfeksiyonlar nadirdir ve genelde katater ilişkili enfeksiyonlardır. Kuruluğa ve dezenfektanlara gösterdiği direnç, bu organizmanın hastane ortamında uzun süre kalabilmesine ve dönem dönem salgınlara neden olmaktadır.

2.3.2. Solunum Yolu Enfeksiyonları

1970'lerden önce *Acinetobacter* enfeksiyonları sıklıkla operasyon sonrası gelişen üriner sistem enfeksiyonlarıydı ve *Acinetobacter* daha çok cerrahi ve dahili servis hastalarından izole edilmekteydi. Resisitasyon tekniklerinin gelişimi, geniş

spektrumlu antibiyotik kullanımı ve invaziv işlemlerin artması *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tiplerini ve izole edildikleri servisleri değiştirdi (90).

Günümüzde bu bakterinin en sık karşılaşılan formu, mekanik ventilasyon sonrası gelişen nozokomiyal pnömonidir. Yapılan bir çalışmaya göre, 1976-1990 arası *Acinetobacter* kaynaklı nozokomiyal pnömoni insidansı %0,64'ten %6,4'e yükselmiştir (93). Daha geniş bir başka çalışmaya göre, ABD'de *Acinetobacter* spp. insidansı %8 bulunmuş (94). Balcı ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada, hastane enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanan *A.baumannii* suşlarının %43'ü solunum sistemi kaynaklı bulunmuş (95).

2.3.3. Bakteriyemi

Bakteriyemi, hastane enfeksiyonları içinde en ölümcül olanlarından birisidir. İngiltere'de yapılan bir çalışmaya göre *Acinetobacter* bakteriyemisi bulunan hastaların, genellikle 50 yaş üstü olduğu ve %54'ünün yoğun bakım servislerinde yattıkları rapor edilmiş (90). *A.baumannii* bakteriyemisinin en sık görülen kaynakları, intravasküler ve solunum yolu kataterleri olup, cerrahi yaralardan, yanıklardan ve üriner sistemden kaynaklananlar daha azdır (96, 97, 98). Vakaların %21-70'inde ise bakteriyemi nedeni bulunamaz (96, 73). Muhtemelen bunların da nedeni tanı konulamamış bir katater enfeksiyonu veya barsak kaynaklı olabilir.

2.3.4. Üriner Sistem Enfeksiyonları

İmmün sistemi çalışan kişilerde üriner sistemde *A.baumannii* enfeksiyonu alışılmış bir durum değildir. Bu organizma daha çok katater ile ilişkili olup, yapılan bir çalışmaya göre yoğun bakım hastalarında üriner sistem enfeksiyonu %1,6 bulunmuştur (99).

2.3.5. Menenjit

1970'li yıllara kadar toplum kaynaklı *Acinetobacter* menenjitleri rapor edilirken, bu tarihten sonra rapor elden menenjit vakalarının hemen hepsi nozokomiyal *A.baumannii* enfeksiyonlarıdır (12). Bu hastaların çoğunluğu lumbar ponksiyon, myelografi, ventrikülografi veya başka nöro-cerrahi işlem geçiren hastalardır. Mortalite oranları %20-27 arasında bulunmuştur.

Risk faktörleri arasında ventrikül şantları, ventrikülostomi ve BOS (Beyin Omurilik Sıvısı) fistülleri bulunmaktadır. İnvaziv materyallerin, kullanım sürelerinin uzaması, enfeksiyon riskini artıran bir diğer faktördür. Aktaş ve arkadaşları, eksternal ventriküler şant sistemi ile ilişkili *A.baumannii* enfeksiyonu rapor ederek bu risk faktörlerini göstermişlerdir (100).

2.3.6. Yara Enfeksiyonları

A.baumannii'ye bağlı deri ve yumuşak doku enfeksiyonları solunum yolu veya kan kültürleri ile kıyaslanınca daha az görülür. Özdemir ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada, izole edilen *A.baumannii*'lerin %24,4'ü yara yeri kaynaklıydı (101). *A.baumannii* ayrıca yanık ünitelerinde de sıkça karşılaşılan bir patojendir (102). Son dönemlerde *A.baumannii*, Irak ve Afganistan'daki askeri personelden savaş yaralarından sıkça izole edilmiştir (103, 104, 105).

2.4. Salgın Suşlarının Tiplendirilmesi

2.4.1. Moleküler Epidemiyolojik Teknikler

Hastanede *A.baumannii*'nin yayılmasını kontrol etmek için, organizmanın kaynaklarının ve yayılma yollarının tespit edilmesi gereklidir. Salgın suşlarının diğer epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlardan ayrımını yapabilmek için, izolatların alt tür seviyesine kadar ayrımı yapıp karşılaştırılmalıdır. Bu amaçla kullanılan biyokimyasal özelliklere dayalı fenotipik tiplendirme sistemleri, antibiyotik duyarlılık paternleri, serotiplendirme, faj tiplendirmesi ve protein profilleri artık yerini daha güvenilir sonuçlar veren moleküler yöntemlere bırakmıştır.

2.4.1.1. PCR Temelli Tiplendirme Metotları

Genomik DNA'nın tek primerle rastgele parçalarının amplifikasyonunu içeren yöntem, *Acinetobacter* suşlarının ilişkilerinin araştırılmasında başarılı bir yöntem olmuştur. Genelde PCR temelli tiplendirme yöntemleri, epidemiyolojik benzerlik konusunda hızlı bir tahmin imkanı verir, ancak geniş ölçekli karşılaştırmalı epidemiyolojik çalışmalar için uygun değildir.

2.4.1.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analizi

1990’larda kullanılmaya başlanan bu yöntem yüksek sensitiviteye sahiptir. DNA restriksiyon enzimleri ile parçalanır ve selektif amplifikasyon sonrası fragmanlar elektroforetik olarak ayrılır ve görüntülenir. Pahalı olan bu yöntem, dizi platformu üzerinde fragmanların lazer ile tespitine dayanan yarı otomatik bir işlemi içerir. Oluşan kompleks profiller bilgisayar ortamında analiz edilir. Bakteriyel taksonomide kullanılamasa da, hastanede oluşan salgınlarda suşların alt tür seviyesinde tanımlanmasında faydalıdır (106).

2.4.1.3. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

MLST, çeşitli patojen bakteri gruplarında uygulanan yüksek ayırıcı özelliği bulunan tiplendirme metodudur. Mevcut MLST verileri, PFGE ve AFLP gibi diğer yöntemlerle elde edilen verilerle uyum içinde bulunmuştur (107). Pahalı ve fazla iş gücü gerektirmesi, rutin laboratuvar çalışmalarında kullanımını kısıtlar.

2.4.1.4. Ribotiplendirme

Ribotiplendirmede özetle; kromozomal DNA, restriksiyon enzimleri ile parçalanır, elektroforez yapılır, blotlanır ve *E.coli* rRNA’sından elde edilen işaretlenmiş cDNA probu ile hibridize edilir (53). Yapılan çalışmalarda enzim kombinasyonları kullanılarak mükemmel tekrarlanabilirlik elde edilmiş ve salgın suşlarındaki paternlerin diğer tiplendirme yöntemleri ile uyumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir (108). Oldukça fazla iş gücü gerektiren bu metot, diğer tiplendirme yöntemleri ile birlikte çalışıldığında önemli epidemiyolojik veriler sunmaktadır.

2.4.1.5. Plazmid Analizi

Acinetobacter türlerinin çoğunluğu doğal olarak plazmidler bulundurur. Plazmid tiplendirme yöntemi, çeşitli çalışmalarda *Acinetobacter* suşları için başarılı şekilde kullanılmıştır (109, 110, 111). *Acinetobacter*’de bulunan plazmidler, büyüklük ve sayı bakımından farklılıklar gösterir. Benzer plazmid profilleri bulunan suşlar restriksiyon endonükleaz enzimleri ile parçalanıp plazmid parmak izleri belirlenir (111, 112) veya işaretlenmiş probe ile plazmidler hibridize edilir (113).

Plazmid tiplendirmesinde sonuçlar yorumlanırken, plazmidlerin kolayca aktarılabildiği ve kolayca kaybedilip kazanılabileceği gerçeği nedeniyle ancak diğer tiplendirme yöntemleriyle birlikte değerli sonuçlar vereceği bilinmelidir.

2.4.1.6. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

1983 yılından bu yana kullanılan Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), salgın kaynağının tespitinde kullanılan moleküler epidemiyolojik yöntemlerin altın standardı olarak kabul edilmektedir (114). Bir salgın esnasında, araştırılan izolatın sık görülen ve salgının kaynağı olduğu düşünülen organizma ile karşılaştırılıp, birbirleri ile ilişkilerinin incelenmesi işlemine epidemiyolojik analiz denir. Bir hastanede veya bölgede bir mikroorganizmaya ait enfeksiyon sıklığının artışı akla salgını getirir. Bu izolatların aynı kökenden olup olmadıklarının tespit edilmesi epidemiyolojik açıdan gereklidir. Bakterilerde bu ilişkinin en iyi göstergesi kromozomal yapıdır. Olası bir salgın tablosunda mikroorganizmalar arasındaki kromozomal ilişkinin gösterilmesi, salgın kaynağının tespitine ve enfeksiyonun yayılmasına karşı alınacak önlemlerin belirlenmesinde önemli rol oynar (115).

Bir hücrenin kimliğinin temel yapısı olarak kabul edilen kromozom, hücreler arası benzerliklerin karşılaştırılmasında en önemli unsurdur. Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimi (RE) ile parçalanıp, farklı büyüklükteki DNA parçalarının, agaroz jelde yürütülmesi ile oluşan paternlerin incelenmesi benzerlik karşılaştırılmasında kullanılan bir yaklaşımdır. Başlarda kullanılan enzimler, bakteriyel kromozomu verimli ve doğru şekilde kıyaslamaya olanak vermeyecek şekilde çok sayıda parçaya ayırmakta idi. Daha sonraları kullanılan RE'leri kromozomu daha az sayıda parçalara bölüp, analize olanak sağladı. Konvansiyonel agaroz jel elektroforez uygulamalarında, 40-50 kb'dan daha büyük DNA moleküllerinin yürütülmesinde sorunlar yaşanır. Elektrik akımının yönünü periyodik olarak değiştirerek PFGE megabaz (>1000 kb) büyüklüğündeki DNA moleküllerini ayırabilir. Zamanla, elektroforez tekniği geliştirildi ve çeşitli elektroforez yöntemleri uygulanabilir hale getirildi. Agaroz jele uygulanan elektrik akımının yönünün belirlediği bu yöntemlerden bazıları şunlardır (116).

Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE): 1986 yılında Carle, Frank ve Olsen tarafından geliştirilmiş yöntemde elektrot polaritesi ileri ve geri hareketlere

sahipti. Ancak ileri hareketin süresi biraz daha uzundu ve böylece net bir ileri hareket gözlemlenmekteydi. 600-750 kb fragmanları ayırmada başarılıdır.

Transverse Alternating Field Gel Electrophoresis (TAFE): 1600 kb gibi büyük DNA fragmanlarını ayırmada başarılı bir yöntem olduğundan, özellikle protozoanların DNA fragmanlarını ayırmada faydalıdır.

Counter –Clamped Homogeneous Electric Fields (CHEF): En sık kullanılan ve PFGE denildiğinde akla gelen yöntemdir. Eşit mesafeli yerleştirilen 24 elektrot ile 7000 kb'a kadar olan fragmanlar ayrılabilir.

Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE): 1000-2000 kb arası fragmanları ayırmada başarılı bir yöntemdir.

Rotating Gel Electrophoresis (RGE): 1987'de Southern ve arkadaşları, ayarlanan iki açı arasında dönen jelin kullanıldığı bir elektroforez sistemi geliştirmişler. 50 kb ile 6000 kb arası fragmanları ayırmada başarılı olmuşlardır.

Programmable Autonomously-Controlled Electrodes (PACE): 100 bp ile 6 mb arası fragmanları ayırabilen gelişmiş bir yöntemdir.

Pulsed Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis (PHOGE): Bu sistemde 1 mb'a kadar olan DNA fragmanları ayrılabilir.

PFGE ile oluşturulan DNA paternlerinin yorumlanması ve nozokomiyal patojenlerin tiplendirilmesinde bu paternlerin faydalı epidemiyolojik verilere dönüştürülmesi önemlidir. Bu işlem sırasında, paternlerin kıyaslanması ve genetik değişikliklere yol açan olayların bu paternlere etkisinin göz önünde tutulması gerekmektedir. Bir salgını temsil eden suşun diğer salgın suşlarından farkının olmaması ve salgın dışı bir suş ile benzerliğinin bulunmaması gerekmektedir. Ancak salgın sırasında DNA'da oluşacak nokta mutasyonlar, insersiyon veya delesyonlar, restriksiyon profillerini değiştirebilir (117).

Bütün bunların yanı sıra, PFGE prosedürünün her hangi bir basamağında oluşacak bir parametre değişikliği, sonuçların tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini azaltacaktır. Düşük erime ısılı agarozdan, jelin hazırlandığı agaroz, yıkamaların yapıldığı tampon sıvılarından elektroforez sürelerine kadar birçok parametrenin standardı hala tam olarak oluşturulamamıştır. Restriksiyon paternlerinin doğru

yorumlama kriterlerinin oluşturulması, bir suşun salgın suşuyla olan ilişkisinin ortaya konmasında önemlidir.

Herhalde tüm işlemler içinde en can alıcı nokta RE'nin seçimidir (114). Günümüzde 250'nin üzerinde ticari RE bulunmaktadır (116). Mevcut RE'lerinden bazıları Tablo-2'de gösterilmiştir. Kromozomal DNA'yı farklı büyüklüklerde kesen RE'leri, DNA'nın G+C içeriğinin yoğunluğuna göre seçilmelidir. Ancak dünyada oluşturulmaya çalışılan ve kabul gören uygulama ve yorumlama şekliyle (22), PFGE hala moleküler yöntemler arasındaki önemli yerini korumaktadır.

Tablo 2. PFGE'de kullanılan bazı Restriksiyon Enzimleri (Kaynak: 114)

Organizma	Restriksiyon Enzimi
<i>Acinetobacter spp</i>	<i>SmaI, ApaI</i>
<i>Enterococcus spp</i>	<i>SmaI, ApaI</i>
<i>Staphylococcus spp</i>	<i>SmaI, CspI, StsII, SgrAI</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>XbaI, NotI, SfiI</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>SpeI, XbaI, DraI, SspI</i>

PFGE yönteminde agaroz jelde oluşan DNA paternlerinin değerlendirilmesinde, 1995 yılında Tenover ve arkadaşlarının önerdiği sistem, en yaygın kullanılan değerlendirme kriterleridir. Buna göre; PFGE bant profilleri Tablo-3'teki gibi değerlendirilmektedir (22).

Buna göre; aynı sayıda ve boyutlarda bant içerenlere “**Aynı izolat**”, salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı olanlara “**Yakın İlişkili İzolat**”, salgın suşu ile aralarında 4-6 bant farkı olanlara ise “**Olası İlişkili İzolat**” denilir. Salgın suşu ile arasında yedi veya daha fazla bant farkı olan profillere “**İlişkisiz İzolatlar**” denilir. Eğer PFGE işlemi sonunda en az 10 bant oluşmuş ise bu kriterler kullanılabilir. Daha az sayıda bant oluşursa, kriterlerin güvenilirliği ve ayırt etmedeki yeterliliği bilinmemektedir.

Tablo 3. PFGE bant profillerinin değerlendirilmesi (Kaynak: 118).

Kategori	Salgın suşuna kıyasla genetik farklılık	Salgın suşundan farklılık gösteren bant sayısı	Epidemiyolojik yorum
Aynı	0	0	Salgının bir parçası
Yakın ilişkili	1	2-3	Yakın ilişkili
Olası ilişkili	2	4-6	Olası ilişkili
Farklı	≥ 3	≥ 7	İlişki yok

2.4.1.7. Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction: rep-PCR

Rep-PCR, çeşitli prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmada, genomun içinde bir çok bölgede yerleşen tekrarlayan elemanları hedefleyen primerleri kullanan bir tekniktir. Amplifikasyon gerçekleştikçe farklı büyüklükte fragmanlar oluşur ve bu fragmanların ayırımı, agaroz jel veya kapiller elektroforez gibi çeşitli yöntemlerle gerçekleşir (119). 1991 yılında ilk kez manuel rep-PCR parmak izi paternleri, bakterilerde alt tür sınıflamasında ve suş tanımlamasında kabul gören bir yaklaşım haline geldi (120).

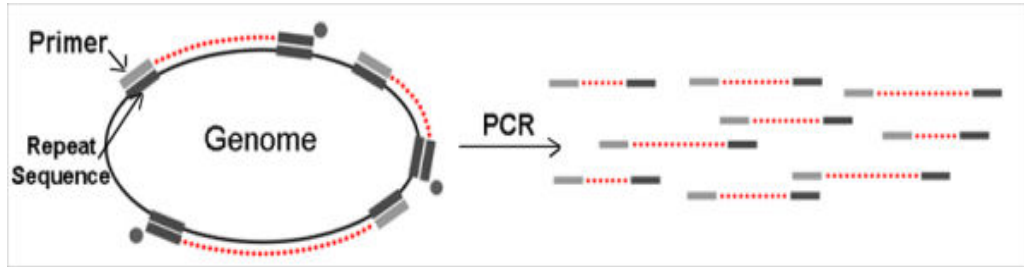
İlk ticari rep-PCR (manuel) kiti olan rep-PRO DNA Fingerprinting kiti, çeşitli tekrarlayan elemanları hedefleyen primerleri ile kullanıma sunulmuştur. Bu testte ayırım yöntemi olarak agaroz jel önerilmiştir. Değerlendirme gözle veya bilgisayar ortamına taranmış jel görüntülerinin değerlendirilmesi ile yapıyordu. Tiplendirme için faydalı olmasına rağmen, manuel rep-PCR laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği düşük, süresi uzun, agaroz jelde DNA ayırımı ve tespitinde sorunlar içermekteydi.

2005 yılında Heally ve arkadaşları rep-PCR'ı otomatize hale getirmek için yapılan düzenlemeleri tarif etmişler ve moleküler genotiplendirmedeki performans ve tekrarlanabilirliğini incelemişlerdir (21). Bir epidemiyolojik araç olarak suş tiplendirmesi; hastane kaynaklı enfeksiyonlarda, kirlı su ve gıdalarla oluşan salgınlarda ve veterinerlikte hayvanlar arası oluşan salgınlarda kullanılabilir. Klinik

kullanımının yanı sıra araştırma ve endüstri alanlarında da (Gıda, biyo-savunma, adli bilimler gibi) kullanımı vardır.

Çalışmamızda kullanılan otomatize rep-PCR metodu olan DiversiLab sistemi (Bacterial Barcodes, bioMérieux, ABD) mikrobiyal enfeksiyonların ve salgınlarnın yayılma ve kaynak tespitinde kullanılan güçlü bir araçtır.

Rep-PCR işlemi, kodlamaya katılmayan ve genom içindeki tekrarlayan dizileri temsil eden farklı büyüklükteki fragmanların (Amplikonların) çoğaltılması esasına dayanır (Şekil-1). Geno-tiplendirmesi yapılan organizmada, bu fragmanlar farklılıklar gösterir ve mikroorganizmalar suş seviyesinde ayrılabilirler.

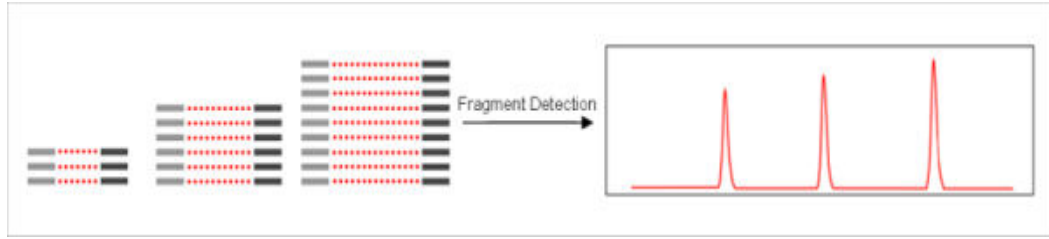


Şekil 1. Genom içindeki tekrarlayan dizilere primerlerin tutunması ve çoğaltılması.
(Kaynak: 121)

Rep-PCR primerleri, genom içinde dağılmış bir çok tekrarlayan dizilere tutunur ve farklı uzunluklarda bir çok fragman amplifiye edilir. Bu fragmanlar büyüklük ve yüklerine göre ayrılabilir. Böylece farklı büyüklük ve yoğunlukta çok sayıda bant içeren bir DNA parmak izi profili oluşturulur.

