

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON YOĞUN BAKIM ÜNİTESİ'NDE
YATAN HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *Acinetobacter* KÖKENLERİNİN
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Uğur DİNÇ

TRABZON-2008

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON YOĞUN BAKIM ÜNİTESİ'NDE
YATAN HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *Acinetobacter* KÖKENLERİNİN
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Uğur DİNÇ

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr.Gülçin BAYRAMOĞLU

TRABZON-2008

Desteğini sürekli arkamda hissettiğim
Sevgili eşim Feran'a
ve biricik kızım
Ekin Su'ya

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Yrd.Doç.Dr.Gülçin BAYRAMOĞLU'na, bölüm başkanım Prof.Dr.Murat ERTÜRK'e ve hocalarım Doç.Dr.Faruk AYDIN, Doç.Dr.Neşe KAKLIKKAYA, Doç.Dr.İlknur TOSUN ve Yrd.Doç.Dr. C. Kurtuluş BURUK'a, yaptığım testler sırasında sürekli yanımda olan ve neredeyse benim kadar yorulan dostum Yeşim BEŞLİ'ye ve eğitimim boyunca birlikte çalıştığım diğer arkadaşlarım Altan AKINEDEN, Hikmet ÖZTEL OCAK, Esra GÖVCE, Ruşen DEDE, Zeynep AKYÜZ, Gülsün ÖZKUL, Tuba KÖSE, Mehdi GHASEMİ ve Nejla CEBECİ GÜLER'e ve anne sıcaklığı ve sevecenliğiyle dolu Zehra CIRAV başta olmak üzere tüm Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Dr. Uğur DİNÇ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Hastane Enfeksiyonları	3
2.2. <i>Acinetobacter</i> Kökenlerinin Genel Özellikleri	3
2.2.1. Tarihçe	3
2.2.2. Morfolojik, Kültürel ve Metabolik Özellikleri	4
2.2.3. Klinik Önemi Olan Türler	5
2.2.4. Klinik Örneklerden İzolasyon	5
2.2.5. <i>Acinetobacter</i> Türlerinin Sınıflandırılması	6
2.2.6. <i>Acinetobacter</i> Kökenleriyle Oluşan Hastane Kaynaklı Enfeksiyonlar	6
2.2.6.1. Solunum Yolu Enfeksiyonları	7
2.2.6.2. Bakteriyemi	8
2.2.6.3. Menenjit	8
2.2.6.4. İdrar Yolu Enfeksiyonu (İYE)	9
2.2.6.5. Yumuşak Doku Enfeksiyonları	9
2.2.6.6. Diğer Enfeksiyonlar	9
2.2.7. <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonlarının Patogenezi	10
2.2.8. <i>Acinetobacter</i> Kökenlerinin Virülansı	10
2.2.9. Epidemiyoloji	11
2.2.9.1. İnsanlardaki Taşıyıcılığı	11
2.2.9.2. Hastane Ortamındaki Muhtemel Kaynakları	11
2.2.10. Klinik Antibiyotik Direnci	11
2.2.11. Çoklu Antibiyotik Direnci:	12
2.2.12. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları	12
2.2.12.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	13
2.2.12.1.1. Beta-laktamaz Üretimi	13
2.2.12.1.1.1. Kromozomal Beta-laktamazlar	13
2.2.12.1.1.2. Plazmid Aracılığı ile Sentezlenen Beta-laktamazlar	14

2.2.12.1.2. β -laktam Antibiyotiğin Hücre İçine Girişinin Azalması	14
2.2.12.1.3. Penisilin Bağlayan Proteinlerde Değişiklik	14
2.2.12.2. Aminoglikozidlere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları	14
2.2.12.3. Kinolonlara Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları	15
2.2.12.4. Tetrasiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları	16
2.2.12.5. Diğer Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları	16
2.2.13. <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi	16
2.2.14. Tiplendirme Yöntemleri	17
2.2.14.1. Fenotipik Yöntemler	18
2.2.14.1.1. Antibiyotiplendirme	18
2.2.14.1.2. Serotiplendirme	19
2.2.14.1.3. Biyotiplendirme	19
2.2.14.1.4. Bakteriyofaj Tiplendirme	19
2.2.14.1.5. Bakteriosin Tiplendirme	19
2.2.14.2. Moleküler Yöntemler	20
2.2.15. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)	20
2.2.15.1. PFGE’de Kullanılan Kontroller	24
2.2.15.2. PFGE’ni Etkileyen Faktörler	24
2.2.15.3. Restriksiyon Profillerinin Analizi	25
2.2.15.4. Epidemiyolojik Yorum	25
2.2.15.4.1. Aynı İzolat	25
2.2.15.4.2. Yakın İlişkili İzolat	25
2.2.15.4.3. Muhtemel İlişkili İzolat	25
2.2.15.4.4. İlişkisiz İzolat	26
2.2.15.5. Genetik Değişikliklerin PFGE Profillerine Etkisi	26
2.2.15.6. PFGE Analizinde Sık Rastlanılan Problemler	27
2.2.15.7. Sonuçların Rapor Edilmesi	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Çalışma Grubu	28
3.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	28
3.3. %2’lik Düşük Erime Isılı Agaroz Hazırlanması	30
3.4. Elektroforez Jelinin Hazırlanması	31
3.5. Suşların İdentifikasyonu	31

3.6. Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE) Protokolü	32
3.6.1. İzolatların Hazırlanması	32
3.6.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi	32
3.6.3. Agar İçerisindeki Hücrelerin Parçalanması	33
3.6.4. <i>Agaroz Kalıpların Yıkanması</i>	33
3.6.5. DNA'nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi	33
3.6.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması	34
3.6.7. Elektroforez	34
3.6.8. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi	35
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	62
7. ÖZET	
8. SUMMARY	
9. KAYNAKLAR	

TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 1:	<i>Acinetobacter</i> spp. ve <i>Neisseriaceae</i> ailesi üyelerinin karakteristik özellikleri	4
Tablo 2:	Tjernberg ve Ursing'in yaptığı numaralandırma şemasında yer alan ve resmi tür ismi verilmiş <i>Acinetobacter</i> kökenleri	6
Tablo 3:	<i>Acinetobacter</i> enfeksiyonlarını kolaylaştıran risk faktörleri	10
Tablo 4:	<i>Acinetobacter</i> kökenlerinde bulunan beta laktamaz enzimleri	13
Tablo 5:	Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla kullanılan fenotipik ve genotipik yöntemler	18
Tablo 6:	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tipleri	20
Tablo 7:	PFGE'ni etkileyen faktörler	24
Tablo 8:	PFGE profillerini yorumlama kriterleri	25
Tablo 9:	Genetik değişikliklerin PFGE profilleri üzerindeki etkisi	26
Tablo 10:	PFGE Analizinde Sık Rastlanılan Problemler	27
Tablo 11:	Elektroforez koşulları	34
Tablo 12:	<i>Acinetobacter</i> kökenlerinin izole edildikleri materyaller ve görülme oranları	40
Tablo 13:	Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastalarda <i>A. baumannii</i> enfeksiyonu veya kolonizasyonu için potansiyel risk faktörleri	41
Tablo 14:	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesine hastaların yatırılış nedenleri	42
Tablo 15:	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinde <i>Acinetobacter</i> kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonlar	43
Tablo 16:	<i>Acinetobacter</i> kökenlerinin kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlı, orta duyarlı ve dirençli izolat sayıları	45
Tablo 17:	Antibiyotip I-VII'nin antibiyotiplendirmede kullanılan antibiyotiklere duyarlılık paternleri	46
Tablo 18:	Antibiyotip I-VII'nin iki aylık dönemler içerisindeki izolasyon sayıları	46
Tablo 19:	İki aylık dönemlerde tespit edilen klon sayıları	47
Tablo 20:	Antibiyotip I-VII'nin yedi PFGE klonu ve subgruplarındaki dağılımı	52
Tablo 21:	Çalışmaya alınan <i>Acinetobacter</i> kökenlerinin antibiyotip, PFGE ve onaltı antibiyotiğe duyarlılıkları	55

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1:	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tipleri	21
Şekil 2:	PFGE'nin yapılış aşamaları	23
Şekil 3:	Genetik değişikliklerin PFGE profilleri üzerindeki etkisi	26
Şekil 4:	Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE) akış şeması	36
Şekil 5:	PFGE için yapılması gereken ön hazırlık	37
Şekil 6:	Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE) Protokolü	39
Şekil 7:	Aylara göre hasta ve bu hastalardan izole edilen örnek sayıları	40
Şekil 8:	<i>Acinetobacter</i> kökenlerinin antibiyotik duyarlılık oranları	44
Şekil 9:	Antibiyotip I-VII'nin aylara göre dağılımı	47
Şekil 10:	A, B ve C klonlarının ve subtiplerinin aylara göre dağılımları	48
Şekil 11:	A klonunun ve subtiplerinin aylara göre dağılımları	48
Şekil 12:	B klonunun aylara göre dağılımı	49
Şekil 13:	C klonunun aylara göre dağılımı	50
Şekil 14:	Antibiyotip I-VII'nin yedi PFGE klonu ve subgruplarındaki dağılımı	52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 1: <i>Acinetobacter</i> kökenlerinin morfolojik görünümü	4
Resim 2: Kanlı agar ve Müller Hinton agardaki <i>A. baumannii</i> kolonilerinin görünümü	5
Resim 3: PFGE Analizinde Sık Rastlanılan Problemler	27
Resim 4: Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE)'inde kullanılan cihazlar	35
Resim 5: Mart-Haziran 2006 tarihleri arasında izole edilen ilk 10 örneğe ait PFGE paternleri	49
Resim 6: Şubat-Mart 2007 tarihleri arasında izole edilen on <i>Acinetobacter</i> kökenine ait PFGE paternleri	50
Resim 7: 30 Kasım-26 Aralık 2006 tarihlerinde izole edilen 12 <i>Acinetobacter</i> kökenine ait PFGE paternleri	51

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hastane enfeksiyonları hastanede kalış süresini uzatan, mortalite ve morbidite oranlarını arttıran ve tedavi maliyetlerini yükselterek ekonomik kayıplara yol açan önemli bir sağlık problemidir (1, 2, 3, 4) . Yatan hastaların %5–15’inde geliştiği ve özellikle Yoğun Bakım Üniteleri (YBÜ)’nde 5-10 kat fazla görüldüğü bildirilmiştir (5, 6, 7, 8). Ülkemizde ise sürveyans çalışması yapılan hastanelerin Yoğun Bakım Ünitelerinde hastane enfeksiyonu görülme oranı %12,5-88,9 arasında değişmektedir (3, 9, 10). Hastane enfeksiyonlarının oluşumu uygun enfeksiyon kontrol programlarının uygulanmasıyla yaklaşık %30 önlenebilmekte, böylece tedavi maliyeti düşürülebilmektedir (1, 2, 3, 11).

Acinetobacter kökenleri kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH değerlerinde yaşayabilmeleri ve antibiyotiklere karşı çoğul direnç geliştirmeleri nedeniyle önemli hastane enfeksiyonu etkenleridir (12, 13, 14, 15). Deri, ağız boşluğu, solunum yolları ve sindirim kanalında kolonize olabilirler (4, 12, 13). Sağlıklı bireylerin en az %25’inde derinin koltuk altı, kasık, parmak uçları gibi nemli bölgelerinde normal bakteriyel floranın bir üyesi olarak bulunurlar ve salgın dönemlerinde hastaların normal florasında görülme sıklıkları artar (4, 5, 12, 13).

Yoğun Bakım Ünitelerine yatırılan hastalarda %12.4-14 gibi yüksek oranlarda *Acinetobacter* enfeksiyonu geliştiği ve bunların % 66.7’sinin epidemiyolojik çalışmalarla önlenebilir enfeksiyonlar olduğu bildirilmiştir (7, 16). En sık alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olurlar. Birçok çalışmada ventilatörle ilişkili pnömoni ve kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık nedeni oldukları gösterilmiştir (3, 17). İdrar yolu enfeksiyonu, merkezi sinir sistemi ve yumuşak doku enfeksiyonları diğer sık görülen enfeksiyonlarıdır (12). *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar ise son derece nadir olarak rapor edilmektedir (18).

Solunum yollarında *Acinetobacter* kökenlerinin kolonize olduğu hastalara uygulanan mekanik ventilasyon sırasında kullanılan ekipmanların kontaminasyonu salgınların en önemli nedenidir (12, 19). Hastalarda salgın sırasında sıklıkla deri kolonizasyonu da bulunmakta ve bu hastalarla temas eden hastane personelinin elleri salgının yayılımı ve devamında önemli rol oynamaktadır (4, 20). Salgın kaynağı olarak sindirim sistemi kolonizasyonu da nadiren etken olabilmektedir (12).

Tiplendirme metodları epidemik kökenlerin yayılımının kaynağını ve şeklini saptamada önemli bir araçtır. Moleküler tiplendirme *Acinetobacter* türlerinin epidemiyolojik çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli moleküler tiplendirme metodları olmasına rağmen bunlar arasında Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) altın standart kabul edilmektedir (21).

Çalışmamızda Mart 2006-Temmuz 2007 tarihleri arasında hastanemiz Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi'nden Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen örneklerden izole edilen *Acinetobacter* kökenleri arasındaki klonal ilişkinin PFGE kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Hastane Enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonları "hastanın yatışı sırasında kuluçka döneminde olmayan, hastane ortamında gelişen veya kuluçka dönemindeyken taburcu edilen hastalarda daha sonra ortaya çıkan enfeksiyonlar" olarak tanımlanmaktadır (9, 22, 23, 24). Hastaneye yatırılan hastaların yaklaşık %5–15’inde hastane kaynaklı enfeksiyon gelişmektedir (5). Yoğun Bakım Ünitelerinde diğer servislere oranla 5-10 kat daha sık meydana gelmekte ve tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların %20-25’i Yoğun Bakım Ünitelerinde gelişmektedir (5, 6, 7, 25). Türkiye’de Yoğun Bakım Birimlerine yatırılan hastaların % 12,5–88,9’unda hastane kaynaklı bir enfeksiyon geliştiği gösterilmiştir (3).

2.2. *Acinetobacter* Kökenlerinin Genel Özellikleri

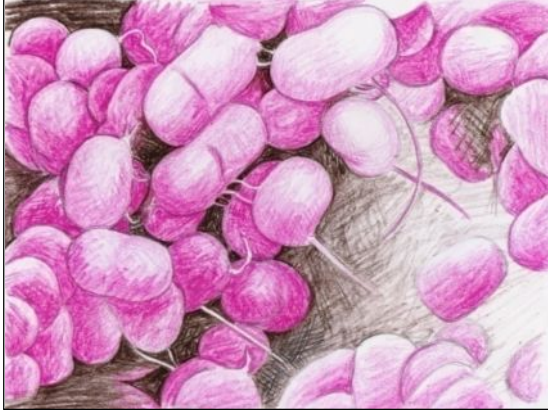
2.2.1. Tarihçe

İlk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından topraktan izole edilen ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak isimlendirilen bu bakteri günümüze kadar en az 15 farklı jenerik isimle anılmıştır. Bunlardan en iyi bilinenleri *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*/*Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, B5W, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii*'dir (12, 26).

Acinetobacter cinsi önceleri pigmentasyon yapmayan, nitratı indirgeyemeyen, nonfermentatif bakterilerden oluşturulmuştur (27) *A. calcoaceticus* adı altında tek bir tür olarak *Neisseriaceae* ailesi içinde sınıflandırılmışken, DNA rRNA hibridizasyonu ve 16S rRNA sekans analizi kullanılarak yapılan filogenetik çalışmaların *Proteobacteria*'nın γ alt sınıfına ait olduğunu göstermesi nedeniyle *Moraxellaceae* ailesi içerisinde incelenmeye başlanmıştır (12, 28). Böylece *Moraxellaceae* ailesi *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* ve ilişkili organizmaları içerir hale gelmiştir (12).

2.2.2. Morfolojik, Kültürel ve Metabolik Özellikleri

Acinetobacter kökenleri çoğunlukla kapsüllü, hareketsiz, zorunlu aerob, gram negatif, 1.0-1.5 ile 1.5-2.5 µm boyutlarındaki kokobasillerdir (28, 29, 30, 31) (Resim:1). Katalaz pozitif, oksidaz negatif, nonfermantatif bakterilerdir (27). Negatif oksidaz testi



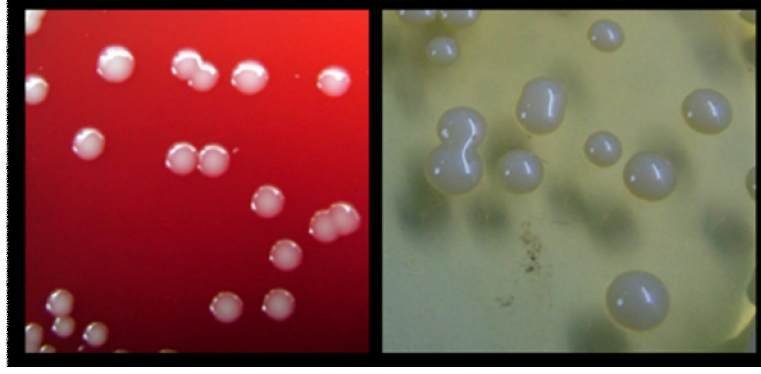
Acinetobacter kökenlerini diğer nonfermentatif bakterilerden ve Gram boyamasında sıklıkla karıştırıldıkları *Neisseria*, *Moraxella* ve *Kingella*'dan ayırımı sağlayan hızlı bir test vazifesi görmektedir (Tablo 1). Birçok suş nitratı nitrite indirgeyememektedir (12).

Resim 1: *Acinetobacter* kökenlerinin morfolojik görünümü (32).

	<i>Acinetobacter</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Kingella</i>
Şekil	Diplokok-basil	Diplokok	Diplokok-kısa basil	Diplokok
Oksidaz	-	+	+	+
Katalaz	+	+	+	-
Nitrat kullanımı	-	+	±	+
Glukozdan asit oluşturma	±	-	-	+

Tablo 1: *Acinetobacter* ve *Neisseriaceae* ailesi üyelerinin karakteristik özellikleri (27)

Kanlı agarda 24 saatlik inkübasyondan sonra 0.5-2 mm çapında düz ve opak koloniler oluştururlar (33). Birçoğu MacConkey agarda renksiz veya hafif pembemsi koloniler yaparlar (31). Glukozu okside eden bazı *Acinetobacter* kökenleri trozin içeren kalp infüzyon agarda ve glukoz eklenmiş kanlı agarda kahverengi renk değişimine neden olabilirler (33). Bazı klinik izolatlar özellikle genomik tür 4 (*A. haemolyticus*) ve genomik tür 6 koyun kanlı agarda hemolize neden olabilmektedir (34, 35).



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

2.2.3. Klinik Önemi Olan Türler

Acinetobacter kökenleri klinik laboratuvarlara gelen örneklerden izole edilen en sık ikinci nonfermentatif Gram negatif bakterilerdir (31). Sağlıklı insanlar için patojen olmayan ancak bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı bakterilerdir (36). İnsanlardan en sık izole edilen türü *A. baumannii*'dir (33). *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, genomospecies 3 ve genomospecies 6 diğer sık izole edilen türleridir (12, 37). *A. ursingii* hastanede yatan hastalarda bakteriyemi veya sepsis nedeni olabilmektedir (38). Toplumdan edinilmiş *A. radioresistens* bakteriyemisi Human Immunodeficiency Virus (HIV) pozitif bir hastada rapor edilmiştir (31). Sağlıklı insanlarda yaklaşık %25 oranında flora bakterisi olarak bulduklarından, nadir görülen *Acinetobacter* kökenleri izole edildiğinde enfeksiyon tanısı klinik bulgulara ve aynı hastadan aynı kökenin tekrarlayan izolasyonuna bağlı olarak konulmalıdır (12, 39).

2.2.4. Klinik Örneklerden İzolasyon

Acinetobacter kökenleri Nutrient agar ve Tryptic soy agar gibi yaygın kullanılan besiyerlerinde kolayca üreyebilmektedir (12). Birçok suş MacConkey agarda renksiz veya hafif pembemsi, Eosin Methylene Blue (EMB) agarda mavi renkli, gri merkezli koloniler yapmaktadır (31, 33). Kontamine klinik örneklerden izolasyonunda diğer mikroorganizmaların çoğalmasını baskılayan ayırıcı ve seçici besiyerleri (Herellea agar, Leeds *Acinetobacter* Medium) kullanılabilir (31, 40, 41). Genomik tür 2 (*A. baumannii*), 3 ve 13TU 37°C veya daha yüksek sıcaklıklarda üreyebilmesine karşın diğer genomik türlerden bazıları daha düşük sıcaklıklarda üreyebilmektedir. Bu nedenle 30°C genel kültür sıcaklığı olarak tavsiye edilmektedir (12).

2.2.5. *Acinetobacter* Türlerinin Sınıflandırılması

Acinetobacter genusu içerisinde 25 DNA-DNA benzerliği gösteren grup (genomospecies) tanımlanmış ve bunların yalnız onuna resmi tür ismi verilmiştir (27, 31, 33, 42) (Tablo 2).

Tjernberg ve Ursing'in yaptığı numaralandırma şemasında grup 1, 2, 3, ve 13TU fenotipik olarak çok benzer oldukları ve geleneksel fenotipik yöntemlerle ayrımları zor olduğundan *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi olarak isimlendirilmiştir (18, 42, 43).

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

Tablo 2: Tjernberg ve Ursing'in yaptığı numaralandırma şemasında yer alan ve resmi tür ismi verilmiş *Acinetobacter* kökenleri (27).

*Phenon: Fenotipik olarak farklı

2.2.6. *Acinetobacter* Kökenleriyle Oluşan Hastane Kaynaklı Enfeksiyonlar

Acinetobacter kökenleri kullanılan invaziv tanı ve tedavi prosedürlerinin çokluğu nedeniyle özellikle Yoğun Bakım Ünitelerinde önemli hastane enfeksiyonu etkenleri olarak karşımıza çıkmaktadırlar (44, 45, 46). Klinik örneklerden izole edilen tüm *Acinetobacter* kökenlerinin %80'inden fazlasını *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi oluşturmaktadır (33). Son 30 yılda pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu ve cerrahi alan enfeksiyonlarında görülme sıklığı artan tek gram negatif bakterinin *A. baumannii* olduğu gösterilmiştir (47).

2.2.6.1. Solunum Yolu Enfeksiyonları

Yatış sırasında inkübasyon döneminde olmayan hastalarda, hastaneye yattıktan en az 48 sonra ortaya çıkan pnömoniler hastane kaynaklı pnömoni olarak tanımlanmaktadır (48). Pnömoni *Acinetobacter* kökenlerinin en sık neden olduğu hastane kaynaklı enfeksiyondur (8, 33, 44). Pnömoni tanısı konulan tüm enfeksiyonların Kanada ve Amerika'da %2-2.5'undan, Avrupa'da ise %4'ünden sorumludurlar (48). Yoğun Bakım Ünitelerinde meydana gelen pnömonilerin ise %10'unun nedenidirler (49).

Acinetobacter kökenleriyle meydana gelen hastane kaynaklı pnömoni sıklıkla mekanik ventilasyonun bir komplikasyonu olarak ortaya çıkmaktadır (12, 33, 49). Ventilatörle ilişkili pnömoni sıklıkla subglottik bölgede kolonize olan bakterilerin mikroaspirasyonlarla trakeobronşial ağaca ve alt solunum yollarına ulaşmaları sonucu oluşmaktadır ve %13-49'unda etken *A. baumannii*'dir (46, 48, 50). Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada Yoğun Bakım Ünitelerinde ventilatörle ilişkili pnömonilerin %29.2'sinde görüldükleri ve en sık karşılaşılan etken haline geldikleri tespit edilmiştir (3).

