



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

***HASTANE İNFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN
ACİNETOBACTER BAUMANNİİ SUŞLARININ AFLP ve PFGE
YÖNTEMİ İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU***

Dr. Işıl Gökçe Benk

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih Köksal**

ADANA 2013



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

***HASTANE İNFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN
ACİNETOBACTER BAUMANNİİ SUŞLARININ AFLP ve PFGE
YÖNTEMİ İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU***

Dr.İşıl Gökçe Benk

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih Köksal**

**Bu çalışma TF2011 LTP10 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince engin bilgisini ve desteğini esirgemeyen, her konuda olduğu gibi tezimin hazırlanmasında da sonsuz yardımlarını sunan danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL' a ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarım, Prof. Dr. Fügen YARKIN, Prof. Dr. Akgün YAMAN ve Prof. Dr. Macit İLKİT' e,

Tez sürecimde ve çalışmalarımda bana yardımcı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve personeline, tezimin yazım aşamasında büyük katkı sağlayan bölüm sekreterimiz Suna GÖKMEN' e,

Tıp ve Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanması sırasında yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime, ufacık kalbiyle bu sürede sabır göstermeye çalışan biricik kızım Zeynep Pinhan' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1-Hastane İnfeksiyonları	3
2.1.1.Tarihçe	4
2.1.2.Tanım	5
2.1.3- Epidemiyoloji	6
2.1.4- SHİİ'ın Kontrolü	8
2.2- Asinetobakterler	10
2.2.1- <i>A.Baumannii</i>	11
2.2.2- Tarihçe:	11
2.2.3- Taksonomi:	11
2.2.4- Morfoloji:	14
2.2.5- Üreme ve fizyolojik özellikleri	14
2.2.6- Direnç	15
2.2.7- Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri	16
2.2.8- Genom Özellikleri	17
2.2.9- Virulans Faktörleri	17
2.2.9.1- Hücre duvarı Lipopolisakkaridi (LPS)	18
2.2.9.2- Fimbrialar ve adeziv OMP' leri	18
2.2.9.3- Kapsül	19
2.2.9.4- Biyofilm Oluşumu	19

2.2.9.5- Demir Kazanım Mekanizmaları ve Lipid yıkımına neden olan enzimler.	20
2.2.10- <i>Acinetobacter baumannii</i> İnfeksiyonları	21
2.2.10.1- <i>A.baumannii</i> infeksiyonlarının Epidemiyolojik özellikleri	21
2.2.10.2- <i>A.baumannii</i> infeksiyonlarında klinik tablo	23
2.2.10.3- Solunum Yolu İnfeksiyonları	23
2.2.10.4- Bakteriyemiler	24
2.2.10.5- Üriner Sistem İnfeksiyonları:	24
2.2.10.6- Menenjit	25
2.2.10.7- Diğer İnfeksiyonlar:	25
2.3- Tanı	25
2.3.1-Klinik tanı	25
2.3.2- Laboratuvar tanı	25
2.3.2.1- <i>A.baumannii</i> izolasyonu	26
2.3.2.2- <i>A.baumannii</i> İdentifikasyonu	26
2.3.2.2.1- Fenotipik yöntemler	26
2.3.2.2.2- Genotipik yöntemler	30
2.3.2.3- DNA-DNA hibridizasyon yöntemi	30
2.3.2.4- Plasmid tipleme	31
2.3.2.5- Ribotipleme	31
2.3.2.6- MLST	32
2.3.2.7- Parsiyel dizi analizi	32
2.3.2.8- Random Ampflified Polimorphic DNA-RAPD	33
2.3.2.9- ARDRA	33
2.3.2.10- Repetitive Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rep-PCR)	34
2.3.2.11- PFGE	34
2.3.2.12- AFLP	35
2.3.3- Tedavi ve Antibiyotik direnci	36
2.3.3.1- Antibiyoterapi	36
2.3.3.2- Antibiyotik Direnci	37
2.3.3.2.1-Antibiyotik direncinin mekanizması	37
2.3.3.2.2- Antibiyotik direncinin epidemiyolojik özellikleri	42