Bu fragmanlar Microfluidics (Caliper Technologies Inc, ABD) elektroforez kullanılarak ayrılır. Bu teknolojiye geleneksel elektroforez prensipleri kullanılır ancak, çok az miktarda numune yeterlidir.

LabChip (Caliper Technologies Inc, ABD) içinde ayrıştırılan DNA fragmanları boyanır ve birbirlerinden ayrıldıkça lazer okuyucu ile okunurlar. Daha sonra florasan yoğunluklarına göre bir grafik oluşturulur (Şekil 2). Bu grafikler kullanılarak mikroorganizmaların birbirleri ile benzerlikleri kıyaslanabilir.



Şekil 2. Fragmanların floresan yoğunluğuna göre oluşan grafikler (Kaynak: 121).

Manuel rep-PCR ve otomatik rep-PCR DiversiLab sistemlerinin arasındaki bazı farklı özellikler Tablo- 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Manuel ve DiversiLab rep-PCR sistemlerinin başlıca özelliklerinin karşılaştırılması (Kaynak: 21).

	Manuel rep-PCR	DiversiLab
Reaksiyon Hacmi (µl)	50	25
Template-Kalıp (ng)	100	50
Bağlanma ısısı (°C)	38-60	50-70
Siklus parametreleri	95°C'de 7 dakika 35 siklus (Her siklуста 90°C 30 san, bağlanma 1 dak, 65°C 8 dakika) 65°C 16 dakika 4°C'de tutma	94°C'de 2 dakika 35 siklus (Her siklуста 94°C 30 san, bağlanma 30 san, 70°C 1,5 dakika) 70°C 3 dakika 4°C'de tutma
Siklus süresi	6,5 saat	2 saat
Amplikon ayrımı	Agaroz jel	Microfluidics
Toplam çalışma zamanı	6 saat	55 dakika
Biozararlı madde	Etidyum bromide, UV ışın	<30µl %1,5 Acrylamide
Veri analizi	Dijital kamera, manuel	Agilent 2100 Bioanalyzer, otomatik
Raporlama	Bionumerics	DiversiLab

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Suşlar

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Anestezi Yoğun Bakım, Nöroloji Yoğun Bakım, Koroner Yoğun Bakım ve cerrahi servis hastalarından gönderilen numunelerden izole edilen 48 *A.baumannii* izolatları kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Müller Hinton Agar (MHA) (Himedia, Hindistan)

%5 Koyun Kanlı Agar (Oxoid, İngiltere)

LB (Luria Bertani) Broth (Sigma, ABD)

Buyyon (LabM İdg, İngiltere)

3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Testler

BBL BD Crystal Enterik-NonFermenter İdentifikasyon kiti (Becton Dickinson-ABD)

Ultra Clean Microbial DNA izolasyon kiti (MO Bio Laboratories, ABD)

MicroBead çözeltisi (Caliper Technologies Inc, ABD)

MD1, MD2, MD3, MD4 ve MD5 çözeltileri

DiversiLab rep-PCR fingerprinting *A. baumannii* kiti (Bacterial Barcodes Inc, ABD)

AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, ABD)

ApaI Restriksiyon Endonükleazı (Fermentas, Litvanya)

Tango Buffer: Hazır stok solusyon (Fermentas, Litvanya)

Proteinaz K (Qiagen, Almanya)

Lambda Ladder Marker (BioLabs, İngiltere)

Sodium Dodecyl Sulfate (Riedel De Haen, Almanya)

%1,3'lük Plus Agaroz (AppliChem, Almanya)

Etidyum Bromid (AppliChem, Almanya)

%1,3'lük Low Melting Point (LMP) agaroz (AppliChem, Almanya)

Oksidaz testi (Merck, Almanya)

Hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck, Almanya)

SE Tamponu: 100ml distile su, 0,435gr NaCl ve 0,903 gr EDTA (pH=8)

TE: 400ml distile su, 4ml 1M Tris, 0,8ml 0,5M EDTA (pH=8)

Lizis Tamponu:400 ml distile su, 1M Tris Base, 40ml 0,5M EDTA, 4gr Sarcosyl

10XTris-Borat-EDTA (TBE) Solusyonu: 2000ml distile su, 215,6gr Tris, 110,06grBoric Acid ve 14,88gr EDTA (pH=7-9)

Tioüre: 2,5ml distile su, 0,190gr tioüre

1M Tris: 200ml distile su, 24,2 gr Tris

3.1.4. Araçlar

GeneAmp PCR 9600 Termal Cyler cihazı (Applied Biosystems, ABD)

LabChip Device (Caliper Technologies, ABD)

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies-ABD) cihazı

BD PhonixSpec Nephelometer

CHEF DR II PFGE cihazı (BioRad Hercules, ABD)

Syngene GeneDirectory Application version 1.02.0 (Syngene, İngiltere)

Antibiyogram diskleri (Himedia, Hindistan)

Mikrodalga fırın, benmari, etüv, santrifüj, çalkalayıcı, dijital fotoğraf makinesi ve kuru ısıtıcı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Klinik Örneklerin Toplanması

Bu çalışma Şubat 2009-Haziran 2010 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Anestezi Yoğun Bakım, Nöroloji Yoğun Bakım, Koroner Yoğun Bakım ve cerrahi servis hastalarından gönderilen numunelerden izole edilen 48 *Acinetobacter baumannii* izolatları ile yapılmıştır.

3.2.2. *Acinetobacter baumannii* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

İzolatların 19 adeti Şubat 2009-Haziran 2009 tarihleri arasında, 29 adeti Ocak 2010-Haziran 2010 tarihleri arasında izole edilmiştir. Toplanan izolatların 30'u (%62,5) Anestezi Yoğun Bakım (AYB), 7'si (%14,5) Nöroloji Yoğun Bakım (NYB), 1'i (%2) Koroner Yoğun Bakım (KYB), 3'ü (%6) Beyin Cerrahisi, 2'si (%4) Ortopedi, 1'i (%2) Genel Cerrahi, 1'i (%2) Kulak Burun Boğaz (KBB), 1'i (%2) Üroloji, 1'i (%2) Kardiyoloji Vasküler Cerrahi (KVC) ve 1'i (%2) Plastik Cerrahi servis hastasına aittir.

İzolatların 23 (%47,9) tanesi trakeal aspirat, 16 (%33,3) tanesi kan, 3'ü (%6) idrar, 2'si (%4) BOS, 2'si (%4) yara ve 2 (%4) tanesi katater kültürlerinden elde edilmiştir.

Bakteriyel tanımlama için Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapılmış ve oksidaz negatif, laktoz nonfermenter ve Gram negatif kok-kokobasil olan izolatlar BBL BD Crystal Enterik-Nonfermenter identifikasyon kiti (BD Becton Dickinson-ABD) kullanılarak tür düzeyinde *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanmıştır. Bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) 2010'da (122) *Acinetobacter*'ler için belirlenen kriterlere göre, disk difüzyon tekniği ile yapılmıştır. Bölüm 2.2.1'de tanımlanan MDR kriterlerine uyan *A.baumannii*'ler %15 gliserollü (v/v) LB (Luria Bertani) Broth içeren 1,5 ml'lik saklama tüplerinde -80°C'de saklanmıştır. Stoklanan kültürler birden fazla dondurma ve çözme işlemine tabi tutulmamıştır.

Tüm suşların her iki yöntemle oluşturduğu bant paternlerinin, imipenem, meropenem, siprofloksasin, ampisilin sulbaktam ve gentamisine direnç, yaş ve

hastanede yatış sürelerinin arasındaki ilişkiyi değerlendirirken, SPSS bilgisayar programı, tanımlayıcı istatistik (Ortalama, standart sapma, frekans, Chi kare) ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,005$ olarak alındı.



Resim 1. Mueller Hinton Agar'da *A.baumannii* kolonileri.

3.2.3. *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmamızda kullanılan *A.baumannii* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesinde CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2010 kriterlerinde disk difüzyon yöntemi için belirlenen kriterler kullanılmıştır (Tablo 5) (122). Bu kriterlere göre, buyyona BD PhoenixSpec Nephelometer (BD Becton Dickinson-ABD) cihazı ile 0,5 McFarland standart bulanıklığında hazırlanan inokulum, steril ucu pamuklu eküvyon ile MHA'a ekildi. Antibiyotik diskleri yerleştirildikten sonra, 36°C'de 20 saat %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Tablo 5. Disk difüzyon yöntemiyle *A.baumannii*'de kullanılan zon çapları (Kaynak: 122)

ANTİBİYOTİK	TEST/RAPOR GRUBU	DUYARLI (mm)	ORTA SEVİYEDE DUYARLI (mm)	DİRENÇLİ (mm)
Ampisilin/Sulbaktam 10/10 µg	A	≥15	12-14	≤11
Seftazidim 30µg	A	≥18	15-17	≤14
İmipenem 10 µg	A	≥16	14-15	≤13
Meropenem 10 µg	A	≥16	14-15	≤13
Gentamisin 10 µg	A	≥15	13-14	≤12
Tobramisin 10 µg	A	≥15	13-14	≤12
Siprofloksasin 5 µg	A	≥21	16-20	≤15
Levofloksasin 5 µg	A	≥17	14-16	≤13
Trimetoprim/sülfometaksazol	B	≥16	11-15	≤10
Doksisiklin 30 µg	B	≥13	10-12	≤9
Minosiklin 30 µg	B	≥16	13-15	≤12
Tetrasiklin 30 µg	B	≥15	12-14	≤11
Amikasin 30 µg	B	≥17	15-16	≤14
Sefepim 30 µg	B	≥18	15-17	≤14
Sefotaksim 30 µg	B	≥23	15-22	≤14
Seftriakson 30 µg	B	≥21	14-20	≤13
Piperasilin/Tazobaktam 100/10 µg	B	≥21	18-20	≤17
Gatifloksasin 5 µg	O	≥18	15-17	≤14

3.2.4. rep-PCR DiversiLab (Bacterial Barcodes Inc, BioMerieux ABD)

Rep-PCR, bakteriyel suşların genotiplendirilmesinde etkili bir yöntemdir. Heally ve arkadaşlarının (21) rep-PCR'ın otomatik ticari kit haline getirildiği DiversiLab sistemini ve adaptasyonlarını tanımladığı çalışmadan bu yana birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda da DiversiLab sistemi için bu çalışma temel alınmış ve buna göre yapılmıştır.

DiversiLab DNA parmak izi kitleri, daha önceki çalışmalarda tanımlanan bakteriyel DNA içerisinde dağılmış halde bulunan, kodlamaya katılmayan tekrarlayan dizilerin kullanılmasını sağlayan rep-PCR yöntemini kullanmaktadır (120). DiversiLab kitinde, kodlamaya katılmayan bu tekrarlayan dizilere karşılık gelen primerler bulunmaktadır. Bu primerler kullanılarak yapılan rep-PCR ile tekrarlayan diziler arasındaki DNA dizileri çoğaltılır edilir. Sonuçta bakteriyel genomun içerisinde çok sayıda fragman elde edilir. Bu yöntem, alt türlerin

sınıflandırılmasında ve bakterilerin suş tanımlamasında kabul görmüş bir yöntemdir (119, 123).

3.2.4.1. Bakteri Kültürü ve DNA Ekstraksiyonu:

Çalışma öncesine kadar -80°C 'de saklanan *A.baumannii* suşları, eritilerek %5 koyun kanlı agara tek koloni düşürülecek şekilde ekildi ve 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde inkübe edildi.

DNA ekstraksiyonu:

DNA ekstraksiyonu için Ultra Clean Microbial DNA izolasyon kiti (MO Bio Laboratories, ABD) kullanıldı ve ekstraksiyon aşaması üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır.

1. MicroBead tüplerine $300\mu\text{l}$ MicroBead çözeltisi konuldu.
2. %5'lik koyun kanlı agara, taze pasajlanmış uygun kolonilerden $1\mu\text{l}$ 'lik özeler ile alınan bakteriler tüplere eklendi.
3. Tüplere $50\mu\text{l}$ MD1 solüsyonu eklendikten sonra, 10 dakika vortekslenerek karıştırıldı.
4. Vorteksleme sonrası 30 saniye $10000x\text{ g}$ 'de santrifüj yapıldı.
5. Boş steril ependorf tüplerine $100\mu\text{l}$ MD2 sıvısı konulup, santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, MD2 sıvısına eklendi. İyice karışmaları için tekrar vortekslendi.
6. Daha sonra bu karışımın soğuması için 15 dakika buzdolabında bekletildi.
7. Buzdolabından çıkartıldıktan sonra 1 dakika $10000x\text{ g}$ 'de santrifüj edildi.
8. Yeni steril tüplere $200\mu\text{l}$ süpernatant boşaltıldı ve üzerine $450\mu\text{l}$ MD3 sıvısı eklendi, kısa bir süre vortekslenip $10000x\text{ g}$ 'de santrifüj ile çevrildi.
9. Süpernatantı steril yeni bir spin filtreye aktarıldı.
10. Spin filtre ile 30 saniye 10000 x g 'de santrifüj edildikten sonra tüpün altında kalan sıvı atıldı.

11. 300µl MD4 sıvısı spin filtreye eklendi ve tekrar 10000 x g'de 30 saniye çevrilip alta kalan sıvısı atıldı.
12. 1 dakika 10000x g'de kuru olarak santrifüj işleminden sonra toplama tüpleri atıldı.
13. Spin filtre yeni bir tüpe yerleştirildi, 35µl MD5 sıvısı eklendi. 2 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 10000x g'de 30 saniye santrifüj edildi.
14. Santrifüj sonrası filtresi çıkarılıp atıldı ve tüplerin dibinde bakterilere ait DNA elde edilmiş oldu.

3.2.4.2. Çoğaltma

Bu aşamada elde edilen DNA'ların çoğaltma işlemi için GeneAmp PCR 9600 cihazı kullanıldı.

1)Amplifikasyonda kullanılan Master Mix hazırlanırken suş başına ilave edilen sıvıların miktarları şu şekildedir:

Rep-PCR MM1 →18µl

GeneAmp 10 X PCR Tamponu →2,5µl

Primer Mix A →2,0 µl

AmpliTaq DNA Polymerase →0,5 µl

Master Mix hazırlama sırasında AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, ABD) en son ilave edilmiş ve tüm hazırlık boyunca soğuk tutmak amacıyla buz kalıpları kullanılmıştır.

2) Termal Cycler cihazı, Başlangıç Denatürasyon (Initial Denaturation) 94°C'de 2 dakikaya ayarlanıp 35 siklus boyunca,

Denatürasyon (Denaturation) 94°C'de 30 saniye,

Bağlanma (Annealing) 50°C'de 30 saniye,

Uzama (Extension) 70°C'de 90 saniye ve

Son Uzama (Final Extension) 70°C’de 3 dakikaya ayarlanıp amplifikasyon yapılmıştır.

Amplifiye DNA örnekleri, rep-PCR kitine yerleştirilene kadar 4°C’de saklanmıştır.

3.2.4.3. Otomatize rep-PCR DNA Fingerprinting Yöntemi

48 *A.baumannii* suşundan elde edilen ve PCR cihazında çoğaltılan DNA örnekleri, her birinde 16 kuyucuk bulunan DiversiLab rep-PCR fingerprinting *Acinetobacter baumannii* kitine üretici firmanın talimatları doğrultusunda, sırasıyla yerleştirilmiştir. DNA’lar yerleştirilmeden hemen önce kitin jel ile doldurulması işlemi yapıldı. Bunun için özel bir basınç uygulayan LabChip Device (Caliper Technologies, ABD) (Çip yükleme istasyonu) kullanıldı ve jel kitin içine dolduruldu. Daha sonra boyar madde ilave edildi ve kuyucuklara sırası ile DNA yerleştirildi. Kitin hazırlama işlemi bittikten sonra kiti okuyacak olan Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, ABD) cihazına yerleştirildi. Her bir kit yaklaşık olarak 1 saat boyunca cihazda tutuldu.

3.2.4.4. rep-PCR Fingerprinting ve *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının DiversiLab Software ile Analizi

Her bir kit yaklaşık olarak 1 saat boyunca cihazda kaldıktan sonra elde edilen görüntüyü kaydeden cihaz bu bilgileri bağlı olduğu bilgisayara aktardı. Buradan aldığımız ham işlenmemiş verilerin üzerine her bir izolata ait bilgiler kaydedildi. Analiz işlemi DiversiLab Software Version 3.4 ile Pearson Korelasyon katsayısı kullanılarak yapıldı. Dendogramlar oluşturulurken UPGMA %1 optimizasyon ayarı kullanıldı.

Daha sonra bu bilgiler cihazların bağlı bulunduğu bir bilgi bankasına aktarıldı. Burada bulunan bilgilere istenildiği anda ulaşım imkanı bulunmakta ve buradaki bilgilerden raporlar hazırlanabilmektedir. 48 *A.baumannii* suşunun DNA patern benzerlikleri otomatik rep-PCR yöntemi kullanan DiversiLab sistemi ile belirlendi. Bu 48 suşun izole edildikleri tarihler ve DiversiLab sırasında kullanılan alternatif numaraları ile çip numaraları tablo haline getirildi.

3.2.5. PFGE Yöntemi ile *A.baumannii* Suşlarının Tiplendirilmesi ve Dendogramların Analizi

Tüm suşlar PFGE yöntemi ile daha önce Dolapçı ve arkadaşlarının yaptığı çalışma temel alınarak çalışıldı (124). Jel elektroforez için CHEF DR II PFGE cihazı (Bio-Rad Hercules, ABD) kullanıldı. Genomik DNA'nın kesilmesi sırasında *Apal* Restriksiyon Endonükleazı (Fermentas, Litvanya) kullanıldı. PFGE ile elde edilen veriler Syngene GeneDirectory Application-Version 1.02.0 (Syngene, İngiltere) ile analiz edilip değerlendirildi. Paternler arası benzerlik yüzdesi için Dice korelasyon katsayısı ve %1 tolerans değeri kullanılmıştır. Gözle yapılan değerlendirmede ise Tenover ve arkadaşlarının tanımladığı ilkeler temel alınmıştır (22).

3.2.5.1. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya ekstraksiyon aşaması ile başlandı. Bu aşamada; steril tüplerdeki 1ml steril distile su içine kanlı agardaki seçilen uygun taze kolonilerden 5-6 tanesi eklendi. 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bakteri pelletinin üst kısmı (süpernatant) dökülüp, dipte kalan bakteri üzerine 300µl SE (75mM NaCl-25mM EDTA) tamponu eklendi ve pipetajla iyice karıştırıldı. Üstüne 25µl Proteinaz K (20mg/ml) eklenerek tüp birkaç kez ters çevrilip, karıştırıldı.

Daha sonra %1,3'lük LMP (Low Melting Point) Agaroz hazırlanmasına geçildi. Temiz bir cam kaba 0,130g LMP koyup üzerine 10ml TE (Tris EDTA) eklendi. Mikrodalga fırında 70W'da yavaşça eritildi. İçinde hava kabarcığı veya partikül kalmayınca kadar eritilip karıştırıldı ve üzerine 500µl SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) eklendi.