Hastaneye yatıştan sonraki ilk beş günde meydana gelen pnömoni erken başlangıçlı, beş günden sonra meydana gelen pnömoni ise geç başlangıçlı pnömoni olarak isimlendirilmektedir. Toplum kaynaklı pnömoni etkenleri olan *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* ve enterik gram negatif basiller erken başlangıçlı pnömoninin başlıca etkenleriyken, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Stenotrophomonas maltophilia* geç başlangıçlı pnömoniyle ilişkilidirler (48).

Yoğun Bakım Ünitesinde yatma, ilerlemiş yaş, kronik akciğer hastalığı, cerrahi, immünoşüpresyon, antimikrobiyal ilaç kullanımı, trakeostomi ve endotrakeal entübasyon gibi risk faktörlerinin varlığı *Acinetobacter* kökenlerine bağlı pnömoni oluşma riskini arttırmaktadır (33, 48, 51, 52).

Acinetobacter kökenleri ile meydana gelen hastane kaynaklı pnömoniler için %70'in üzerinde mortalite oranı rapor edilmiştir (33). Prognozunun *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki gram negatif ve gram pozitif bakterilerden daha kötü olduğu bildirilmektedir (53).

2.2.6.2. Bakteriyemi

Türkiye’de yapılan çok merkezli bir çalışmada kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık (%23.2) nedeni oldukları tespit edilmiştir (3). *A. baumannii* bakteriyemilerde en sık izole edilen *Acinetobacter* türüdür (12). Gerçek *Acinetobacter* bakteriyemisini yanlış kan alma tekniğinden kaynaklanan yalancı bakteriyemiden ayırmak bazen güç olabilmektedir (33). Solunum yolu ve intravenöz kateterler bakteriyemilerin en önemli kaynaklarıdır (54). Cerrahi alan, yanık ve idrar yolu enfeksiyonları daha az sıklıkla karşılaşılan kaynaklardır (33). Bakteriyemilerin %21-70 kadarında ise herhangi bir kaynak tespit edilememektedir. Bu tanı konulamamış primer bakteriyemilerin bir kısmının saptanamamış vasküler kateter enfeksiyonlarından kaynaklandığı veya kolonize olduğu barsaktan intestinal translokasyonla kana geçtiği düşünülmektedir (54, 55).

Yetişkin hastalar içerisinde en büyük grubu immün yetmezlikli hastalar oluşturmaktadır (52, 55, 56, 57). İkinci önemli hasta grubu yenidoğanlardır. Düşük doğum ağırlığı, antibiyotik tedavisi, mekanik ventilasyon ve yenidoğan konvülsiyonları en önemli risk faktörleridir (54).

A. baumannii bakteriyemisi %25-30 sıklıkla septik şoka ve Dissemine İntravasküler Koagülasyona (DİK) neden olmaktadır (54, 58). Mortalite oranı %17-46’dır ve özellikle Yoğun Bakım Ünitelerinde mortaliteyi arttırmaktadır (33, 55).

2.2.6.3. Menenjit

Sporadik primer menenjit olguları rapor edilmesine rağmen *Acinetobacter* menenjitinin baskın formu sekonder menenjittir ve genellikle kafa travması sonrası veya invaziv nöroşirürji girişimlerini takiben ortaya çıkmaktadır (12, 59). *Acinetobacter* Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)’nın gram boyamasında morfolojik olarak *Neisseria meningitidis* ile karışabilmektedir (26, 33). Ventriküller ile dış çevre arasında devamlı bir ilişki bulunması, ventrikülostomi, serebrospinal sıvı fistüllerinin olması, beş günden uzun süre kalan ventriküler kateter varlığı önemli risk faktörleridir (12). *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu menenjitlerde mortalite oranı %20–27 kadardır (60, 61).

2.2.6.4. İdrar Yolu Enfeksiyonu (İYE)

Çoğunlukla idrar yollarında enfeksiyon oluşturmaksızın kolonize olmalarına karşın nadiren invazyon yaparak enfeksiyon etkeni olarakta karşımıza çıkabilmektedirler (33). Son 20 yılda *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının görülme sıklığında anlamlı bir artış görülmektedir (47). Türkiye’de yapılan çok merkezli bir çalışmada kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarında *Acinetobacter* kökenlerinin görülme oranı %7,5 olarak rapor edilmiştir (3).

2.2.6.5. Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Acinetobacter kökenleri venöz kateterle ilişkili sellülite neden olabilirler (33). Ayrıca travmatik yara, yanık ve postoperatif insizyon yerinde kolonizasyon veya enfeksiyona da yolaçabilirler (12, 13, 33).

2.2.6.6. Diğer Enfeksiyonlar

Acinetobacter kökenleriyle meydana gelmiş doğal veya prostetik kapak endokardit olguları tanımlanmıştır (33). *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu doğal kapak endokarditi genellikle akut ve şiddetli bir hastalıktır ve mortalite oranı prostetik kapak endokarditinden daha yüksektir (62).

Acinetobacter kökenleri devamlı peritoneal dializ uygulanan hastalarda peritonite neden olabilmektedir (63). Sık görülen belirtileri karın ağrısı ve bulanık diyaliz sıvısıdır (64).

Konjunktivit, endoftalmit, kontamine yumuşak kontak lens kullanımına bağlı korneal ülserasyon ve korneal perforasyon gibi göz enfeksiyonları tanımlanmıştır (33, 65, 66)

Diğer nadir görülen enfeksiyonları osteomyelit, septik artrit, pankreatit ve karaciğer apseleridir (33).

2.2.7. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarının Patogenezi

Acinetobacter enfeksiyonlarını kolaylaştıran çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır (Tablo 3).

KONAĞA AİT FAKTÖRLER	DİĞER RİSK FAKTÖRLERİ
<ul style="list-style-type: none">• İlerlemiş yaş• Malinite• Yanık• Kronik akciğer hastalığı• İskemik kalp hastalığı• Diabet• Prematürite	<ul style="list-style-type: none">• Uzun süre YBÜ’de kalma• Uzun süre antibiyotik kullanımı• İmmünoşüpresyon• Cerrahi girişimler• Mekanik ventilasyon• Endotrakeal tüp• Trakeostomi• Damar içi katater• İdrar sondasının varlığı• Enteral beslenme

Tablo 3: *Acinetobacter* enfeksiyonlarını kolaylaştıran risk faktörleri (Kaynak 7, 19, 44, 67, 68’den derlenmiştir).

2.2.8. *Acinetobacter* Kökenlerinin Virülansı

Acinetobacter kökenlerinin patojenitesi düşük olmasına rağmen çeşitli virülans faktörleri tanımlanmıştır (3, 12).

1. L-ramnoz, D-glukoz, D-glukuronik asid ve D-mannoz içeren bir polisakkarit kapsülün varlığı (69).
2. Bakterinin insan epitelyal hücrelerine adezyonunu sağlayan fimbriaların varlığı (70, 71).
3. Doku lipitlerine zarar veren enzimlerin üretimi (12).
4. Hücre duvarının lipopolisakkarit içeriğinin potansiyel toksik rolü (12)

İnsan vücudunda çoğalmak için gerekli demiri sağlama kabiliyeti de önemli bir virülans belirleyicisidir ve bazı *Acinetobacter* suşlarının aerobactin ve demir bağlayan dış membran reseptör proteinleri gibi sideroforları ürettiği gösterilmiştir (72, 73).

2.2.9. Epidemiyoloji

2.2.9.1. İnsanlardaki Taşıyıcılığı

Acinetobacter kökenleri normal bireylerin en az %25'inin derilerinde (özellikle aksilla, kasık ve parmak araları gibi nemli bölgelerde) bakteriyel floranın bir parçasını oluşturmaktadırlar (4, 5, 67). Sağlıklı yetişkinlerin solunum sistemi ve oral kavitesinde de flora bakterisi olarak bulunabilirler (67, 74). Yatan hastalarda özellikle salgınlar sırasında *Acinetobacter* kolonizasyon oranı çok artmaktadır (5). Yoğun Bakım Ünitelerinde yatan hastalarda solunum sistemi kolonizasyonunun yüksek oranda görülmesi, tedavi ekipmanlarını kontamine ederek ventilasyonla ilişkili pnömoni salgınlarına yolaçmaktadır (29). Salgın dönemlerinde deri kolonizasyonunun da artıyor olması hastane personelinin ellerini kontamine ederek salgının yayılımı ve sürmesine katkıda bulunmaktadır (5, 29, 50, 57). Nadirde olsa *Acinetobacter* kökenlerinin sindirim sistemini kolonize etmesi de salgınlara yol açabilmektedir (13).

2.2.9.2. Hastane Ortamındaki Muhtemel Kaynakları

Acinetobacter kökenlerinin farklı sıcaklık ve pH değerlerinde üreme kabiliyetleri, ıslak veya kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmeleri salgının gelişimi ve devamlılığına katkıda bulunmaktadır (13, 55, 67, 75). Ayrıca bazı kökenleri antiseptiklere de direnç göstermektedir (5).

Kolonize veya enfekte hastaların çevresindeki havadan *Acinetobacter* kökenleri sıklıkla izole edilebilmekte ve hava yolu organizmaların yayılımında önemli bir rol oynamaktadır (5, 13). Kontamine yataklar da yayılım için önemli bir kaynaktır. Bakteri su geçişine izin veren plastik yatak örtülerindeki yırtıklar yoluyla yatağı kontamine etmekte ve yataklardaki ıslak bölgelerde uzun süre canlı kalabilmektedir (5).

Solunum tedavisi veya desteği için kullanılan materyaller de birçok salgının kaynağını oluşturmaktadır (13).

2.2.10. Klinik Antibiyotik Direnci

1970'lerde *Acinetobacter* enfeksiyonları ampisilin, ikinci kuşak sefalosporinler, minosiklin, kolistin, karbenisilin, ve gentamisin ile tedavi edilebiliyorken, günümüzde birçok *Acinetobacter* kökeni yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere (ampisilin, karbenisilin, sefotaksim, aminoglikozidler, kloramfenikol v.b.) klinik olarak uygulanabildiği seviyelerde dirençli hale gelmiştir (5, 33, 53, 56, 57, 76, 77).

Florokinolonlar, seftazidim, trimetoprim-sülfametoksazol, doksisisiklin, polimiksin B, kolistin hastane kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonlarına karşı aktif kalabilmiş ilaçlar arasındadır (14, 33, 77).

Karbapenemler *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde halen başarılı antibiyotikler olarak kalmalarına karşın imipenem direncinin ilk kez belirlendiği 1985 yılından beri bu bileşiklere direnç oranı tüm dünyada hızla artmaktadır (53, 54, 67, 78). *A. baumannii* suşlarının karbapenem duyarlılığını araştırmak amacıyla 1997–2000 yıllarını kapsayan Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programında Avrupa'daki birçok ülkede karbapenemlerin *A. baumannii* izolatlarının %93-100'üne karşı etkili oldukları bulunmuştur. Ancak bölgesel farklılıklar olduğu da saptanmıştır. Örneğin İngiltere'de %70–78, Türkiye'de ise yalnızca %62–66 oranında etkili oldukları belirlenmiştir (48). Yeni karbapenemlerden Ertapenem'in ise *Acinetobacter* karşı düşük intrensek aktivitesi vardır ve tedavide kullanılmamalıdır (33, 79).

Beta-laktamaz inhibitörleri arasında sulbaktam *Acinetobacter* kökenlerine karşı klavulanik asit ve tazobaktama göre daha yüksek aktivite göstermektedir. (14, 48, 55, 80). Bu farklılık sulbaktamın β -laktamaz inhibitörü etkisine ek olarak Penisilin Bağlayan Protein-2 (PBP-2) üzerinden intrensek bakterisidal aktivite göstermesinden kaynaklanmaktadır (33). Bu nedenle ampisilin/sulbaktamın *A. baumannii*'ye karşı amoksisilin/klavulanik asit ve piperasilin/tazobaktama göre daha etkili olduğu görülmektedir (48, 80).

2.2.11. Çoklu Antibiyotik Direnci:

Mikroorganizmaların üç veya üzerinde farklı antibiyotik gurubuna dirençli olmaları çoklu antibiyotik direnci olarak tanımlanmaktadır (14, 29, 55). *Acinetobacter* kökenleri arasında çoklu antibiyotik direnci en sık *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi ve *A. haemolyticus*'da bulunmaktadır (81).

2.2.12. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter kökenleri son derecede hızlı antibiyotik direnci geliştirme eğiliminde olan bakterilerdir (12). Kromozomal gen aktarım mekanizmalarının üç şeklini de kullandıkları gösterilmiş ve konjugasyonun bu cinsin üyeleri arasında antibiyotik direnç genlerinin aktarımında en önemli rolü oynadığı kanıtlanmıştır (12).

2.2.12.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç üç mekanizma ile gelişebilmektedir (48, 53, 54, 56).

- 1- Beta-laktamaz üretimi.
- 2- Beta-laktam antibiyotiğin hücre içine girişinin azalması.
- 3- Penisilin Bağlayan Proteinlerde (PBP) değişiklik.

2.2.12.1.1. Beta-laktamaz Üretimi

Acinetobacter kökenlerinde beta-laktam antibiyotiklere karşı olan direnç büyük ölçüde beta-laktamaz üretimine bağlıdır (5, 67). Beta-laktamazların sentezi kromozom, plazmid veya transpozon kontrolündedir (5, 48, 54, 56).

2.2.12.1.1.1. Kromozomal Beta-laktamazlar

Sefalosporinaz aktivitesi gösteren enzimler *Acinetobacter* kökenlerindeki en önemli kromozomal beta-laktamazlardır. *A. baumannii* izolatlarının %98'inde sefalosporinaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir (53). Kromozomal sefalosporinazlardan olan AmpC'nin varlığı beta-laktamlara karşı dirençte önemli bir rol oynamaktadır (48, 53).

Ambler Sınıfı	Enzimin Adı	Genin Yerleşimi	Etkisi
A	VEB1	Kromozom	GSBL*
	PER-1	-	GSBL
	SHV benzeri	-	Penisilinaz
	TEM-1	Plazmid	Penisilinaz
	TEM-2		
	CARB-5		
	ARI-1	Plazmid	Karbapenemaz
	ARI-2		
B	IMP	Plazmid	MBL**
	VIM		
C	ACE-1	Kromozom	Sefalosporinaz
	ACE-2		
	ACE-3		
	ACE-4		
	NCTC 7844		
	ML 4961		
	CCM 5593	Belirtilmemiş	Sefalosporinaz
D	OXA-24	Kromozom	Karbapenemaz

Tablo 4: *Acinetobacter* kökenlerinde bulunan beta laktamaz enzimleri (12, 48, 53, 81, 82'den derlenmiştir).

*Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz.

**Metallo Beta Laktamaz.

2.2.12.1.1.2. Plazmid Aracılığı ile Sentezlenen Beta-laktamazlar

TEM-1, TEM-2 gibi plazmid aracılı beta-laktamazlar penisilinleri inaktive etmekte ancak sefalosporinleri etkilememektedir (53). Ambler sınıflamasına göre A sınıfında bulunan PER-1 ve VEB-1 enzimleri Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) aktivitesi göstermekte, penisilin ve sefalosporinlerin her ikisini de etkileyebilmektedir (48, 83). B sınıfında yer alan, Metallo-Beta-Laktamaz (MBL) aktivitesi gösteren ve plazmid aracılı karbapenemazdan olan IMP ve VIM ise aztreonam dışındaki tüm beta-laktam antibiyotikleri hidroliz edebilme yeteneğindedir (48, 53).

2.2.12.1.2. β -laktam Antibiyotiğin Hücre İçine Girişinin Azalması

Beta-laktam antibiyotikler gram-negatif bakterilerde bulunan dış membran proteini (Outer Membran Protein (OMP)) adı verilen, porin proteinlerinin oluşturduğu porlar aracılığıyla hücre içerisine geçmektedirler. (81). Porin proteinlerinin sayısını değiştiren mutasyonlar beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişimine neden olabilmektedir (81).

2.2.12.1.3. Penisilin Bağlayan Proteinlerde Değişiklik

Penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklikler kromozomal mutasyonlara bağlı olarak üç farklı mekanizma ile meydana gelebilmektedir (81).

1. Beta-laktam antibiyotiğe PBP'lerin afinitesinin azalması.
2. PBP sayısında azalma.
3. Beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi.

2.2.12.2. Aminoglikozidlere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Aminoglikozidler 30S ribozomlara geri dönüşümsüz olarak bağlanıp protein sentezini inhibe ederek bakteri ölümüne neden olmaktadır (33, 52). Bu antibiyotiklere direnç üç mekanizma ile gelişmektedir:

- 1- Ribozomal hedeflerde mutasyonlara bağlı değişiklik oluşması (48).
- 2- Aminoglikozidlerin hücre içine girişinin azalması ve/veya dışarı pompalanması (33, 48, 52).
- 3- Aminoglikozidlerin enzimlerle değiştirilmesi (12, 48, 52, 54).

Aminoglikozidlerin enzimlerle değiştirilmesi en sık görülen aminoglikozid direnç mekanizmasıdır (48, 52). Başlıca asetilaz, adenilaz ve fosfotransferaz gibi enzimlerin antibiyotiklerin hidroksil ve amino grublarını değiştirmesi sonucu oluşur (12, 48, 52, 84). Bu enzimler plazmid veya kromozomda kodlanmakta ve aminoglikozid direncinin yayılımında önemli rol oynamaktadır (52). Amikasinde dahil tüm aminoglikozidlerin aktivitesini baskılayabilen bu enzimatik mekanizma dirençli izolatların çoğunda bulunmaktadır (48, 52).

2.2.12.3. Kinolonlara Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Kinolonların bakteri hücreindeki başlıca hedefleri DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimleridir (33). Bakteri DNA'sında süpersarmallar oluşturan DNA giraz sırasıyla *gyrA* ve *gyrB* genlerince kodlanan A ve B alt birimlerinden oluşur (33). DNA replikasyonunda görev alan topoizomeraz IV ise *parC* ve *parE* genlerince kodlanan iki alt birimden oluşmaktadır (33).

Yeni florokinolonlar 1988 yılına kadar *Acinetobacter* kökenleri ile oluşan enfeksiyonlara karşı etkili iken günümüzde bu etkinlik oranı hızla azalmaktadır (48). Kinolon direnci *Acinetobacter* kökenleri arasında aktarılamayan iki mekanizmayla oluşmaktadır (81):

- 1- DNA giraz enziminin alt birimlerindeki değişiklikler: *gyrA* ve *parC* genlerindeki kromozomal mutasyonlar bu antibiyotiklerin hedefleri olan DNA giraz ve topoizomeraz IV'te değişikliğe neden olarak florokinolon direncine neden olmaktadır (5, 48, 85, 86). *gyrB* mutasyonları ise *Acinetobacter* kökenlerinde saptanamamıştır (12).
- 2- Dış membran geçirgenliğinin azalması ve/veya ilacın aktif olarak dışarı atılması: *Acinetobacter* kökenlerinde kinolonları dışarı atan pompa sayısının artması veya ilacın hücre içerisine girişine aracılık eden spesifik dış membran proteinlerinin üretiminin azalmasıyla sonuçlanan mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir (48).

2.2.12.4. Tetrasiklinlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Tetrasikline karşı bakteriyel direnç üç farklı mekanizma ile meydana gelmektedir (87, 88, 89):

- 1- Aktif pompa mekanizması
- 2- Hedef koruması
- 3- Enzim modifikasyonu

Acinetobacter kökenlerinde spesifik aktif pompa sistemi ile tetrasiklin direncini kodlayan *tet(A)*, *tet(B)* ve *tet(H)* isimli üç gen sınıfı saptanmıştır (87, 88). *adeB* ise spesifik olmayan bir pompa mekanizması ile çoklu antibiyotik direncine (tetrasiklin, aminoglikozid ve florakinolon) neden olmaktadır (85, 87). Diğer bir tetrasiklin direnç geni çoğunlukla *A. baumannii* izolatlarında rapor edilen *tet(M)*'dir ve hedef koruması ile tetrasiklin direnci oluşturmaktadır (87, 88).

2.2.12.5. Diğer Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter kökenlerinde kloramfenikol direncine Kloramfenikol Asetiltransferaz-I (KAT-I) enzimi neden olmaktadır. Bu enzim transpozon ve plazmidlerce kodlanmaktadır (12).

Acinetobacter kökenleri ayrıca yüksek oranda trimetoprim direnci göstermekte ve bu direnci kodlayan genler çoğunlukla plazmidlerde yer almaktadır (12).

2.2.13. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Hastane kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonlarında özellikle de Yoğun Bakım Ünitelerinde yatmakta olan hastalarda çok az sayıda antibiyotik etkinliğini sürdürebilmektedir (12). Aminoglikozidlerin karbenisilinle kombinasyonu orta düzeyde aminoglikozid direnci varlığında bile sinerjistik etki göstermektedir (33). Bir aminoglikozid ile imipenem veya meropenem ve bir aminoglikozid ile β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonu çoklu antibiyotik direnci olan *A. baumannii* izolatlarına karşı in vitro sinerjistik etkilidir (33, 53, 84). Karbapenemlere dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda sulbaktamın bir β -laktam antibiyotikle kombinasyonu tedavi amacıyla kullanılmaktadır (5). Sefoperazon/sulbaktam kombinasyonunun ampisilin/sulbaktama göre biraz daha etkili olduğu gösterilmiştir (55).

Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin hepsine karşı çoklu antibiyotik direnci gösteren *A. baumannii*'lerin tedavisinde kolistin (polimiksin E) veya polimiksin B kullanılabilir (53, 54, 60, 90). Ancak in vitro aktiviteleri iyi olmasına karşın özellikle pnömonili hastaların tedavisinde in vivo etkinliği düşük olabilmektedir (53, 54). İmipenem, meropenem, azitromisin, trimetoprim/sülfometaksazol, rifampin veya ampisilin/sulbaktamla polimiksin B kombinasyonu in vitro sinerjistik etki göstermesine karşın kullanımıyla ilgili klinik veri yetersizdir (53).

2.2.14. Tiplendirme Yöntemleri

Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri epidemik suşların yayılım kaynağını ve şeklini saptamada önemli olduklarından özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonların engellenmesinde sürveyans çalışmalarının bir parçası olarak kullanılmaları önerilmektedir (7). Bu amaçla çeşitli fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır (tablo:5).

Tiplendirme yöntemleri standartize edilmiş, duyarlı ve özgül olmalı ayrıca tüm tiplendirme sistemlerinin tekrar edilebilirliği, ayırım gücü, uygulama ve değerlendirme kolaylığı belirlenmiş olmalıdır (91). Ayırım gücü epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatları ayırt etme kabiliyeti olarak tanımlanmaktadır (92). Fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında moleküler yöntemlerin ayırım gücü daha yüksektir ve birçok türe uygulanabilme avantajı sağlamaktadır (91, 92).

FENOTİPİK YÖNTEMLER

- Antibiyotiplendirme
- Serotiplendirme
- Biyotiplendirme
- Bakteriofaj tiplendirme
- Bakteriyosin tiplendirme
- Multilokus enzim elektroforezi
- Hüresel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi
- Immunoblot fingerprinting

MOLEKÜLER YÖNTEMLER

I. Nükleik asit temelli yöntemler

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

II. PCR temelli yöntemler

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

Tablo 5: Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla kullanılan fenotipik ve genotipik yöntemler (Kaynak 56, 91, 92, 93, 94, 95, 96'dan derlenmiştir).

2.2.14.1. Fenotipik Yöntemler

Mikroorganizmler arasındaki ilişkiyi belirlemede birçok farklı fenotipik metod kullanılabilir (tablo 5). Ancak genellikle fenotipik metodların tekrarlanabilirliği, tiplendirme yeteneği ve ayırım gücü yetersizdir (42).