2.3.4- <i>A.baumannii</i> İnfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri	43
3- GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1- Mikroorganizmanın izolasyonu ve tür tayini	45
3.2.1. PFGE	47
3.2.1.1.Örneklerin hazırlanması	47
3.2.1.2.Örneklerin agoraza gömülmesi	48
3.2.1.3. Örneklerin agaroz içinde parçalanması	49
3.2.1.4. Lisis işlemlerinden sonra kalıpların yıkanması	49
3.2.1.5- Agaroz kalıpları içindeki DNA' m RE ile kesilmesi	49
3.2.1.6- Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi	50
3.2.1.7- Elektroforez	51
3.2.1.8- Sonucun gözlenmesi	51
3.2.1.9- PFGE yönteminde kullanılan solüsyonlar	52
3.2.1.9.1- TE buffer	52
3.2.1.9.2- Hücre Süspansiyon Tamponu	52
3.2.1.9.3- Lisis-1	52
3.2.1.9.4- Lisis-2	52
3.2.1.9.5- 0,5x TBE	52
3.2.1.9.6- 20mg/ml proteinase K solüsyonu	53
3.2.1.9.7- %10 sodium dodecyl sulfate solüsyonu	53
3.2.2 Amplified Fragment Length Polimorfizm	53
3.2.2.1-Restriksiyon-ligasyon işlemi	54
3.2.2.2-Preselektif ve Selektif PCR – Amplifikasyon	57
3.2.2.3-Fragmentlerin analizi.	59
4- BULGULAR	62
5- TARTIŞMA	75
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	93

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1- Asinetobakterlerin sınıflandırılması	12
Tablo 2- <i>Acinetobacter</i> spp. için çeşitli araştırmacılara göre genomik tür ve sus tipleri	13
Tablo 3- <i>A.baumannii</i> test suşlarının kliniklere göre dağılımları	46
Tablo-4- <i>A. baumannii</i> test suşlarının izole edildikleri klinik materyallere göre dağılımı	46
Tablo-5- Test suşlarının PFGE ile klonal küme dağılımı	65
Tablo 6- Test suşlarının AFLP ile klonal küme dağılımı.	68
Tablo 7- Test suşlarının AFLP ve PFGE İLE elde edilen dendogram kümelerinin karşılaştırılması	69
Tablo 8- Her iki yöntem ile ilişkili olduğu tespit edilen suşların kliniklere göre dağılımları	70
Tablo 9- Test suşlarının her iki yöntemle %100 ilişkili küme/alt kümelere dağılımı	72
Tablo 10. Test suşlarının her iki yöntemle tük üyeli kümelere dağılımı	73

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Asinetobakterlerin Gram boyama görüntüsü	14
Şekil 2. Kanlı Agarda Asinetobakter kolonileri	15
Şekil 3. CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) cihazı	47
Şekil 4. EcoRI ve MseI enzimlerinin farklı bazları tanıyan kesim bölgeleri	54
Şekil 5. Açık uçlara adaptörlerin bağlanması sonucu oluşan yeni DNA parçası	55
Şekil 6. Adaptörlere komplementer preselektif primerler	58
Şekil 7. Adaptörlere komplementer selektif primerler	59
Şekil 8. ABI PRISM 310 cihazı	60
Şekil 9. Test suşlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüsü	63
Şekil-10. Test suşlarının PFGE ile elde edilen dendrogram görüntüsü	64
Şekil 11. Test suşlarının GeneMapper 4.0 ile analiz edilen pik görüntüsü	66
Şekil 12. İzolatların AFLP paternlerine göre dendrogram görüntüsü	67

KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Amplified Fragment Length Polimorfizm
AIDS	Acquired İmmuno Deficiency Syndrome
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis
ATCC	American Type Culture Collection
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobakter baumannii</i>
CAİ	Cerrahi alan enfeksiyonu
CDC	Centers for Disease Control
CDC-SENIC Control	Center for Disease Control-Study on the Efficacy of Nosocomial İnfections
ÇİD	Çoklu ilaç dirençli
ESBL	Extended Spectrum Beta lactamase
GNNFB	Gram Negatif Nonfermentatif Bakteri
HICPAC	Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
İL	İnterlökın
LPS	Lipopolisakkaridler
MLEE	Multilokus enzim elektroforezi
MLSA	Multilokus sekans analizi
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NHSN	National Healthcare Safety Network
NNIS	National Nosocomial İnfections Surveillance
OMP	Other Membran Protein
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	Pulsed Field Jel Electrophoresis
PI	Patojenite adası
QS	Quorum sensing
RAPD	Randomly Amplified Polimorfik-DNA
RE	Restriksiyon endonükleaz
Rep-PCR	Repetitif PCR
SDS-PAGE	Sodium Dodesil Sülfat poli- akrilamid jel Electrophoresis
SHİİ	Sağlık Hizmeti ile İlişkili İnfeksiyonlar
SVKİ-KDİ	Santral venöz kataterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları
TBE	Tris- Borik asit EDTA

TLR	Toll Like Receptor
TNF-Alfa	Tumor nekrotizan faktör-alfa
UHESA	Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı
UPGMA	Unweighted pair group mathematical averaging
ÜKİ-ÜSİ	Üriner kateterle ilişkili üriner sistem enfeksiyonları
VİP	Ventilatörle ilişkili pnömoni
VRE	Vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i>
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi

ÖZET

Hastane enfeksiyonlarından izole edilen *A.baumannii* suşlarının AFLP ve PFGE yöntemi ile moleküler karakterizasyonu

A. baumannii'nin hastane enfeksiyonlarında önemi giderek artmaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde sıklıkla izole edilmektedir. Hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde hijyen, personel eğitimi, akılcı antibiyotik kullanımı ve surveyans önemlidir. Tüm hastane enfeksiyonlarında olduğu gibi *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlarda da enfeksiyonun epidemiyolojik özelliklerini değerlendirmek ve enfeksiyon ile ilişkili izolatların klonal özelliklerini ortaya koymak için genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden PFGE, *A. baumannii* salgınlarının surveyansında, salgın izolatlarının klonal ilişkisinin ve kaynağının tespit edilmesinde 'alt standart' olarak kabul edilen bir yöntemdir. Ancak son yıllarda AFLP' nin surveyans çalışmalarında PFGE yönteminin alternatifi olabileceği, yöntemin, PFGE' ye göre maliyet, geri dönüş süresi ve ayırım gücü yönünden avantajları olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada hastane enfeksiyonlarının surveyansında AFLP' nin kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmış, test mikroorganizması olarak *A. baumannii* kontrol yöntem olarak da PFGE seçilmiştir. Çalışmada test suşu olarak Ç. Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına çeşitli servislerden gönderilen klinik materyalden izole edilen Karbapeneme dirençli 49 *A. baumannii* izolatı kullanılmıştır. Test suşları arasındaki klonal ilişki AFLP ve PFGE ile araştırılmıştır. PFGE yöntemi ile % 100 uyumlu bulunan ve A kümesi içerisinde alt kümelerle dağılan 18 suşun 11' inin AFLP ile de % 100 ilişkili benzer alt kümelerle dağıldıkları, bu küme içerisinde yer alan 14 suşun da her iki yöntem ile bağımsız tek üyeli kümeler içerisinde dağıldıkları görüldü. Böylece iki testin aynı suşları % 100 uyumlu ve ilişkisiz tek üyeli kümelerle dağıtabilme yetenekleri dikkate alındığında AFLP' nin PFGE karşısında özgüllüğünün % 78.1 (25/32) olduğu görüldü. Ancak her iki yöntemin ayırım güçleri arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, Amplified Fragment Length Polymorphis, Pulsed Field Gel Electrophoresis.