3.2.5.2. Plugların Hazırlanması

Plugların hazırlanması sırasında ise, plug kalıplarının alt kısmı otoklav bandı ile sıkıca kapatıldı. Kalıplardaki her bölme için suşların numaraları cama yazar kalemi ile yazıldı. Hazırlanan LMP+SDS karışımından sıcakken 700 µl'si bakteri pelleti bulunan tüpe eklendi. Karışım donmadan hızlıca, baloncuk oluşturmadan plug kalıbına 100µl yavaşça döküldü. Bu işlem sırasında donmaya başlayan stok LMP+SDS, tekrar ısıtarak kullanıldı. Bütün kalıplar döküldükten sonra +4C°'de 20-

30 dakika donması beklendi. Sonuçta bakteri LMP+SDS karışımı içine homojen şekilde dağıtılmış ve hapsedilmiş oldu.

3.2.5.3. Yıkama

15 ml'lik steril tüplerinin üzerine suşların numaraları yazıldı. Tüplerin içine 5ml lizis tamponu konuldu. Daha sonra içine 25µl Proteinaz K eklendi. Plug kalıbının arkasındaki otoklav bandı yavaşça söküldü ve dondurulan pluglar kalıbın içinden parçalamadan tüpün içine bırakıldı. Pluglar şeffaf olduğu için lizis tamponu ve Proteinaz K içeren sıvının içinde çok zor görünür, bu nedenle sıvının içine girdiğinden emin olmak gerekir. Plugların konulduğu tüpler benmaride 54 C°'de 2 saat inkübe edildi. Plugların çıkarıldığı kalıp önce alkolle yıkayıp sonra distile suyla durulayıp, kurumaya bırakıldı.

2 saatlik inkübasyon sonrası, tüpün içindeki lizis tamponu gazlı bez kullanılarak yavaşça süzüldü. Bu aşamada plugların parçalanmamasına çok dikkat edildi. Sıvı süzüldükten sonra 3-5 ml distile su konuldu ve benmaride 54 C° de 15 dakika bekletildi. Bu işlem 2 kez yapıldı. İkinci distile su ile yıkama sonrası, distile su yerine TE tamponu konuldu. 3 kere 3ml TE tamponu ile yıkama yapılır. En son yıkama işleminden sonra kürek olarak kullanılabilen bir plastik parçası ile pluglar çıkarıldı ve 4°C'de birkaç gün saklanabilen, üstlerine suş numaraları yazılmış 1'er ml TE tamponu eklenmiş steril plastik tüplere aktarıldı. .

3.2.5.4. *ApaI* Resriksiyon Enzimi ile Kesim

Hazırlanan plugların enzim (*ApaI*) ile kesim aşamasında, her plug için boş tüplere suş numaraları yazılıp hazırlandı. TE tamponu içeren tüplerdeki pluglar parafilm üzerine çıkarıldı. Bistüri ile 2mm'lik dilimler kesildi. Her bir tüpün üzerine 90'ar µl steril distile su ve 10'ar µl Tango Buffer koyup kesilen 2 mm'lik dilimler bunun içine konuldu. Bu tüpler 10 dakika 30 C°'de kuru ısıtıcıda inkübe edildi. Pipetle içindeki sıvı çekildi, plugların parçalamamasına özen gösterildi.

Pluglardaki genomik DNA'yı fragmanlara ayıracak olan RE karışımı hazırlamak için suş başına;

56µl → steril distile su

10µl→Tango Buffer

4µl→ApaI Restriksiyon Endonükleazı eklenerek bir enzim karışımı hazırlanır. Pipetleme sırasındaki kayıplar düşünülerek hazırlık sırasında suş sayısının birkaç fazlası hesaplanarak karışım hazırlandı.

Enzim karışımı hazırladıktan sonra plug dilimlerinin konulduğu tüplere 70'er µl bu enzim karışımından konuldu. 70'er µl enzim karışımı konulan tüpleri 30 C°'de kuru ısıtıcıda 2 saat inkübe edildi. Bu sırada; PFGE cihazı kullanıma hazırlandı. Cihazın hazırlanması işlemi için tanka 2 lt distile su doldurup, boşaltıldı ve yıkama yapıldı. Bir balonda 1900 ml distile su içine 10 X TBE (Tris-Borat-EDTA) solüsyonundan 100ml koyarak dilüe edildi ve tank bu sıvıyla dolduruldu. İnkübasyon süresi bitince pluglar tarağa yerleştirildi. Ortada Lambda Ladder Marker için yer bırakıldı. Plugların tarağa yapışmasını sağlamak için 10 dakika beklendi, %1,3'lük plus agaroz hazırlandı.

3.2.5.5. %1,3'lük Plus Agarozun Hazırlanması

1,43 gr plus agaroz tozu cam balona konuldu ve üzerine 110ml 0,5X TBE solüsyonu eklendi. İyice karıştırıldı ve mikrodalga fırında 350W'da ısıtarak eritildi.

Jel tablası birleştirildi ve plug dilimlerinin yapıştığı tarak dik olarak jel tablasına oturtuldu. Hazırlanan %1,3'lük plus agaroz jeli el yakmayacak dereceye kadar soğuyunca tablaya döküldü. Yaklaşık 5-10 ml'sini tarağı çekince boşlukları doldurmak için ayrıldı. 30 dakika jelin donması beklendi. Donduktan sonra tarak yavaşça çekildi ve plug dilimleri jelin içine hapsoldular. Ancak; çekilen tarağın dişlerinin bıraktığı boşluklara 5-10 ml jel pipet yardımıyla yavaşça hava kabarcığı olmayacak şekilde dolduruldu.

Jel hazırlanınca, PFGE cihaz ısısının 14°C'ye gelmesi beklendi ve *Acinetobacter* için uygun ayarlamalar yapıldı.

Cihazda *Acinetobacter* için aşağıdaki şekilde ayarlamalar yapılmıştır:

Derece ayarı: 14°C

Blok→b1

Volt→5 V/cm

Initial switch time→5 saniye

Final switch time→20 saniye

Run→ 24 saat

Tank suyunun 14°C'ye düşmesinden sonra, jeli tanka yerleştirmeden önce 125µl Tioüre eklendi. Cihazda suyun sirkülasyonunda herhangi bir sorun olup olmadığı kontrol edildikten sonra jel tablasına yerleştirildi. Cihaz 24 saat süreyle 120° açılarla elektrik akımı uyguladı. Ertesi gün süre bittiğinde, cihazdan çıkarılan jel, Etidyum Bromid içeren 200 ml musluk suyunda çalkalayıcı ile 15 dakika yıkandı. Yıkama işleminin ardından 20 dakika Etidyum Bromid içermeyen musluk suyu ile yine çalkalayıcıda yıkama yapıldı ve agaroz jeller okumaya hazır hale getirildi.

3.2.5.6. Bantların Analizi

UV ışığı altında jelde oluşan bantların fotoğrafları çekildi. Bilgisayara aktarılan fotoğraflarda, Syngene Genedirectory Application (Syngene, İngiltere) isimli bilgisayar programı yardımı ile bant paternlerinin birbirleriyle olan benzerliklerine göre dendogram elde edildi.

4. BULGULAR

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Anestezi Yoğun Bakım, Nöroloji Yoğun Bakım, Koroner Yoğun Bakım ve cerrahi servis hastalarından gönderilen numunelerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* izolatları 2009 ve 2010 yıllarını içeren iki farklı gruba ayrılmıştır. Bu suşların izole edildiği numunelerin servislere ve yıllara göre dağılımı Tablo 6'da verilmiştir. Rep-PCR ve PFGE sonuçları ayrı ayrı değerlendirilmiş ve ayrı raporlar elde edilmiştir.

Tablo 6. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının elde edildiği klinik örneklerin servislere ve yıllara göre dağılımı.

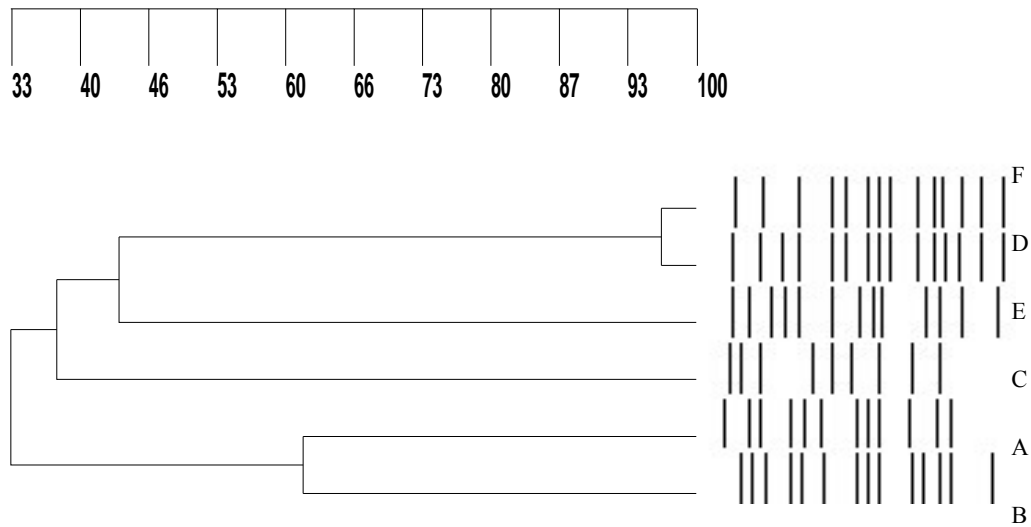
		Trakeal aspirat	Kan	İdrar	BOS	Yara	Nefrostomi Katateri	Femoral Katater	TOPLAM
Anestezi Yoğun	2009	4	8	-	1	-	-	-	13
	2010	14	2	1	-	-	-	-	17
Nöroloji Yoğun	2009	1	2	-	-	-	-	-	3
	2010	1	2	1	-	-	-	-	4
Koroner Yoğun	2009	1	-	-	-	-	-	-	1
	2010	-	-	-	-	-	-	-	-
Beyin Cerrahi	2009	-	-	-	-	-	-	-	-
	2010	-	1	1	1	-	-	-	3
Ortopedi	2009	-	-	-	-	-	-	-	-
	2010	-	-	-	-	2	-	-	2
Genel Cerrahi	2009	-	-	-	-	-	-	-	-
	2010	1	-	-	-	-	-	-	1
KBB	2009	-	-	-	-	-	-	-	-
	2010	1	-	-	-	-	-	-	1
Üroloji	2009	-	-	-	-	-	-	-	-
	2010	-	-	-	-	-	1	-	1
KVC	2009	-	-	-	-	-	-	1	1
	2010	-	-	-	-	-	-	-	-
Plastik Cerrahi	2009	-	1	-	-	-	-	-	1
	2010	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPLAM		23	16	3	2	2	1	1	48

4.1. PFGE Bulguları

4.1.1. 2009 Yılına Ait Suşların PFGE Bulguları

2009 yılına ait suşların PFGE ile elde edilen dendogramları değerlendirildiğinde, 2009 yılına ait 19 *A.baumannii* izolatı, altı farklı kümelenme göstermektedir. Model A'da 7 izolat (%36,8), Model B'de 2 izolat (%10,5), Model C'de 2 izolat (%10,5), Model D'de 6 izolat (%31,5), Model E'de ve Model F'de 1'er izolat (%5) bulunmuştur.

Model F ve D arasındaki DNA bant patern benzerliği \geq %93 olurken, Model A ve B arasındaki benzerlik %60 civarında bulunmuştur. Model E'nin Model F ve D'ye olan benzerliği %43 civarlarındadır. Model C'nin ise bu gruplara benzerliği %36 civarlarında bulunmuştur. Model A ve B'nin diğer tüm izolatlara benzerliği %33 bulunmuştur. 2009 yılı suşlarına ait dendogramlar Şekil 3'te verilmiştir.



PATERNLER	MODELLER	SUŞ NUMARALARI
Track 1	A	32-33-34-42-43-44-45
Track 2	B	31-38
Track 3	C	30-40
Track 4	E	37
Track 5	F	39
Track 6	D	35-36-41-46-47-48

Şekil 3. 2009 yılı suşlarına ait dendogramlar

2009 yılına ait 19 suşun ayrıntılı incelemesinde, suşlar 06.02.2009-11.06.2009 tarihleri arasında izole edilmişlerdir. 19 suşun 13 tanesi (%68,4) AYB hastalarından izole edilmiştir. Model A'da mevcut olan 44 nolu hastaya ait suş Plastik cerrahi servisinde yatan bir hastadan izole edilmiş olmasına rağmen bu hasta, plastik cerrahi servisinde önce AYB'da yatış hikayesine sahiptir. 6 suşun (%31,5) bulunduğu Model D'de 41 ve 46 nolu hastalar NYB servisinden izole edilmiş olmalarına rağmen bu hastalarında AYB'da yatış hikayeleri vardır. Model E'de izole edilen 37 nolu suş, Kardiyo vasküler cerrahi servisinde izole edilmiştir. Bu servis, Tıp Fakültesi Hastanesi bünyesinde ayrı bir binada bulunmaktadır ve bu suşun ayrı bir patern yapısına sahip olması, bu bulguyu desteklemektedir. 19 suşun ayrıntılı inceleme sonuçları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. 2009 yılına ait suşlar ve PFGE model grupları.

MODEL	SUŞ NO	ALTERNATİF NO	SERVİS	İZOLASYON TARİHİ
A	32	A104	AYB	03.06.2009
	33	A103	AYB	11.06.2009
	34	A101	AYB	03.06.2009
	42	A86	AYB	07.05.2009
	43	A85	AYB	05.05.2009
	44	A83	PLASTİK	15.02.2009
B	45	A82	AYB	06.02.2009
	31	A106	AYB	02.06.2009
	38	A93	KYB	13.05.2009
C	30	A107	NYB	10.06.2009
	40	A89	AYB	21.04.2009
D	35	A100	AYB	30.04.2009
	36	A99	AYB	11.05.2009
	41	A88	NYB	05.05.2009
	46	A78	NYB	22.03.2009
	47	A77	AYB	05.02.2009
	48	A76	AYB	28.03.2009
E	37	A98	KVC	28.04.2009
F	39	A92	AYB	15.05.2009

2009 yılına ait 19 suşun izole edildiği hastaların yaş ortalaması 58,3 bulunmuştur (Yaş dağılımı 16-86 arasındır). Hastanede yatış süreleri ise ortalama 86,3 gün olarak bulunmuştur (6-289 gün). Hastanede yatış süreleri açısından en uzun ortalama 134 gün ile Model D'de bulunmuştur.

Bu hastalardan izole edilen suşlarda disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogramlara göre, imipeneme karşı (%78,9), meropeneme (%73,6), seftazidime (%100), siprofloksasine (%100), ampisilin sulbaktama (%68,4), gentamisine (%94,7) oranında direnç bulunmuştur. Bu bulgularla ampisilin sulbaktama karşı direnç oranı imipenem ve meropeneme karşı direnç oranına göre düşük bulunması dikkat çekicidir. Ancak 2009 yılı suşlarında yapılan istatistik incelemelerinde, Model grupları ile antibiyotik duyarlılık paternleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca yine model grupları ile cinsiyet ve yaş değişkenleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

2009 yılı suşlarının PFGE model grupları ve imipenem, meropenem, seftazidim, ampisilin sulbaktam, siprofloksasin ve gentamisin duyarlılıkları ile bu hastalara ait cinsiyet, yaş ve hastanede yatış sürelerine ait bilgiler Tablo 8'de gösterilmiştir.

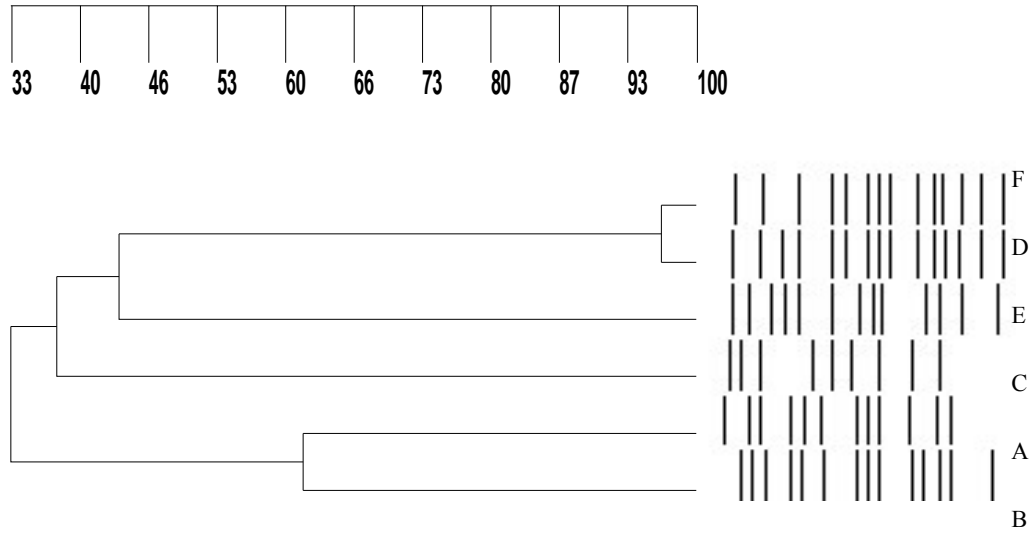
Tablo 8. 2009 yılı suşlarının, PFGE model gruplarına ait antibiyotik direnç oranları ve hasta bilgileri.

MODEL A	SUŞ NO	IPM (%85,7)	MEM (%85,7)	CAZ (%100)	SAM (%85,7)	CIP (%100)	GEN (%100)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 59	YATIŞ SÜRESİ(GÜN) ORT: 75,2 GÜN
A	32	R	R	R	R	R	R	K	75	84 GÜN
	33	R	R	R	R	R	R	K	82	41 GÜN
	34	R	R	R	R	R	R	E	63	108 GÜN
	42	R	R	R	R	R	R	E	69	83 GÜN
	43	S	S	R	I	R	R	E	16	34 GÜN
	44	R	R	R	R	R	R	E	39	140 GÜN
	45	R	R	R	R	R	R	E	69	37 GÜN
MODEL B	SUŞ NO	IPM (%100)	MEM (%100)	CAZ (%100)	SAM (%100)	CIP (%100)	GEN (%100)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 60	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 28,5
B	31	R	R	R	R	R	R	E	42	19 GÜN
	38	R	R	R	R	R	R	E	78	38 GÜN
MODEL C	SUŞ NO	IPM (%50)	MEM (%50)	CAZ (%100)	SAM (%100)	CIP (%100)	GEN (%100)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 59	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 95 GÜN
C	30	R	I	R	R	R	R	K	46	170 GÜN
	40	S	R	R	R	R	R	E	72	20 GÜN
MODEL D	SUŞ NO	IPM (%83,3)	MEM (%83,3)	CAZ (%100)	SAM (%50)	CIP (%100)	GEN (%83,3)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 56	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 134 GÜN
D	35	R	R	R	R	R	R	E	18	122 GÜN
	36	R	R	R	I	R	R	E	50	21 GÜN
	41	R	R	R	I	R	R	E	67	289 GÜN
	46	S	S	R	S	R	R	K	86	262 GÜN
	47	R	R	R	R	R	R	E	81	25 GÜN
	48	R	R	R	R	R	I	K	37	86 GÜN
MODEL E	SUŞ NO	IPM (%0)	MEM (%0)	CAZ (%100)	SAM (%0)	CIP (%100)	GEN (%100)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 68	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 6 GÜN
E	37	S	S	R	S	R	R	K	68	6 GÜN
MODEL F	SUŞ NO	IPM (%100)	MEM (%0)	CAZ (%100)	SAM (%0)	CIP (%100)	GEN (%100)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 50	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 64 GÜN
F	39	R	S	R	S	R	R	E	50	64 GÜN

4.1.2. 2010 Yılına Ait Suşların PFGE Bulguları

2010 yılına ait 29 *A.baumannii* izolatının, dendogramlarında ise dört farklı kümelenme gözlenmektedir. Model A'da 18 izolat (%62), Model B'de 8 izolat (%27,5), Model C'de 2 izolat (%6,8), Model D'de 1 izolat (%3,4) bulunmuştur. Model E'de ve Model F'de ise 2010 yılı izolatlarından bir patern bulunmamıştır.