2.2.14.1.1. Antibiyotiplendirme: Benzer suşların tespitinde Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve disk difüzyon zon çapı gibi antibiyotik duyarlılık paternleri kullanılmaktadır (96). Antibiyotiplendirmenin yapılması kolay olmasına karşın ayırım gücü düşüktür (96). Genetik ve epidemiyolojik ilişkisi olmayan birçok tür aynı plasmidi alarak benzer duyarlılık paternine sahip olabildiğinden (plazmid salgını) ve enfeksiyon sırasında

duyarlılıkta değişiklik meydana gelebildiğinden dolayı epidemiyolojik çalışmalarındaki değeri sınırlıdır (91, 92).

2.2.14.1.2. Serotiplendirme: Bakterilerin yüzeyindeki antijenleri onlara spesifik antikoları kullanarak belirlemeye dayanan tiplendirme yöntemidir. Antiserumun elde edilme güçlüğü ve farklı metodlar arasındaki standardizasyon problemleri nedeniyle değeri düşüktür. Bu yöntemin avantajı serotipin mikroorganizmanın değişmez bir özelliğini yansıtmasıdır (91, 92).

2.2.14.1.3. Biyotiplendirme: Bakterilerin farklı besiyerlerindeki üreme kabiliyetlerinin ve biyokimyasal özelliklerinin kullanıldığı tiplendirme yöntemidir. Gen ekspresyonundaki çeşitlilikten ve rastlantısal mutasyonların mikroorganizmanın biyolojik özelliklerini değiştirebilmesinden dolayı ayırım gücü zayıftır. Örneğin aynı klinik örnekten alınan iki *Klebsiella* kolonisinin triptofandan indol üretme yeteneği farklı olabilmektedir. İndol üretimi *Klebsiella pneumoniae*'dan (indol negatif) *Klebsiella oxytoca*'yı (indol pozitif) ayırmada önemli olduğundan iki izolat genotipik olarak benzer oldukları halde farklı türler olarak değerlendirilebilmektedir. Ayrıca biyotiplendirme enterokoklar gibi belirgin biyokimyasal farklılıkları olmayan bakteriler arasında ayırım yapamamaktadır. Bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda biyotiplendirmenin yararı sınırlıdır (92).

2.2.14.1.4. Bakteriyofaj Tiplendirme: Zahmetli ve tekrarlanabilirliği düşük bir yöntem olması ve standardizasyonundaki problemler metodun kullanımını sınırlandırmaktadır (92).

2.2.14.1.5. Bakteriosin Tiplendirme: Diğer metodlarla kolayca tiplendirilemeyen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida* kökenleri gibi mikroorganizmaların tiplendirilmesinde kullanılabilir. Bakteriyofaj tiplendirmeden daha az zahmetlidir ve serotiplendirme antibiyotiplendirme veya biyotiplendirmeye birlikte epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir (91).

2.2.14.2. Moleküler Yöntemler

Moleküler tekniklere ilgi her geçen gün artmakta ve enfeksiyonların epidemiyolojik araştırmalarına artan bir oranda dahil edilmektedirler (91, 95). Çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiş olmasına karşın bakteriyel türlerin çoğunda kullanılabilecek en uygun metod PFGE olarak görölmektedir (97).

2.2.15. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ilk kez 1983 yılında tarif edilmiş ve kısa bir sürede moleküler epidemiyolojik analizler arasında "altın standart" haline gelmiştir (21, 94). Bakteriyel kromozom megabaz büyüklüğünde bir molekül olmasına karşın geleneksel elektroforez teknikleri 50 kb üzerindeki DNA moleküllerinin jel içerisindeki elektroforetik göçüne izin vermemektedir (98). Kromozomal DNA'yı daha az sıklıkla kesen dolayısıyla geleneksel agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilemeyecek kadar büyük DNA parçaları oluşturan restriksiyon enzimlerinin tanımlanması alternatif metodlara gereksinim doğurmuştur (99). Bu nedenle çeşitli elektroforetik teknikler tanımlanmıştır (tablo 6).

PULSED-FİELD GEL ELECTROPHORESİS TİPLERİ
<ul style="list-style-type: none">• Rotating Gel Electrophoresis (RGE)• Programmable Autonomously Controlled Electrodes (PACE)• Pulse Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis (PHOGE)• Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE)• Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE)• Field İnversion Gel Electrophoresis (FIGE)• Counter-damped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF)

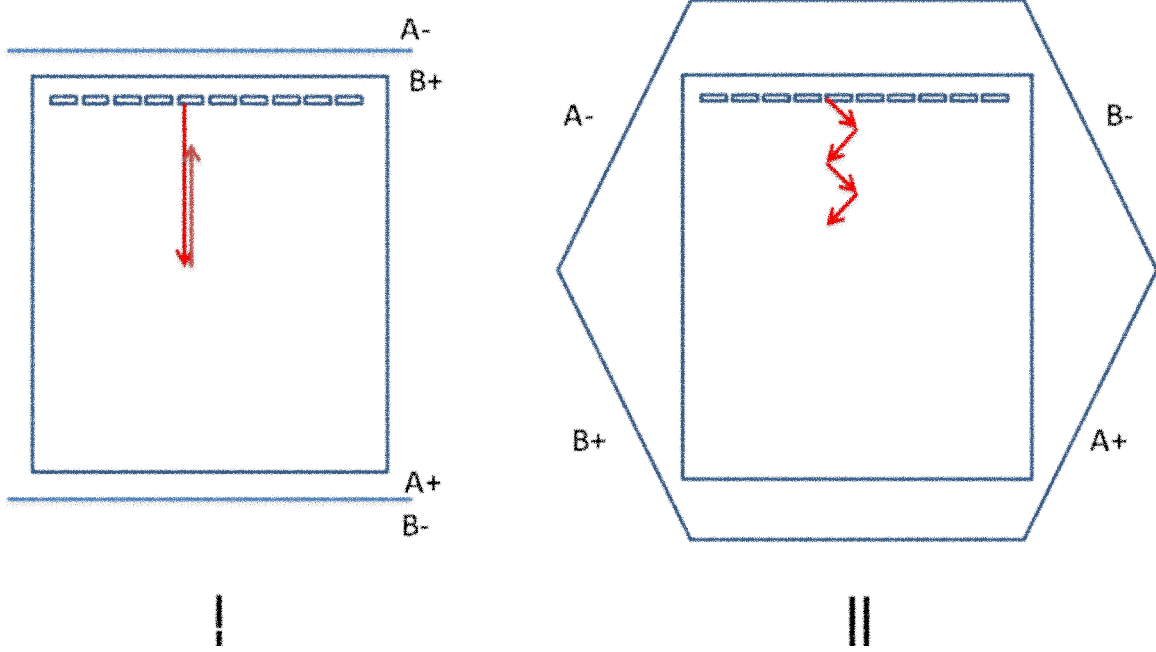
Tablo 6: Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tipleri (Kaynak 91, 92, 98, 99'dan derlenmiştir).

Bu teknikler, süresi ve yönleri değiştirilen bir elektriksel akım (pulse) ile 1000 kb uzunluğuna kadar olan DNA moleküllerinin çözümlenmesine izin vermektedir (92).

Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE) PFGE'nin en basit tipidir. Elektrik akımı belirli sürelerle ve 180° açılı ile (ileri ve geri) iki yönde verilmektedir (şekil 1-I). İleri yönde uygulanan akımın süresi daha uzundur (98, 100).

Counter-damped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF)

PFGE'nin en yaygın kullanılan tipidir. Bu sistemde altıgen biçiminde yerleştirilen çok sayıda elektrod yardımıyla 120° açı ile sabit hızda elektrik akımı verilmektedir (şekil I-II) (98, 100, 101).



Şekil 1: Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tipleri (100)

I: Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE)

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

PFGE'de bozulmamış DNA gereklidir ancak geleneksel DNA izolasyon yöntemleri DNA'da kırılmalara yol açmaktadır (101). Bu problemi çözmek ve sağlam DNA elde etmek amacıyla bakteriler düşük erime ısıları agaroz ile karıştırılır (100, 102). DNA miktarının gözlenemeyecek kadar az veya "smearing" ve distorsiyona neden olacak kadar fazla olmaması için hücre konsantrasyonu belli değerler arasında [1×10^9 - 5×10^9 CFU/ml (610 nm de yaklaşık 0.5-1 absorbans aralığında)] olmalıdır (99).

Agaroz kalıbı hazırlandıktan sonra bakteri hücreleri, enzim ve deterjanların yardımıyla parçalanır. Bu amaçla stafilkoklar, streptokoklar ve enterokoklar gibi gram pozitif bakteriler için rutin olarak kullanılan enzimler lizozim, lizostafin ve mutanolizindir. Gram-negatif mikroorganizmaların lizisinde ise proteinaz-K/deterjan karışımı

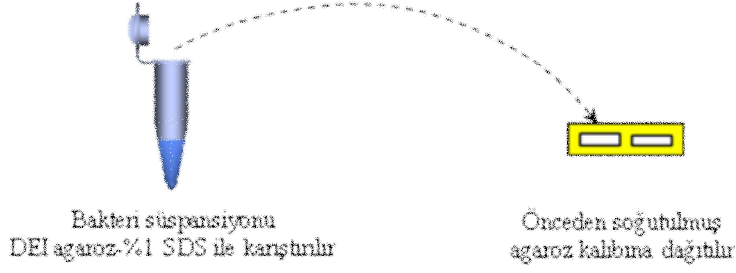
kullanılmaktadır (99). Proteolizis işleminden sonra agaroz kalıbı 50-55°C'de distile su ve TE solüsyonu ile yıkanır. Böylece protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Hazırlanan agaroz kalıpları TE (10mM Tris, 1mM EDTA (pH 7.5)) tamponu içerisinde 4°C'de aylarca saklanabilmektedir (99).

Agaroz içerisinde saf ve bir bütün halinde kalan kromozomal DNA bir restriksiyon enzimi (RE) kullanılarak kesilir. Bakteriler arasındaki epidemiyolojik ilişkinin değerlendirilebilmesi için DNA kabul edilebilir bir sayı (10'dan az 25-30'dan fazla olmamalı) ve büyüklükte kesilmelidir (97, 102). Kromozomun G+C içeriği bakteriyel kromozom üzerindeki restriksiyon enzim kesim noktalarının dağılımını etkileyerek oluşacak DNA bantlarının sayı ve büyüklüğünü belirler (100). GC'den zengin bakteriyel genomda AT içeren, AT'den zengin bakteriyel genomda ise GC içeren tanıma bölgeleri daha az sıklıkla bulunmaktadır. Bu nedenle *XbaI*, *SpeI* gibi AT içeren kesim noktalarını tanıyan enzimler GC'den zengin bakterilerin kromozomlarını, *SmaI* gibi GC içeren kesim bölgelerini tanıyan enzimler ise AT'den zengin bakterilerin kromozomlarını daha az sıklıkta kesmektedir (99, 100, 102).

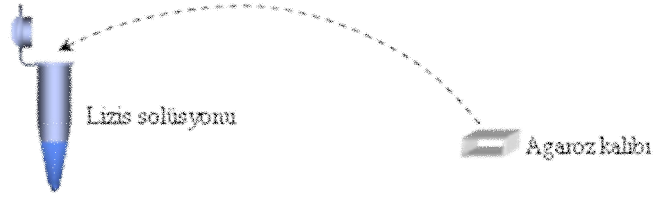
Kesme işleminden sonra agaroz dilimi jelin uygun kuyucuklarına konular ve jelle daha iyi bir temas sağlaması için erimiş agaroz ile kaplanır. Ayrıca agaroz dilimleri tarak dişine yerleştirildikten sonra çevresine jel dökülebilir. Böylece daha sıkı bir ilişki sağlanarak, kırılma riski en aza indirilir, dolayısıyla daha keskin bant paternleri elde edilebilir.

Hazırlanan elektroforez jeli belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutularak 10-800kb uzunluğundaki DNA parçalarının ayrımı sağlanır. Elektroforez işleminden sonra jel etidyum bromürle boyanarak, bant profilleri görünür hale getirilmektedir (99). PFGE'nin yapılış aşamaları şekil 1'de özetlenmiştir.

1. Bakterileri içeren agaroz kalıbı hazırlanır.

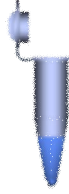


2. Lizis solüsyonu I ve II kullanılarak bakteri hücresi parçalanır (DNA izolasyonu).



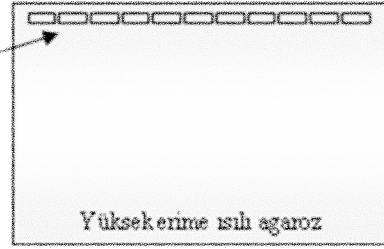
3. Yıkama ile protein ve karbonhidrat gibi kontaminantlar uzaklaştırılır.

4. DNA bir RE kullanılarak kesilir.

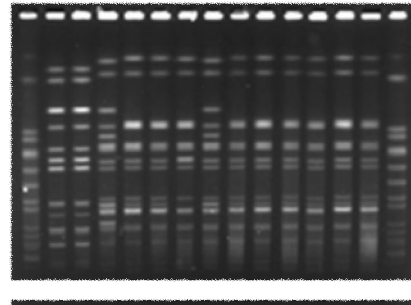


5. Elektroforez işlemi uygulanır.

Agaroz kalıbı bisturi ile
1/4 oranında kesilir.
Uygun kuyucuklara yerleştirilir.



6. Etidyum bromürle boyanarak incelenir.



Şekil 2: PFGE'nin yapılaş aşamaları (102).
Şekil 3: PFGE'nin yapılaş aşamaları (103).

2.2.15.1. PFGE'de Kullanılan Kontroller

Epidemiyolojik olarak araştırılan suşların yanında mutlaka band paterni çok iyi bilinen bir bakteride kontrol amacıyla kullanılmalı ve jelin en az bir kuyucuğuna moleküler ağırlık standardı konulmalıdır. Çünkü en iyi şartlarda bile jeller arasında DNA bant paternlerinde değişiklikler görülebilmekte ve jel kalınlığı, tampon değişiklikleri gibi faktörler distorsiyona neden olabilmektedir (102). Lambda DNA ladder en yaygın kullanılan moleküler ağırlık standardıdır (91, 97). Staphylococcus aureus NCTC 8325 genomu da Sma I ile kesildiği zaman iyi tanımlanmış bantlar (674, 361, 324, 262, 257, 208, 175, 135, 117, 80, 76, 44.36 ve <20 kb) oluşturmaktadır (102). Moleküler ağırlık standardı kullanılarak;

- 1) Bakterinin parçalanması, yıkama ve endonükleaz ile kesiminin kalitesi,
- 2) Jel ve elektroforez koşulları,
- 3) Sonuçların tekrarlanabilirliği kontrol edilmiş olmaktadır (97, 102).

2.2.15.2. PFGE'ni Etkileyen Faktörler

PFGE'ni etkileyen faktörler tablo 7'de özetlenmiştir.

Band paternlerinin kalitesini etkileyen faktörler
<ul style="list-style-type: none">• Agaroz tipi ve konsantrasyonu• Tampon konsantrasyonu• Tampon sıcaklığı• Pulse açısı• Pulse süresi• Elektrik akımının gücü (santimetreye düşen volt)• Toplam elektroforez süresi

Tablo 7: PFGE'ni etkileyen faktörler (100, 101).

Bu parametreler son yıllarda standardize edilmeye çalışılmaktadır. Genellikle % 0.8-1 konsantrasyonunda agaroz, 0.5 X Tris-borate-EDTA tamponu [45mM Tris, 45mM borate, 1.0mM EDTA (pH 8.3)], pulse açısı 120° ve elektrik akımı 6V/cm olacak şekilde kullanılmaktadır (99).

2.2.15.3. Restriksiyon Profillerinin Analizi

İlk yapılması gereken PFGE'deki ortak band paternlerinin belirlenmesidir. Salgın suşunun profili diğer izolatların bantlarının sayı ve boyutları ile karşılaştırılır. (91). Bakteri kromozomunda nokta mutasyon, insersiyon ve delesyon gibi genetik olaylarla ortaya çıkan tek bir genetik değişiklik çok anlamlı bir epidemiyolojik değişim yaratmamaktadır (102). Tenover ve ark. PFGE sonuçlarının yorumlanması sırasında karşılaşılan bu gibi problemleri çözmek amacıyla bir sistem önermişlerdir (Tablo 8). Bu sistemde bant paternlerindeki farklı band sayısına bakılarak, izolatların epidemiyolojik ilişkileri değerlendirilmektedir (97).

Kategori	Genetik farklılık sayısı	Farklı bant sayısı	Epidemiyolojik yorum
Aynı	0	0	İzolat salgının bir parçası
Yakın ilişkili	1	2-3/1-3	İzolat salgınla yakından ilişkili
Olası ilişkili	2	4-6	İzolat salgınla olası ilişkili
İlişkisiz	≥3	≥7	İzolat salgınla ilişkisiz

Tablo 8: PFGE profillerini yorumlama kriterleri (97)

2.2.15.4. Epidemiyolojik Yorum

2.2.15.4.1. Aynı İzolat: PFGE'de sayı ve boyutları aynı bant paterni sergileyen bakterilerin genetik olarak aynı ve epidemiyolojik olarak ilişkili oldukları kabul edilir. Tek bant farklılığı gösteren izolatlarında klonal olarak ilişkili oldukları gösterilmiştir (91, 97).

2.2.15.4.2. Yakın İlişkili İzolat: Tek bir nokta mutasyon, insersiyon veya delesyon oluşması nedeniyle aralarında 2-3 bant farkı oluşan izolatlar yakından ilişkili olarak değerlendirilmekte ve epidemiyolojik olarak salgının bir parçası oldukları düşünülmektedir (91, 92).

2.2.15.4.3. Muhtemel İlişkili İzolat: İnsersiyon veya delesyon ile restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı gibi iki bağımsız genetik değişiklik meydana geldiğinde aralarında 4-6 bant farkı olan izolatlar oluşur. Çok sayıda hastanın kullanıldığı ve 3-6 aydan uzun bir süreyi kapsayan çalışmalarda sıklıkla gözlenir. Bu tür izolatlar muhtemel ilişkili izolatlar olarak değerlendirilir (91, 92). Ancak genetik olarak yakından ilişkili olmadıklarından epidemiyolojik olarak ilişkili olma olasılıkları daha düşüktür (97).

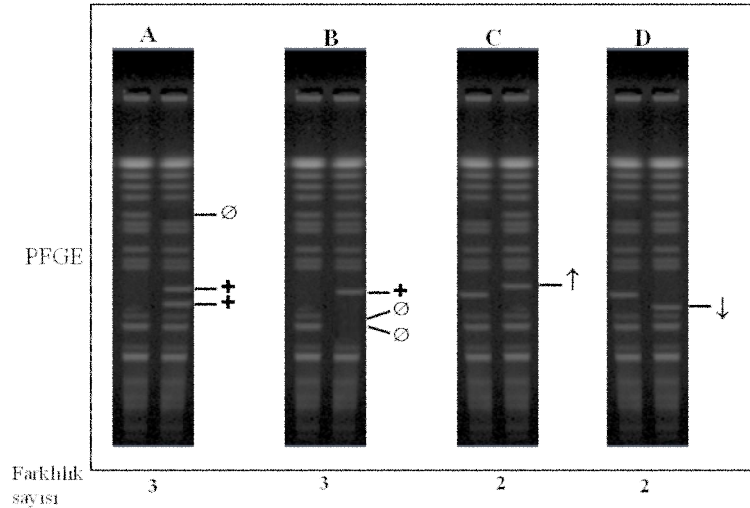
2.2.15.4.4 İlişkisiz İzolat: DNA'sında meydana gelen üç ya da daha fazla genetik değişiklikten dolayı yedi ya da daha fazla bant farkı sergileyen bakteriler epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar olarak kabul edilir (91, 92, 97).

2.2.15.5. Genetik Değişikliklerin PFGE Profillerine Etkisi

Genetik değişikliklerin PFGE profilleri üzerindeki etkisi tablo 9'da ve şekil 3'te özetlenmiştir.

Genetik değişiklik tipi	PFGE paterninde oluşan değişiklik
Nokta mutasyon nedeniyle Yeni bir kesim noktası oluşursa	Büyük bir DNA parçası iki küçük parçaya ayrılır. Bir büyük bant kaybolurken iki yeni küçük bant oluşur. Bant paterninde üç bantlık bir değişiklik meydana gelir.
Nokta mutasyon nedeniyle Bir kesim noktası kaybolursa	İki DNA parçası ayrılmaz ve daha büyük yeni bir bant oluşur. Bu sırada iki bant kaybolur. Bant paterninde üç bantlık bir değişiklik meydana gelir.
Kesim noktası dışındaki bir bölgeye DNA insersiyonu olduğunda	Bant sayısı değişmez. Bir DNA parçası büyüdüğünden bir bant yer değiştirir. Bant paterninde iki bantlık bir değişiklik meydana gelir.
Kesim noktası dışındaki bir bölgeden DNA delesyonu olduğunda	Bant sayısı değişmez. Bir DNA parçasının küçüldüğünden bir bant yer değiştirir. Bant paterninde iki bantlık bir değişiklik meydana gelir.

Tablo 9: Genetik değişikliklerin PFGE profilleri üzerindeki etkisi (97, 102)



Şekil 3. Genetik değişikliklerin PFGE profilleri üzerindeki etkisi: A, yeni bir restriksiyon bölgesinin eklenmesi; B, bir restriksiyon bölgesinin kaybolması; C, bir parçanın içine DNA insersiyonu; D, bir parçadan DNA'nın delesyonu (+, kazanılan bant; Ø, kaybedilen bant) (97, 102)

2.2.15.6. PFGE Analizinde Sık Rastlanılan Problemler

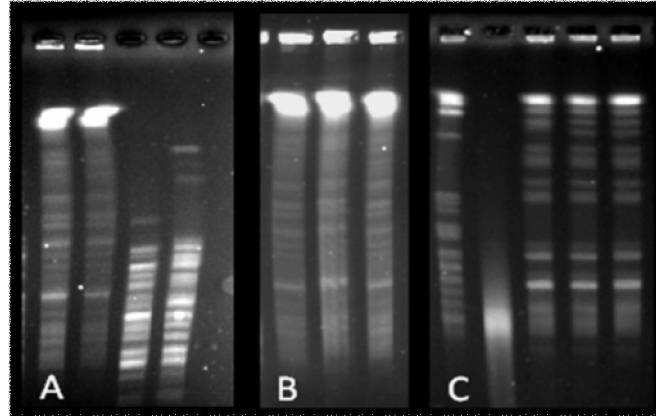
PFGE analizinde sık rastlanılan problemler tablo 10'da özetlenmiştir.

PROBLEMİN NEDENİ	SONUÇ
Agaroz jelinin kalın olması Tampon konsantrasyonunun yüksekliği Elektrotlardaki bozukluk	Bant sıralarında eğrilik (Resim 3A)
DNA'nın iyi kesilmemesi	Jelin üst kısmında büyük kalın bir bant Diğer bantlar küçük ve soluk (Resim 3B)
Nükleaz aktivitesi (<i>P. aeruginosa</i> , <i>C. difficile</i> * v.b)	Bant paternleri tamamen ortadan kalkmış (Resim3C)

Tablo 10: PFGE Analizinde Sık Rastlanılan Problemler (99)

**Clostridium difficile*

P. aeruginosa, *C. difficile* gibi bakterilerle çalışırken nükleaz aktivitesinin üstesinden gelmek için zarar verici süreçten sorumlu tris radikallerini nötralize eden **thiourea** (Son konsantrasyon 50-70 μ M) PFGE yürütme tamponuna eklenmelidir (103, 104).



Resim 3: PFGE Analizinde Sık Rastlanılan Problemler.

A: Bant sıralarında eğrilik, B: DNA'nın iyi kesilmemesi durumunda oluşan görünüm, C: Nükleaz aktivitesi sonucu bant paterninin kaybolması.