ABSTRACT

Molecular characterization of *A. baumannii* strains isolated from nosocomial infections by AFLP and PFGE methods

Importance of *A. baumannii* is rising among nosocomial infections. It is isolated so often especially from intensive care units. Surveillance programmes, rational antibiotic usage, education of personnel and hygiene is very important to prevent nosocomial infections. Like in most of nosocomial infections, it is very important to evaluate the epidemiological properties and to elucidate the clonal relations between *A. baumannii* isolates. Among these methods the PFGE is accepted as golden standard in terms of surveillance of outbreaks with especially *A. baumannii* associated infections and in determining the source and clonal relations of those strains. But in recent years it is suggested that AFLP could be an alternative to PFGE in terms of advantages of cost, feedback time and discriminatory power. In this study, the investigation of availability of AFLP method was the goal and *A. baumannii* was selected as test organism while PFGE was the control method. 49 *A. baumannii* isolates which are identified as carbapenem resistant and sent to Cukurova university faculty of medicine Balçali Hospital Central laboratory from various wards were included as testing isolates. The clonal relations between isolates were determined both with PFGE and AFLP methods to investigate the discrimination power of methods. The 11 of 18 strains which are distributed into subclusters in group A with 100% compatibility were found to be in 100% related subclusters in AFLP too and furthermore 14 strains which were in this cluster were found to distribute in independent single-membered clusters by two of the methods. Thus when considering the ability of two methods to distribute same strains into 100% identical and unrelated single membered clusters the specificity of AFLP was found to be 78.1%(25/32). However there was no significant difference between discriminatory power of two methods.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, AFLP, Pulsed Field Gel Electrophoresis

1.GİRİŞ

Toprak kökenli bir bakteri olup tıbbi önemi uzun yıllar anlaşılmamış olan asinetobakterler günümüzde hastane florasının önemli bir bileşeni haline gelmiştir. Son 15 yılda *A.baumannii* ve *A.lwofi* gibi bazı türler, hastanelerde özellikle yoğun bakım ünitelerinde, ventilasyon bağımlı hastalarda, cerrahi yara enfeksiyonlarında yüksek mortalite ile seyreden Hastane Enfeksiyonları yani “Sağlık Hizmeti ile İlişkili Enfeksiyonlar (SHİİ)” ile neredeyse birlikte anılmaya başlamıştır. Bu bakteriler ciddi enfeksiyonlarda rezerv olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğu ile hastane ortamında yer yüzey ve tıbbi cihaz dezenfeksiyonunda kullanılan kimyasallara karşı kısa sürede direnç geliştirmeleri bu mikroorganizmaların hastane ortamından eradikasyonunu güçleştirmektedir^{1,2,7}. Tıbbi uygulamalar esnasında duyarlı hastaya bulaşan asinetobakterler hastane uygulamalarına bağlı görülen ölümlerin en önemli sebebi haline gelmiştir. Tüm Hastane Enfeksiyonlarında olduğu gibi asinetobakter enfeksiyonlarının tedavi ve kontrolünde yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi kadar yeni ve etkin kontrol stratejilerinin geliştirilmesi de önemlidir. Yeni antibiyotik geliştirmenin zamana bağlı, yüksek maliyetli ve selektif toksisite özelliklerinin iyi programlanması gibi zorluklarının yanı sıra, bu antibiyotiklere karşı da kısa sürede direnç gelişeceği korkusudur. Bu bağlamda hasta ve personel eğitimi, kısıtlı veya akılcı antibiyotik kullanımı ve güçlü sürveyans dayalı kontrol programlarının önemi artmaktadır. Eğitim ve akılcı antibiyotik kullanımında faydalanılacak verilerin, hızlı sonuçların üretilebildiği güvenilir bir mikrobiyoloji laboratuvarından elde edilmiş moleküler düzeyde, yüksek ayırım gücüne sahip sonuçlar üreten sürveyans çalışmalarından elde edilmiş olması kontrol çalışmalarının başarısını artıracaktır.^{3,4,5,9} Bu nedenle tüm dünyada öncelikli strateji moleküler epidemiyolojik yöntemlerle bu suşların izlenmesi üzerine kurulmaktadır. Yeni ve duyarlı yöntemlerle tek nokta mutasyon tespitine bile olanak veren moleküler çalışmalar sayesinde, suşların klonal düzeyde tanımlanmaları, bulaş suşlarının sporadik suşlardan ayırt edilmesi sağlanacak ve hedef doğru tespit edilerek kaynak yok edilecektir^{6,10}. Bu bağlamda *A. baumannii* izolatlarının klonal ilişkilerinin tespit için Randomly Amplified Polimorfik DNA (RAPD), Polimeraz zincir reaksiyonu-Restricted fragment length polymorphism (PCR-RFLP), Multilokus sekans analizi