Model A ve B arasındaki benzerlik %60 civarında bulunmuş ve 29 izolatın üçü hariç bu iki grupta kümelenmiştir. Model E'nin Model F ve D'ye olan benzerliği %43 civarlarındadır. Model C'nin ise bu gruplara benzerliği %36 civarlarında bulunmuştur. Model A ve B'nin diğer tüm izolatlara benzerliği %33 bulunmuştur. 2010 yılı suşlarına ait dendogramlar Şekil 4'te verilmiştir.



PATERNLER	MODELLER	SUŞ NUMARALARI
Track 1	A	1-2-5-6-7-8-9-10-12-13-14-17-18-20-23-25-
Track 2	B	3-15-16-19-21-22-27-29
Track 3	C	11-24
Track 4	E	-
Track 5	F	-
Track 6	D	4

Şekil 4. 2010 yılı suşlarına ait dendogramlar

2010 yılına ait 29 suşun ayrıntılı incelemesinde, suşlar 18.01.2010-21.06.2010 tarihleri arasında izole edilmişlerdir. 29 suşun 17 tanesi (%58,6) AYB, 4 tanesi (%13,7) NYB hastalarından izole edilmiştir. Model A'da mevcut olan 18 hastanın, 12 tanesi AYB'da yatan veya AYB'da yatış hikayeleri bulunan hastalardan izole edilmişlerdir. Model A'da bulunan 13 nolu ve 23 nolu hasta ortopedi, 18 nolu hasta üroloji, 20 nolu hasta beyin cerrahi, 26 ve 28 nolu hastalar NYB'da yatan hastalardan izole edilmiş olup bu hastalarda AYB'da yatış hikayesi bulunmamaktadır. Model B'de bulunan 8 suşun 7 tanesi AYB'da yatan hastalardan izole edilmiş olup 3 nolu hastada da AYB'da yatış hikayesi bulunmaktadır. 29 suşun ayrıntılı inceleme sonuçları Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. 2010 yılına ait suşlar ve PFGE model grupları.

MODEL	SUŞ NO	ALTERNATİF NO	SERVİS	İZOLASYON TARİHİ	
A	1	T1	AYB	18.01.2010	
	2	T2	BEYİN CERH.	18.01.2010	
	5	T5	AYB	08.02.2010	
	6	T6	AYB	06.02.2010	
	7	T8	AYB	23.02.2010	
	8	T9	AYB	23.02.2010	
	9	T10	AYB	16.02.2010	
	10	T12	NYB	05.03.2010	
	12	T15	AYB	18.03.2010	
	13	T16	ORTOPEDİ	15.03.2010	
	14	T17	BEYİN	09.03.2010	
	17	T21	KBB	14.04.2010	
	18	T22	ÜROLOJİ	09.04.2010	
	20	T24	BEYİN	24.03.2010	
	23	T27	ORTOPEDİ	30.04.2010	
	25	T29	AYB	26.05.2010	
	26	T30	NYB	23.05.2010	
	28	T32	NYB	14.06.2010	
	B	3	T3	NYB	25.01.2010
		15	T19	AYB	06.04.2010
16		T20	AYB	02.04.2010	
19		T23	AYB	09.04.2010	
21		T25	AYB	28.04.2010	
22		T26	AYB	05.05.2010	
27		T31	AYB	15.06.2010	
29		T44	AYB	21.06.2010	
C		11	T14	AYB	15.03.2010
		24	T28	AYB	06.05.2010
D	4	T4	GENEL	25.01.2010	

2010 yılına ait 29 suşun izole edildiği hastaların yaş ortalaması 57,2 bulunmuştur (Yaş dağılımı 18-79 arasındır). Hastanede yatış süreleri ise ortalama 73,4 gün olarak bulunmuştur (1-312 gün). Hastanede yatış süreleri açısından en fazla suşun bulunduğu Model A'da ortalama süre 66 gün olarak bulunmuştur. Bu hastalarda izole edilen suşlarda disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogramlarına göre, imipeneme karşı (%51,7), meropeneme (%72,4), seftazidime (%100), siprofloksasine (%93,1), ampisilin sulbaktama (%72,4), gentamisine (%89,6) oranında direnç bulunmuştur. Bu bulgularla ampisilin sulbaktama karşı direnç oranı imipenemden daha yüksek olmasına rağmen meropenem direnç oranına eşit bulunmuştur. İmipeneme karşı %51,7'lik direnç oranının 2009 suşlarında bulunan %78,9'lük direnç oranına göre daha az bulunması dikkat çekicidir. 2009 ve 2010 yıllarına ait suşlarda, seftazidime karşı %100 direnç bulunurken,

siprofloksasine karşı direnç oranı tüm suşlarda >%90 bulunmuştur. Ancak 2010 yılı suşlarında yapılan istatistik incelemelerinde, Model grupları ile antibiyotik duyarlılık paternleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca yine model grupları ile cinsiyet ve yaş değişkenleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. 2010 yılı suşlarının imipenem, meropenem, seftazidim, ampisilin sulbaktam, siprofloksasin ve gentamisin duyarlılıkları ile bu hastalara ait cinsiyet, yaş ve hastanede yatış sürelerine ait bilgiler Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tüm suşlarda PFGE yöntemi ile incelenen 48 suşun 25 tanesinde (%52) Patern A bant profili izlenmiş ve salgın suşu olarak bulunmuştur. Salgın suşu ile kıyaslandığında, 10 suşta (% 20,8) 3 bant farkı gözlenen B bant paterni görülmüştür. B paterni salgın suşu ile “Yakın ilişkili” bulunmuştur. Dendogramda 6 bant farkı görülen D bant paterninde 7 suş bulunmuş ve “Olası ilişkili” izolat kabul edilmiştir. Tüm suşlarda PFGE yöntemi ile incelenen 48 suşun elde edilen paternler ve bantların ilişkisi Tablo 10’da verilmiştir.

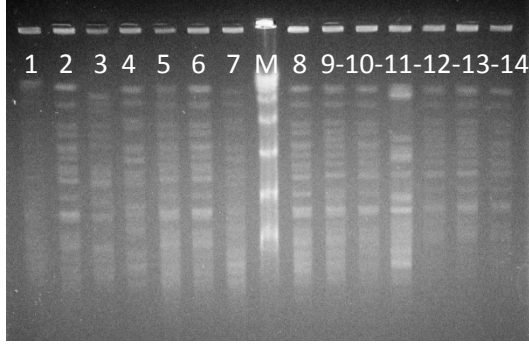
Tablo 10. PFGE yöntem ile elde edilen paternler ve bantların ilişkisi.

PATERNLER	SUŞ SAYISI		BANT FARKI
	2009	2010	
A	7	18	I (Bant farkı yok): Aynı
B	2	8	3 Bant farkı: Yakın ilişkili izolat
C	2	2	≥7 Bant farkı: Farklı izolat
D	6	1	6 Bant farkı: Olası ilişkili izolat
E	1	-	≥7 Bant farkı: Farklı izolat
F	1	-	≥7 Bant farkı: Farklı izolat

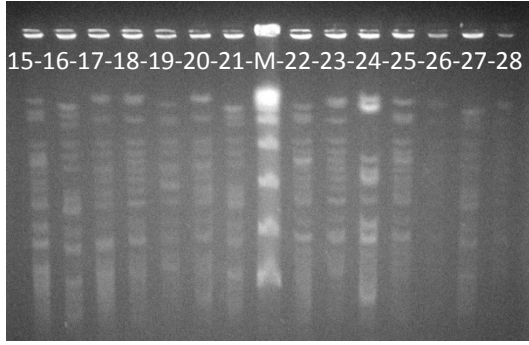
Tablo 11. 2010 yılı suşlarının, PFGE model gruplarına ait antibiyotik direnç oranları ve hasta bilgileri.

MODEL A	SUŞ NO	IPM (%44,4)	MEM (%66,6)	CAZ (%100)	SAM (%66,6)	CIP (%94,4)	GEN (%88,8)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 59	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 66 GÜN
A	1	S	R	R	I	R	R	K	28	75 GÜN
	2	R	R	R	R	R	R	E	77	46 GÜN
	5	R	S	R	R	R	I	K	69	64 GÜN
	6	R	S	R	R	R	R	K	64	108 GÜN
	7	R	R	R	R	R	R	E	54	192 GÜN
	8	R	R	R	R	R	R	K	49	78 GÜN
	9	R	R	R	I	R	R	E	48	4 GÜN
	10	S	S	R	R	R	R	K	77	95 GÜN
	12	S	R	R	I	R	R	E	59	176 GÜN
	13	I	S	R	R	R	R	K	74	19 GÜN
	14	I	R	R	R	R	R	E	18	36 GÜN
	17	S	I	R	S	R	R	K	65	34 GÜN
	18	R	R	R	I	R	R	E	41	3 GÜN
	20	S	R	R	R	R	R	K	79	100 GÜN
	23	S	S	R	R	I	R	K	62	18 GÜN
	25	I	R	R	R	R	S	E	69	39 GÜN
	26	R	R	R	R	R	R	K	54	26 GÜN
	28	S	R	R	S	R	R	E	69	75 GÜN
MODEL B	SUŞ NO	IPM (%62,5)	MEM (%75)	CAZ (%100)	SAM (%75)	CIP (%87,5)	GEN (%87,5)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 51	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 62,75 GÜN
B	3	R	R	R	R	R	R	E	77	150 GÜN
	15	S	I	R	R	R	R	E	64	1 GÜN
	16	R	S	R	R	I	S	E	73	104 GÜN
	19	R	R	R	R	R	R	K	60	16 GÜN
	21	S	R	R	R	R	R	E	43	13 GÜN
	22	S	R	R	S	R	R	E	37	196 GÜN
	27	R	R	R	R	R	R	E	27	16 GÜN
	29	R	R	R	S	R	R	E	25	3 GÜN
MODEL C	SUŞ NO	IPM (%50)	MEM (%100)	CAZ (%100)	SAM (%100)	CIP (%100)	GEN (%100)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 67	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 168 GÜN
C	11	S	R	R	R	R	R	K	69	312 GÜN
	24	R	R	R	R	R	R	E	65	24 GÜN
MODEL D	SUŞ NO	IPM (%100)	MEM (%100)	CAZ (%100)	SAM (%100)	CIP (%100)	GEN (%100)	CİNSİYET	YAŞ ORT: 65	YATIŞ SÜRESİ (GÜN) ORT: 3 GÜN
D	4	R	R	R	R	R	R	E	65	3 GÜN

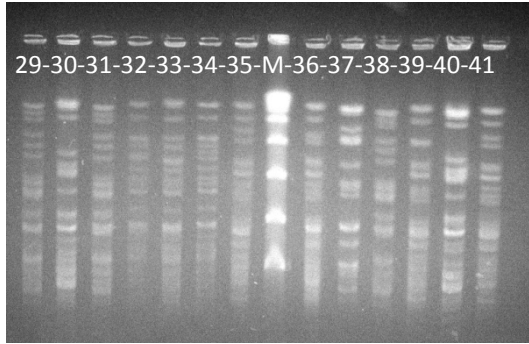
48 *A.baumannii* izolatının PFGE ile agaroz jelde elde edilen DNA bant paternleri Resim 2’de verilmiştir.



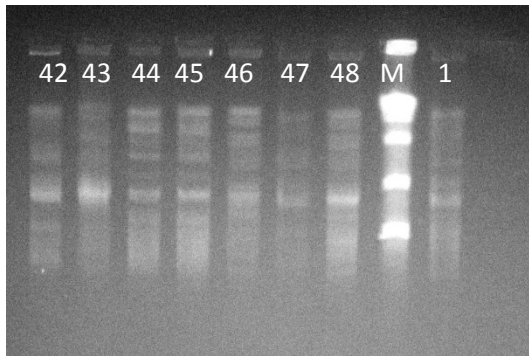
1-14 nolu izolatların PFGE bant paternleri.



15-28 nolu izolatların PFGE bant paternleri.



29-41 nolu izolatların PFGE bant paternleri.



42-48 nolu izolatlar ve Ladder'in sağ tarafında 1 nolu izolatın tekrar yapılan PFGE bant paternleri.

Resim 2. 48 *A.baumannii* izolatının PFGE ile agaroz jelde elde edilen DNA bant paternleri.

4.2. rep-PCR Bulguları

4.2.1. 2009 Yılına Ait Suşların rep-PCR DiversiLab Bulguları

2009 yılına ait 19 adet *A.baumannii* suşuna ait alternatif numaralar ve rep-PCR işlemi sırasındaki çip numaraları ile suşların izolasyon tarihleri Tablo 12’de gösterilmiştir.

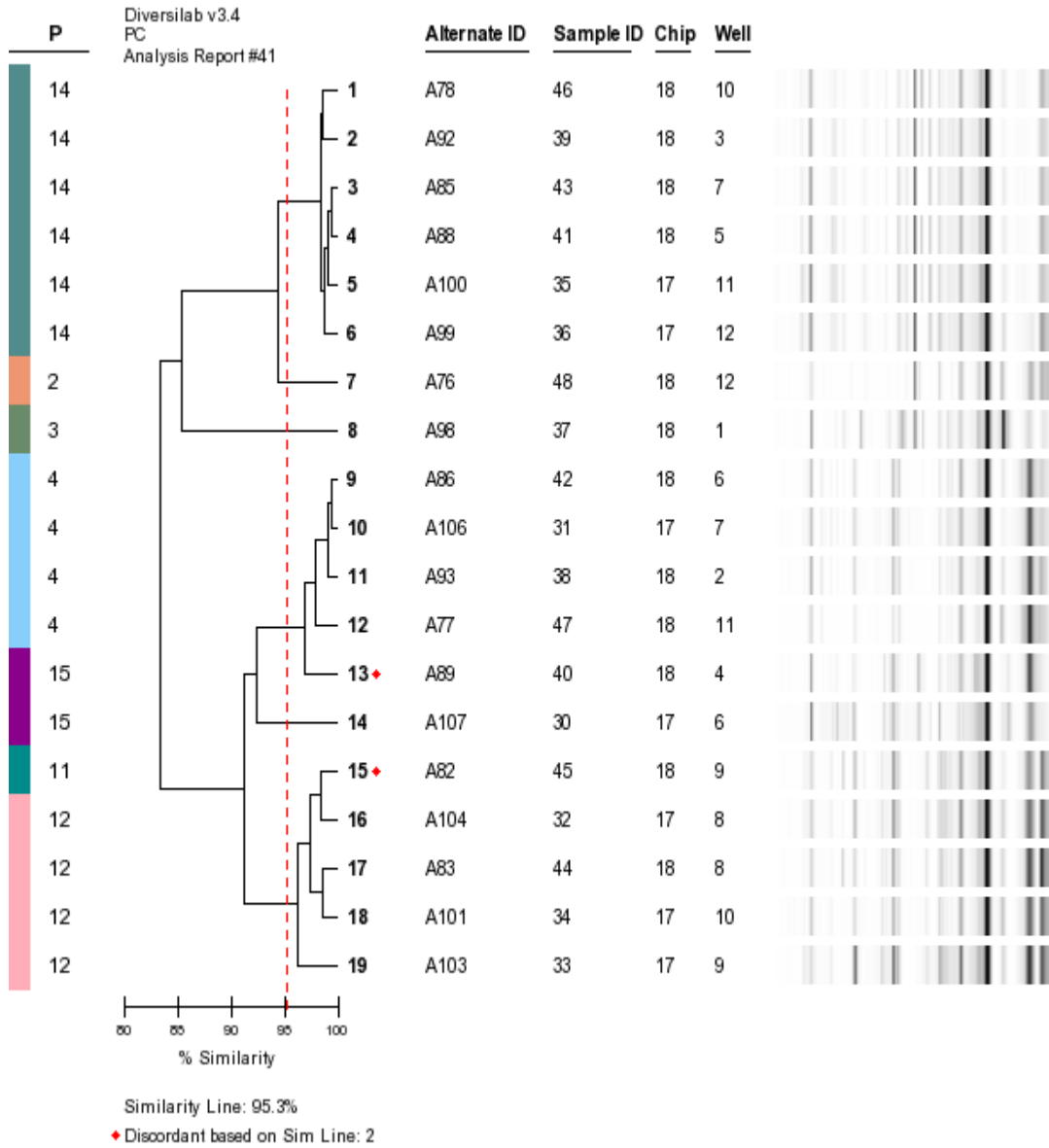
Tablo 12. 2009 yılına ait suşlar ve rep-PCR çip numaraları.

SUŞ NO	ALTERNATİF NO	REP-PCR ÇİP NO	TARİH	NUMUNE	SERVİS
30	A107	17-6	10.06.2009	KAN	NYB
31	A106	17-7	02.06.2009	KAN	AYB
32	A104	17-8	03.06.2009	KAN	AYB
33	A103	17-9	11.06.2009	TRAKEAL	AYB
34	A101	17-10	03.06.2009	TRAKEAL	AYB
35	A100	17-11	30.04.2009	BOS	AYB
36	A99	17-12	11.05.2009	TRAKEAL	AYB
37	A98	18-1	28.04.2009	FEMORAL	KVC
38	A93	18-2	13.05.2009	TRAKEAL	KYB
39	A92	18-3	15.05.2009	KAN	AYB
40	A89	18-4	21.04.2009	KAN	AYB
41	A88	18-5	05.05.2009	KAN	NYB
42	A86	18-6	07.05.2009	KAN	AYB
43	A85	18-7	05.05.2009	KAN	AYB
44	A83	18-8	15.02.2009	KAN	PLASTİK
45	A82	18-9	06.02.2009	KAN	AYB
46	A78	18-10	22.03.2009	TRAKEAL	NYB
47	A77	18-11	05.02.2009	KAN	AYB
48	A76	18-12	28.03.2009	TRAKEAL	AYB

4.2.1.1. 2009 Yılına Ait Suşların rep-PCR DiversiLab Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 2009 yılına ait 19 adet suşun DiversiLab Software Version 3.4 kullanılarak, Pearson Korelasyon katsayısı ve UPGMA %1 optimizasyon ayarı kullanılarak ve Similarity Line (Benzerlik çizgisi) %95,3 alındığında elde edilen dendogramlarda 4 farklı kümede yığılmanın gözlemlendiği 7 farklı patern olduğu tespit edilmiştir. 2009 yılına ait suşların rep-PCR DiversiLab sitemi ile elde

edilen dendogramları Şekil 5'te, benzerlik matrisi Şekil 6'da ve scatter plot'ları Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 5. 2009 Yılına ait suşların rep-PCR DiversiLab Sistemi ile elde edilen Dendogramları.