2.2.15.7. Sonuçların Rapor Edilmesi

Salgın suşlarına ait olduğu düşünülen DNA restriksiyon profilleri tip A, yakın ya da muhtemel ilişkili profiller tip A₁, tip A₂, ilişkisiz profil sergileyenler ise tip B, tip C ... olarak isimlendirilir ve rapor edilir (97, 105).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışmamıza Mart 2006 - Temmuz 2007 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatmakta olan 76 hastanın trakeal aspirat, kan, idrar, yara gibi çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Acinetobacter* kökenleri dahil edildi. Her hastadan ilk izole edilen *Acinetobacter* kökeni çalışıldı.

3.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

a. Hücre Süspansiyon Tamponu (HST) (pH:8)

100 mM Tris HCl

100 mM EDTA

b. TE Tamponu (pH=7,6)

10 mM Tris HCl

0.1 mM EDTA

c. Hücre Lizis Solüsyonu I (HLS-I)

50 mM Tris HCl

50 mM EDTA

2,5 mg/ml lizozim

1.5 mg/ml Proteinaz K

d. Hücre Lizis Solüsyonu II (HLS-II)

0.5 M EDTA

%1 Sarkozil

400 mg/ml Proteinaz

e. Proteinaz K Hazırlama Tamponu

50 ml Gliserol
1 ml 1M Tris HCl (pH:7,5)
0.29 g CaCl₂

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

f. Proteinaz-K Stok Solüsyonu

100 mg Proteinaz K
10 ml Hazırlama Tamponu

Kristaller çözünene kadar alt üst edilerek karıştırıldı.

Ependorflara bölünerek -20°C'de saklandı.

g. Restriksiyon Tamponu (1 örnek)

10 µl SmaI tamponu
90 µl distile su

h. SmaI Enzim Karışımı (1 örnek)

10 µl 10X SmaI tamponu
3 µl SmaI enzimi [Bovine Serum Albumin (BSA) içeren]
87 µl Distile su

i. 0,5X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu: (pH 8.0)

44.5 mM Trisma base
44.5 mM Borik asit
1 mM EDTA

j. 0.5 M EDTA (pH:8)

29.2 g EDTA (FW:292.2).
Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.
pH'nin 8.0 olması için NaOH peleti ilave edildi.
Otoklavda steril edilerek kullanıldı.

k. 1M Tris (FW:121,14): (pH:8)

12.1 g Tris

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH'nin 8.0 olması için HCl ilave edildi.

Otoklavda steril edilerek kullanıldı.

l. Etidyum Bromür (5 mg/ ml stok)

50 mg Etidyum bromür

10 ml distile su

Etidyum bromür çok mutajenik bir madde olduğundan tartarken eldiven giyildi, maske kullanıldı ve etrafa bulaştırmamaya özen gösterildi.

Manyetik çalkalayıcı üzerinde bir kaç saat karıştırılarak çözünmesi sağlandı.

Renkli şişeye konuldu ve şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatıldı.

Oda ısısında saklandı.

m. % 10 Sarkozil

1g Sarkozil

10ml DiethylenePyrocarbonate-H₂O (DEPC-H₂O)

Oda ısısında en az 3 ay bozulmadan saklanabilir.

n. Lizozim Çözeltisi (2000 µg/ml)

20 mg lizozim

10 ml TE tamponu

3.3. %2'lik Düşük Erime Isılı Agaroz Hazırlanması

0.50 g düşük erime ısılı agaroz

23.5 ml HST

100 ml'lik balona konuldu ve ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı.

Mikrodalga fırında 10 saniye tutulduktan sonra çıkarılarak hafifçe karıştırıldı.

Takiben 2-3 saniye mikrodalga fırınında tutuldu ve bu işlem agaroz çözününceye kadar tekrarlandı.

Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konuldu.

1.25 ml %20'lik sodyum dodezil sülfat (50°C de ısıtılmış) eklenerek iyice karıştırıldı.

3.4. Elektroferez Jelinin Hazırlanması

1g Pulsed-Field Certified Agarose

100 ml 0.5 x TBE

200 ml'lik balona konuldu ve yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.

Balonun ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutuldu.

Çıkarılıp hafifçe karıştırıldıktan sonra tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutuldu ve bu işlem agar tamamen eriyinceye kadar tekrarlandı.

3.5. Suşların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi'nden gelen tüm örnekler %5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye) ve EMB agara (Oxoid, England) ekilerek inkübe edildi. Üreyen mikroorganizmalar klasik yöntemlere ilaveten Phoenix identification/ antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) otomotize mikrobiyoloji sistemi ile tür düzeyinde tanımlandı. Suşlar Phoenix ID/AST otomotize mikrobiyoloji sisteminde üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. *Acinetobacter* olduğundan şüphelenilen oksidaz negatif, nonfermentatif, gram negatif kokobasillere ait kolonilerden CrystalSpec™ nephelometer (Becton Dickinson company, USA) kullanılarak ID buyyon içerisinde 0.5 McFarland standartına ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlandı. Antimicrobial susceptibility test (AST) buyyon tüpüne, bakteri konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde, 25 µl bakteri süspansiyonu ilave edildikten sonra AST buyyon içerisine bir damla Phoenix™ AST indikatörü damlatıldı. Hazırlanan paneller 35°C inkübasyon sıcaklığı sağlayan ve 20 dakikada bir okuma yapan Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) cihazına yerleştirildi (106, 107). *Acinetobacter* olarak tiplendirilen suşlar PFGE yapılmaya kadar %15 gliserol (Riedel-de Haën AG, Germany) içeren triptik soy buyyon besiyerinde (Fluca, 22092) -70 °C'de saklandı (108).

Suşların antibiyotik duyarlılıkları NMIC/ID-55 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix sistemine ilaveten Kirby-Bauer metoduna göre, Mueller Hinton Agar (MHA) kullanılarak standart disk diffüzyon metodu ile de araştırıldı (109). Duyarlılık testlerinin sonuçları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (107, 110).

3.6. Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE) Protokolü

Şekil 4'te Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE) protokolü özetlenmiş ve şekil 5'te PFGE'ne başlamadan önce yapılması gereken ön hazırlıklar listelenmiştir.

3.6.1. İzolatların Hazırlanması

1. Tür düzeyinde tanımlanan ve -70°C'de saklanan bakteri suşları % 5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye) besiyerine ekildi ve 35°C de 20-24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi (111, 112).

2. Saf bir kültür elde etmek için buradan alınan tek koloni tekrar triptikaz soy agar besiyerine pasajlandı ve inkübasyona bırakıldı (111).

3. Üreyen koloniler öze kullanılarak kapaklı cam tüplerdeki 2,5 ml HST içinde süspansiyon edildi (21).

4. Bakteri yoğunluğu CrystalSpec™ nephelometer (Becton Dickinson company, USA) kullanılarak yaklaşık 4 McFarland olacak şekilde ayarlandı (111).

5. Bu hücre süspansiyonundan 1ml alınarak ependorf tüplere aktarıldı ve 13 000 x g'de 4°C'de 1 dakika santrifüj edildi (21, 111).

6. Üstteki HST atılarak pellet boyutu gözle değerlendirildi (21).

7. Tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı (111).

8. Bakteri yoğunluğu, CrystalSpec™ nephelometer (Becton Dickinson company, USA) kullanılarak tekrar yaklaşık 4 McFarland olacak şekilde ayarlandı (111).

3.6.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi.

1. Yukarıda tarif edildiği şekilde HST kullanılarak %2'lik düşük erime ısılı agaroz hazırlandı (111, 112).

2. 200 µl Agaroza-SDS karışımı Ependorf tüplere dağıtılarak 45-50°C'deki su banyosunda bekletildi (111).

3. Buna 200 µl bakteri süspansiyonu eklenerek pipet yardımıyla hücrelerin agaroz içinde homojen şekilde dağılması sağlandı (111, 113).

4. Buzdolabına konularak daha önceden soğutulmuş olan agaroz kalıbının kuyucuklarına hava kabarcığı olmamasına özen göstererek hücre-agaroz-SDS karışımı dağıtıldı (21, 113).

5. Kalıplar önce oda ısısında 10-15 dakika, sonra buzdolabında +4°C'de, 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı (21, 113).

3.6.3. Agar İçerisindeki Hücrelerin Parçalanması:

1. Hücre liziz solüsyonu I hazırlanarak 5 ml'lik steril, kapaklı tüplere 0.5 ml dağıtıldı (111).
2. Kalıptan ıkarılan hücre-agaroz-SDS karışımı liziz solüsyonu I içerisine konuldu (21, 111).
3. Tüpler hafif yatık şekilde çalkalamalı su banyosuna (Resim 4.A) yerleştirildi ve 37 °C'de 1 saat burada tutuldu (111).
4. Bu süre sonunda pipet yardımıyla Liziz solüsyonu I uzaklaştırılarak, yerine 0.5 ml Hücre Liziz Solüsyonu II konuldu (111).
5. 55°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 2 saat bekletildi (21, 111, 113).

3.6.4. Agaroz Kalıpların Yıkınması:

1. Tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletilerek agaroz kalıbın katılaşması sağlandı (111).
2. Pipet yardımıyla liziz solüsyonu II aspire edildi.
3. Agaroz kalıbı dikkatlice 50ml falkon tüplere aktarıldı ve üzerine 4 ml 50°C'ye ısıtılmış steril ultra saf su eklenerek, 50°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 15 dakika yıkandı (111).
4. Süre bitiminde su tamamen boşaltıldı ve ultra saf su ile yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı (21, 111).
5. Su ile yıkama işlemi bittikten sonra üç kez de 50°C'ye ısıtılan 4 ml TE tamponu kullanılarak 15 dakika süresince yıkandı (21, 111).

3.6.5. DNA'nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi:

1. Bir bistüri yardımıyla ¼ oranında kesilen agaroz kalıbı daha önce hazırlanan ve 5 ml'lik steril kapaklı tüplere dağıtılan 100 µl 1x *SmaI* tamponu içine konuldu ve 30°C'deki çalkalamalı su banyosunda 10 dakika bekletildi.
2. Süre sonunda sıvı aspire edilerek, 100 µl *SmaI* enzim karışımı içerisinde agaroz kalıbı bulunan tüplere dağıtıldı (42).
3. Çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
4. Bu aşamadan sonra tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

3.6.6. Elektroforez Jelinin Hazırlaması:

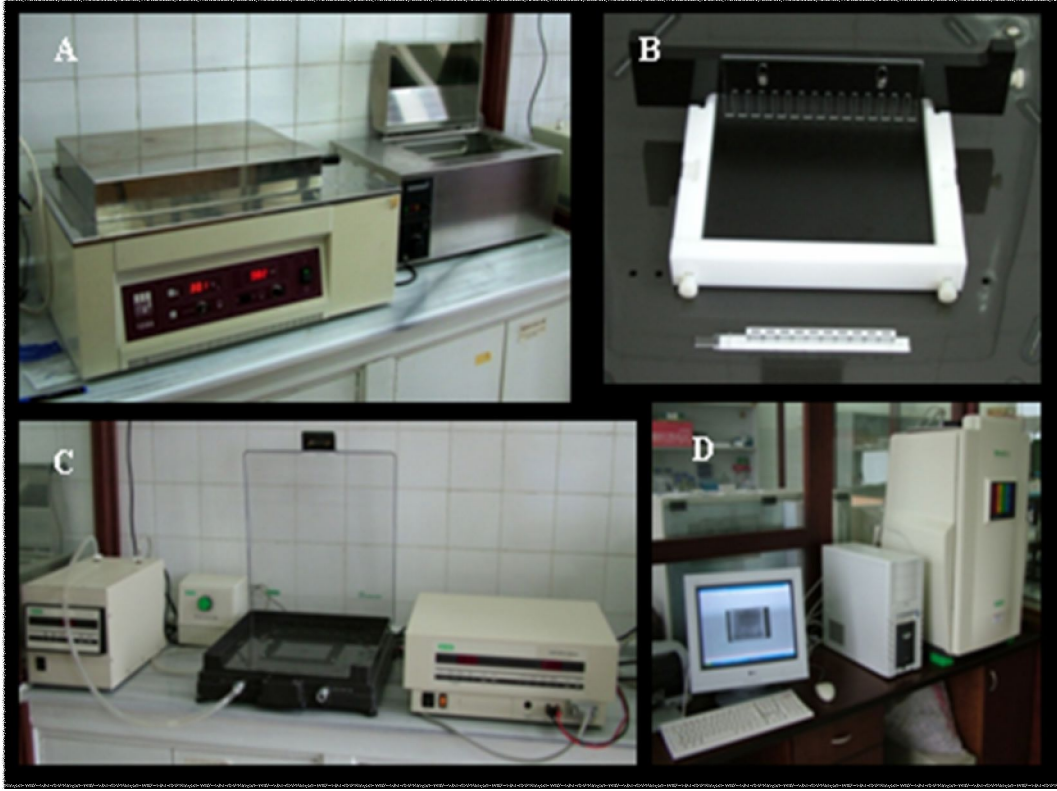
1. Yukarıda tarif edildiği şekilde 100 ml %1'lik pulsed-field certified agarose (Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.
2. Agaroz dökülecek kaset (Resim 4.B) hazırlandı ve su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine yerleştirildi.
3. 15 dişli tarağın (Resim 4.B) dişlerinin uç kısmına agaroz kalıpları yerleştirildi.
4. Agaroz kalıplarının etrafında kalan *SmaI* enzim karışımı kurutma kâğıdı veya havlu kullanılarak uzaklaştırıldı.
5. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, tarak agaroz dökülecek kasete yerleştirildi.
6. 45-50°C sıcaklığında olan agaroz hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kasete döküldü.
7. Katılaşması için oda ısısında 20–30 dakika bekletildikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı.
8. Tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 ml 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına (Resim 4.C) yerleştirildi.

3.6.7. Elektroforez:

Çalışmamızda **CHEF-DR III sistemi** (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (Resim 4.D) kullanıldı. Elektroforez koşulları tablo 11'de gösterildiği gibi ayarlandı.

ELEKTOFOREZ KOŞULLARI	
Başlangıç vuruş süresi	5 sn
Bitiş vuruş süresi	30 sn
Vuruş açısı	120°
Akım	6 V/cm ²
Sıcaklık	14°C
Süre	20 saat

Tablo 11: Elektroforez koşulları



Resim 4: Pulsed-Field Gel Elektroferez (PFGE)'inde kullanılan cihazlar

A:Çalkalamalı su banyosu

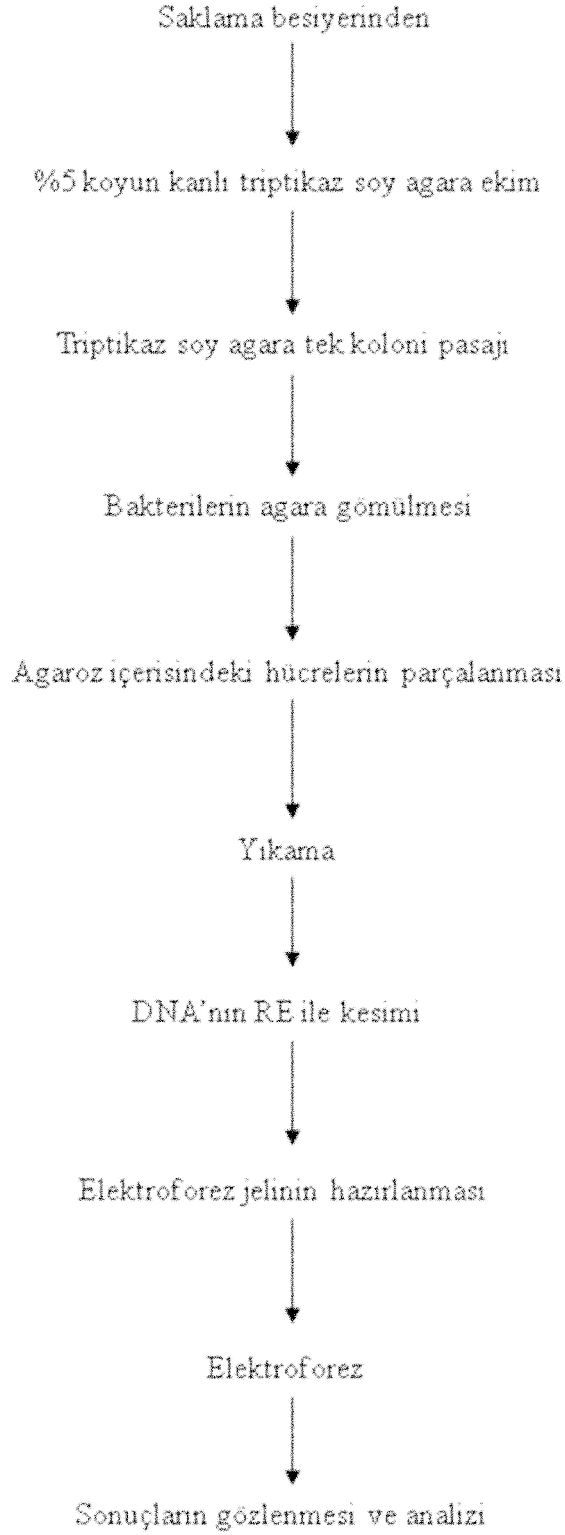
B: PFGE agaroz kaseti ve 15 dişli tarağı

C: CHEF-DR III sistemi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

D: VersaDoc imaging system (Bio-Rad Laboratories Ltd., UK)

3.6.8. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi:

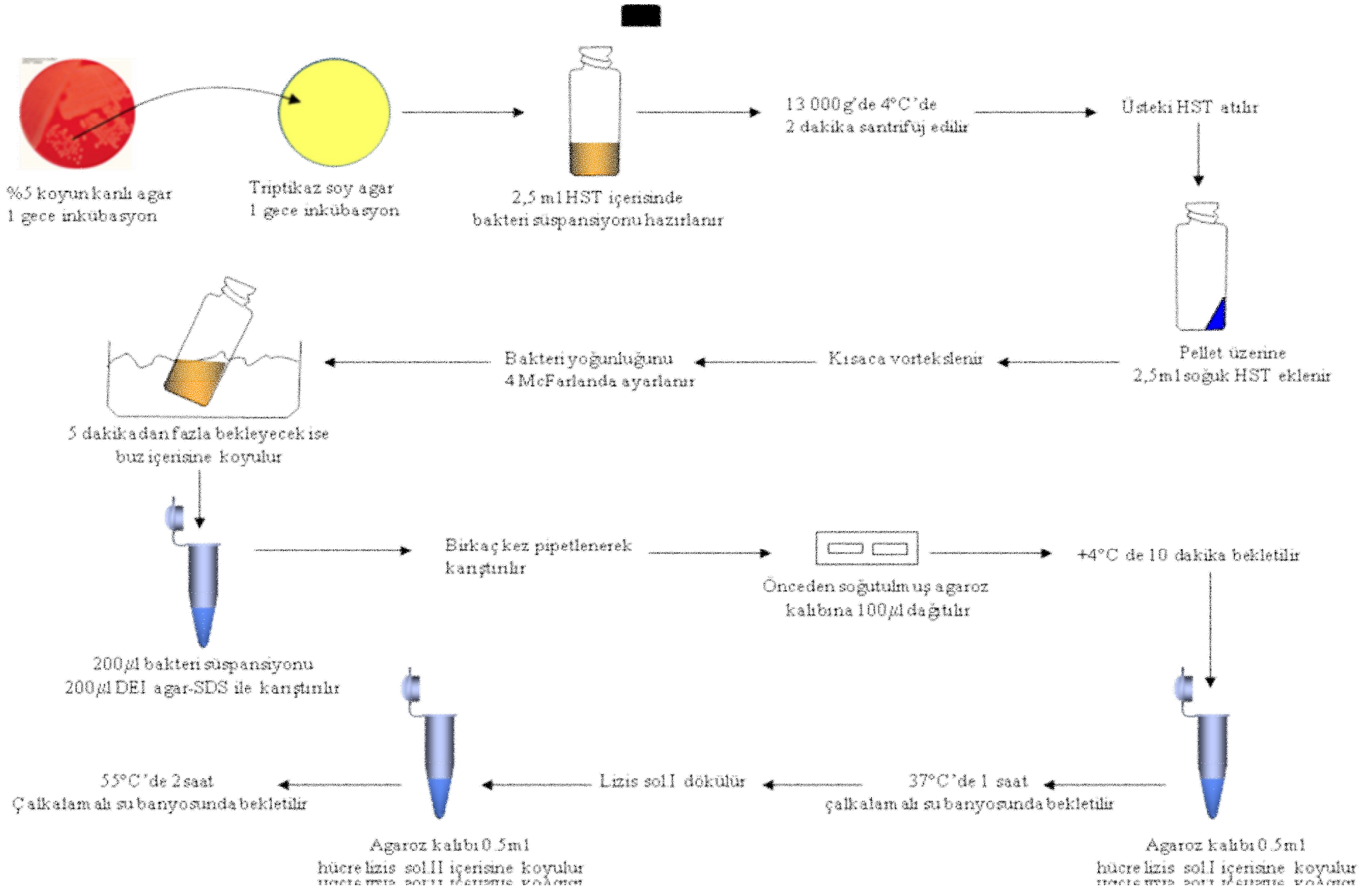
1. Elektroferez sonrasında jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su ile 20 dakika boyandı.
2. Boyanan jel 400 ml ultra saf su içerisinde 45 dakika yıkanarak DNA'ya bağlanmamış boya uzaklaştırıldı.
3. UV ışık altında VersaDoc imaging system (Bio-Rad Laboratories Ltd., UK) (Resim 4.D) kullanılarak DNA bantlarının fotoğrafı çekildi ve kaydedildi.
4. Gözle bant profilleri analiz edildi.
5. Tenover ve ark. tarafından önerilen kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi.



Şekil 4: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) akış şeması

- 1- Agaroz kalıbı buz dolabına konulur.
- 2- Çalkalamalı su banyosu 37°C'ye ayarlanır.
- 3- Su banyosu 50°C'ye ayarlanır.
- 4- SDS 50°C'ye konur.
- 5- Ultra saf ddw 50°C'ye konur.
- 6- 100ml HST hazırlanır buzdolabına konur.
- 7- 200ml TE hazırlanır, otoklavlanır, 50°C'ye konur.
- 8- %2'lik düşük erime ısılı agaroz hazırlanır.
50°C'ye konur.

Şekil 5: PFGE için yapılması gereken ön hazırlık



Tüpler en az 15 dakika
Buz içerisinde bekletilir

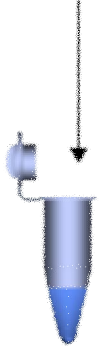
Lizis solü aspire edilir

50°C steril ultra saf sudan 4ml eklenerek
3 kez 15 dakika yıkanır

Bir lam üzerinde ¼ oranında kesilir

Agaroz kalıp şeffaflaşır

50°C TE tamponundan 4ml eklenerek
3 kez 15 dakika yıkanır



Çalkalamalı su banyosunda
30°C'de 10 dakika bekletilir



100 µl Sm aI tamponu
İçine koyulur

100 µl Sm aI enzim
Karışımı içine koyulur

Kalıplar elektroferez için hazırdır

Buz dolabında
15 dakika bekletilir

Çalkalamalı su banyosunda
30°C'de 2 saat bekletilir

Şekil 6: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) protokolü.