(MLSA), Multilokus enzim elektroforezi(MLEE) ve Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) gibi yöntemler kullanılmış, bu yöntemlerin hiç birisinin tek başına istenen ayırım gücüne sahip olmadığı görülmüştür.^{15,16} Bu yöntemlerden en az ikisinin birlikte kullanılması ile ayırım gücünün artırılabilceği bildirilmiştir. Son yıllarda bu yöntemlere alternatif olarak genomun açık uçlu kesen spesifik restriksiyon enzimleri ile kesimi ve açık uçları tanıyan adaptörlerle başlayan primerlerin kullanıldığı nükleik asit amplifikasyonu bazlı AFLP testinin, MLSA ve total genom dizi analizi kadar yüksek ayırım gücüne sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Hastane infeksiyonlarının günümüzdeki önemi, asinetobakterlerin Hastane İnfeksiyonlarındaki yeri ve sürveyansda kullanılan klonal düzeyde sonuç üreten PFGE ve AFLP testlerinin ayırım güçlerine dayalı kullanılabilirlikleri irdelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastane İnfeksiyonları

Hastane infeksiyonları dünya genelinde, modern sağlık hizmetlerinin uygulandığı hastanelerde, hizmet kalitesini olumsuz yönde etkileyen en önemli tıbbi problemlerden birisidir. İlerleyen teknolojik gelişmeler sonucunda kompleks tanı ve tedavi yöntemleri kullanılarak bir taraftan hastaların ömrü uzatılırken, diğer taraftan da Hastane infeksiyonları sebebi ile önemli oranda önlenabilir hasta kayıpları ve maddi kayıplar yaşanmaktadır.^{8,11} ABD’ de, hastane infeksiyonları ölüm sebepleri arasında 4. sırada yer almakta olup, her yıl iki milyon kişide hastane infeksiyonu görüldüğü ve bunlardan 103.000’ inin hayatını kaybettiği bildirilmektedir.^{3,12} Bu rakam bu ülkede bir yıl içerisinde AIDS, meme kanserleri ve trafik kazalarında ölenlerin toplam sayısına denktir. Bir başka ifade ile bu ülkede hastaneye yatırılarak izlenen hastalar arasında infeksiyon riskinin en az 1/3’ ü önlenabilir olmak üzere % 5-8 olduğunu göstermektedir. Bu hastaların sağlık kuruluşlarına ek maliyetinin 2003 yılında 4.5 Milyar Dolar olduğu bildirilmiştir.¹² İngiltere’ de ise her yıl 100.000 hastane infeksiyonu şekillendiği ve bu hastaların en az 5.000’ inin kaybedildiği bildirilerek, hastane infeksiyonlarının sağlık kurumlarına getirdiği ek maliyetin yaklaşık olarak 1.6 milyar euro kadar olduğu belirtilmiştir.¹³ Ek mali yükün üriner sistem infeksiyonlarında 4, pnömonilerde 33.5 güne kadar uzayan ek yatış süresi, yoğun bakım ünitesinde uzamış yatış, hematolojik, biyokimyasal, mikrobiyolojik ve radyolojik ek testler, ek ve daha geniş spektrumlu antibiyotik kombinasyonlarının kullanılması, ek diğer ilaçlar, ek cerrahi işlemler ve katater uygulamaları ve ek çalışma saatinden kaynaklanmaktadır¹⁷. Çeşitli ülkelerden bildirilen raporlarda da hastane infeksiyonlarının küçümsenemeyecek morbidite ve mortalite oranlarına ulaştığı, artan yoğunlukta hasta güvenliğini tehdit ettiği, hastanede kalış süresini artırdığı ve dolaylı olarak iş yükü ve maliyette artışlara neden olduğu bildirilmiştir^{3,17}. Araştırmalarda %20-40’ı önlenabilir olan hastane infeksiyonlarının alınacak ciddi tedbirler ile gelecekte sıfıra indirgenmesinin mümkün olacağı ileri sürülmüştür^{11,12,45}.