DiversiLab sisteminde dendogramlar değerlendirilirken oluşan bant paternlerine göre 3 farklı grup oluşturulur. Buna göre;

I: (Indistinguishable) Ayrılamayan-Aynı örnekler (Bant farkı yoktur)

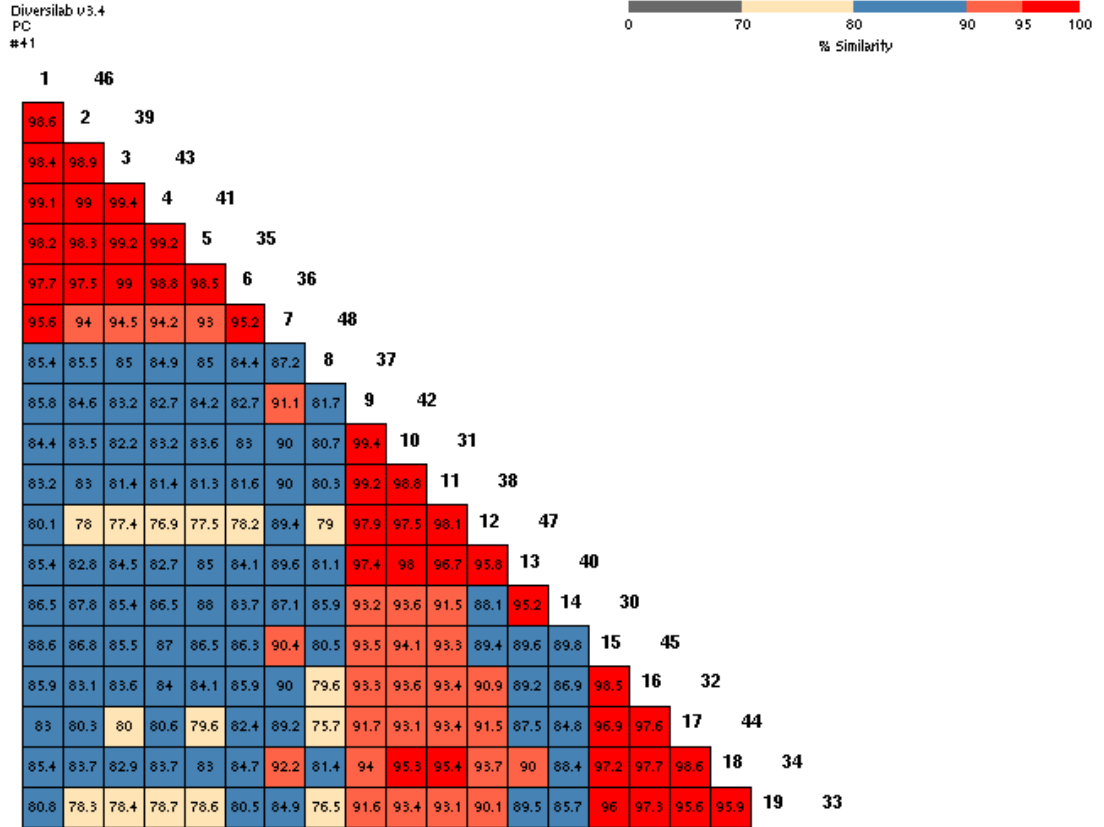
S: (Similar) Benzer örnekler (1 veya 2 bant farkı vardır)

D: (Different) Farklı örnekler (3 veya daha fazla bant farkı vardır)

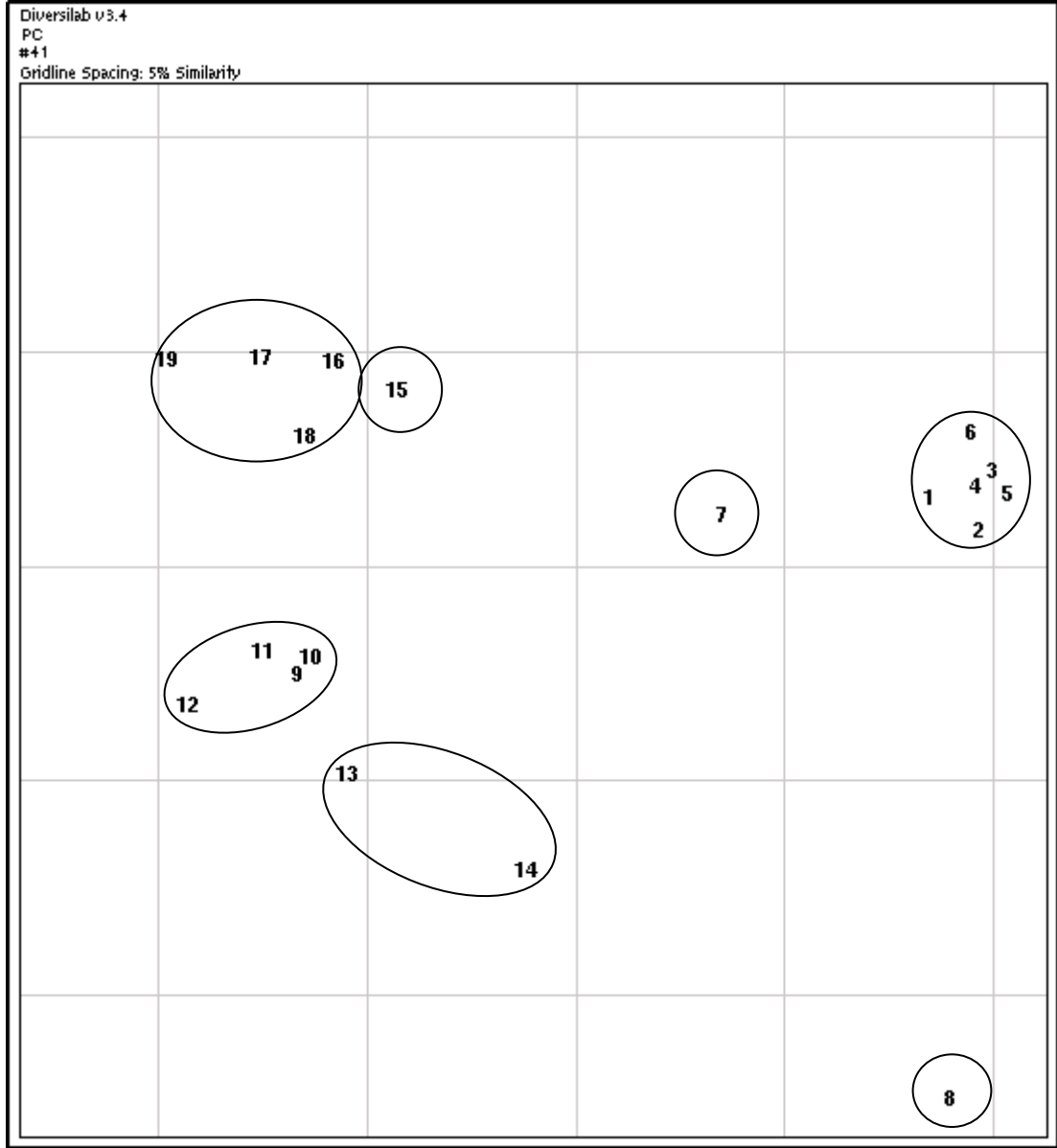
2009 yılına ait suşlar ile DiversiLab sisteminde oluşan bant paternlerinin yorumu Tablo 13'te verilmiştir.

Tablo 13. 2009 yılına ait suşlar ile DiversiLab sisteminde oluşan paternler.

PATERNLER	SUŞ NUMARALARI	BANT FARKI
P14	35-36-39-41-43-46	I (Bant farkı yok): Aynı örnek
P4	31-38-42-47	I (Bant farkı yok): Aynı örnek
P12	32-33-34-44	I (Bant farkı yok): Aynı örnek
P15	30-40	I (Bant farkı yok): Aynı örnek
P2	48	D (>3 bant farkı): Farklı örnek
P3	37	D (>3 bant farkı): Farklı örnek
P11	45	D (>3 bant farkı): Farklı örnek



Şekil 6. 2009 Yılına ait suşların DiversiLab sistemi ile elde edilen benzerlik matrisi



Şekil 7. 2009 Yılına ait suşların DiversiLab sistemi ile elde edilen scatter plot'ları

2009 yılına ait suşlar, her iki yöntemde patern uyumluluğu açısından incelendiğinde, PFGE'de en fazla suşun kümelendiği A Paterninin rep-PCR'da karşılığı olan P12 paterni 7 suşun 4'ünde (%57) görülmüştür. İkinci sıklıkta görülen D Paterninin rep-PCR'da karşılığı olan P14 paterni ise 6 suşun 4'ünde (%66) uyumlu bulunmuştur. PFGE'de B ve C paternleri ikiye suştan oluşmuş ve rep-PCR'da bu suşlar P4 ve P15 paternleri ile tam uyumlu bulunmuştur. F Paterni tek bir suştur ve karşılığı rep-PCR'da P3 paterni de tek bir suştan oluşmuş ve uyumlu bulunmuştur. Patern E ise tek bir suştan oluşmasına rağmen rep-PCR'da bu suş Patern D ile benzerlik göstermiş ve uyumsuzluk gözlenmiştir. 2009 suşları açısından PFGE ve

rep-PCR yöntemlerinde oluşan bant paternleri, minör farklılıklar dışında birbirleriyle uyumlu patern grupları oluşturmuşlardır. Her iki yöntemle oluşan bant paternleri Tablo 14’te gösterilmiştir.

Tablo 14. 2009 yılına ait suşların PFGE ve DiversiLab sistemi ile oluşan bant paternleri.

SUŞ NO	ALTERNATİF	PFGE	DiversiLab
30	A107	C	P15
31	A106	B	P4
32	A104	A	P12
33	A103	A	P12
34	A101	A	P12
35	A100	D	P14
36	A99	D	P14
37	A98	F	P3
38	A93	B	P4
39	A92	E	P14
40	A89	C	P15
41	A88	D	P14
42	A86	A	P4
43	A85	A	P14
44	A83	A	P12
45	A82	A	P11
46	A78	D	P14
47	A77	D	P4
48	A76	D	P2

4.2.2. 2010 Yılına Ait Suşların rep-PCR DiversiLab Bulguları

2010 yılına ait 29 adet *A.baumannii* suşunun alternatif numaraları, rep-PCR işlemi sırasında kullanılan çip numaraları ile suşların izolasyon tarihleri Tablo 15’te gösterilmiştir.

Tablo 15. 2010 yılına ait suşlar ve rep-PCR çip numaraları.

SIRA NO	ALTERNATİF NO	REP-PCR ÇİP NO	TARİH	NUMUNE	SERVİS
1	T1	15-1	18.01.2010	TRAKEAL	AYB
2	T2	15-2	18.01.2010	BOS	BEYİN
3	T3	15-3	25.01.2010	TRAKEAL	NYB
4	T4	15-4	25.01.2010	TRAKEAL	GENEL
5	T5	15-5	08.02.2010	TRAKEAL	AYB
6	T6	15-6	06.02.2010	KAN	AYB
7	T8	15-7	23.02.2010	TRAKEAL	AYB
8	T9	15-8	23.02.2010	TRAKEAL	AYB
9	T10	15-9	16.02.2010	TRAKEAL	AYB
10	T12	15-10	05.03.2010	KAN	NYB
11	T14	15-11	15.03.2010	TRAKEAL	AYB
12	T15	15-12	18.03.2010	TRAKEAL	AYB
13	T16	19-1	15.03.2010	YARA	ORTOPEDİ
14	T17	19-2	09.03.2010	İDRAR	BEYİN
15	T19	19-3	06.04.2010	TRAKEAL	AYB
16	T20	19-4	02.04.2010	TRAKEAL	AYB
17	T21	19-5	14.04.2010	TRAKEAL	KBB
18	T22	19-6	09.04.2010	NEFROSTOMİ	ÜROLOJİ
19	T23	19-7	09.04.2010	KAN	AYB
20	T24	16-8	24.03.2010	KAN	BEYİN
21	T25	16-9	28.04.2010	TRAKEAL	AYB
22	T26	16-10	05.05.2010	İDRAR	AYB
23	T27	16-11	30.04.2010	YARA	ORTOPEDİ
24	T28	18-13	06.05.2010	TRAKEAL	AYB
25	T29	17-1	26.05.2010	TRAKEAL	AYB
26	T30	17-2	23.05.2010	KAN	NYB
27	T31	17-3	15.06.2010	TRAKEAL	AYB
28	T32	17-4	14.06.2010	İDRAR	NYB
29	T44	17-5	21.06.2010	TRAKEAL	AYB

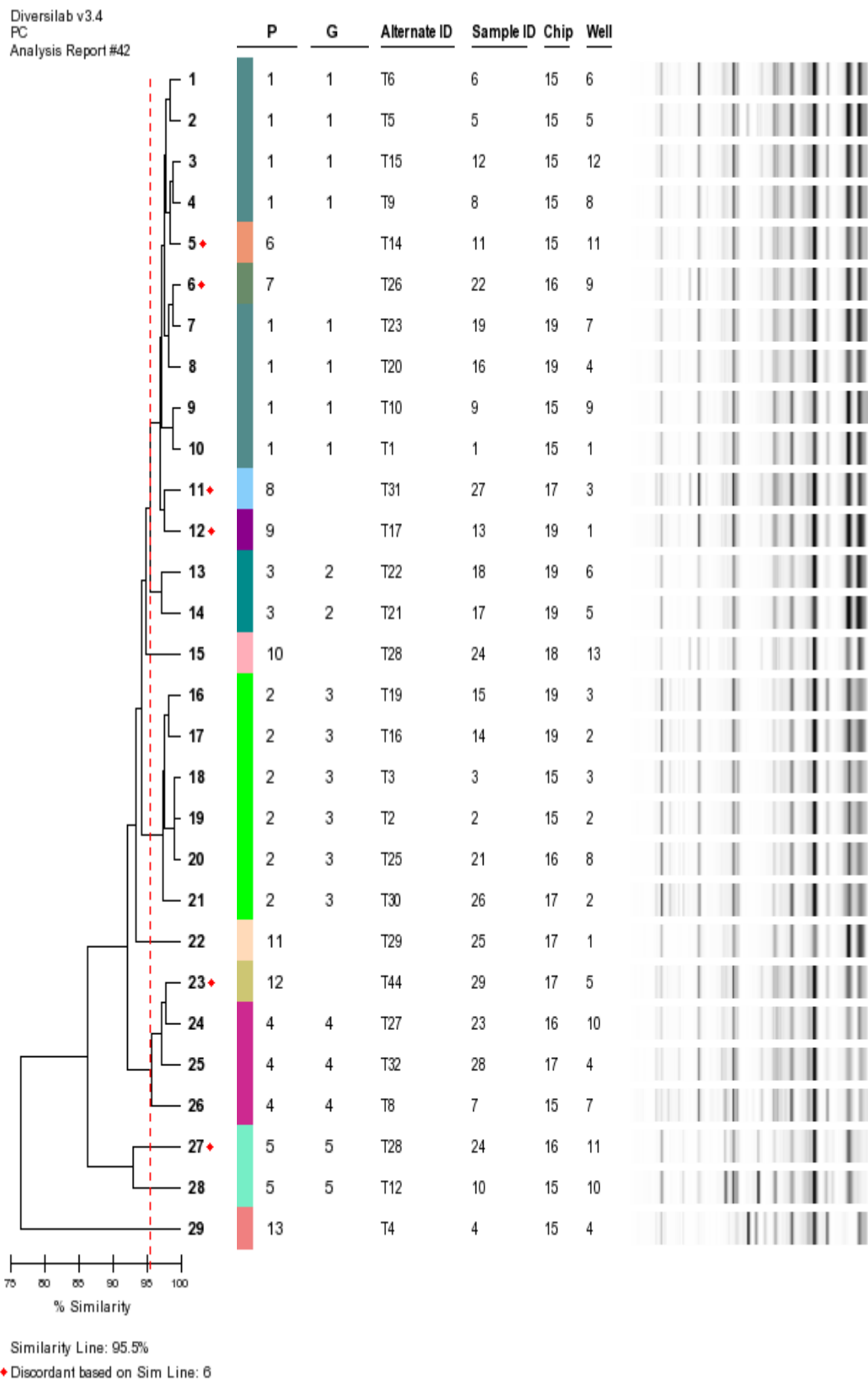
4.2.2.1. 2010 Yılına Ait Suşların rep-PCR DiversiLab Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 2010 yılına ait 29 adet suşun DiversiLab Software Version 3.4 kullanılarak, Pearson Korelasyon katsayısı ve UPGMA %1 optimizasyon ayarı kullanılarak ve Similarity line (Benzerlik çizgisi) %95,3 alındığında, elde edilen dendogramlarda beş farklı grup ve onüç farklı patern olduğu tespit edilmiştir. 2010 yılına ait suşların rep-PCR DiversiLab sistemi ile elde edilen dendogramları Şekil 8’de, benzerlik matrisi Şekil 9’da ve scatter plot’ları Şekil 10’da verilmiştir.

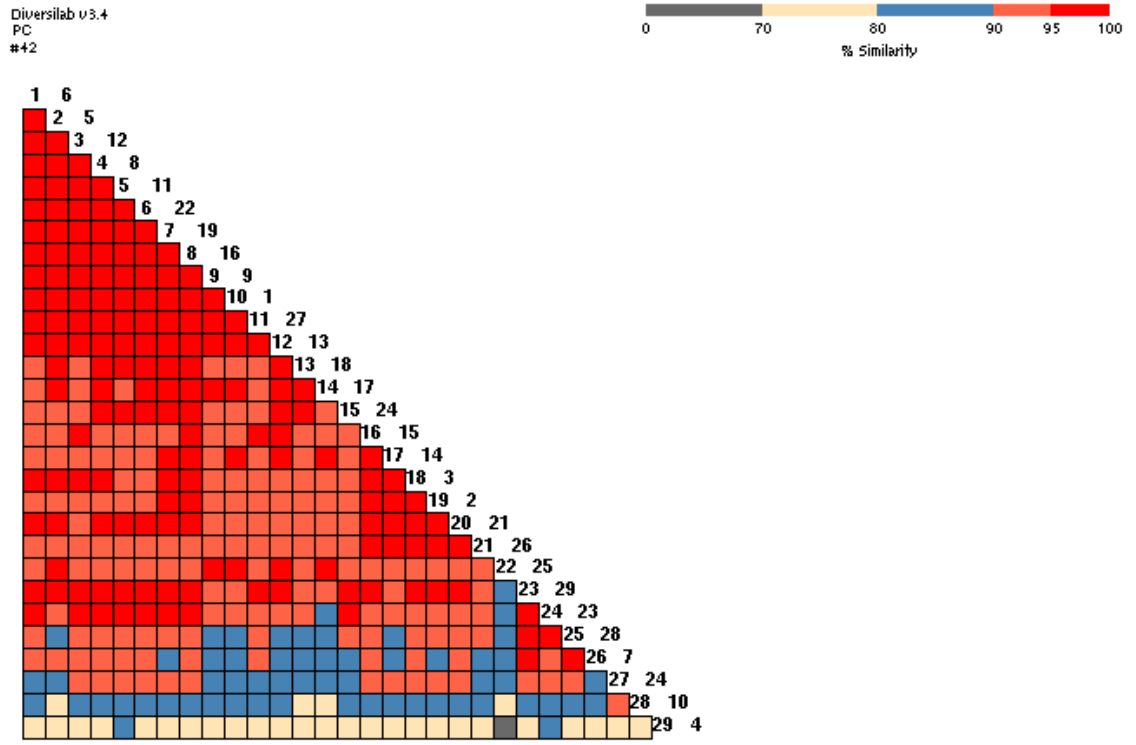
2010 yılına ait suşlar ile DiversiLab sisteminde oluşan bant paternlerinin yorumu Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 16. 2010 yılına ait suşlar ile DiversiLab sisteminde oluşan paternler.