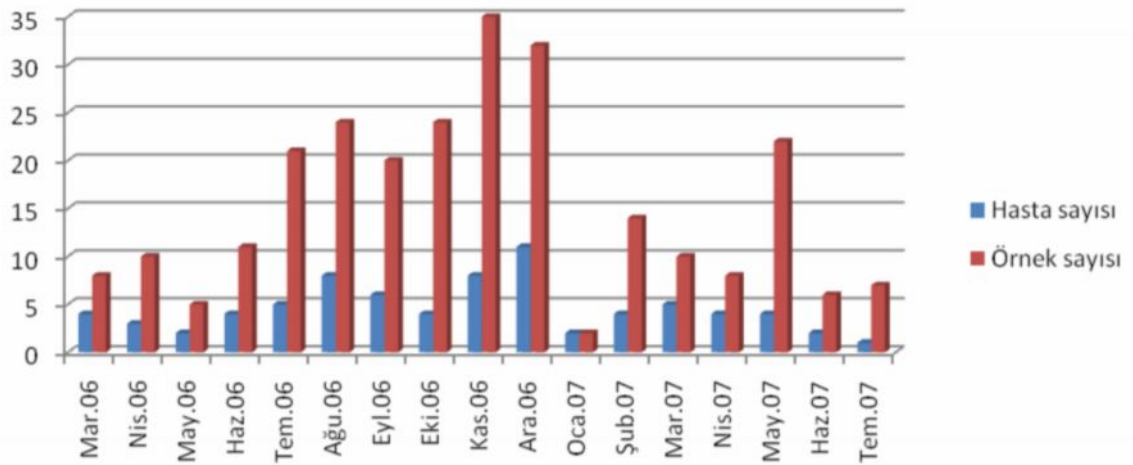
4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 76 hastanın 59 (%77.6)'sı erkek 17 (%22.4)'ü kadındı ve yaş aralığı 7-65 (ortalama yaş: 37)'di. Örneklerin 114 (%47.5)'u trakeal aspirat, 72 (%30)'u kan ve 18 (%7.5)'u kateter kültüründen izole edildi (tablo 9). Örnekler incelendiğinde 42 hastadan (%55.2) 156 örneğin (%65) Temmuz-Aralık aylarını içeren 6 aylık dönemde geldiği görüldü. Şekil 1'de aylara göre hasta sayısı ve izole edilen örnek sayıları verilmiştir.

İZOLASYON YERİ	ÖRNEK SAYISI	YÜZDE (%)
Trakeal aspirat kültürü	114	46.9
Kan kültürü	75	30.9
Kateter kültürü	18	7.4
Yara kültürü	17	7.0
İdrar kültürü	12	4.9
Diren kültürü	2	0.8
Diğer materyaller*	6	2.4
TOPLAM	240	100

Tablo 12: *Acinetobacter* kökenlerinin izole edildikleri materyaller ve görülme oranları.

*Vajen, püy, doku, kültürü v.b



Şekil 7: Aylara göre hasta ve bu hastalardan izole edilen örnek sayıları.

Hastaların 56 (%73.7)'sının dosyaları incelendi. Tablo 13'te Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastalarda *A. baumannii* enfeksiyonu veya kolonizasyonu için potansiyel risk faktörleri ve hastalarda görülme oranları verildi. En sık karşılaşılan risk faktörlerinin invaziv girişimler olduğu ve tüm hastaların en az iki invaziv girişime maruz kaldığı görüldü. Önemli bir risk faktörü olan enfeksiyon öncesi antibiyotik kullanımının 49 hasta (%63.6)'da bulunduğu tespit edildi. Amikasin 11 (%19.6), imipenem 7 (%12.5), piperasilin/tazobaktam 5 (%8.9), sefepim 4 (%7.1) ve vankomisin 2 (%3.6) hasta tarafından kullanılmıştı.

RİSK FAKTÖRLERİ	HASTA SAYISI	YÜZDE (%)
Erkek cinsiyet	60	78
Kronik hastalıklar		
Diabetes mellitus	2	3.6
Kronik akciğer hastalığı	9	16.1
Kardiovasküler hastalık	9	16.1
Tümör	1	1.8
İmmünoşüpresyon	8	14.3
Travma	34	60.7
Yanık	1	1.8
Cerrahi	38	67.9
İnvaziv girişimler		
Üriner kateter	54	96.4
IV kateter	56	100
Parenteral beslenme	5	8.9
Entübasyon	44	78.6
Trakeostomi	23	41.1
Antibiyotik kullanımı	49	63.6

Tablo 13: Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastalarda *A. baumannii* enfeksiyonu veya kolonizasyonu için potansiyel risk faktörlerinin görülme oranları (Kaynak 13, 16, 78'e göre hazırlanmıştır).

Hastaların Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesine yatış nedenleri incelendiğinde travma (%60.7)'ların en önemli nedenler olduğu ve bunlar içerisinde özellikle Araç İçi Trafik Kazaları (AİTK)'nin en büyük gurubu oluşturdukları görüldü. %8.9 oranında görülen enfeksiyonlar ikinci en sık yatış nedeni olup, üç hasta pnömoni, birer hasta da bakteriyemi ve sepsis bulgularıyla yatırılmıştı. Hastaların Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesine yatış nedenleri Tablo 14'te özetlendi.

YATIŞ NEDENİ	HASTA SAYISI	YÜZDE (%)
Travma	34	60.7
AİTK*	19	33.9
ADTK**	2	3.6
Kesici-delici alet yaralanması	6	10.7
Künt travma	6	10.7
Elektrik çarpması	1	1.8
Kronik akciğer hastalığı	4	7.1
Kardiyovasküler hastalık	3	5.4
Enfeksiyon	5	8.9
Pnömoni	3	5.4
Bakteriyemi	1	1.8
Sepsis	1	1.8
Preeklamsi	2	3.6
Diğer***	8	14.3

Tablo 14: Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesine hastaların yatırılış nedenleri.

*Araç İçi Trafik Kazası

**Araç Dışı Trafik Kazası

***Tümör, akut böbrek yetmezliği, barsak perforasyonu, insizyonel herni operasyonu, subaraknoid kanama v.b

Acinetobacter kökenlerinin Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinde en çok hastane kaynaklı pnömoni (%55.4), bakteriyemi (%39.3), idrar yolu enfeksiyonu (%14.3) ve yara enfeksiyonu (%7.1) etkeni oldukları saptandı (Tablo 15). 28 hastada en az iki odakta enfeksiyon olduğu, bu gruptaki 25 hastada pnömoni, 21 hastada ise bakteriyemi bulunduğu görüldü. Pnömoni olgularının hepsi hastaneye yatışın beşinci gününden sonra ortaya çıkan geç başlangıçlı pnömonilerdi ve tüm pnömonilerin %87'si ventilatörle ilişkili pnömoniydi. Hastane kaynaklı pnömoni tanısı konulan hastaların 26 (%84)'sı iyileşmiş, 5 (%16)'i ise ölmüştü.

Acinetobacter kökenlerinin neden olduğu bakteriyemilerde en önemli kaynakların pulmoner (%54.5) ve intravenöz kateter (%18.2) olduğu görüldü. 3 (%13.6) hastada ise primer odak saptanamadı. *Acinetobacter* bakteriyemisi 3 (%13.6) hastada septik şok ve Dissemine İntravasküler Koagülasyona (DİK), 4 (%18) hastada ise ölüme neden olmuştu.

Acinetobacter kökenleri sadece 8 (%14.3) hastada idrar yolu enfeksiyonuna neden olmuştu. İdrar yolu enfeksiyonu gelişen olguların tümünde öncesinde üriner kateter kullanımını olduğu saptandı.

15 (%26.8) hastada *Acinetobacter* kökenleri başta trakeal aspirat ve kan olmak üzere çeşitli materyallerden izole edilmesine karşın, bu hastalarda enfeksiyona neden olmadıkları ve kolonizasyondan kaynaklandıkları gösterildi.

ENFEKSİYON	HASTA SAYISI	YÜZDE (%)
Hastane kaynaklı pnömoni	31	55.4
Ventilatörle ilişkili pnömoni	27	87.0*
Bakteriyemi	22	39.3
Pulmoner kateter	12	54.5**
İntravenöz kateter	4	18.2**
Yara	1	4.55**
İdrar yolu enfeksiyonu	1	4.55**
Nedeni bilinmeyen	4	18.2**
İdrar yolu enfeksiyonu	8	14.3
Yara enfeksiyonu	4	7.1
Menenjit	0	0
Yanık enfeksiyonu	0	0
Kolonizasyon	15	26.8

Tablo 15: Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinde *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonlar.

* Hastane kaynaklı pnömoniler içindeki görülme oranı (%)

** Bakteriyemiler içindeki görülme oranı (%)

Mikrobiyolojik inceleme:

Acinetobacter olduğundan şüphelenilen oksidaz negatif, nonfermentatif, gram negatif kokobasiller biyokimyasal testler ve BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) sistemiyle tür düzeyinde tanımlandı ve örneklerin tümünün *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* kompleks olduğu tespit edildi.

***Acinetobacter* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları:**

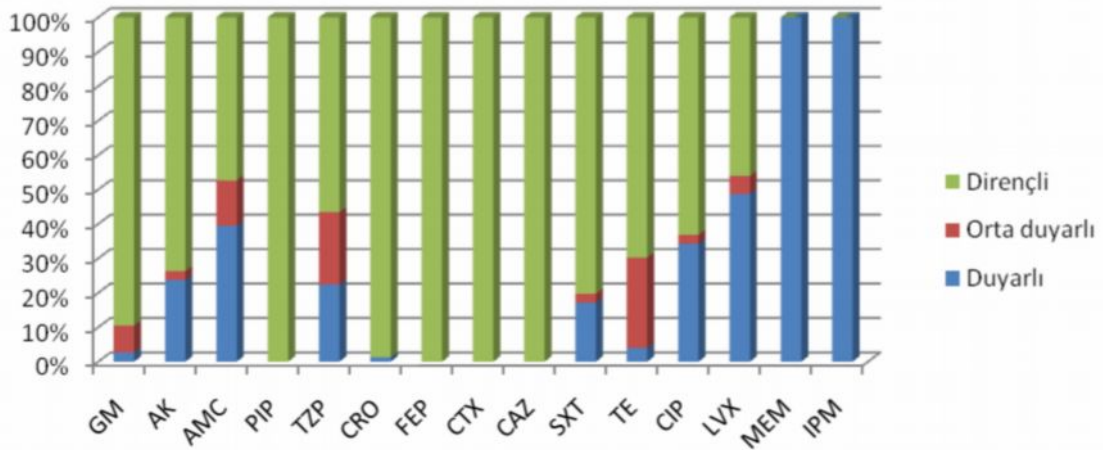
Acinetobacter kökenlerinin duyarlılık paternlerini belirlemek amacıyla 15 antibiyotik kullanıldı. Bu antibiyotikler arasında en etkili olanların karbapenem gurubu antibiyotikler olduğu, imipenem ve meropeneme dirençli izolat bulunmadığı tespit edildi. Karbapenemler dışındaki beta laktam antibiyotiklerin ise etkinliklerinin çok düşük olduğu görüldü. Seftriaksona sadece 1 izolat (%1.3) duyarlı iken sefepim, sefotaksim, seftazidime ve piperasiline duyarlı izolat olmadığı belirlendi. Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarından piperasilin/tazobaktama 17 izolat (%22.4)'m, ampisilin/sulbaktama ise 30 izolat (%39.4)'m duyarlı olduğu saptandı.

Aminoglikozid antibiyotiklerden amikasinine karşı 18 izolat (%23.7)'m, gentamisine karşı ise 2 izolat (%2.6)'m duyarlı olduğu belirlendi.

Kinolon gurubu antibiyotikler arasında levofloksasinin *Acinetobacter* kökenlerine karşı daha etkili olduğu, levofloksasine 37 izolat (%48.7) duyarlıyken siprofloksasine 26 izolat (%34.2)'m duyarlı olduğu görüldü.

Diğer iki farklı antibiyotik gurubunda yeralan tetrasikline 3 izolat (%4), trimetoprim/ sülfometaksozole 13 izolat (%17.1) duyarlı bulundu.

Acinetobacter kökenlerinin kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlı, orta duyarlı ve dirençli izolat sayıları tablo 16'da, antibiyotik duyarlılık oranları şekil 8'de verildi.



Şekil 8: *Acinetobacter* kökenlerinin antibiyotik duyarlılık oranları

GM: Gentamisin, AK:Amikasin, AMC:Amoksisilin/klavulanik asit, PIP: Piperasilin, TZP:Piperasilin/tazobaktam, CRO:Seftriakson, FEP: Sefepim, CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, SXT: Trimetoprim/Sülfametaksazol, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, LVX: Levofloksasin, MEM: Meropenem, IPM: İmipenem

	DUYARLI		ORTA DUYARLI		DİRENÇLİ	
	İzolat sayısı	Yüzde (%)	İzolat sayısı	Yüzde (%)	İzolat sayısı	Yüzde (%)
G	2	2,6	6	7.9	68	89.5
AK	18	23.7	2	2.6	56	73.7
AMC	30	39.4	10	13.2	36	47.4
PIP	0	0	0	0	76	100
TZP	17	22.4	16	21	43	56.6
CRO	1	1.3	0	0	75	98.7
FEP	0	0	0	0	76	100
CTX	0	0	0	0	76	100
CAZ	0	0	0	0	76	100
SXT	13	17.1	2	2.6	61	80.3
TE	3	4	20	26.3	53	69.7
CIP	26	34.2	2	2.6	48	63.2
LVX	37	48.7	4	5.3	35	46
MEM	76	100	0	0	0	0
IPM	76	100	0	0	0	0

Tablo 16: *Acinetobacter* kökenlerinin kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlı, orta duyarlı ve dirençli izolat sayıları.

GM: Gentamisin, AK:Amikasin, AMC:Amoksisilin/klavulanik asit, PIP: Piperasilin, TZP:Piperasilin/tazobaktam, CRO:Seftriakson, FEP: Sefepim, CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, SXT: Trimetoprim/Sülfametaksazol, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, LVX: Levofloksasin, MEM: Meropenem, IPM: İmipenem

Antibiyotiplendirme: *Acinetobacter* kökenlerinin antibiyotiplendirmesi gentamisin, amikasin, ampisilin/sulbaktam, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, seftriakson , sefepim, sefotaksim, seftazidim, trimetoprim/sülfametaksazol, tetrasiklin, siprofloksasin, levofloksasin, meropenem ve imipenem duyarlılık paternleri kullanılarak yapıldı. *Acinetobacter* kökenlerinin 15 farklı antibiyotik duyarlılık paterni gösterdikleri belirlendi ve bu paternler Antibiyotip I-XV olarak isimlendirildi. Antibiyotip I-XV'in antibiyotik duyarlılıkları Tablo:17'de gösterildi.

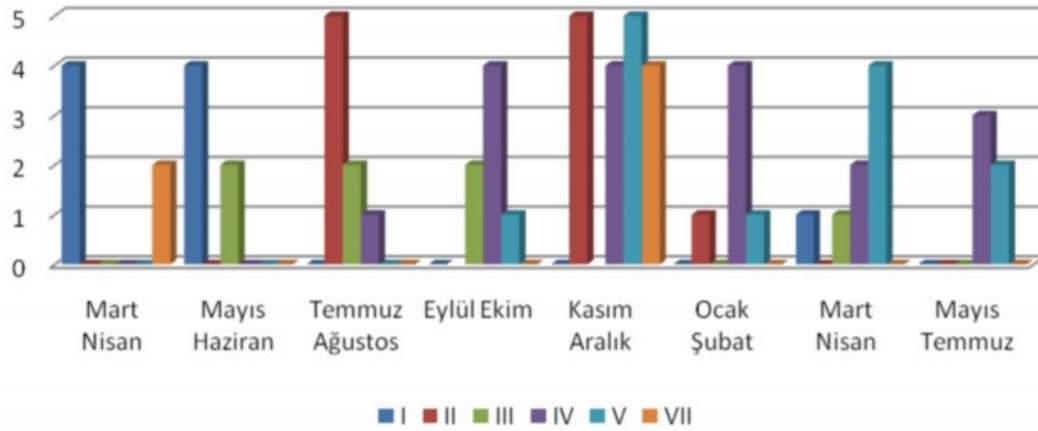
	G	AK	AMC	PIP	TZP	CRO	FEP	CTX	CAZ	SXT	TE	CIP	LVX	MEM	IPM
I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
III	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
V	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
VI	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
VII	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
VIII	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S
IX	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
X	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
XI	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
XII	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
XIII	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
XIV	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
XV	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S

Tablo 17: Antibiyotip I-XV'in antibiyotiplendirmede kullanılan antibiyotiklere duyarlılık paternleri.

18 izolat (%27.6)'ta saptanan Antibiyotip IV'ün en sık karşılaşılan antibiyotip olduğu, Antibiyotip I'in Mart-Haziran 2006'da pik yaptığı, Antibiyotip II'nin Temmuz-Ağustos 2006 ve Kasım-Aralık 2006, Antibiyotip V'in Kasım-Aralık 2006 ve Mart-Nisan 2007 tarihleri arasında ikişer pik yaptıkları görüldü. Antibiyotip I-XV'in iki aylık dönemler içerisindeki izolasyon sayıları tablo 18'de verildi ve bunlar arasından en sık görülen altısı (Antibiyotip I, II, III, IV, V, VII) seçilerek dönem içerisindeki dağılımları grafik halinde Şekil 9'da gösterildi.

	Mart Nisan	Mayıs Haziran	Temmuz Ağustos	Eylül Ekim	Kasım Aralık	Ocak Şubat	Mart Nisan	Mayıs Temmuz	Toplam	Yüzde
I	4	4	-	-	-	-	1	-	9	11,8
II	-	-	5	-	5	1	-	-	11	14,5
III	-	2	2	2	-	-	1	-	7	9,1
IV	-	-	1	4	4	4	2	3	18	23,7
V	-	-	-	1	5	1	4	2	13	17,1
VI	-	-	-	1	-	-	-	1	2	2,6
VII	2	-	-	-	4	-	-	-	6	8
VIII	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2,7
IX	-	-	1	1	-	-	-	-	2	2,7
X	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1,3
XI	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1,3
XII	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1,3
XIII	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1,3
XIV	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1,3
XV	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1,3

Tablo 18: Antibiyotip I-XV'in iki aylık dönemler içerisindeki izolasyon sayıları.

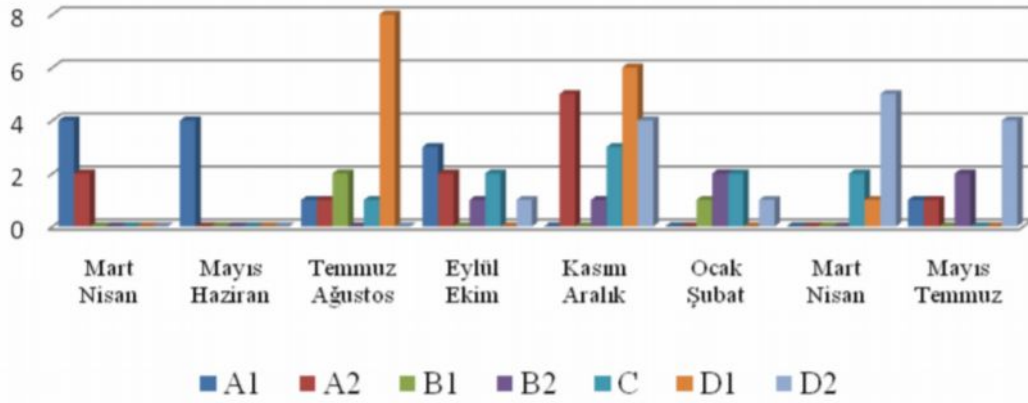


Şekil 9: En sık görülen 6 antibiyotipin (I, II, III, IV, V, VII) iki aylık dönemler içerisindeki izolasyon sayıları.

Çalışma süresi boyunca izole edilen 76 *Acinetobacter* suşu PFGE ile analiz edildi. Buna göre 7 (A-G) farklı ana klon ve A, B ve D klonlarında ikişer subtip olduğu belirlendi. Suşların 24 (%31.6)'sının A, 9 (%11.8)'inin B, 10 (%13.2)'sinin C, 30 (%39.4)'ünün D klonuna ait olduğu görüldü. E, F ve G klonlarına ait birer (%1.3) suş saptandı. Tablo 19' da A, B ve D klonlarına ait subtiplerin ve C, E, F, G klonlarının iki aylık dönemler halinde görülme oranları, şekil 10'da C klonu ile A, B, D klonlarına ait subtiplerin aylara göre dağılımı verilmiştir.

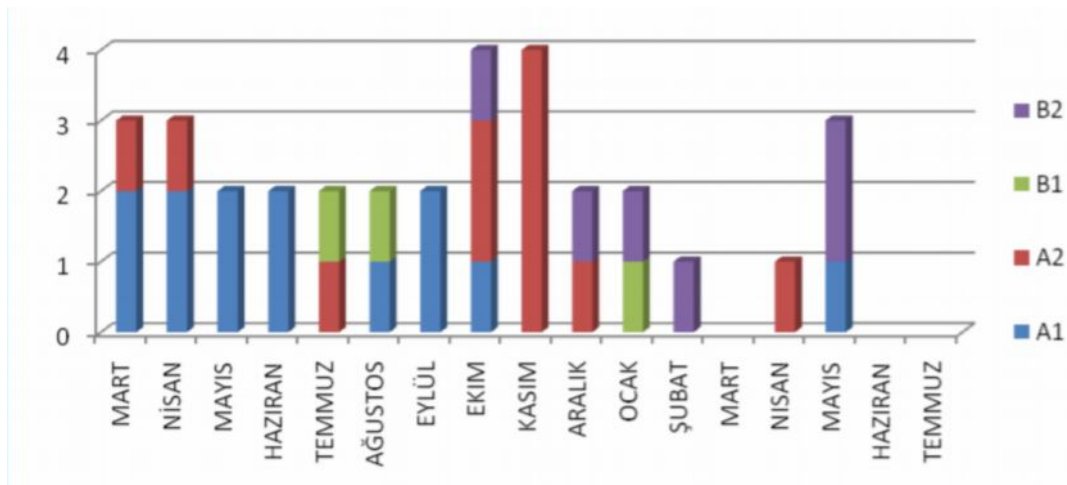
	Mart Nisan	Mayıs Haziran	Temmuz Ağustos	Eylül Ekim	Kasım Aralık	Ocak Şubat	Mart Nisan	Mayıs Temmuz	Toplam	Yüzde
A1	4	4	1	3	0	0	0	1	13	17.1
A2	2	0	1	2	5	0	1	0	11	14.5
B1	0	0	2	0	0	1	0	0	3	3.9
B2	0	0	0	1	1	2	0	2	6	7.9
C	0	1	1	2	3	2	2	0	10	13.2
D1	0	0	8	0	6	0	1	0	15	19.7
D2	0	0	0	1	4	1	5	4	15	19.7
E	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1.3
F	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1.3
G	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1.3

Tablo 19: A, B ve D klonlarına ait subtiplerin ve C, E, F, G klonlarının iki aylık dönemler halinde görülme oranları.