2.1.1. Tarihçe

Hastane infeksiyonları çeşitli sebeplerle tanı veya tedavi almak için sağlık kurumlarına başvuran hastalar arasında çok daha eski dönemlerden beri görülmekle beraber, ilk olarak 19 yy sonlarına doğru önemi fark edilmiştir. Bu dönemde Boston’ dan Oliver Wendel Holmes ve Vienna’ dan Ignaz Philip Semmelweis puaperal sepsisin bulaşıcı tabiatıta olduğunu fark etmişlerdir. Semmelweis gebe kadınlar arasında % 8.3 olan hastane kökenli puaperal sepsis ölümlerini, klorlu su ile ellerin yıkanmasını sağlayarak %2.3’ e düşürmüştür³. Aynı yıllarda Joseph Lister’ in postoperatif yara infeksiyonlarında bakterilerin önemini gösterip, karboksilik asidi bu infeksiyonların tedavisi ve önlenmesinde başarı ile kullanması, hastane infeksiyonu konseptinin yerleşmesine ve kontrole yönelik yeni fikirlerin doğmasına sebep olmuştur. Günümüze kadar hastane infeksiyonlarından korunmada birçok görüş ortaya atılmıştır. Pasteur 1862’ de mikroorganizmaların bazı hastalıklara neden olduğunu ispatlamış ve etyolojik ajanların infeksiyon oluşturduğu fikrini tamamen benimsetmiştir. Florence Nightingale 1863’ de hastanedeki hijyen şartlarının postoperatif komplikasyonlarla doğrudan ilişki olduğunu tespit etmiş ve hastane infeksiyonlarını önlemek için yaptığı el yıkama ve hasta izolasyonu çalışmaları ile yaşadığı dönemde hastane enfeksiyonuna bağlı ölümlerin azaltılmasına büyük katkılar sağlamıştır³. Penisilinin 1940’ ıl yıllarda bulunarak hekimlerin kullanımına sunulması, infeksiyon hastalıkların önlenmesi konusunda son derece önemli mesafelerin kat edilmesine yol açarken, yarattığı aşırı güvenle yanlış kullanım sonucu dirençli suşların ortaya çıkışına sebep olmuş ve hastaneler bu günkü anladığımız manada kendine özgü yeni patojenlerle tanışmıştır^{18,19}. Bu bağlamda 1950’ li yıllarda pandemi haline dönüşen ve yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden *Staphylococcus aureus* hastane infeksiyonları, infeksiyon kontrol programlarının yeniden ve daha ciddi olarak değerlendirilmesine sebep olmuştur. Artık hastane kökenli infeksiyon etkenleri hastanın yanında getirdiği suşlarla değil hastanede yaratılan çoklu ilaç dirençli suşlarla yeni bir boyut kazanmıştır. Dr. Brendan Moore (1959) İngiltere’ de kontrol programlarının kurumsallaştırılması yönünde ilk adımları atmış ve “ kontrol henşireleri” tanımının yaratıcısı olmuştur³.