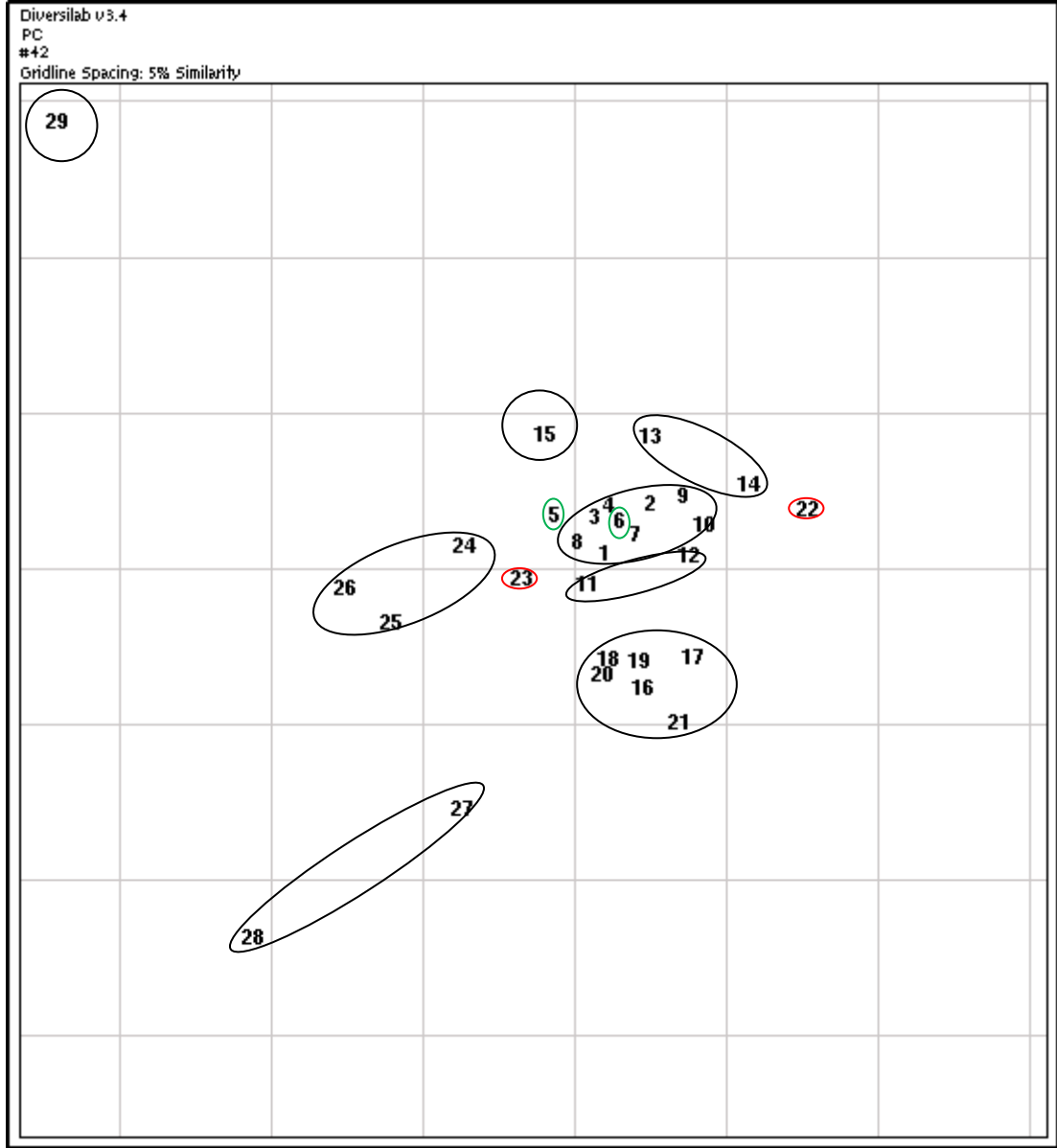
GRUPLAR	PATERNLER	SUŞ NUMARALARI	BANT FARKI
G1	P1	1-5-6-8-9-12-16-19	I (Bant farkı yok): Aynı
G2	P3	17-18	I (Bant farkı yok): Aynı
G3	P2	2-3-14-15-20-26	I (Bant farkı yok): Aynı
G4	P4	7-22-28	I (Bant farkı yok): Aynı
G5	P5	10-23	I (Bant farkı yok): Aynı
	P6	11	S (2 bant farkı): Benzer izolat
	P7	21	
	P8	27	S (2 bant farkı): Benzer izolat
	P9	13	
	P10	24	D (>3 bant farkı): Farklı
	P11	25	S (2 bant farkı): Benzer izolat
	P12	29	
	P13	4	D (>3 bant farkı): Farklı



Şekil 8. 2010 yılına ait suşların rep-PCR DiversiLab sistemi ile elde edilen dendrogramları



Şekil 9. 2010 yılına ait suşların DiversiLab sistemi ile elde edilen benzerlik matrisi



Şekil 10. 2010 yılına ait izolatların DiversiLab sistemi ile elde edilen scatter plot'ları

2010 yılına ait suşlar incelendiğinde, PFGE yöntemine göre rep-PCR'da daha dağınık bir patern oluşumu gözlenmiştir. 29 suş PFGE yöntemi ile 4 farklı patern oluştururken, rep-PCR'da ise 21 suşun 5 paterde kümelendiği, diğer 8 suşun her birinin ayrı bir patern oluşturduğu toplam 13 farklı patern oluşmuştur. PFGE yöntemi ile A paterni oluşturan 18 suşun rep-PCR ile sadece 6 tanesi (%33) P1 paterninde gözlenmiştir. 8 suşun bulunduğu B Paterninde ise sadece 2 suş (%25) rep-PCR'da P2 paterni oluşturmuştur. 29 suş incelendiğinde, 2009 yılı suşlarında görülen iki yöntem arasındaki uyum, 2010 yılı suşlarında gözlenmemiştir. 2010 yılına ait suşların her iki yöntemle oluşturdukları bant paternleri Tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17. 2010 yılına ait suşların PFGE ve DiversiLab sistemlerindeki oluşan paternleri.

SIRA NO	ALTERNATİF NO	PFGE PATERNİ	DiversiLab PATERNİ
1	T1	A	P1
2	T2	A	P2
3	T3	B	P2
4	T4	D	P13
5	T5	A	P1
6	T6	A	P1
7	T8	A	P4
8	T9	A	P1
9	T10	A	P1
10	T12	A	P5
11	T14	C	P6
12	T15	A	P1
13	T16	A	P9
14	T17	A	P2
15	T19	B	P2
16	T20	B	P1
17	T21	A	P3
18	T22	A	P3
19	T23	B	P1
20	T24	A	P2
21	T25	B	P7
22	T26	B	P4
23	T27	A	P5
24	T28	C	P10
25	T29	A	P11
26	T30	A	P2
27	T31	B	P8
28	T32	A	P4
29	T44	B	P12

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hastanede yatarak tedavi edilen hastalar için, nozokomiyal enfeksiyonlar büyük bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu nedenle nozokomiyal enfeksiyon izleme sistemleri, yoğun bakım üniteleri, yanık birimleri gibi kritik hastane bölümlerinde oldukça etkin çalışmalıdır. Özellikle immün sistemi zayıflayan hastalar, hastanede çok uzun süre yatan ve yoğun antibiyotik tedavisi alanlar, solunum desteği alanlar ve invaziv cerrahi işlemlere tabi tutulan hastalar nozokomiyal enfeksiyonlar açısından dikkat edilmesi gereken hasta gruplarıdır.

Yukarıda bahsedilen hasta grupları, daha çok yoğun bakım üniteleri ve cerrahi servislerde tedavi edilen hastaları içermektedir. Yoğun bakım ünitelerinin nozokomiyal enfeksiyonlarda ayrı bir yeri ve önemi vardır. Solunum yetmezliği, kardiyak nedenler, travma, dolaşım bozuklukları veya metabolik bozukluklar gibi çeşitli nedenlerden dolayı bazı hastalar, belirli bir dönem solunum desteğinin verildiği, kritik bakım ve tedavinin düzenlendiği yoğun bakım ünitelerinde takip edilirler. Bu hastaların bir kısmı mevcut altta yatan hastalıkları nedeniyle kaybedilirler. Bazı hastalar bu savaşı kazanır ve bu zorlu dönemi atlatarak sağlıklarına kavuşurlar. Ne yazık ki bazı hastalar ise, hastanede kalma süresi uzadıkça, hastaneye yatış nedenlerinden bağımsız olarak gelişen bazı komplikasyonlarla mücadele etmek durumunda kalırlar. Bu komplikasyonların en önemlilerinden birisi gelişen hastane kaynaklı enfeksiyonlardır.

Yoğun bakım üniteleri sıklıkla nozokomiyal salgınların merkezidirler. GSBL üreten *Enterobacteraceae*, MRSA, *Pseudomonas* spp. ve *A.baumannii* bu salgınlarda öne çıkan patojenlerdir (125). Bu patojenler arasında da, *A.baumannii*, yastık, yatak, perde, tıbbi cihazlar gibi çevresel yüzeylerde günlerce yaşayabilmesi (126) ve hastanın cildi, solunum yolu ve dışkıında kolonize olabilmesiyle farklı bir yere sahiptir (127).

Amerikan CDC (The Centers or Disease and Prevention) kurumu, her yıl ABD’de 2 milyondan fazla hastane kaynaklı enfeksiyon geliştiğini tahmin etmektedir (128). Nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık %5’i bir salgının parçasıdır (129). ABD’ndeki Ulusal Nozokomiyal İzleme Sistemi, bu ülkedeki *Acinetobacter*

insidansının Gram negatif basiller içindeki oranının, 1973'te %1,4 iken 2003'te %6,2'ye yükseldiğini bildirmiştir (130).

Salgın ve sporadik enfeksiyon suşlarının ayrımı ancak, şüpheli bakteri izolatlarının arasındaki genomik benzerlik ve farklılıkların ortaya konulduğu laboratuvar teknikleri ile yapılabilmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların ortaya çıkması, antibiyotik direncinin artması ve bunlara bağlı olarak morbidite ve mortalitedeki artışa gösterilen ilgi, nozokomiyal enfeksiyonların tanısına ve epidemiyolojik analizine yardımcı olacak moleküler tekniklerin geliştirilmesine yol açmışlardır. Aynı türdeki izolatların genetik ilişkileri hakkında bilgi sağlayan DNA analizi temeline dayanan çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu DNA temelli teknikler arasında PFGE, PCR temelli tiplendirme metotları, AFLP, RFLP, MLEE, MLST plazmid analizi ve rep-PCR bulunmaktadır (131).

A.baumannii salgınlarının kaynağının hızlı ve doğru tespiti, enfeksiyonun tedavisi ve salgının kontrolü açısından önemlidir. Bu amaçla yapılan moleküler temelli çalışmalarda PFGE altın standart kabul edilmiş ve diğer teknikler PFGE ile kıyaslanmıştır.

Yakın dönemde geliştirilen rep-PCR DiversiLab sistemi, bakteriyel ve fungal izolatların genomik benzerliklerinin tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Bu otomatize sistemin, salgınların aydınlatılmasında etkinliğinin gösterilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

H.Seifert ve arkadaşları, epidemiyolojik olarak iyice tanımlanmış 9 farklı hastane salgınından elde edilen 103 *A.baumannii* izolatu ve 21 salgınla ilişkisiz suşu PFGE yöntemi kullanarak genomik benzerliklerini araştırmışlar (132). Salgınlar 2 aydan 12 aya kadar sürmüş ve hepsi yoğun bakım ünitelerinde gerçekleşmiş. PFGE yönteminde, DNA kesim aşamasında ApaI Restriksiyon Enzimi kullanılmış ve salgın suşları ile 8 farklı patern ve 5 muhtemel ilişkili patern oluşmuş. Sonuçlar plazmid analizi, antibiyotik duyarlılık profilleri ve karbon kaynağı kullanımı temeline dayanan biyotiplendirme yöntemleri ile karşılaştırılmış. Buna göre, plazmid analizi ile 6 farklı patern ve 2 ilişkili patern oluşmuş. Antibiyotik duyarlılıklarına göre 5 farklı grup oluşurken biyotiplendirme ile izolatlar 4 farklı gruba ayrılmışlar. Bu çalışmaya göre antibiyotik duyarlılık ve biyotiplendirme paternleri, epidemiyolojik

araştırmalarda tarama yöntemi olarak uygun olmakla beraber, sonuçların tamamlayıcı başka tekniklerle desteklenmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Plazmid analizi *A.baumannii* salgılarının incelenmesinde faydalı bir yöntem olarak bulunmuş. PFGE ise bu dört yöntem arasında izolatların birbiri ile ilişkisini göstermede en üstün yöntem olmuştur.

Carretto ve arkadaşları, İtalya'nın farklı bölgelerinde yer alan 7 hastaneden dört haftalık bir dönemde izole edilen 21 *A.baumannii* izolatını DiversiLab sistemi kullanarak epidemiyolojik analizini yapmışlardır (133). Aynı izolatlarda ribotiplendirme yaparak bu iki yöntemi kıyaslamışlardır. DiversiLab yöntemi ile 8 küme (Cluster) oluşurken ribotiplendirme ile 6 küme oluşmuş. Fazla sayıda izolatın çalışılıp kısa süre içinde sonuç alınması gereken durumlarda DiversiLab sisteminin oldukça uygun olduğunu bu çalışma ile rapor etmişler. Maliyetinin yüksek olduğu, buna karşın kolay ve hızlı bir metot olduğu vurgulanmıştır.

Brolund ve arkadaşları, Şubat-Nisan 2007 tarihleri arasında İsveç'teki 26 klinik laboratuvarında izole edilen, GSBL üreten 258 *E.coli* ve 48 *K.pneumoniae* izolatının birbirleri ile ilişkisini DiversiLab sistemi ve PFGE yöntemleri ile araştırmışlardır (134). Yöntemleri birbirleri ile kıyaslamak için Simpson's Index of Diversity ve Wallace Coefficients katsayıları kullanılmıştır. Çalışmada 258 *E.coli* izolatının, DiversiLab sistemi ile hepsi tiplendirilebilirken, PFGE ile 226 izolat tiplendirilebilmiş. 226 *E.coli* ile DiversiLab sisteminde 24 tanesi iki ve üzerinde izolat içeren, 65 tanesi tek bir izolat içeren 89 farklı tip oluşmuş. PFGE yönteminde ise 27 tanesi iki ve üzerinde izolat içeren, 125 tanesi tek bir izolat içeren toplam 152 PFGE tipi oluşmuştur. 48 *K.pneumoniae* izolatının hepsi her iki yöntemle tiplendirilebilmiş. Her iki yöntemle de, 20 tanesi tek bir izolat içeren 25 farklı patern oluşmuş. Bu bulgulara ve sonuçlara göre, PFGE DiversiLab'a göre daha yüksek ayırım gücüne sahip bulunmuştur.

Witt ve arkadaşları 2009 yılında Hollanda'da yaptıkları çalışmada, 93 Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatında DiversiLab sistemi, PFGE ve MLST yöntemlerinin ayırım gücünü araştırmışlar (135). Çalışma sonucunda PFGE yöntemi ile 28 farklı patern oluşmuş. DiversiLab sistemi ile 7 farklı küme ve tek izolattan oluşan 8 patern ile birlikte toplam 15 farklı patern, MLST ile 16 farklı

patern oluşmuştur. Yöntemler birbirleri ile Simpson Index of Diversity kullanılarak kıyaslanmış ve sonuçta, DiversiLab ve MLST yöntemlerinin ayırıcı gücü birbirine yakın iken PFGE'nin ayırıcı gücü bu üç yöntem arasında en yüksek bulunmuş. Aynı çalışmada MLST maliyeti en yüksek yöntem iken en az maliyet PFGE yönteminde bulunmuş.

Qiang Yan ve arkadaşları 2010 yılındaki bir makalede, Çin'deki üç askeri hastaneden izole edilen 49 MDR *A.baumannii*'yi DiversiLab sistemi kullanarak genotiplendirme yapmışlardır (136). Çalışma sonunda her biri üçten fazla izolat içeren ve >%95 benzerliğe sahip 5 adet klon (A-E) tanımlamışlar. Klon A 27 izolat, klon B 8, klon C 4, klon D 3 ve klon E 3 izolattan oluşurken, kalan 4 izolatin her biri farklı bir paterne sahip bulunmuştur. Toplamda 9 farklı patern oluşmuş. DiversiLab sisteminin hızlı sonuç vermesinin bir avantaj olduğu vurgulanırken, maliyetinin yüksek olması bir dezavantaj olarak rapor edilmiş.

Grisold ve arkadaşları, 2010 yılında yayınlanan bir makalede, Avusturya'daki 6 hastane salgınına ait iyi tanımlanmış 70 salgın izolatı, 52 salgınla ilgisi olmayan toplam 122 farklı klinik izolatı araştırmışlar (125). 29'u MRSA, 31'i *A.baumannii*, 49'u GSBL üreten *K.pneumoniae* ve 13'ü GSBL üreten *K.oxytoca* olan 122 izolatin DiversiLab ve PFGE yöntemleri ile genomik benzerlikleri karşılaştırılmış. Farklı bakteri gruplarını içeren bu çalışmada *A.baumannii* için her iki yöntemde de %100 uyumlu sonuçlar alınmış. MRSA ve *K.pneumoniae* içinde yöntemler arası uyum bulunurken, *K.oxytoca* izolatlarında DiversiLab sisteminin ayırma gücü PFGE'e göre daha güçlü bulunmuştur.

Ligozzi ve arkadaşları, 2010 yılında yayınlanan bir makalede, İtalya'da bir yenidoğan yoğun bakım ünitesinde tanımlanan *Serratia marcescens* salgınında izole edilen 36 epidemiyolojik ilişkili izolatı DiversiLab sistemi ve PFGE yöntemleri ile moleküler olarak araştırmışlar (131). PFGE yöntemi ile 5 farklı patern oluşurken, DiversiLab sistemi ile 7 farklı patern oluşmuş. Çalışma sonucunda DiversiLab sisteminin ayırma gücünü PFGE yöntemine göre daha üstün olarak rapor etmişler.

Ratkai ve arkadaşları tarafından 17 ay boyunca Macaristan'da bir üniversite hastanesindeki farklı servislerden izole edilen 29 *P.aeruginosa* izolatı genomik benzerlik yönünden incelenmiştir (137). Bu inceleme rep-PCR DiversiLab ve PFGE

yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sonunda DiversiLab ve PFGE yöntemleri izolatlar arasında benzer genetik ilişki paternleri göstermişler ve her iki yöntemde 28 ve 1 izolattan oluşan iki patern olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bu yapılan çalışmalar bizim çalışmamız ile birebir örtüşmese de, altın standart kabul edilen PFGE yönteminin farklı moleküler yöntemler ile kıyaslanmasını içermekte veya bizim kullandığımız iki moleküler yöntemin farklı bakteri grupları ile kıyaslamalarını içermekte ve PFGE yönteminin bakteriyel genomik ayırım gücü hakkında bizlere fikir vermektedir.

Bizim çalışmamız ile birebir örtüşen veya benzeyen çalışma sayısının az olması; tartışmamızı kısıtlı sayıda literatürle yapmamıza neden olmuştur.

2006 yılında yayınlanan, S.Saeed ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 600 yataklı Amerikan hastanesinde ve bağlantılı kurumlarında *A.baumannii*'nin yayılmasını PFGE ve rep-PCR yöntemleri kullanarak araştırmışlar (138). Beş aylık bir dönemde (Ağustos 2003-Ocak 2004) toplanan 99 *A.baumannii* izolatu, *SmaI* Restriksiyon Enzimi ve Dendron 3.0 bilgisayar programı kullanılarak PFGE yöntemi ile incelenmiş. Aynı suşlarda rep-PCR yöntemi için DiversiLab sistemi kullanılmıştır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak, Saeed ve arkadaşları, test çalışması ve sonuç alımı arasındaki zaman, maliyet ve teknik zaman değerlendirmesi yapmışlardır. Ayrıca hastaları, katater varlığı, ventilatör desteği ve trakeostomi varlığı açısından da incelemişlerdir.

Bu çalışmaya göre, incelenen 99 *A.baumannii* izolatında, PFGE yöntemi ile 34, rep-PCR yöntemi ile 38 bant paterni oluşmuş. Rep-PCR yöntemi ile daha fazla bant paterni oluşması bizim çalışmamız ile uyumlu bulunmuştur.

Ana paterni 54 izolat oluşturmuş ve bu tüm suşların %54'ünü oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda ise 48 suşun 25 tanesi esas paterni oluşturmuş ve bu da suşların %52'sini oluşturmuştur.

Yine aynı çalışmaya göre PFGE yöntemi için 5,75 saat teknik zaman gerekirken rep-PCR için 2,5 saat teknik zaman gerekmiş. Bizim çalışmamızda zaman açısından herhangi bir objektif değerlendirme yapılmamasına rağmen, 48 suş için harcanan çalışma süreleri karşılaştırıldığında, PFGE yöntemi rep-PCR yöntemine

göre daha uzun sürmüş ve bu sonuç Saeed ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

Zamanın yanı sıra maliyetinde karşılaştırıldığı bu çalışmada, PFGE için kit maliyeti 13\$ iken rep-PCR yöntemi için 31\$ olarak bulunmuş. Yine aynı şekilde bizim çalışmamızda da detaylı bir maliyet incelemesi yapılmamasına rağmen bu çalışmayla uyumlu şekilde rep-PCR yöntemi daha maliyetli olarak bulunmuştur. Tüm bu bulgular ile Saeed ve arkadaşları PFGE ve rep-PCR yöntemleri arasında minör uyumsuzluklar ile *A.baumannii* suşlarını ayırabildiklerini göstermişler ve bizim çalışmamız ile uyumlu sonuçlar bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda, tüm suşlar değerlendirildiğinde, izole edildikleri hastaların yaş ortalaması 57,6 olarak bulunmuştur (16-86 yaş arası). Hastanede yatış süreleri açısından tüm hastalar incelendiğinde hastanede yatış süresi ortalama 78,5 gün olarak bulunmuştur (1-312 arası). Tüm izolatların 23 (%47,9) tanesi trakeal aspirat, 16 (%33,3) tanesi kan, 3'ü (%6) idrar, 2'si (%4) BOS, 2'si (%4) yara ve 2 (%4) tanesi katater kültürlerinden elde edilmiştir. Saeed ve arkadaşlarının çalışmasında da izolatların %45'i solunum yolundan izole edilirken ikinci olarak idrardan (%21) izole edilmişlerdir. Ortalama yaş ise bizim çalışmamızdakine yakın olarak 60 olarak hesap edilmiştir.