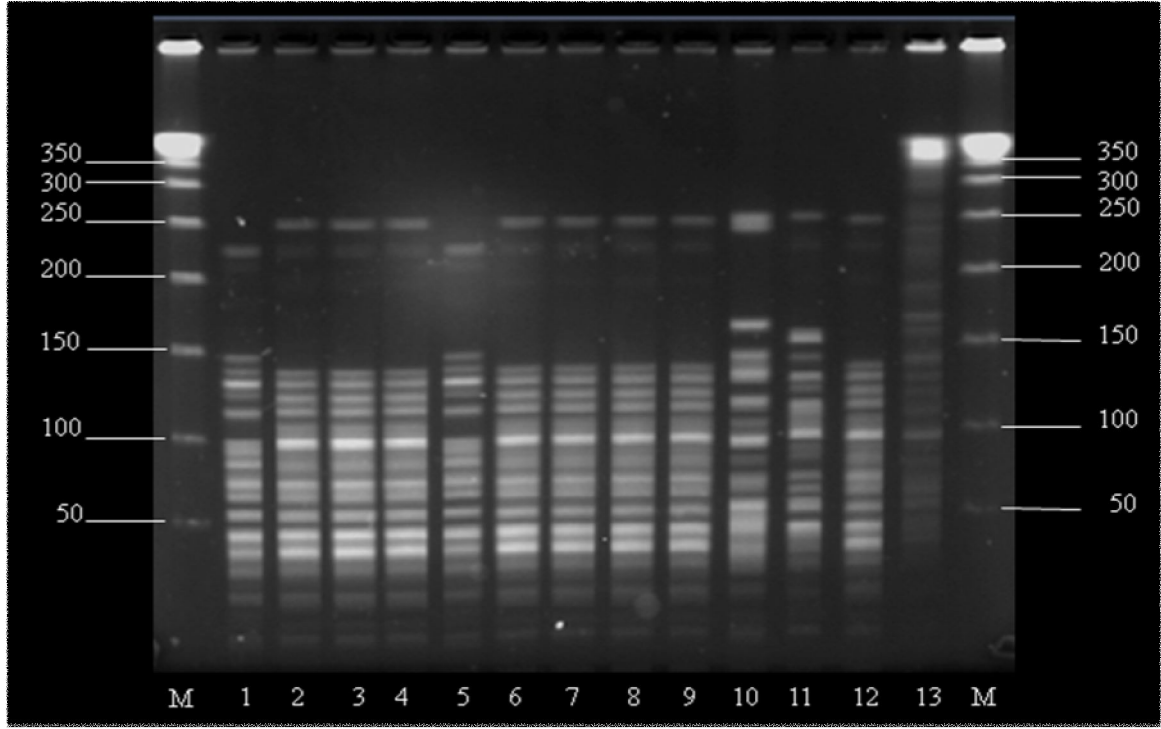


Şekil 10: C klonu ile A, B ve D klonlarına ait subtiplerin aylara göre dağılımı.

Çalışmamızda 13 izolatta bulunduğunu belirlediğimiz A1 subtipi belirgin olarak iki dönemde yoğunlaşmıştı. Mart-Haziran 2006'da bu PFGE paternini sergileyen 8 (%61.5) izolat olduğu saptandı, Temmuz 2006'da herhangi bir örnekten izole edilemedi, ancak Ağustos-Ekim 2006 tarihlerinde tekrar 4 (%30.7) izolatta olduğu belirlendi. Ocak-Temmuz 2007 tarihlerini içeren yedi aylık dönemde sadece bir izolatta saptandı. A2 subtipinin 10 izolatta bulunduğu ve bunların 7 (%70)'sinin Ekim-Aralık 2006 tarihlerinde gelen örneklerden izole edildiği belirlendi. Sadece 6 izolatta bulunduğu belirlenen B2 subtipini taşıyan 2 (%50) izolat Mayıs 2007'de izole edildi. 3 izolatın sergilediği B1 subtipinin ise yoğunlaştığı belirli bir dönem bulunamadı. Şekil 11'de A ve B klonlarında bulunan dört subtipin aylara göre dağılımları, resim 5'te Mart-Haziran 2006 tarihleri arasında izole edilen ilk 13 örneğe ait PFGE paternleri verilmiştir.

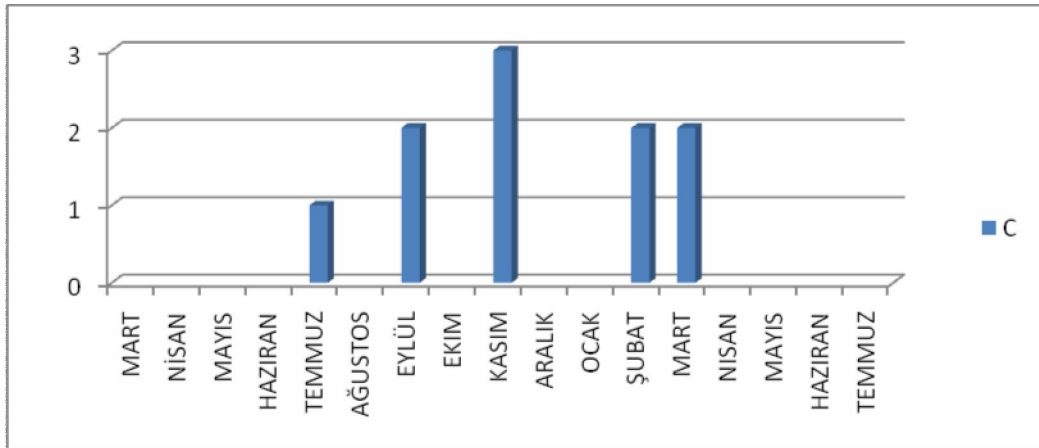


Şekil 11: A ve B klonlarında bulunan dört subtipin aylara göre dağılımları.

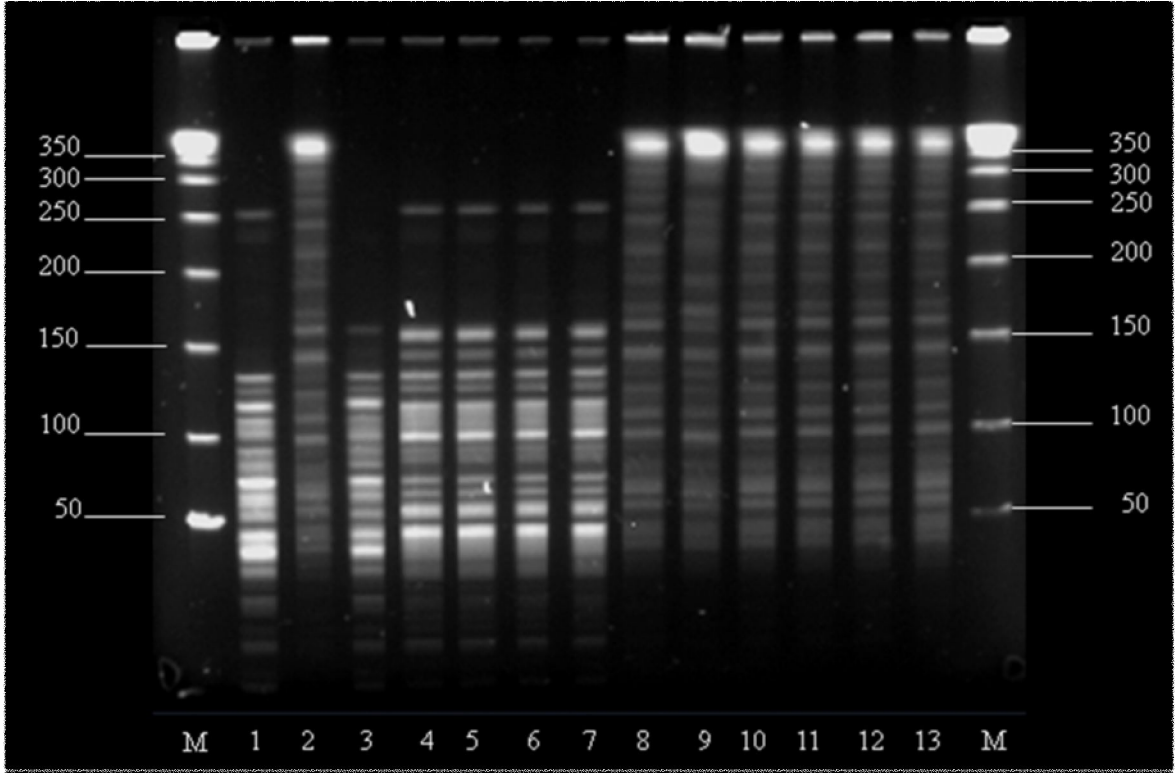


Resim 5: Mart - Temmuz 2006 tarihleri arasında izole edilen ilk 13 *Acinetobacter* kökeninin *Sma*I ile kesilen genomik DNA'sına ait PFGE paternleri. M, Lambda DNA leader; 1 ve 5, A2 subtipine; 2-4, 6-9 ve 12, A1 subtipine; 10, E subtipine; 11, C subtipine; 13, D1 subtipine ait DNA paterni.

Toplam 10 *Acinetobacter* kökeninde görülen C klonuna ait PFGE paterni ilk kez Temmuz 2006'da bir izolatta belirlendi. Eylül-Kasım 2006'da 5 (%50), Şubat-Mart 2007'de ise 4 (%40) örnekten izole edildi. Şekil 6'da C klonunun aylara göre dağılımı, resim 3'te Şubat-Mart 2007 tarihleri arasında izole edilen 13 *Acinetobacter* kökenine ait PFGE paternleri görülmektedir.

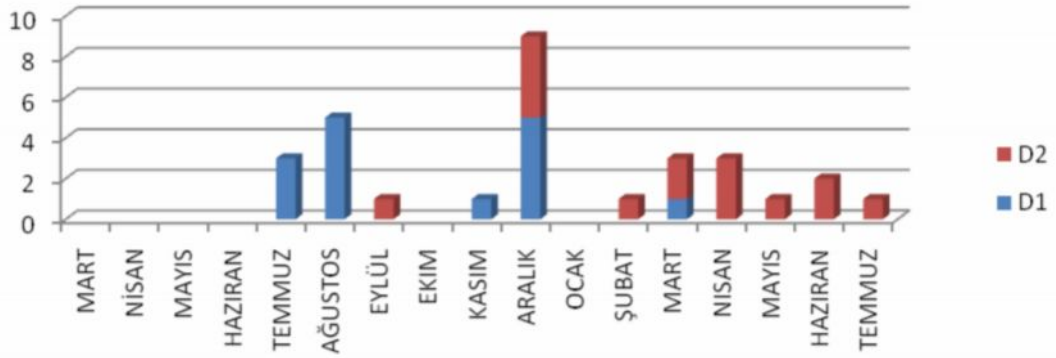


Şekil 12: C klonunun aylara göre dağılımı.

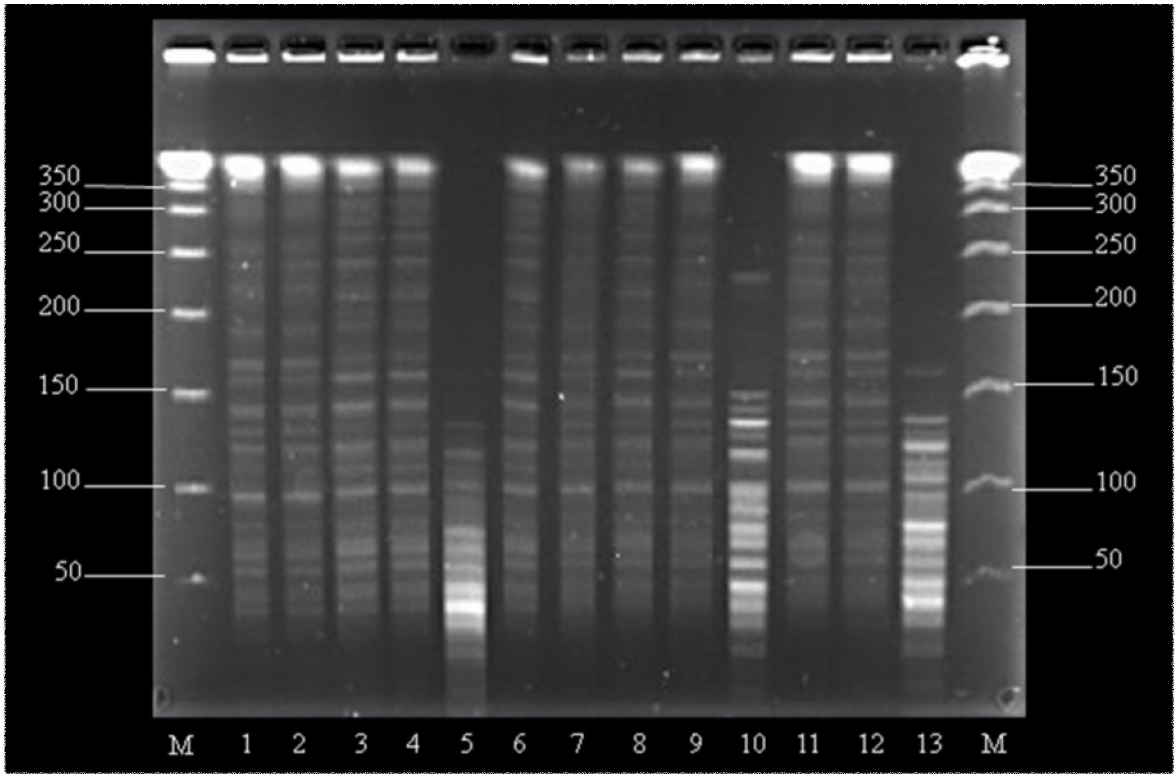


Resim 6: 02 Ocak 2007 – 24 Nisan 2007 tarihleri arasında izole edilen 13 *Acinetobacter* kökeninin SmaI ile kesilen genomik DNA'sına ait PFGE paternleri. M, Lambda DNA leader; 1, B1; 2,8,10-13, D2 subtipine; 3, B2 subtipine; 4-7, C subtipine; 9, D1 subtipine ait DNA bant paternleri.

15 *Acinetobacter* kökeninde saptanan D1 subtipi ilk kez Temmuz-Ağustos 2006'da 8 (%53.3) klinik örnekten izole edildi, sonraki 2 ayda herhangi bir hastada enfeksiyon oluşturmadığı, ancak Kasım-Aralık 2006'da tekrar pik yaparak 6 (%40) hastadan izole edildiği saptandı. İlk kez Eylül 2006'da bir izolatta görülen D2 subtipinin toplam 15 *Acinetobacter* kökeninde bulunduğu belirlendi. D1 subtipinin ikinci kez pik yaptığı Aralık 2006'da 4 (%26.7) izolatta, Şubat-Temmuz 2007 tarihlerinde ise toplam 10 (%66.7) izolatta saptandı. Şekil 7'de D klonunda bulunan iki subtipin aylara göre dağılımı, resim 4'te 30 Kasım-26 Aralık 2006 tarihlerinde izole edilen 12 *Acinetobacter* kökenine ait PFGE paternleri görülmektedir.



Şekil 13: D klonunda bulunan iki subtipin aylara göre dağılımı.



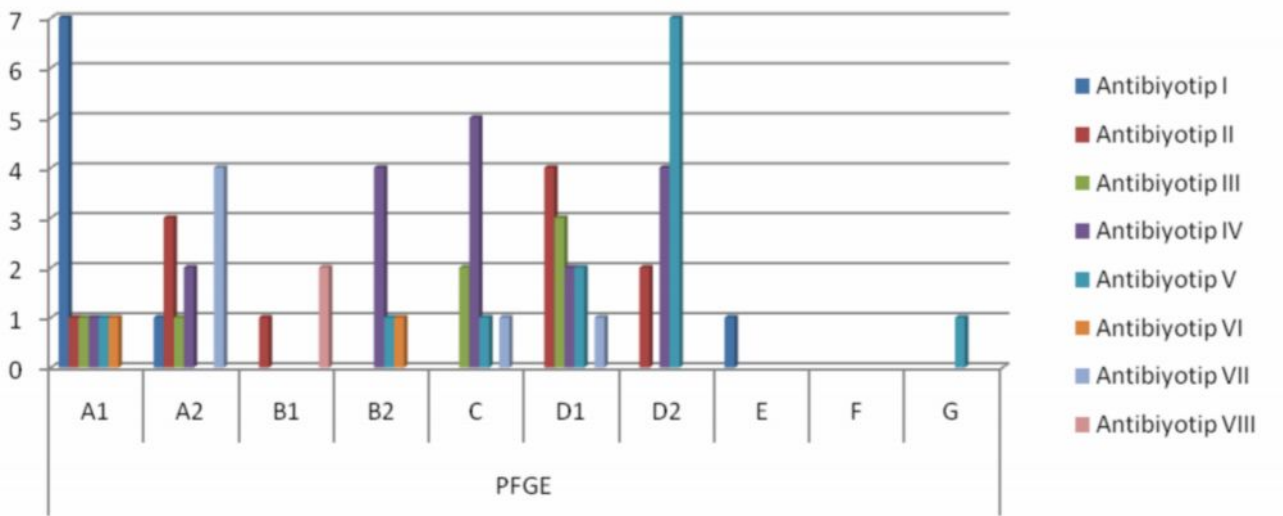
Resim 7: 30 Kasım 2006 - 02 Ocak 2007 tarihlerinde izole edilen 13 *Acinetobacter* kökeninin SmaI ile kesilen genomik DNA'sına ait PFGE paternleri. M, Lambda DNA leader; 1, 2, 7, 9, 11, 12, D1 subtipine; 3, 4, 6, 8 D2 subtipine; 5 ve 13, B2 subtipine; 10, A2 subtipine ait DNA paternleri.

PFGE klonları ile en sık görülen antibiyotik profilleri karşılaştırıldığında; A1 subtipinde yeralan 13 izolatin 7 (%53.8)'inde Antibiyotip I, A2 subtipi sergileyen 11 izolatin 4 (%36.4)'ünde Antibiyotip VII, C klonunda yeralan 10 izolatin 5 (%50)'sinde Antibiyotip IV, D1 subtipinde yeralan 15 izolatin 4 (% 26.7)'sinde Antibiyotip II, 3 (% 20)

'sinde Antibiyotip III ve D2 subtipi sergileyen 15 izolatın 7 (%46.7)'sinde Antibiyotip V duyarlılık profili saptanmıştır. Antibiyotip I-XV'in altı PFGE klonu ve subgruplarındaki dağılımı Tablo:20'de, *Acinetobacter* kökeninin en sık sergiledikleri antibiyotipler olan Antibiyotip I-VIII'in altı PFGE klonu ve subgruplarındaki dağılımı şekil 20'de verilmiştir.

	A1	A2	B1	B2	C	D1	D2	E	F	G	Toplam
I	7	1	-	-	-	-	-	1	-	-	9
II	1	3	1	-	-	4	2	-	-	-	11
III	1	1	-	-	2	3	-	-	-	-	7
IV	1	2	-	4	5	2	4	-	-	-	18
V	1	-	-	1	1	2	7	-	-	1	13
VI	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2
VII	-	4	-	-	1	1	-	-	-	-	6
VIII	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2
IX	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2
X	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
XI	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
XII	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
XIII	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
XIV	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
XV	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1

Tablo 20: Antibiyotip I-XV'in altı PFGE klonarı ve subgruplarındaki dağılımı.



Şekil 14: Antibiyotip I-VIII'in altı PFGE klonları ve subgruplarındaki dağılımı.

İzolat no	İzolasyon tarihi	Materyal	PFGE	Antibiyotip	GM	AK	AMC	PIP	TZP	CRO	FEP	CTX	CAZ	SXT	TE	CIP	LVX	MEM	IMP
1	19.03.2006	T.aspirat	A2	VII	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
2	25.03.2006	Kan	A1	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
3	30.03.2006	Yara	A1	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
4	02.04.2006	T.aspirat	A1	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S
5	02.04.2006	T.aspirat	A2	VII	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
6	11.04.2006	Kan	A1	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
7	08.05.2006	T.aspirat	A1	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S
8	10.05.2006	T.aspirat	A1	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
9	04.06.2006	Doku	A1	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
10	07.06.2006	Katater	E	I	I	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
11	13.06.2006	T.aspirat	C	III	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S
12	26.06.2006	Kan	A1	III	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
13	02.07.2006	T.aspirat	D1	IV	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
14	07.07.2006	T.aspirat	D1	II	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
15	10.07.2006	T.aspirat	A2	II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S
16	13.07.2006	Vagen	D1	X	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
17	26.07.2006	T.aspirat	B1	VIII	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S
18	01.08.2006	T.aspirat	D1	III	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
19	07.08.2006	T.aspirat	D1	II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
20	08.08.2006	Kan	D1	III	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
21	20.08.2006	Kan	F	XI	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
22	21.08.2006	T.aspirat	B1	VIII	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S
23	21.08.2006	Yara	A1	II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
24	27.08.2006	Kan	D1	II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
25	29.08.2006	T.aspirat	D1	IX	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
26	01.09.2006	T.aspirat	C	III	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
27	15.09.2006	Kan	D2	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

İzolasyon no	İzolasyon tarihi	Materyal	PFGE	Antibiyotip	GM	AK	AMC	PIP	TZP	CRO	FEP	CTX	CAZ	SXT	TE	CIP	LVX	MEM	IMP
28	18.09.2006	T.aspirat	G	V	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
29	23.09.2006	Kan	A1	XII	S	S	S	R	S	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S
30	24.09.2006	T.aspirat	C	IX	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
31	28.09.2006	Kan	A1	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
32	03.10.2006	T.aspirat	B2	IV	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	S	S
33	12.10.2006	Kan	A2	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S
34	23.10.2006	İdrar	A1	VI	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S
35	30.10.2006	Kan	A2	III	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S
36	02.11.2006	Kan	A2	VII	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S
37	09.11.2006	T.aspirat	C	V	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
38	09.11.2006	İdrar	C	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
39	10.11.2006	T.aspirat	A2	VII	R	S	I	R	S	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S
40	17.11.2006	T.aspirat	A2	II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
41	17.11.2006	T.aspirat	A2	IV	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S
42	20.11.2006	T.aspirat	C	VII	R	S	I	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
43	30.11.2006	T.aspirat	D1	XV	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S
44	05.12.2006	T.aspirat	D1	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
45	05.12.2006	Yara	D2	V	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
46	05.12.2006	Kan	D2	II	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
47	11.12.2006	T.aspirat	B2	V	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
48	13.12.2006	Yara	D2	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
49	14.12.2006	Kan	D1	V	I	R	I	R	I	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S
50	15.12.2006	Kan	D2	II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S
51	19.12.2006	T.aspirat	D1	V	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S
52	23.12.2006	T.aspirat	A2	II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
53	25.12.2006	İdrar	D1	II	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

İzolasyon no	İzolasyon tarihi	Materyal	PFGE	Antibiyotip	GM	AK	AMC	PIP	TZP	CRO	FEP	CTX	CAZ	SXT	TE	CIP	LVX	MEM	IMP
54	26.12.2006	T.aspirat	D1	VII	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S
55	02.01.2007	T.aspirat	B2	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	S	S
56	02.01.2007	T.aspirat	B1	II	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
57	12.02.2007	Yara	D2	V	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
58	16.02.2007	T.aspirat	B2	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
59	27.02.2007	Kan	C	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
60	27.02.2007	Kan	C	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
61	01.03.2007	Katater	C	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
62	05.03.2007	T.aspirat	C	IV	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
63	11.03.2007	T.aspirat	D2	V	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
64	14.03.2007	T.aspirat	D1	III	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
65	22.03.2007	Kan	D2	V	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
66	17.04.2007	T.aspirat	D2	V	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
67	21.04.2007	T.aspirat	D2	XIII	R	S	R	R	I	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S
68	24.04.2007	T.aspirat	D2	V	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
69	30.04.2007	T.aspirat	A2	I	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	S	S
70	08.05.2007	T.aspirat	A1	V	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
71	17.05.2007	Kanül	D2	XIV	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
72	23.05.2007	Katerer	B2	VI	R	S	R	R	I	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S
73	31.05.2007	Kan	B2	IV	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	I	R	I	S	S
74	15.06.2007	Katerer	D2	IV	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S
75	16.06.2007	Kan	D2	IV	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S
76	04.07.2007	T.aspirat	D2	V	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S

Tablo 21: Çalışmaya alınan *Acinetobacter* kökenlerinin PFGE, antibiyotip ve antibiyotik duyarlılıkları

5. TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonları hastanede kalış süresini uzatarak, mortalite ve morbidite oranlarını arttıran ve tedavi maliyetlerini yükselterek ekonomik kayıplara yol açan önemli bir sağlık problemidir (1, 2, 3, 4). Amerika’da her yıl 88 000 hastanın ölümüne yolaçan 2 milyon hastane kaynaklı enfeksiyon oluşmakta ve 4,5 milyar dolarlık ekonomik kayba neden olmaktadır (23, 91, 114). Hasta başına ortalama maliyet artışı 1800 dolar (1000-4500 dolar) kadardır (115). Khan ve arkadaşları tarafından 1995 yılında hastane enfeksiyonlarının Türkiye’ye maliyetinin 48 milyon dolar olduğu rapor edilmiştir (116). Kayıpların en önemli nedenlerinden biri hastane enfeksiyonlarının hastanede kalış süresini 4-33,5 gün kadar uzatmalarıdır. Hastanede kalış süresinin uzaması hematolojik, biyokimyasal, mikrobiyolojik ve radyolojik testler ile cerrahi girişimlerin artmasına neden olmaktadır (115). Kayıpları yükselten diğer önemli bir neden antibiyotik kullanımındaki artıştır ve tedaviye yüklediği günlük ek maliyet 48,5-111,7 dolardır (114). Neden oldukları mortalite artışı ise %4-33 kadardır ve en yüksek mortalite oranı hastane kaynaklı pnömoni sırasında görülmektedir (114).