Ayan ve Durmaz'ın 2003 yılında yayınlanan bir makalesinde (139), *A.baumannii* enfeksiyonları antibiyogram profilleri, PCR temelli parmak izi analizi ve PFGE yöntemleri ile incelenmiş. Yaklaşık 18 ay boyunca 50 hastadan, 14'ü pediatri, 20'si ortopedi, 18'i yoğun bakım servislerinden olmak üzere toplam 52 *A.baumannii* suşu izole edilmiş. Ayrıca, tarama amaçlı, 97 çevresel örnek ve 57 çalışanlardan örnekler toplanmış. Çevresel örnekler inkübatör, lavabo, musluk, yatak, ventilatör, antiseptik solusyonlar, biberonlar, zemin, telefon gibi nesnelere alınmış ancak, çoğaltıcı bir besiyeri kullanılmamış. Antibiyogramlar, MHA'da disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır.

AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) çalışması sırasında M13 ve DAF4 primerleri kullanılmış, %1,5 agaroz jelde yürütülmüş. Değerlendirmesinde Dice benzerlik katsayısı kullanılmış, >%70 benzerliği olanlar "Cluster" olarak tanımlanmış, > % 90 benzerlik olanlar "Aynı" olarak, < %70

benzerliği olanlar “Farklı” olarak değerlendirilmiş. PFGE için CHEF DR II sistemi kullanılmış ve Tenover kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Bu alışmada 38 *A.baumannii* tiplendirilmiş ve 12 farklı antibiyogram profili elde edilmiş. AP-PCR ile 8 tip ve 5 subtip oluşmuş. PFGE ile 9 farklı patern oluşmuş. Kendall’s Tau-b katsayısına göre antibiyogram tiplendirme ve PFGE arasındaki uyum %59 iken, AP-PCR ve PFGE arası uyum % 87 olarak bulunmuş. PFGE sonuçları klinik ve epidemiyolojik bilgi ile en iyi uyumu göstermiştir. Bu çalışmaya göre antibiyogram tiplendirme kolay ancak ayırım gücü zayıf bulunmuş. Salgınlar sırasındaki suşlardaki epidemiyolojik ilişki, AP-PCR ile %77 bulunurken PFGE ile %91 bulunmuştur.

Xavier Corbella ve arkadaşları, 2000 yılında yayınlanan bir makalede (140), 1000 yataklı bir İspanyol hastanesindeki karbapenem dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarını rep-PCR ve PFGE ile incelemişler ve karbapenem direncinin, dirençli mutantlardan değil, 2 yeni epidemik klondan kaynaklandığını tespit etmişlerdir.

Bizim alışmamızda 2009 yılına ait 19 *A.baumannii* izolatu ve 2010 yılına ait 29 *A.baumannii* izolatu PFGE ve rep-PCR DiversiLab sistemi ile genomik benzerlik açısından incelenmiştir. 2009 suşlarında PFGE yöntemi ile 7 izolat A paterni, 2 izolat B paterni, 2 izolat C paterni, 6 izolat D paterni 1 izolat E ve 1 izolat F paterni olmak üzere toplam 6 farklı patern oluşmuştur. Aynı suşların DiversiLab sistemi ile yapılan analizinde ise 6 izolat P14 paterni, 4 izolat P4 paterni, 4 izolat P12 paterni, 2 izolat P15 paterni ve 1’er izolatta P2, P3 ve P11 paternlerini olmak üzere toplam 7 farklı patern oluşturmuştur.

2010 yılına ait suşların PFGE ile yapılan analizinde 18 izolat A paterni, 8 izolat B paterni, 2 izolat C paterni ve 1 izolat ise D paterni olmak üzere 4 farklı patern oluşturmuştur. 2010 suşları, DiversiLab sistemi ile daha dağınık bir profil oluşturmuş ve 8 izolat P1 paterni, 6 izolat P2 paterni, 2 izolat P3 paterni, 3 izolat P4 paterni, 2 izolat P5 paterni ve kalan 8 izolat P6-P13 arası her biri farklı birer patern oluşturmuşlardır. 2010 suşları DiversiLab sistemi ile toplamda 13 farklı patern oluşturmuşlardır.

Çalışmamızda bu iki farklı moleküler yöntemin ayırıcılık güçlerini kıyaslayacak bir ayırıcılık indeksi kullanılmadığı için birbirlerine karşı üstünlükleri hakkında objektif bir yorum yapılamamaktadır. Ancak, bu bulgular ışığında DiversiLab sistemi, patern kümelenmelerine göre daha fazla sayıda patern oluşumuna neden olmuştur.

Her iki yöntem çalışma süreleri açısından incelendiğinde, DiversiLab sistemi PFGE yöntemine göre daha kısa süre sonunda veriler elde edilirken, DiversiLab sistemi, iş gücünü önemli ölçüde azaltmış ve zaman kazandırmıştır. Özellikle çok kısa sürede sonuç alınması gereken moleküler çalışmalar ve salgın kaynaklarının aydınlatılması durumlarında DiversiLab sistemi PFGE yöntemine göre daha üstündür.

Her iki yöntem için cihaz alımı yapmadan, sadece malzeme ve kit alımı yaptığımız için net bir maliyet tablosu çıkarmamız olanaklı değildir. Ancak malzeme ve kit harcamalarına göre DiversiLab sisteminin maliyeti, PFGE yöntemine göre daha fazla olmaktadır. Yüksek maliyet ve sistemin her yerde ulaşılabilir olmaması, DiversiLab sistemi için bir dezavantajdır.

Elde edilen verilerin, internet ortamından kolaylıkla ulaşılabilen bir veri bankasında toplanması, DiversiLab sistemini, genomik benzerliklerin zaman içinde uluslar arası kıyaslanmanın yapılabileceği ve global bir epidemiyolojik haritanın çıkarılabileceği yöntem haline getirmektedir. PFGE yöntemi altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, uluslar arası standartlarının tam oluşmaması ve her merkezin farklı protokoller uygulaması, bu yöntemin sahip olduğu dezavantajlardan birisidir. Fazla sayıda izolatu çalışılıp kısa süre içinde sonuç alınması gereken durumlarda DiversiLab sisteminin oldukça uygun olduğu pek çok çalışma ile rapor edilmiştir. Maliyetinin ise yüksek olduğu, buna karşın kolay ve hızlı bir metot olduğu vurgulanmıştır.

Sonuç olarak günümüzde *A.baumannii* salgınlarının kaynağının hızlı ve doğru tespiti, enfeksiyonun tedavisi ve salgının kontrolü açısından çok önemlidir. Ancak moleküler temelli çalışmaların daha fazla yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu sayede daha ucuz, kolay ve hızlı moleküler temelli yöntemlerin rutinde kullanılmasına imkân sağlanabilecektir.

ÖZET

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ YOĞUN BAKIM VE CERRAHİ SERVİS HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN MULTI-DRUG RESISTANT (MDR) *Acinetobacter* *baumannii* İZOLATLARININ REPETATIVE SEQUENCE BASED-PCR (rep- PCR) VE PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) YÖNTEMLERİ İLE KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedeni olan Multi Drug Resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii*, tüm insanlar için tehdit oluşturan bir fırsatçı patojendir. Özellikle immün sistemi zayıflayan ve invaziv işlemlere tabi tutulan hastaları etkileyen bu patojenin hızlı tespit edilmesi, enfeksiyonla mücadelede önemlidir.

Salgın kaynağının araştırılmasında, PFGE yöntemi bugün için altın standart olarak kabul edilmektedir. DiversiLab sistemi ise yeni geliştirilen bir moleküler tekniktir.

Çalışmamızda, Süleyman Demirel üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Anestezi Yoğun Bakım, Nöroloji Yoğun Bakım, Koroner Yoğun Bakım ve cerrahi servis hastalarında izole edilen, 48 adet MDR *A.baumannii* izolatının PFGE ve rep-PCR DiversiLab yöntemleri ile moleküler benzerliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma sonunda, 2009 yılına ait 19 izolat, PFGE yöntemi ile 6 farklı patern oluşturmuştur (P-A 7, P-B 2, P-C 2, P-D 6, P-E ve P-F 1'er izolat). Aynı suşların DiversiLab sistemi ile yapılan moleküler çalışmasında 7 farklı patern oluşmuştur (P14 6, P4 4, P12 4, P15 2 izolat ve P2, P3 ve P11 1'er izolat).

2010 yılına ait 29 izolat, PFGE yöntemi ile 4 farklı patern oluşturmuştur (P-A 18, P-B 8, P-C 2 ve P-D 1 izolat). 2010 yılı suşlarının rep-PCR DiversiLab sistemi ile yapılan analizinde, 13 farklı patern oluşmuştur. Bu paternlerin 21 tanesi 5 kümeye ait bulunmuş ve kalan 8 izolatın her biri farklı patern oluşturmuştur (P1 8, P2 6, P3 2, P4 3, P5 2 izolat ve P6-P13 arası 1'er izolat).

PFGE yöntemine göre daha kısa sürede sonuç veren DiversiLab sistemi, patern kümelenmelerine göre daha fazla sayıda patern oluşumuna neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: MDR, *Acinetobacter baumannii*, PFGE, rep-PCR, DiversiLab

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE ORIGIN OF MULTI DRUG RESISTANT (MDR) *Acinetobacter baumannii* STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS OF SURGERY SERVICE AND INTENSIVE CARE UNITS OF SULEYMAN DEMIREL UNIVERSITY, MEDICAL SCHOOL HOSPITAL, WITH THE REPETATIVE SEQUENCE-BASED PCR (Rep-PCR) AND PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) METHODS.

MDR *A.baumannii*, which is an important cause of hospital acquired infections, is an opportunistic pathogen being a threat for all human beings. Early detection of this pathogen, which effects especially immunocompromised patients and patients who have invasive procedures, is important in struggling with infection.

For today, PFGE is a gold standard in searching for the source of outbreaks. DiversiLab system is a newly developed molecular technique.

In our study, we aimed to investigate molecular relatedness of 48 MDR *A.baumannii*, by PFGE and rep-PCR DiversiLab systems in patients from Anesthesia Intensive Care Unit (ICU), Neurology ICU, Coronary ICU and surgical wards.

At the end of study, 19 isolates belonging to the year 2009, we identified 6 different patterns by PFGE method (P-A 7, P-B 2, P-C 2, P-D 6 isolates, P-E and P-F 1 isolate each). In an analysis of same isolates with DiversiLab system, we obtained 7 different molecular patterns (P14 6, P4 4, P12 4, P15 2 isolates and P2, P3 ve P11 1 isolate each).

With 29 isolates belonging to the year 2010, we obtained 4 different paterns by PFGE method (P-A 18, P-B 8, P-C 2 isolates and P-D 1 isolate). In an analysis of isolates belonging to 2010, rep-PCR DiversiLab system differentiated 13 different molecular patterns. Of these patterns 21 isolates were belonged to 5 clusters and the rest 8 isolates had a different pattern each (P1 8, P2 6, P3 2, P4 3, P5 2 isolates and P6-P13 1 isolate for each).

DiversiLab system which we obtained a result in a shorter time than PFGE method, has resulted in more pattern formation according to pattern clustering.

Keyword: MDR, *Acinetobacter baumannii*, PFGE, rep-PCR, DiversiLab

KAYNAKLAR

1. A. J. Grisold, G. Zarfel, V. Stenger, G. Feierl, E. Leitner, L. Masoud, M. Hoenigl, R.B. Raggam, V. Dosch, E. Marth. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J. Infection* 2010; 60: 44-51.
2. Nan-Yao Lee, Tsung Chain Chang, Chi Jung Wu, Chia-Ming Chang, Hsin-Chun Lee, Po-Lin Chen, Ching-Chi Lee, Nai-Ying Ko, Wen-Chien Ko. Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia. *J. Infection* 2010; 61: 219-227.
3. M. Ayan, R. Durmaz, E. Aktaş, B. Durmaz. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J. Hosp. Infect.* 2003; 54: 39-45.
4. R. Smolyakov, A. Borer, K. Riesenber, F. Schlaeffer, M. Alkan, A. Porath, D. Rimar, Y. Almong, J. Gilad. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *J. Hosp. Infect.* 2003; 54: 32-38.
5. M. Catalano, L. S. Quelle, P. E. Jeric, A. Di Martino, S.M. Maimone. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. *J. Hosp. Infect.* 1999; 42: 27-35.
6. J. Rodriguez-Bano, L. Garcia, E. Ramirez, L.M. Martinez, M.A. Muniain, F. F. Cuenca, M. Beltran, J. Galvez, J. M. Rodriguez, C. Velasco, A. Endimiani. Long-term control of hospital-wide, endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive "bundle" approach. *Am. J. Infect. Control* 2009; 37: 715-22.
7. J. Berlau, H.M. Aucken, E. Houang, T. L. Pitt. Isolation of *Acinetobacter* spp including *A.baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* 1999; 42: 201-204.
8. Sivaprakash Ratthina, Yana Zavros, Juanita L. Merchant. *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis. *Microbes and Infection* 2003; 5: 651-657.
9. David L. Paterson. The epidemiological profile of infections with multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 2006;43:S43-8.
10. Seifert H., L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg, M. Vaneechoutte. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: Comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* Nov 1997; Vol.35, No.11 p: 2819-25.
11. M.J. Struelens, E. Carlier, N. Maes, E. Serruys, W.G. V. Quint, A.V. Belkum. Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J. Hosp. Infect.* 1993; 25: 15-32.
12. E. Bergogne-Berezin, K. J. Towner. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* Apr 1996; Vol. 9, No. 2, p:148-165.
13. E. Bergogne Berezin, M.L. Joly Guillou. Hospital infection with *Acinetobacter* spp: an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* Jun. 1991; Suppl. A. P: 250-255.

14. Dror Marchaim, Shiri Navon-Venezia, D. Schwartz, J. Tarabeia, I. Fefer, M. J. Schwaber, Y. Carmeli. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. May 2007; vol.45, No. 5, p:1551-55.
15. M. Van Looveren, H. Goossens, ARPAC steering group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10: 684-704.
16. Aharon Abbo, S.Navon-Venezia, O. Hammer-Muntz, T. Krichali, Y.S. Igra, Y. Carmeli. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Emerging Infectious Diseases Jan 2005;Vol. 11, No.1, p: 22-29.
17. Mark D. Adams, K. Goglin, N. Molyneaux, K.M.Hujer, H. Lavender, J. J. Jamison, I. MacDonald, K. M. Martin, T. Russo, A.A. Campagnari, A.M. Hujer, R.A. Bonomo, S.R.Gill. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. Dec 2008; Vol. 190, No. 24, p:8053-64.
18. Shawn R. Lockhart, M.A. Abramson, S. E. Beekmann, G. Gallagher, S. Riedel, D.J. Diekema, J. P. Quinn, G.V. Doern. Antimicrobial Resistance among gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. J. Clin. Microbiol. Oct 2007; Vol. 45, No. 10, p: 3352-59.
19. Emel Sesli Çetin, R. Durmaz, T. Tetik, B.Otlu, S. Kaya, A. Çalışkan. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. Am. J. Infect. Control. 2008; Vol.37, No.1, p:56-64.
20. D. M: Lozano, J. M. Cisneros, B. Becerril, L. Cuberos, T. Prados, C. O. Leyba, E. Canas, J. Pachon. Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. J. Clin. Microbiol. Dec. 2002; Vol. 40, No. 12, p: 4571-4575.
21. Mimi Healy, J. Huong, T. Bittner, M. Lising, S. Frye, S. Raza, R. Schrock, J. Manry, A. Renwick, R.Nieto, C. Woods, J. Versalovic, J. R. Lupski. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence based PCR. J. Clin. Microbiol. Jan 2005; Vol. 43, No. 1, p:199-207.
22. Tenover C. Fred, R.D. Arbeit, R.V.Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. Sept 1995; Vol. 33, No. 9, p: 2233-39.
23. A.Davis Margaret, D.D. Hancock, T. E. Besser, D. R. Call. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. J. Clin. Microbiol. May 2003; Vol. 41, No. 5, p: 1843-1849.
24. K.J. Towner. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J. Hosp. Infect. 2009; 73: 355-363.
25. Sverre Dick Henriksen. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. J. Bacteriol. Rev. Dec.1973; Vol. 37, No. 4, p: 522-561.
26. Rudolph Hugh, Robert Reese. Designation of the type strain for *Bacterium Anitratum* Schaub and Hauber. Int. J. Syst. Bacteriol. July 1967; Vol. 17, No. 3, p: 245-254.

27. J.Z. Montgomerie, M. J. Pickett, R. N. Yoshimori, A.W. Chow, L.B.Guze. Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* (Herellea vaginicola) to minocycline. *Antimic. Agent. Che.* July 1976; Vol. 10, No. 1, p:102-105.
28. J. Brodie, A. Henderson. *Mima polymorpha* infection. *J. Clin. Path.* 1963; 16: 49-52.
29. P.T. Bray, J.C. Cruickshank. Meningitis due to *Diplococcus mucosus*. *British Medical Journal* May 1943; 15: 601-602.
30. Ben Benjamin. *Diplococcus mucosus* (Lingelsheim) septicaemia in an infant. *Canad. M. A. J.* Nov. 1950, Vol. 63, p: 496-498.
31. Wolfgang Stenzel, Walter Mannheim. On the classification and nomenclature of some nonmotile and coccoid diplobacteria, exhibiting the properties of *Achromobacteriaceae*. *Int. Bull. Bacteriol. Nom. Tax.* Oct. 1963; Vol. 13, No. 4, p:195-200.
32. D.J.B. Ashley, W. Kwantes. Four cases of human infection with *Achromobacter anitratus*. *J. Clin. Path.* 1961;14: 670-673.
33. Anton Y. Peleg, Harald Seifert, David L. Paterson. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* July 2008; Vol. 21, No. 3, p:538-582.
34. P. Baumann, M. Doudoroff, R.Y. Stainer. A study of the *Moraxella* group II oxidative negative species (Genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* May. 1968; Vol. 95, No. 5, p:1520-1541.
35. Lessel E.F. International committee on nomenclature of bacteria subcommittee on the taxonomy of *Moraxella* and allied bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Apr. 1971; Vol. 21, No. 2, p: 213-214.
36. Philippe J.M. Bouvet, Patrick A.D. Grimont. 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 descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Apr. 1986; Vol. 36, No. 2, p: 228-240.
37. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Ed. Winn Jr. Washington, Stephen Allen, William Janda, Elmer Koneman, Gary Procop, Paul Schreckenberger, Gail Woods. Lippincott Williams Wilkins Pres. 2006; p: 349-359.
38. R. Rossau, A.V. Landschoot, M. Gillis, J. D. Ley. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov. a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Apr. 1991; Vol. 41, No. 2, p: 310-319.
39. Bailey Scott's *Diagnostic Microbiology*. Betty a. Forbes, Daniel F. Sahn, Alice S. Weissfeld. Mosby Elsevier 12th.Ed. p: 334-339.
40. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Prof.Dr. Hakkı Bilgehan. Barış Yayınları 4. Baskı. 2004; s: 471-472.
41. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Bölüm 15, Miscellaneous (Çeşitli) Gram Negatif Bakteriler. Devran Gerçeker. Editör: Prof.dr. Şemsettin Ustaçelebi. 1999 Güneş Kitabevi, s: 541-550.
42. Jane Hata. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. Academic Press Inc. 2010 1 st Ed. Chapter 26 p: 313-326.

43. Peter Gerner Smidt, Ingela Tjernberg, Jan Ursing. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J.Clin. Microbiol. Feb. 1991; Vol. 29, No. 2, p: 277-282.
44. Helen Giamarellou, Anastasia Antoniadou, Kyriaki Kanellakopoulou. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? Int. J. Antmic. Ag. 2008; 32: 106-119.
45. Yu-Chung Chuang, W.H. Sheng, S. Y. Li, Y.C. Lin, J. T. Wang, Y.C. Chen, S.C. Chang. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. Clin. Infect. Dis. 2011; 52 (3): 352-360.
46. Samuel A. Shelburne III, K. V. Singh, A.C. White Jr., L. Byrne, A. Carmer, C.Austin, E. Graviss, C. Stager, B.E. Murray, R.L. Atmar. Sequential outbreaks of infections by distinct *Acinetobacter baumannii* strains in a public teaching hospital in Houston, Texas. J. Clin. Microbiol. Jan. 2008; Vol. 46, No. 1, p: 198-205.
47. M. M. Wroblewska, L. Dijkshoorn, H. Marchel, M. V. D. Barselaar, E. S. Kopec, P. J. V. Broek, M. Luczak. Outbreak of nosocomial meningitidis caused by *Acinetobacter baumannii* in neurosurgical patients. J. Hosp. Infect. 2004; 57: 300-307.
48. Manual of Clinical Microbiology. 9th Ed. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Lousie Landry, Michael A. Pfaller. ASM Pres 2007; p: 770-774.
49. A. Jawad, P. M. Hawkey, J. Heritage, A. M. Snelling. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp and comparison with Herellea Agar and Holton's Agar. J. Clin. Microbiol. Oct. 1994; Vol. 32, No. 10, p: 2353-58.
50. J. Berlau, H. M. Aucken, E. Houang, T. L. Pitt. Isolation of *Acinetobacter* spp including *A.baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. J. Hosp. Infect. 1999; 42: 201-204.
51. Pierre Edouard Fournier, Herve Richet. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin. Infect. Dis. 2006; 42: 692-699.
52. Helke V. Dessel, L. Dijkshoorn, T. V.D. Reijden, Nancy Bakker, A. Paauw, P.V.D. Broek, J. Verhoef, S. Brisse. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. Research In Microbiology. 2004; 155: 105-112.
53. Peter Gerner Smidt. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. J. Clin. Microbiol. Oct. 1992; Vol. 30, No. 10, p: 2680-85.
54. J. Coelho, N. Woodford, J. Turton, D. M. Livermore. Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? J. Hosp. Infect. 2004; 58: 167-169.
55. D. A. Noch, C. I. Birket, H.A. Ludlam. Non-fermentative gram-negative bacteria. Int. J. Antimic. Ag. 2007;29 Suppl. 3, p: 33-41.
56. Anna M. Ferrara. Potentially multidrug-resistant non-fermentative gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. Int. J. Antimic. Ag. 2006; 27: 183-195.
57. Ioannis k. Neonakis, Demetrios A. Apandidos, Efthimia petinaki. Confronting multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. Int. J. Antimic. Ag. 2011; 37: 102-109.

58. Michele Iacono, L. Villa, D. Fortini, R. Bordoni, F. Imperi, R. J. P. Bonnal, T. S. Ponten, G. D. Bellis, P. Visca, A. Cassone, A. Carattoli. Whole genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *J. Antimic. Ag. Chem.* July 2008; Vol. 52, No. 7, p: 2616-2625.
59. Virginia Post, Ruth M Hall. AbaR5, a large multiple antibiotic resistance region found in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimic. Ag. Chem.* June 2009; Vol. 53, No. 6, p: 2667-2671.
60. Claire Heritier, L. Poirel, P.E. Fournier, J. M. Claverie, D. Raoult, P. Nordmann. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimic. Ag. Chem.* Oct. 2005; Vol. 49, No. 10, p: 4174-79.
61. L.Poirel, P. Nordmann. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, 12. 826-836.
62. Nicola C. Gordon, David W. Wareham. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimic. Ag.* 2010; 35: 219-226.
63. R. J. Seward, T. Lambert, K.J. Towner. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J. Med. Microbiol.* 1998; 47: 455-462.
64. Alexadr Nemeč, L. Dolzani, S. Brisse, P. V. D. Broek, L. Dijkshoorn. Diversity of aminoglycoside resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53: 1233-1240.
65. Maria del Mar Tomas, Alejandro Beceiro, Astrid Perez, David Velasco, Rita Moure, Rosa Villanueva, Jesus M. Beltran, German Bou. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33-to 36 kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimic. Ag. Chem.* Dec 2005; Vol. 49, No. 12, p: 5172-5175.
66. Isabelle Marchand, L. D. Piolle, P. Courvalin, T. Lambert. Expression of the RND-Type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two component system. *J. Antimic. Ag. Chem.* Sept.2004; Vol. 48, No. 9, p: 3298-3304.
67. Laurence D. Piolle, S. Magnet, S. Bremont, T. Lambert, P. Courvalin. AdeIJK a resistance nodulation cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimic. Ag. Chem.* Feb. 2008; Vol. 52, No. 2, p: 557-562.
68. Xian-Zhong Su, J. Chen, T. Mizushima, T. Kuroda, T. Tsuchiya. AbeM an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *J. Antimic. Ag. Chem.* Oct 2005; Vol. 49, No. 10, p: 4362-4364.
69. Vijaya B. Srinivasan, G. Rajamohan, W.A Gebreyes. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimic. Ag. Chem.* Dec 2009; Vol.53, No.12, p: 5312-5316.
70. Ralf Rene Reinert, D. E. Low, F. Rossi, X. Zhang, C. Wattal, M.J. Dowzicky. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the *in vitro* activity of tigecycline. *J. Antimic. Chem.* 2007; 60: 1018-1029.

71. A.C. Gales, R. N. Jones, H.S. Sader. Global assesment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54731 clinical isoolates of gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). Clin. Microbial. Infect. 2006; 12: 315-321.
72. Caroline J. Henwood, T. Gatward, M.Warner, D. James, M. W. Stockdale, R. P. Spence, K.J. Towner, D. M. Livermore, N. Woodford. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and in vitro evaluation of tigecycline (GAR-936). J. Antimic. Chem. 2002; 49: 479-487.
73. Jose M. Cisneros, M. J. Reyes, J. Pachon, B.Becerril, F. J. Caballero, J. L. Garmendi, C. Ortiz, A. R. Cobacho. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. Clin. Infect. Dis. Jun. 1996; Vol. 22, No. 6, p: 1026-1032.
74. G. Christopher Wood, S.D. Hanes, M.A: Croce, T. C. Fabian, B.A. Boucher. Comparison of Ampicillin-sulbactam and Imipenem-cilastatin for the treatment of *Acinetobacter venilator* associated pneumonia. J. Clin. Infect. Dis. June 2002; Vol. 34, No. 11, p: 1425-1430.
75. Drosos E. Karageorgopoulos, T. Keledis, Iosif kelesidis, M.E. Falagas. Tigecycline for the treatment of multi-drug resistant (including carbapenem resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. J. Antimic. Chem. 2008; 62: 45-55.
76. Drosos E. Karageorgopoulos, M. E. Falagas. Current control and treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Lancet Infect. Dis. Dec 2008; 8: 751-62.
77. Mireia Saballs, M. Pujol, F. Tubau, C. Pena, A. Montero, M. A. Dominguez, F. Gudiol, J. Ariza. Rifampicin/imipenem combination in the treatmant of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. J. Antimic. Chem. 2006; 58: 697-700.
78. M. Wolff, M.L. J. Guillou, R. Farinotti, C. Carbon. In vivo efficacies of combinations of β -Lactams, β -Lactamase inhibitors, and rifampin against *Acinetobacter baumannii* in a Mouse pneumonia model. J. Antimic. Ag. Chem. June 1999; Vol. 43, No. 6, p: 1406-1411.
79. Yeşim Taşova. Etkenler nasıl değişti? Elimizde ne kaldı? ANKEM Derg. 2009; 23 (Ek-2): 25-36.
80. M. E. Falagas, P. Kopterides. Risk factors for the isolation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. J. Hosp. Infect. 2006; 64: 7-15.
81. Philip J. Turner. Extended Spectrum β -Lactamases. Clin. Infect. Dis. 2005; 41: 273-275.
82. Murat Dizbay, Özur Çağlar, Dilek Arman. Ventilatör ilişkili pnömoni etkeni çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında sefoperazon-sulbaktam ile netilmisin kombinasyonunun in vitro sinerjistik etkisi. ANKEM Derg. 2008; 22 (1): 28-31.
83. Solmaz Çelebi, Mustafa Hacımustafaoğlu, Necla Yüce, Zuhale Karalı, Yahya Gül, Deniz Çakır, Suna Gedikoğlu. Çocuklarda *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarında risk faktörleri ve klinik sonuçları: Beş yıllık çalışma. Çocuk Enf. Derg. 2010; 4: 15-20.
84. P. E. Fournier, H. Richet. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. J. Clin. Infect. Dis. 2006;42: 692-699.
85. G. Da Silva, L. Dijkshoorn, T. Van der Reijden, B. Van Strijen, A. Duarte. Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. Clin Microbiol. Infect. 2007; 13: 190-195.

86. J. F. Turton, J. Shah, C. Ozongwu, R. Pike. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A.baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J. Clin. Microbiol.* Apr. 2010; Vol. 48, No. 4, p: 1445-1449.
87. Juliana M. Coelho, J. F. Turton, M. E. Kaufmann, J. Glover, N. Woodford, M. Warner, M. F. Palepou, R. Pike, T. L. Pitt, B. C. Patel, D. M. Livermore. Occurrence of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J. Clin. Microbiol.* Oct. 2006; Vol. 44, No. 10, p: 3623-3627.
88. Serhat Ünal, Jose angel Garcia Rodriguez. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp isolated in the MYSTIC program 2002-2004. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 53: 265-271.
89. Garcia Garmendia, C.O. Leyba, J. G. Montero, F. J. Jimenez, C. Perez Paridez, A. E. Barrero Almodovar, M. G. Miner. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: 939-946.
90. M. L. Joly Guillou. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *J. Clin. Microbiol. Infect.* 2005; 11: 868-873.
91. S.J. Wilson, C. J. Knipe, J. Zieger, K. M. Gabehart, J.E. Goodman, H.M. Volk, R. Sood. Direct costs of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. *Am. J. Infect. Control* 2004; 32: 342-344.
92. J.Rodriguez Bano, J. M. Cisneros, F. Fernandez Cuenca. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2004; 25: 819-824.
93. L.C. McDonald, S.N. Banerjee, W.R. Jarvis. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987- 1996. Nosocomial infections Surveillance System. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 29: 1133-1137.
94. H. Wisplinghoff, M.B. Edmond, M.A. Pfaller, R.N. Jones, R.P. Wenzel, H. Seifert. Nosocomial blood stream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 31: 690- 697.
95. Mehmet Balcı, Mehmet Bitirgen, Bahar Kandemir, Emel Türk Arıbaş, İbrahim Erayman. Nosokomiyal *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılığı. *ANKEM Derg.* 2010; 24 (1): 28-33.
96. J. M. Cisneros, J. R. Bano. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002; Vol. 8, No. 11, p: 687-693.
97. C.M. Beck Sague, W.R. Jarvis, J.H. Brook. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *Am. J. Epidemiol.* 1990; 132: 723-733.
98. H.Seifert, A. Strate, G. Pulverer. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* Clinical features, epidemiology and predictors of mortality. *Medicine* 1995; 74: 340-349.
99. R.Gaynes, J.R. Edwards. Overview of nosocomial infections caused by gram negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41: 848- 854.
100. Osman Aktaş, Recep Keşli, Halil Yazgı. Eksternal ventriküler drenaj sistemiyle ilişkili *Acinetobacter baumannii* menenjitisi. *AÜTD* 2000; 32: 127-129.

101. Mehmet Özdemir, İbrahim Erayman, N. Seval Gündem, Mahmut Baykan, Bülent Baysal. Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. ANKEM Derg. 2009; 23 (3): 127-132.
102. David M. Livermore, Neil Woodford. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. TRENDS in Microbiology. 2006; Vol. 14, No. 9, p: 413-420.
103. E.N.Johnson, T.C. Burns, R.A. Hayda, D.R. Hospenthal, C.K. Murray. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. Clin. Infect. Dis. 2007; 45: 409-415.
104. C.K. Murray, S.A. Roop, D.R. Hospenthal, D.P. Dooley, K.Wenner, J. Hammock, N. Taufen, E. Gourdine. Bacteriology of war wounds at the time of injury. Mil.Med. 2006; 171: 826-829.
105. K.Petersen, M.S. riddle, J.R. Danko, D.L. Blazes, R. Hayden, S.A. Tasker, J.R. Dunne. Trauma related infections in battle field casualties from Iraq. Ann. Surg. 2007; 245: 803-811.
106. P. Janssen, R. Coopman, G. Huys, J. Swing, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau, K.Kerstens. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology 1996; 142: 1881-1893.
107. S.G. Bartual, H. Seifert, C.Hppler, M.A. Luzon, H. Wisplinghoff, F. R: Valera. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 4382- 4390.
108. Lenie Dijkshoorn, Hazel M. Aucken, P.Gerner Smidt, M. E. Kaufmann, J. Ursing, T. L. Pitt. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. J. Clin. Microbiol. Mar. 1993; Vol. 31, No.3, p: 702-705.
109. M. Alexander, M. Rahman, M. Taylor, W.C. Noble. A study of the value of electrophoretic and other techniques for typing *Acinetobacter-calcoaceticus*. J. Hosp. Infect. 1988; 12: 273-287.
110. P. Gerner Smidt. Frequency of plasmids in strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Hosp. Infect. 1989; 14: 23-28.
111. A. Kropec, J. Hübner, F.D. Daschner. Comparison of three typing methods in hospital outbreaks of *Acinetobacter calcoaceticus* infection. J. Hosp. Infect. 1993; 23: 133-141.
112. J. Vila, M. Almela, M.T. J. Anta. Laboratory investigation of hospital outbreak caused by two different multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratu*s strains. J. Clin. Microbiol. 1989; 27: 1086-1089.
113. P. Gerner Smidt, I. Tjernberg. *Acinetobacter* in Denmark. II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1993; 101: 826-832.
114. Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamaları. Bölüm 15, Pulsed Field Gel Electrophoresis. Richard V. Goering, Çeviri Editörleri: Alper Tekeli, Şemsettin Ustaçelebi. Palme Yayıncılık 2006, s: 185-196.
115. Lisa L. Maragakis, T. M. Perl. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. Clin. Infect. Dis. 2008; 46: 1254-1263.
116. Esin Hacıoğlu Basım, Hüseyin Basım. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and it's use in molecular biology. Turk. J. Biol. 2005; 25: 405-418.

117. Aparajita Singh, Richard V. Goering, Shabbir Simjee, Steven L. Foley, M. J. Zervos. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *J. Clin. Microbiol. Rev.* July 2006; Vol. 19, No. 3, p: 512-530.
118. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Editör: Prof.Dr. Rıza Durmaz. Pulsed Field Gel Electrophoresis. Bengül Durmaz, Rıza Durmaz. 2001 Nobel Tıp Kitapevleri Ltd.Şti. 2.Baskı s: 161-168.
119. James Versalovic, Vivek Kapur, Edward O. Mason, Uma Shah, Thearith Koeuth, James R. Lupski, James M. Musser. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: Identification and molecular characterization of multiple clones. *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 850-856.
120. James Versalovic, Thearith Koeuth, James R. Lupski. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 1991; Vol. 19, No. 24, p: 6823-6831.
121. <http://www.biomerieux.com.tr/servlet/srt/bio/turkey>
122. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. 2010 M100-S20 Vol. 30, No. 1, p:54-55
123. J. Versalovic, J.R. Lupski. Molecular detection and genotyping of pathogens, more accurate and rapid answers. *Trends microbiol.* 2002; 10 (Suppl.): 15-21.
124. İştar Dolapçı, Zeynep Ceren Karahan, İpek Mumcuoğlu, Ebru Us, Derya Çöloğlu, Mehtap Ulusoy, Alper Tekeli. Klinik örneklerden izole edilen karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında sınıf 1 integron taşıyıcılığının araştırılması. *Mikrobiyol. Bul.* 2010; 44: 547-552.
125. A.J. Grisold, G. Zarfel, V. Strenger, G. Feierl, E. Leitner, L. Masoud, M. Hoenigl, R.B. Raggam, V. Dosch, E. Marth. Use of automated repetitive sequence based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J. Infect.* 2010; 60: 44-51.
126. H. Wisplinghoff, R. Schmitt, A. Wöhrmann, D. Stefanik, H. Seifert. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Hosp. Infect.* 2007; 66: 174-181.
127. A. Jawad, H. Seifert, A. M. Snelling, J. Heritage, P. M. Hawkey. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* July 1998, Vol. 36, No. 7, p: 1938-1941.
128. www.cdc.gov
129. M.B. Marques, K.B. Waites, J.E. Mangino, B.B. Hines, S.A. Moser. Genotypic investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a medical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 1997; 37: 125-135.
130. Harald Seifert, Lucilla Dolzani, Raffaella Bressan, T.V. Reijden, B.V. Strijen, D. Stefanik, H. Heersma, L. Dijkshoorn. Standardization and interlaboratory reproducibility assesment of Pulsed Field Gel Electrophoresis generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* Sept. 2005; Vol. 43, No. 9, p: 4328-4335.
131. Marco Ligozzi, Roberta Fontana, Marco Aldegheri, Giovanna Scalet, Giuliana Lo Cascio. Comparative evaluation of an automated repetitive sequence based PCR instrument versus pulsed field gel electrophoresis in the setting of a *Serratia marcescens* nosocomial infection outbreak. *J. Clin. Microbiol.* May 2010; Vol. 48, No. 5, p: 1690-1695.

132. H.Seifert, A. Schulze, R.Baginski, G. Pulverer. Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. July 1994; Vol. 32, No. 7, p: 1816-1819.
133. Edoardo Carretto, D. Barbarini, C. Farina, A. Grossini, P. Nicoletti, E. Manso. Use of the DiversiLab semiautomated repetitive sequence based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on *Acinetobacter baumannii* isolates in different Italian hospitals. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2008; 60: 1-7.
134. Alma Brolund, S. Haeggman, P. J. Edquist, L. Gezelius, B. O. Liljequist, K.T. Wisell, C.G. Giske. The DiversiLab system versus pulsed field gel electrophoresis: characterisation of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.
135. Ren ete Witt, Vikash Kanhai, Willem B. V. Leeuwen. Comparison of the DiversiLab system, pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. J. Microbiological Methods. 2009; 77: 130-133.
136. Z. Q. Yan, D. X Shen, J. R. Cao, R. Chen, X.Wei, L. P. Liu, X. L. Xu. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. Int. J. Antimic. Ag. 2010; 35: 269-273.
137. Csilla Ratkai, L.V. Peixe, F. Grosso, A. R. Freitas, P. Antunes, E. Fodor, E. Hadju, E. Nagy. Successful application of the DiversiLab repetitive sequence based PCR typing system for confirmation of the circulation of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital wards. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 2010; 67: 202-206.
138. S.Saeed, M.G Fakih, K. Reiderer, A.R.Shah, R.Khaatib. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Repetitive Sequence Based Polymerase Chain reaction. Infection Control and Hospital Epidemiology. Sept. 2006; Vol: 27, No: 9, p: 981-983.
139. M.Ayan, R.Durmaz, E.Aktaş, B.Durmaz. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. J. Hosp. Infect. 2003; 54, p: 39-45.
140. Xavier Corbella, Abelardo Montero, Miquel Pujol, Angeles Dominguez, Josefina Ayats, M. Jose argerich, Frederic Garrigosa, Javier Ariza, Francesc Gudiol. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *A.baumannii*. J. Clin. Microbiol. Nov. 2000; Vol: 38, No:11, p: 4086-95.