Hastane enfeksiyonu etkeni olarak önemleri her geçen gün artan *Acinetobacter* kökenleri, doğada toprak ve sularda yaygın olarak bulunan fırsatçı patojenlerdir (117, 118). Birçok antibiyotiğe çoklu direnç göstermeleri, kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmeleri, farklı ısı ve pH değerlerinde yaşayabilmeleri nedeniyle günümüzde *Pseudomonas* cinsi bakterilerle birlikte hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralarda yer alır hale gelmişlerdir (14, 119, 120). Özellikle antibiyotiklerin aşırı ve kontrolsüz kullanıldığı, invaziv tanı ve tedavi prosedürlerinin sık uygulandığı Yoğun Bakım Ünitelerinde önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadırlar (44, 45, 46). Son 30 yılda pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu ve cerrahi yara enfeksiyonlarında görülme sıklığı artan tek gram negatif bakteri oldukları ve ventilatörle ilişkili pnömoni ile kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık nedeni haline geldikleri gösterilmiştir (3, 17, 47). Hastanemizin Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinden gelen örneklerden izole edilen *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonlar incelendiğinde en sık pnömoni (%57.1) ve bakteriyemi (%39.3)’ye neden oldukları,

bunları sırasıyla idrar yolu enfeksiyonu (%14.3) ve yara enfeksiyonlarının (%8.9) takip ettiği görülmüştür.

Önemli hastane patojenleri olmalarına karşın *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu toplumdaki edinilmiş enfeksiyonlar son derece nadir olarak rapor edilmektedir (7). Bizim çalışmamızda da *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonların hiçbirinin toplum kaynaklı olmadığı ve tümünün hastaneye yatış sonrasında gelişen hastane kaynaklı enfeksiyonlar oldukları belirlenmiştir.

Acinetobacter kökenlerinin en sık neden olduğu hastane kaynaklı enfeksiyon olan pnömoni sıklıkla mekanik ventilasyonun bir komplikasyonu olarak ortaya çıkmaktadır (8, 12, 33, 44, 49). Ülkemizde Yoğun Bakım Ünitelerinde ventilatörle ilişkili pnömoni %18.9 oranında gelişmekte ve bunların %29.2'si *Acinetobacter* kökenleriyle meydana gelmektedir (3). Çalışmamızda da *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu en sık enfeksiyonun 32 hasta (%57.1)'da görülen pnömoni olduğu ve bunların %87'sinin mekanik ventilasyona bağlı olarak geliştiği belirlenmiştir.

Leblebicioğlu ve arkadaşlarının yaptığı çok merkezli bir çalışmada *Acinetobacter* kökenlerinin Türkiye'de kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının da en sık (%23.2) nedeni oldukları tespit edilmiştir (3). Bakteriyemilerde en sık izole edilen *Acinetobacter* türü *A. baumannii*'dir ve en önemli kaynakları intravenöz ve solunum yolu kateterleridir (11, 54). Cerrahi yara, yanık ve idrar yolu enfeksiyonları bakteriyeminin daha az sıklıkla karşılaşılan kaynaklarıdır (33). Bakteriyemilerin %21-70 kadarında ise herhangi bir kaynak tespit edilememektedir (54). Çalışmamızda da *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu bakteriyemilerde en önemli kaynakların solunum yolu (%56) ve intravenöz kateterler (%16) olduğu belirlenmiştir. 4 (%18.2) hastada ise primer odak saptanamamıştır.

A. baumannii'nin neden olduğu bakteriyemilerde %25-30 sıklıkla septik şok ve Dissemine İntravasküler Koagülasyon (DİK) meydana gelmekte ve hastaların %17-46'sı ölmektedir (33, 54, 58). Çalıştığımız süre içerisinde *Acinetobacter* bakteriyemisi 3 (%13.6) hastada septik şok ve Dissemine İntravasküler Koagülasyona (DİK), 4 (%18) hastada ise ölüme neden olmuştur. Septik şok, DİK ve ölüm gelişme oranımızın belirgin şekilde düşük olduğu görülmektedir.

En sık neden haline gelemeselerde son 20 yılda *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının görülme sıklığında anlamlı bir artış görülmektedir (47). Türkiye'de kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarında *Acinetobacter* kökenlerinin görülme oranı %7.5 olarak bulunmuştur (3). Yaptığımız çalışmayla *Acinetobacter*

kökenlerinin hastaların %14.3'ünde idrar yolu enfeksiyonuna neden olduğu ve idrar yolu enfeksiyonu gelişen olguların tümünde öncesinde üriner kateter kullanımı bulunduğu saptanmıştır.

Acinetobacter enfeksiyonlarını kolaylaştıran ilerlemiş yaş, kronik akciğer hastalığı, iskemik kalp hastalığı, diyabet, uzun süre Yoğun Bakım Ünitesinde kalma, antibiyotik kullanımı, immünoşüpresyon, cerrahi girişimler, mekanik ventilasyon, trakeostomi, damar içi katater ve idrar sondasının varlığı gibi çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır (7, 17, 39, 44). Hasta gurubumuzda en sık bulunan risk faktörlerinin invaziv girişimler olduğu ve tüm hastaların en az iki invaziv girişime maruz kaldığı belirlenmiştir. Hastaların tamamında IV kateter, %96.4'ünde üriner kateter, %78.6'sında entübasyon, %41.1'inde trakeostomi ve %67.9'unda geçirilmiş cerrahi girişim saptanmıştır. Önemli bir risk faktörü olan enfeksiyon öncesi antibiyotik kullanımının 49 hasta (%63.6)'da bulunduğunu ve amikasin (%19.6), imipenem (%12.5), piperasilin/tazobaktam (%8.9), sefepim (%7.1) ve vankomisin (%3.6)'in en sık reçete edilen antibiyotikler olduğunu tespit edilmiştir. İnan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde en sık reçete edilen antibiyotiklerin bizdeki gibi amikasin ve piperasilin/tazobaktam olduğunu belirtmişlerdir (115).

Günümüzde birçok *Acinetobacter* kökeni yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere klinik olarak uygulanabildiği seviyelerde dirençli hale gelmiştir (33, 36, 53, 57, 77). Karbapenemler *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde halen başarılı antibiyotikler olarak kalmalarına karşın imipenem direncinin ilk kez belirlendiği 1985 yılından beri bu bileşiklere direnç oranı tüm dünyada hızla artmaktadır (39, 53, 54, 121). *A. baumannii* suşlarının karbapenem duyarlılığını araştırmak amacıyla 1997–2000 yıllarını kapsayan Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programında Avrupa'daki birçok ülkede karbapenemlerin *A. baumannii* izolatlarının %93-100'üne karşı etkili oldukları bulunmuştur. Ancak bölgesel farklılıklar olduğu da saptanmıştır. Örneğin İngiltere'de %70–78, Türkiye'de ise yalnızca %62–66 oranında etkili oldukları belirlenmiştir (48). Çalışmamızda en etkili antibiyotik gurubunun karbapenemler olduğu ve bu gurup antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin olmadığı görülmüştür. Karbapenemler dışındaki beta laktam antibiyotiklerin etkinliklerinin ise çok düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Gentamisin, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametaksazol gibi farklı etki mekanizmaları ile etki eden antibiyotiklerde de direnç oranlarının oldukça yüksek düzeylerde olduğu belirlenmiştir.

Mikroorganizmaların üç veya üzerinde farklı antibiyotik gurubuna dirençli olmaları çoklu antibiyotik direnci olarak tanımlanmaktadır (13, 29, 55). Araştırmamız boyunca incelediğimiz *Acinetobacter* kökenlerinin tamamının antibiyotiklere çoğul dirençli olduğu belirlenmiştir. Antibiyotiklere çoğul dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaşanan güçlükler, hastane kaynaklı enfeksiyonların gelişimini %30 gibi yüksek düzeylerde azaltan enfeksiyon kontrol programlarının önemini her geçen gün arttırmaktadır (1, 2, 3, 10). Epidemiyolojik sürveyans çalışmaları başarılı enfeksiyon kontrol programlarının vazgeçilemez unsurlarıdır ve bu amaçla kullanılabilir çok sayıda fenotipik ve genotipik yöntem bulunmaktadır. (7). Ancak fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında moleküler yöntemlerin ayırım gücü daha yüksektir ve birçok türe uygulanabilme avantajı sağlamaktadır (91, 92)

Fenotipik yöntemlerden biri olan antibiyotiplendirmenin yapılması kolay olmasına karşın ayırım gücü diğer fenotipik yöntemlerde olduğu gibi düşüktür (96). Genetik ve epidemiyolojik ilişkisi olmayan birçok tür aynı plasmidi alarak benzer duyarlılık profiline sahip olabildiğinden (plazmid salgını) ve enfeksiyon sırasında duyarlılıkta değişiklik meydana gelebildiğinden dolayı epidemiyolojik çalışmalarda değeri sınırlıdır (91, 92). Çalışmamızda gentamisin, amikasin, ampisilin/sulbaktam, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, seftriakson , sefepim, sefotaksim, seftazidim, trimetoprim/sülfametaksazol, tetrasiklin, siprofloksasin, levofloksasin, meropenem ve imipenem duyarlılık paternleri kullanılarak onbeş antibiyotip (Antibiyotip I-XV) oluşturulmuştur. 18 izolat (%27.6)'ta belirlenen Antibiyotip IV'ün en sık karşılaşılan antibiyotik duyarlılık paterni olduğu saptanmıştır. Antibiyotip I'in Mart-Haziran 2006 tarihleri arasında baskın antibiyotik duyarlılık paterni olduğu belirlenmiş ve Antibiyotip II'nin Temmuz-Ağustos 2006 ve Kasım-Aralık 2006, Antibiyotip V'in Kasım-Aralık 2006 ve Mart-Nisan 2007 tarihleri arasında iki pik yaptıkları görülmüştür.

Fenotipik metodların tekrarlanabilirliği, tiplendirme yeteneği ve ayırım gücündeki yetersizlikler moleküler tekniklere ilgiyi her geçen gün arttırmakta ve enfeksiyonların epidemiyolojik araştırmalarına artan bir oranda dahil edilmelerine neden olmaktadır (91, 95). Çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiş olmasına karşın bakteriyel türlerin çoğunda kullanılabilir en uygun ve altın standart metod Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) olarak görülmektedir (19, 94, 97).

Çalışma süresi boyunca izole ettiğimiz 76 *Acinetobacter* suşunu PFGE ile analiz ettiğimizde 7 (A-G) farklı ana klon olduğu görülmüştür. Suşların 73 (%94.7)'ünün aynı

PFGE paternini sergileyen A, B, C ve D adlarını verdiğimiz dört klon içerisinde yer aldığı ve A, B, D klonlarında ikişer (A1, A2, B1, B2, D1, D2) subtip olduğu saptanmıştır. Salgın suşları yüksek düzeyde farklı PFGE profilleri sergilediğinden epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlardan kolayca ayrılmıştır. Suşların 24 (%31.6)'sı A, 9 (%11.8)'i B, 10 (%13.2)'si C, 30 (%39.4)'ü D klonunda yer almıştır. Sadece birer (%1.3) suş E, F ve G klonlarına ait PFGE paternini sergilemiştir. A1 subtipinin belirgin olarak iki dönemde yoğunlaştığı ve Mart-Haziran 2006 ile Ağustos-Ekim 2006 tarihlerinde toplam 12 izolat (%92.3)'ta bulunduğu belirlenmiştir. A2 subtipine ait PFGE paterni, Ekim-Aralık 2006'da, 7 izolat (%70)'ta saptanmıştır. Sadece 6 izolatta bulunduğu belirlenen B2 subtipini taşıyan 2 (%50) izolat Mayıs 2007'de izole edilmiştir. C klonuna ait PFGE paterni Eylül-Kasım 2006 ve Şubat-Mart 2007 tarihlerinde toplam 9 örnek (%90)'ten izole edilmiştir. D1 subtipi Temmuz-Ağustos 2006 ve Kasım-Aralık 2006'da 14 izolat (%93.3)'ta tespit edilmiştir. D2 subtipi ise D1 subtipinin ikinci kez pik yaptığı Aralık 2006'da 4 (%26.7) izolatta ve Şubat-Temmuz 2007 tarihlerinde toplam 10 (%66.7) izolatta saptanmıştır. Sonuç olarak, çalışmamızı yaptığımız dönem olan Mart 2006-Temmuz 2007 tarihleri arasındaki 17 aylık dönem içerisinde dört ana klona (A, B, C, D) ait altı subtipin (A1, A2, B1, C, D1, D2) en az 10 salgın yaptığı belirlenmiştir.

PFGE klonları ve subtipleriyle en sık görülen antibiyotik profilleri karşılaştırıldığında; A1 subtipinde yeralan 13 izolatın 7 (%53.8)'sinde Antibiyotip I, A2 subtipi sergileyen 11 izolatın 4 (%36.4)'ünde Antibiyotip VII, C subtipinde yeralan 10 izolatın 5 (%50)'inde Antibiyotip IV, D1 subtipinde yeralan 15 izolatın 4 (% 26.7)'ünde Antibiyotip II ve 3 (% 20)'ünde Antibiyotip III, ve D2 subtipi sergileyen 15 izolatın 7 (%46.7)'sinde Antibiyotip V duyarlılık profili saptanmıştır.

Çalışmamızda antibiyotiplendirmenin *Acinetobacter* kökenlerinin epidemiyolojik olarak araştırılmasında çok az yardımcı olduğu belirgin olarak görülmüştür. Salgın suşlarında farklı antibiyotik duyarlılık paternleri sıklıkla gözlenmiş ve tamamlayıcı tiplendirme sistemi olarak PFGE kullanılmadığında yorumlamada zorluklar yaşanmıştır. Ayrıca, farklı PFGE paternleri sergileyen suşlar aynı antibiyotip içerisinde yer almıştır. Bu veriler, antibiyotik duyarlılık paterninin epidemiyolojik araştırmalarda sadece tarama metodu olarak kullanılması ve tamamlayıcı tekniklerle sonuçların mutlaka doğrulanması gerektiğini söyleyen araştırmaları doğrular niteliktedir (75).

PFGE klonları ve subtiplerinin antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde; A1 subtipi için levofloksasin (%92), ampisilin/sulbaktam (%77), piperasilin/tazobaktam (%70)'ın, A2 subtipi için levofloksasin (%82), piperasilin/tazobaktam (%73), amikasin (%64)'in, B1 subtipi için trimetoprim/sülfametaksazol (%100), tetrasiklin (%100)'in ve D1 subtipi için ampisilin/sulbaktam (%93)'in nispeten duyarlı kalmış antibiyotikler olduğu buna karşın C klonu ve B2 subtipinde karbapenemler dışında tedavi amacıyla güvenilir bir şekilde kullanılabilen antibiyotik kalmadığı görülmüştür.

Acinetobacter kökenlerinde olduğu gibi antibiyotiklere çoğul dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaşanan güçlükler, hastane kaynaklı enfeksiyonların gelişimini azaltan enfeksiyon kontrol programlarının uygulanmasını zorunlu hale getirmiştir (1, 2, 3, 10). *Acinetobacter* kökenlerinin Yoğun Bakım Ünitelerinde neden olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonların %66.7'si enfeksiyon kontrol önlemlerinin titizlikle uygulanması halinde önlenmektedir. (7, 24). Enfeksiyon kontrol programlarının ayrılmaz bir parçası olan epidemiyolojik surveyans çalışmaları epideminin kaynağının bulunması, alınacak önlemlerin belirlenmesi ve *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu epideminin sonlandırılması açısından büyük önem taşımaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemleri içerisinde ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği en yüksek olan PFGE'nin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması *Acinetobacter* salgınlarının ve salgına neden olan kaynağın tespitine izin vererek, uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin geliştirilmesini sağlayabilmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mart 2006-Temmuz 2007 tarihleri arasında Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi'nden gelen örneklerden izole edilen 76 *Acinetobacter* kökeni arasındaki klonal ilişkiyi PFGE kullanarak belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. *Acinetobacter* kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonlar incelediğinde en sık pnömoni (%57.1) ve bakteriyemi (%39.3)'ye neden oldukları, bunları sırasıyla idrar yolu enfeksiyonu (%14.3) ve yara enfeksiyonlarının (%8.9) takip ettiği görüldü.

2. *Acinetobacter* pnömonilerinin %87'si mekanik ventilasyona bağlı olarak gelişmişti.

3. *Acinetobacter* kökenli enfeksiyonların hiçbirinin toplum kaynaklı olmadığı ve tümünün hastaneye yatış sonrasında gelişen hastane kaynaklı enfeksiyonlar oldukları belirlendi.

4. Bakteriyemilerde en önemli kaynakların solunum yolu (%56) ve intravenöz kateterler (%16) olduğu, yara (%4) ve idrar yolu enfeksiyonlarının (%4) ise daha az sıklıkla bakteriyemi kaynağı oldukları görüldü. Beş (%20) hastada ise primer odak saptanamadı.

5. *Acinetobacter* bakteriyemisi 3 (%13.6) hastada septik şok ve Dissemine İntravasküler Koagülasyona (DİK), 4 (%18) hastada ise ölüme neden olmuştu.

6. *Acinetobacter* kökenlerinin hastaların %14.3'ünde idrar yolu enfeksiyonuna neden olduğu ve idrar yolu enfeksiyonu gelişen olguların tümünde öncesinde üriner kateter kullanımı bulunduğu belirlendi.

7. Hastalardaki en sık karşılaşılan risk faktörlerinin invaziv girişimler olduğu ve tüm hastaların en az iki invaziv girişime maruz kaldığı görüldü. Hastaların tamamında IV kateter, %96.4'ünde üriner kateter, %78.6'sında entübasyon, %41.1'inde trakeostomi bulunmaktaydı.

8. Hastaların %67,9'u en az bir cerrahi girişim geçirmişti.

9. Önemli bir risk faktörü olan enfeksiyon öncesi antibiyotik kullanımının 49 hasta (%63.6)'da bulunduğu ve enfeksiyon öncesi en sık kullanılan antibiyotiklerin amikasin (%19.6), imipenem (%12.5), piperasilin/tazobaktam (%8.9), sefepim (%7.1) ve vankomisin (%3.6) olduğu tespit edildi.

10. *Acinetobacter* kökenlerinin antibiyotik duyarlılık profillerini belirlemek amacıyla kullandığımız 15 antibiyotik arasında en etkili antibiyotik gurubunun karbapenemler olduğu ve bu grup antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin olmadığı görüldü. Karbapenemler dışındaki beta laktam antibiyotiklerin etkinliklerinin ise çok düşük olduğu saptandı.

11. *Acinetobacter* kökenlerine karşı beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarından piperasilin/tazobaktamın %22.4, ampisilin/sulbaktamın ise %39.4 oranında etkili oldukları görüldü.

12. Aminoglikozid gurubu antibiyotiklerin duyarlılık oranlarının düşük olduğu ve bu grup antibiyotiklerden olan amikasinin (%23.7), gentamisine (%2.6) göre daha etkili olduğu belirlendi.

13. Kinolon gurubu antibiyotikler arasında levofloksasinin *Acinetobacter* kökenlerine karşı daha etkili olduğu ve levofloksasinin duyarlılık oranının %48.7, siprofloksasinin duyarlılık oranının %34,2 olduğu tespit edildi.

14. *Acinetobacter* kökeninin tamamının antibiyotiklere çoğul dirençli olduğu saptandı.

15. Onbeş antibiyotip (Antibiyotip I-XV) oluşturulmasına karşın antibiyotiplendirmenin *Acinetobacter* kökenlerinin epidemiyolojik olarak araştırılmasında çok az yardımcı olduğu ve tamamlayıcı bir tiplendirme sistemi kullanılmadığında yorumlamada zorluklar yaşandığı belirlendi.

16. *Acinetobacter* kökenlerinin PFGE ile analizi sonucu 7 (A-G) farklı ana klon olduğu, suşların 73 (%94.7)'ünün dört klon (A, B,C, D) içerisinde yer aldığı, A ,B ve D klonlarında ikişer (A1, A2; B1, B2 ve C1, C2) subtip bulunduğu saptandı.

17. Çalışma dönemimiz olan Mart 2006-Temmuz 2007 tarihleri arasındaki 17 aylık dönem içerisinde dört ana klona (A, B, C, D) ait altı subtipin (A1, A2, B2, C, D1, D2) birçok kez salgın yaptığı tespit edildi.

Sonuç olarak, çalışmaya dahil edilen 76 *Acinetobacter* kökeninin 73 (%94.8)'ünün üç klona ait olması, etkin enfeksiyon kontrol programlarının uygulanması durumunda *Acinetobacter* enfeksiyonlarını %66.7 gibi büyük bir oranda engellemenin mümkün olduğunu göstermektedir. İzole edilen tüm *Acinetobacter* kökenlerinde çoklu antibiyotik direnci bulunması hastanemizin tüm antibiyotiklere dirençli *Acinetobacter* kökenlerinin gelişme riski altında olduğunu kanıtlamaktadır.

Altın standart metod olarak kabul edilen Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile antibiyotiplendirme arasındaki yüksek uyumsuzluk oranı ve farklı PFGE paterni sergileyen suşların aynı antibiyotip içerisinde yer almış olması, antibiyotiplendirmenin epidemiyolojik araştırmalarda sadece tarama metodu olarak kullanılması ve PFGE gibi tamamlayıcı tekniklerle sonuçların mutlaka doğrulanması gerektiğini göstermektedir.

7. ÖZET

Acinetobacter baumannii hastanelerde özellikle Yoğun Bakım Üniteleri'nde mortalite ve morbiditeyi arttıran, hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Bu non-fermantatif, oksidaz negatif, gram negatif, aerobik kokobasil pnömoni, bakteriyemi, idrar yolu enfeksiyonu, yara enfeksiyonu ve menenjit gibi çeşitli tip fırsatçı enfeksiyondan izole edilebilir.

Bu çalışmanın amacı Karadeniz Teknik Üniversitesi Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi'nden Mart 2006-Ekim 2007 tarihleri arasında gelen örneklerden izole edilen 76 *A. baumannii* izolatının klonal ilişkilerini ve antibiyotik duyarlılık paternlerini belirlemektir.

A. baumannii izolatlarının tanımlanması ve antibiyotik paternleri mikrobiyoloji laboratuvarlarının kullandığı geleneksel biyokimyasal testler ve BD Phoenix sistemi ile yapıldı. Bu çalışmada antimikrobiyal ajan olarak amikasin, gentamisin, ampisilin-sulbaktam, cefepim, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, siprofloksasin, levofloksasin, imipenem, meropenem, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol kullanıldı. *A. baumannii* antimikrobiallerin çoğuna dirençliydi fakat karbapenemler çok aktif ajanlar olarak kalmıştı ve çalışma periyodu sırasında toplanan 76 suşun tümü imipenem ve meropeneme duyarlıydı. Bununla birlikte, *A. baumannii* suşlarının diğer beta-laktam antibiyotiklere dirençli oldukları belirlendi. Tüm suşlar piperasilin, sefepim, sefotaksim ve seftazidime dirençliydi. Çalışmamızda *Acinetobacter* kökenlerinin piperasilin-tazobaktamla karşılaştırıldığında ampisilin-sulbaktama daha duyarlı olduğu görüldü. Levofloksasin, siprofloksasin, amikasin ve gentamisine duyarlılık test edilen izolatlarda sırasıyla %40.8, %32.9, %9.21 ve %26.3 bulundu.

Bakteriyel izolatlar arasında, *A. baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları kullanılarak 15 antibiyotip tanımlandı ve I-XV olarak isimlendirildi.

Acinetobacter suşlarının klonal ilişkisi epidemiyolojik tiplendirmenin altın standardı olarak tanımlanan PFGE ile araştırıldı. *Acinetobacter baumannii* suşlarının SmaI ile kesilen genomik DNA'sına yapılan PFGE 7 farklı ana klon (klon A-G olarak isimlendirildi) ve A klonunda iki (A1, A2), B klonunda iki (B1, B2) ve C klonunda iki

subtip (C1, C2) gösterdi. 73 *Acinetobacter baumannii* suşu (%96) dört ana klonda yerliyordu ve 17 ay içerisinde en az on salgına neden olmuşlardı.

Bu araştırmada, antibiyotik duyarlılık paternlerinin *A. baumannii*'ye yönelik olarak yaptığımız epidemiyolojik çalışmaya yardımı çok azdı. Salgın suşları arasında küçük değişiklikler sıklıkla gözlendi ve PFGE'nin yardımı olmaksızın bunların değerlendirilmesi güçtü. Ayrıca, aynı duyarlılık tipini sergileyen suşlar farklı PFGE paternleri içerisinde yerliyordu. Bu yüzden, antibiyotiplendirmenin epidemiyolojik araştırmalarda uygun bir tarama metodu olabileceği ancak PFGE gibi tamamlayıcı tekniklerle sonuçların doğrulanmasının gerekli olduğu sonucuna varıldı.

Bu çalışmayla 73 suşun dört klon içinde yerlması ve suşların tümünün çoklu antibiyotik direnci sergilemesi nedeniyle uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin gerekliliği kanıtlandı ve entegre enfeksiyon kontrol programlarının uygulanması ile Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi'nde *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı hastane kaynaklı enfeksiyonların insidansının büyük oranda azaltılabileceği gösterildi.

8. SUMMARY

Molecular Epidemiology of *Acinetobacter* spp. isolated from patients admitted in the Anesthesia and Reanimation Intensive Care Unit

Acinetobacter baumannii is an important cause of nosocomial infections, increasing mortality and morbidity in hospital, especially in Intensive Care Units (ICUs). This non-fermenting, oxidase negative, gram negative, aerobic cocobacillus has been isolated from various types of opportunistic infections, including pneumonia, bacteremia, urinary-tract infection, wound infection and meningitis.

The aim of this study is to determine susceptibility patterns and clonal relationships of 76 *A. baumannii* isolates collected between March 2006 and July 2007 in the Anesthesia and Reanimation Intensive Care Unit of Karadeniz Technical University Hospital.

Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *A. baumannii* isolates were performed by the microbiology laboratory using conventional biochemical tests and BD Phoenix System. The antimicrobial agents included in the study were amikacin, ampicillin-sulbactam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, ciprofloxacin, imipenem, levofloxacin, meropenem, piperacillin, piperacillin-tazobactam, tetracycline, gentamicin and trimethoprim-sulfamethoxazole. *A. baumannii* isolates were resistant to most of the antimicrobial drugs but carbapenems were the most active agents and all 76 strains collected during the study period were sensitive to imipenem and meropenem. However, it has been determined that *A. baumannii* strains were become resistant to other beta-lactam antibiotics. All isolates were resistant to piperacillin, cefepime, cefotaxime and ceftazidime. In our study, *Acinetobacter* spp. were observed to be more sensitive to ampicillin-sulbactam than piperacillin-tazobactam. Sensitivity to levofloxacin, ciprofloxacin, amikacin and gentamicin was found in 40.8%, 32.9%, 9.21% and 26.3% of the isolates tested, respectively.

Among the bacterial isolates, 15 antibiotypes were defined by utilizing the results of antibiotics susceptibility testing of *A. baumannii* isolates and designated as I through XV.

Clonal relationships of *Acinetobacter* isolates were investigated with PFGE, regarded as the gold standard of the epidemiological typing. PFGE of genomic DNA after

digestion with SmaI from *Acinetobacter baumannii* isolates revealed 7 different main clones (designated as A through G) and 2 subtypes to clone A (subtype A1 and A2), 2 subtype to clone B (subtype B1 and B2), 2 subtype to clone C (subtype C1 and C2). 73 *Acinetobacter* spp. (96%) were involved in four main clones (A, B, C and D) and they caused at least ten outbreaks in 17 months.

In this research, antibiotic susceptibility patterns were less helpful regarding the epidemiological study of *A. baumannii*. Minor variations were frequently observed among outbreak isolates and were difficult to interpret without the help of PFGE. In addition, strains exhibiting same susceptibility types were placed into the different PFGE patterns. It has been concluded that antibiotics may be suitable as screening methods in epidemiological investigations but require confirmation of results by complementary techniques such as PFGE.

This study demonstrates that appropriate infection control precautions should be required owing to the fact that 73 isolates are involved in three clones and all isolates are multidrug resistance. It has been observed that an integrated infection control program can considerably reduce the incidence of nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii* in Anesthesia and Reanimation Intensive Care Unit.

9. KAYNAKLAR

1. Rosenthal V.D, Guzmán S, Crnich C. Device-Associated Nosocomial Infection Rates In Intensive Care Units Of Argentina. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25: 251-255
2. İnan D, Saba R, Yalçın A.N, Yılmaz M, Ongut G. Ramazanoglu A, Mamikoglu L. Device-Associated Nosocomial Infection Rates in Turkish Medical-Surgical Intensive Care Units. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 343-348
3. Leblebicioğlu H, Rosenthal V.D, Arıkan A, Özgültekin A, Yalçın A.N, Koksal I, Usluer G, Sardan Y.C, Ulusoy S. Device-associated hospital-acquired infection rates in Turkish intensive care units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC), *Journal of Hospital Infection* (2007) 65, 251-257
4. Bayat A, Shaaban H, Dodgsonb A, Dunna K.W. Implications for Burns Unit design following outbreak of multi-resistant *Acinetobacter* infection in ICU and Burns Unit. *Burns* 29 (2003) 303–306
5. Lim S.M, R. Webb S. A. Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance, *Anaesthesia*, 2005, 60, s. 887–902
6. Günserena F, Mamıkoğlu L, Öztürk S, Yücesoy M, Biberoglu K, Yulug N, Doganay M, Sümerkand B, Kocagöz S, Ünal S, Çetin S, Semra S, Köksal İ, Leblebicioglu H, Günaydın M. A surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1999) 43, 373–378
7. Agodil A, Zarrilli R, BarchittaM, Anzaldil A, Di Popolo A, Mattaliano A, Ghiraldi E, Travali S. Alert surveillance of intensive care unit-acquired *Acinetobacter* infections in a Sicilian hospital, *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 241-247
8. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 510-515
9. Çevik M.A, Yılmaz G.R, Erdiñç F.S, Üçler S, Tülek N.E. Relationship between nosocomial infection and mortality in a neurology intensive care unit in Turkey. *Journal of Hospital Infection* (2005) 59, 324–330
10. Durmaz B, Durmaz R, Otlu B, Sönmez E. Nosocomial Infections in a New Medical Center, Turkey. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21: 534-536
11. Moreno CA, Rosenthal VD, Olarte N, Gomez WV, Sussmann O, Agudelo JG, Rojas C, Osorio L, Linares C, Valderrama A, Mercado PG, Bernate PHA, Vergara GR, Pertuz AM, Mojica BE, Navarrete MPT, Romero ASA, Henriquez D. Device-

Associated Infection Rate and Mortality in Intensive Care Units of Colombian Hospitals: Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 349-356

12. Bergogne-Berezin E, Towner K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9: 148-165.
13. Simor AE, Lee M, Vearncombe M, Jones-Paul L, Barry C, Gomez M, Fish JS, Cartotto RC, Palmer R, Louie M. An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: Risk factors for acquisition and management, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23: 261-267
14. Levin AS, Gobara S, Mendes C.M.F, Cursino R, Sinto S. Environmental Contamination by Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22: 717-720
15. Pimentela JD, Lowb J, Stylesb K, Harris OC, Hughesc A, Athanc E. Control of an outbreak of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit and a surgical ward. 2005 Mar;59(3): 249-53
16. Corbella X, Montero A, Pujol M, Domínguez M.A, Ayats J, Argerich M.J, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F. Emergence and Rapid Spread of Carbapenem Resistance during a Large and Sustained Hospital Outbreak of Multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal Of Clinical Microbiology*, Nov. 2000, s. 4086–4095
17. Shaw M.J, Ventilator-associated pneumonia, 2005 Lippincott Williams & Wilkins. 1070-5287
18. Wang JT, McDonald LC, Chang SC, Ho M. Community-Acquired *Acinetobacter baumannii* Bacteremia in Adult Patients in Taiwan, *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2002, s.1526–1529
19. D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. An Outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The Importance of Cross-Transmission, (*Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21: 588-591
20. Husni R. N, Goldstein L. S, Arroliga A. C, Hall G. S, Fatica C, Stoller J. K, Gordon S. M. Risk Factors for an Outbreak of Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter* Nosocomial Pneumonia Among Intubated Patients, *Chest* 1999;115;1378-1382
21. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Reijden T, Strijen B, Stefanik, Heersma H, Dijkshoorn L, Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*, *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2005, s. 4328-4335
22. Garner E, Jarvis WR, Emor G, Horan TC, Hughes Jm: CDC definition for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1998;16: 128-140

23. Emori TG, Gaynes R.P, An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1993, s. 428-442
24. Harbartha S, Saxa H, Gastmeierb P. The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports. *Journal of Hospital Infection* (2003) 54, 258–266
25. Kuçukates E. Antimicrobial Resistance Among Gram Negative Bacteria Isolated from Intensive Care Units in a Cardiology Institute in İstanbul, Turkey *Jpn. J. Infect. Dis.*(2005) 58, 228-231
26. Gospodarek E, Krasnicki K, Ziolkowski G, Kasprzak H, Beuth W. Cerebrospinal meningitis with the presence of *Acinetobacter* spp. *Med Sci Monit*, 2000; 6(1): 50-547
27. Allen, D. M., and B. J. Hartman. 2006. *Acinetobacter* species, s. 2632–2636. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
28. Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, Dijkshoorn L. Discrimination of *Acinetobacter* Genomic Species by AFLP Fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Oct. 1997, s. 1179–1187
29. Zeana C, Elaine Larson E, Sahni J, Bayuga S. J, Wu F, Della-Latta P. The Epidemiology of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Does The Community Represent a Reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:275-279
30. Falagas M.E, Bliziotis I.A, Siempos I.I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies, *Critical Care* 2006;10(2):R48
31. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods, “Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 8. baski kitabinda s. 750-1, ASM Press, Washington, DC (2003).
32. Ishii S, Koki J, Unno H, Hori K. Two Morphological Types of Cell Appendages on a Strongly Adhesive Bacterium, *Acinetobacter* sp. Strain Tol 5. *Applied and Environmental Microbiology*, Aug. 2004, s. 5026-5029
33. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr.WC. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5. Baski kitabinda. Philadelphia: Lippincott; 1997. s. 253-320
34. Baumann, P, Doudoroff M, Stanier R.Y. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidase-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.*1968; 95:1520-1541.
35. Warskow, A. L, Juni E. Nutritional requirements of *Acinetobacter* strains isolated from soil, water, and sewage. *J. Bacteriol.* 1972; 112:1014-1016

36. Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Popolo A.D, Triassi M, Villari P. Molecular Epidemiology of Sequential Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit Shows the Emergence of Carbapenem Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2004, s. 946-953
37. Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl Bakteriol.* 1993 Nov;279(4):544-52.
38. Nemeč A, Baere T.D, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden T.J.K, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. And *Acinetobacter schindleri* sp. nov, isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2001), 51, 1891–1899
39. Fillaux J, Dubouix A, Conil J.M, Laguerre J, Marty N. Retrospective Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated During a 4-Year Period in a University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:647-653
40. Mandel, A.D, Wright K, McKinnon J.M. Selective medium for isolation of Mima and Herellea organisms. *J. Bacteriol.* 1964; 88:1524–1525.
41. Jawad A, Hawkey P.M, Heritage J, Snelling A.M: description of Leeds *Acinetobacter* medium a new selective and differential medium for isolation of clinical important *Acinetobacter* spp. and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2353-2358
42. Prashanth K, Badrinath S. Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. *Indian J Med Res* 122, November 2005, s. 408-418
43. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard J.M, Olsen J.E, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med. Microbiol.* Vol.49. 2000; 929-936
44. Prashanth K, Badrinath S. Nosocomial infections due to *Acinetobacter* species: clinical findings, risk and prognostic factors. *Indian Journal of Medical Microbiology*, (2006) 24 (1):39-44
45. Falagas ME, Karveli EA. The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications, *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 117–119
46. Park D.R. The Microbiology of Ventilator-Associated Pneumonia. *Respiratory Care* June 2005 Vol 50 No 6; 742-765
47. Gaynes R, Edwards J.R, Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:848–54

48. Ferrara A.M. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27 (2006) 183–195
49. Gales A. C, R. Jones N, Forward K. R, Linares J, Sader H. S, Verhoef J. Emerging Importance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in Seriously Ill Patients: Geographic Patterns, Epidemiological Features, and Trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). *Acinetobacter* and *S. maltophilia* in SENTRY, *CID* 2001:32 (Suppl 2) s.104-13
50. Crnich CJ, Safdar N, Maki DG. The Role of the Intensive Care Unit Environment in the Pathogenesis and Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia, *Respiratory Care* June 2005; vol 50 No 6
51. Yu Y.S, Yang Q, Xu X.W, Kong H.S, Gen-Yun Xu G.Y, Zhong B.Y. Typing and characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* complex in a Chinese hospital. *Journal of Medical Microbiology* (2004), 53, 653–656
52. Wei-feng S, Jian-ping J, Tu-huang M. Relationship between antimicrobial resistance and aminoglycoside-modifying enzyme gene expression in *Acinetobacter baumannii*. *Chinese Medical Journal* 2005; 118 (2): 141-145
53. Clark N.M, Patterson J, Lynch J.P. Antimicrobial resistance among gram-negative organisms in the intensive care unit. *Lippincott Williams & Wilkins*. 2003; 9:413-423
54. Cisneros J. M, Rodriguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2002; 8: 687-693
55. Alp E, Ese D, Yildiz O, Andreas Voss A, Melchers W, Doganay M. Genotypic analysis of *Acinetobacter* bloodstream infection isolates in a Turkish university hospital. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2006; 38: 335-340
56. Bou G, Cervero G, Dominguez M.A, Quereda C, Martinez-Beltra J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2000, s. 3299-3305
57. Bou G, Cervero G, Dominguez M.A, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 635-643
58. Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)*. 1995 Nov;74(6):340-9.

59. Chen H.P, Lai C.H, Chan Y.J, Chen T.L, Liu C.Y, Fung C.P, Liu C.Y. Clinical significance of *Acinetobacter* species isolated from cerebrospinal fluid. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2005; 37: 669- 675
60. Katragkou A, Roilides E. Successful Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Central Nervous System Infections with Colistin. *Journal Of Clinical Microbiology*, Sept. 2005, s. 4916–4917
61. Gleeson T, Petersen K, Mascola J. Successful treatment of *Acinetobacter* meningitis with meropenem and rifampicin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* July 2005; s. 602-603
62. Gradon J.D, Chapnick E.K, Lutwick L.I. Infective endocarditis of a native valve due to *Acinetobacter*: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1992 Oct;15(4):748-9.
63. Lye W.C, Lee E.J, Ang K.K. *Acinetobacter* peritonitis in patients on CAPD: characteristics and outcome. *Adv Perit Dial*. 1991;7:176-9
64. Valdez J.M, Asperilla M.O, Smego R.A Jr. *Acinetobacter* peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *South Med J*. 1991 May;84(5):607-10.
65. Schabereiter-Gurtner C, Maca S, Rolleke S, Nigl K, Lukas J, Hirschl A, Lubitz W, Barisani-Asenbauer T. 16S rDNA-Based Identification of Bacteria from Conjunctival Swabs by PCR and DGGE Fingerprinting. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:1164-1171
66. Corrigan K.M, Harmis N.Y, Willcox M.D. Association of *Acinetobacter* species with contact lens-induced adverse responses. *Cornea*. 2001 Jul;20(5):463-6.
67. Fillaux J, Dubouix A, Conil JM, Laguerre J, Marty N. Retrospective Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated During a 4-Year Period in a University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:647-653
68. Mah M.W, Memish Z.A, Cunningham G, Bannatyne R.M. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit associated with tracheostomy. *Am J Infect Control* 2001; 29: 284-8
69. Kaplan N, Rosenberg E, Jann B, Jann K. Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD 4. *Eur. J. Biochem*. 152,453-458 (1985)
70. Rosenberg M, Bayer E.A, Delarea J, Rosenberg E. Role of Thin Fimbriae in Adherence and Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on Hexadecane Applied and *Environmental Microbiology*, Oct. 1982, s. 929-937
71. Lee J.C, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, van der Reijden T, van der Meer J, van de Gevel J, Dijkshoorn L. Adherence of

Acinetobacter baumannii strains to human bronchial epithelial cells. Research in Microbiology 157 (2006) 360-366

72. Actis, L.A, Tolmasky M. E, Crosa L. M, Crosa J. H. Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:2812-2815.
73. Echenique, J. R, Arienti H, Tolmasky M. E, Read R. R, Staneloni R. J, Crosa J. H, Actis L. A. Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 1992; 174:7670-7679.
74. El Shafiea S.S, Alishaqb M, Garcia M.L. Investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in trauma intensive care unit. Journal of Hospital Infection 2004; 56, 101-105
75. Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G. Comparison of Four Different Methods for Epidemiologic Typing of *Acinetobacter baumannii*. Journal of Clinical Microbiology, July 1994, s. 1816-1819
76. Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M, Villari P. Molecular Epidemiology of Sequential Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit Shows the Emergence of Carbapenem Resistance. Journal Of Clinical Microbiology, Mar. 2004, s. 946-953
77. Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter* Species, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Apr. 1993, s. 750-753
78. del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, Molina F. Villanueva R, Cisneros J. M, Bou G. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 540-546
79. Fuchs P.C, Barry A.L, Brown S.D. In Vitro Activities of Ertapenem (MK-0826) against Clinical Bacterial Isolates from 11 North American Medical Centers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 2001, s. 1915-1918
80. Higgins P.G, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. In Vitro Activities of the β -Lactamase Inhibitors Clavulanic Acid, Sulbactam, and Tazobactam Alone or in Combination with β -Lactams against Epidemiologically Characterized Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, May 2004, s. 1586-1592
81. Lanbaran N.S. Nazokomiyal *Acinetobacter baumannii* Kökenlerinde Antibiyotik Direnci ve Antimikrobiyal Sinerjizmin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Edirne (2001)
82. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 826-836

83. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase VEB-1-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug. 2003, s. 3542-3547
84. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec. 2001, s. 3375-3380
85. Higgins P.G, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 54, 821-823
86. Wisplinghoff H, Decker M, Haefs C, Krut O, Plum G, Seifert H. Mutations in *gyrA* and *parC* associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 2003: 51, 177-180
87. Agersøl Y, Guardabassi L. Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2005) 55, 566-569
88. Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vilal J. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 52, 477-480
89. Ribera A, Ruiz J, Vila J. Presence of the Tet M Determinant in a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 2003, s. 2310-2312
90. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L. Heteroresistance to Colistin in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept. 2006, s. 2946-2950
91. Andrei A, Zervos M.J. The Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130: 662-668
92. Singh A, Goering R.V, Simjee S, Foley S.L, Zervos M.J. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2006, s. 512-530
93. Pfaller M.A. Molecular Epidemiology in the Care of Patients. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123: 1007-1010
94. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2005, s. 4328-4335

95. Foxman B, Riley L. Molecular Epidemiology: Focus on Infection . Am J Epidemiol 2001; 153: 1135-41
96. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital, Journal of Hospital Infection 2003; 54: 39-45
97. Tenover, F.C, Arbeit R. D, Goering R. V, Mickelsen P. A, Murray B. E, Persing D. H, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:2233-2239
98. Basim E, Basim H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. Turk J Biol 2001; 25: 405-418
99. Goring R.V, ç. Alper Tekeli, Pulsed Field Gel Electroforesis Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ. (eds). Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamaları. Palme Yayıncılık, Ankara 2006
100. Sambrook, J, Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory. Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
101. Kudaka J, Itokazu K, Taira K, Iwai K, Kondo M, Susa T, Iwanaga M. Characterization of Salmonella Isolated in Okinawa, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 59, 15-19, 2006
102. Durmaz B, Durmaz R. Pulsed Field Gel Electrophoresis, s.161-168, Durmaz R. (ed) Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, Çapa, İstanbul.
103. Corkill J.E, Graham R, Hart C.A, Stubbs S. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Degradation-Sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR Ribotype 1 Strains. Journal of Clinical Microbiology, July 2000, s. 2791-2792
104. Römling U, Tümmler B. Achieving 100% Typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology Jan. 2000, s. 464-465
105. Goering R.V, Tenover F.C. Epidemiological Interpretation of Chromosomal Macro-Restriction Fragment Patterns Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, Sept. 1997, s. 2432-2433
106. <http://www.bd.com/ds/>
107. O'Hara C.M. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST System and NID Panel for Identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and Commonly Isolated Nonenteric Gram-Negative Bacilli. Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2006, s. 928-933

108. Robson R.L, Essengue S, Reed NA, Horvat R.T. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* induced by frozen storage in glycerol. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Jun;58(2):185-90.
109. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Disc Susceptibility Tests; Approved Standards-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute Document M2-A9 [ISBN 1-56238-586-0]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
110. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informatinal Supplement. CLSI document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
111. Durmaz R, Otlu B, Çalışkan A, Gürsoy N. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Türlerinin Moleküler Tiplendirmesinde Kullanilabilecek Kısa Süreli Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE) Protokolü. *ANKEM Derg* 2007;21(2):113-117,
112. Liu P.Y.F, Wu W.L. Use of Different PCR-based DNA Fingerprinting Techniques and Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Investigate the Epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:19-28
113. CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Instruction Manual and Applications Guide, Catalog Numbers 170-3690 through 170-3703
114. Yalçın A.N. Socioeconomic Burden Nosocomial Infections. *Ind. J. Med. Sci* Vol. 57 No.10, October 2003
115. Inan D, Saba R, Gunseren F, Ongut G, Turhan O, YalcinA.N, Mamikoglu L. Daily antibiotic cost of nosocomial infections in a Turkish university hospital. *BMC Infectious Diseases* 2005, 5:5
116. Khan MM, Celik Y. Cost of Nosocomial İnfection in Turkey: An Estimate Based on the University Hospital Data. *Health Serv Manage Res*. 2001 Feb;14(1):49-54.
117. Biendo M, Laurans G, Lefebvre J. F, Daoudi F, Eb F. Epidemiological Study of an *Acinetobacter baumannii* Outbreak by Using a Combination of Antibiotyping and Ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, July 1999, s. 2170-2175
118. Sesli Çetin E, Kaya S, Tetik T, Cicioğlu Aridoğan B. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Örneklere Göre Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2006;20(4):202-205.
119. Ardiç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T. Yatan Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* Suşlarının Karbapenemlere ve Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2004;18(3):145-148.

120. Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, İnmez E, Dinç G, Özbakkaloğlu B. Yoğun Bakım Ünitesi ve Diğer Ünitelerde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında İn-vitro Antibiyotik Direnci. *Ankem Derg* 2005;19(3):115-118.
121. Tomas M.M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, Molina F, Villanueva R, Cisneros J. M, Bou G. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 540-546