2.1.2. Tanım

Hastane infeksiyonları ilk kez 1988 yılında Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından tanımlanmış ve daha sonraki yıllarda ek maddelerle yenilenmiştir. Hastaneye başvuru esnasında inkübasyon periyodunda olmayan ve hastanın hastaneye yattığı süre içinde ortaya çıkan herhangi bir infeksiyon, hastane infeksiyonu olarak kabul edilir. Hastane infeksiyonları, genellikle hasta hastaneye yattıktan 48– 72 saat sonra gelişir. Hastanın taburcu olduktan sonra 10 gün içinde gelişen infeksiyon da hastane infeksiyonu olarak değerlendirilir. Ancak Lejyonella ve suçiçeği gibi inkübasyon süresi uzun hastalıklarda bu zaman süresi ayrıca değerlendirilir^{20,21}.

Yenidoğanda nozokomiyal infeksiyon kriterleri karmaşıktır ve hastanede kalış süresiyle ilişkilidir. Annede hastaneye yatış sırasında infeksiyon yoksa, ama 48-72 saat sonra doğan bebek infekte ise bu infeksiyon nozokomiyal kabul edilir. Transplental yoldan geçen infeksiyonlar bu bağlamda incelenmez. Cerrahi girişim sonrası 30 gün içinde ortaya çıkan cerrahi alan enfeksiyonları ve bir yıl içinde ortaya çıkan protez enfeksiyonları da hastane infeksiyonu kapsamında değerlendirilir^{20,22}.

Sağlık Hizmetleri ile ilişkili infeksiyon tanımı ise hastanelerle birlikte cerrahi merkez, dializ merkezi gibi kurumsal merkezlerde; bakımevi veya evde, ayaktan ya da yatarak hastane ortamı dışında da verilen sağlık hizmetleri sonucu ortaya çıkan infeksiyonları da içine alan yeni bir tanımlama olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu tanım değişiminin arkasında hastane infeksiyonunun hastaneden değil hastanelerdeki hatalı uygulamalardan kaynaklanmış olması ve bu hataların azaltılması veya yok edilmesi halinde aslında hastane infeksiyonu denen bir probleminde kalmayacağı düşüncesi yani “ 0” infeksiyon hedefi yatmaktadır. Sağlık hizmeti verilirken inkübasyon periyodunda veya aktif olmayan ancak daha sonra verilen hizmetle ilişkili olarak ortaya çıkan infeksiyonlar sağlık hizmeti ile ilişkili infeksiyon olarak kabul edilmektedir.

SHİİ taburcu olan hastalar, hasta refakatçileri veya ziyaretçiler yoluyla toplumda da yayılarak ciddi hastalıklara yol açabilirler. Ayrıca sağlık çalışanlarında gelişen mesleki infeksiyon hastalıkları da sağlık hizmeti ile ilişkili infeksiyonlar olarak değerlendirilmelidir.

2.1.3. Epidemiyoloji

SHİİ' lam sıklığı dünya genelinde, ülke, bölge, hasta gruplarının özellikleri, hastaneleri uyguladıkları işlemlerin kompleksliği, cerrahi işlem sayısı, antibiyotik kullanım politikaları ve genel ve yoğun bakım yatak sayıları gibi parametrelere bağlı olarak farklılıklar göstermek üzere %3-17 arasında değişmektedir^{21,23}. Bu oran yoğun bakım üniteleri ve yanık ünitelerinde artarak %20-40' lara çıkmaktadır. SHİİ oranı gelişmiş ülkelerde %5-10 arasında değişirken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran %10-40' lara çıkmaktadır. SHİİ' lamın gelişimi açısından risk faktörleri arasında konağın özellikleri, çevresel faktörler ve sağlık personeli ile ilişkili özelliklerde belirleyicidir^{21,23,24}. Konağın yaşı, immün sistem hastalıkları yada immünsupresif ilaç kullanımı, prematürite ve düşük doğum ağırlığı, santral kateter, üriner kateter, entübasyon gibi invaziv araç kullanımı, yanık yada derin travma öyküsü riski arttıran faktörler arasında sayılır^{13,26}. Ameliyathane şartları, hastanede yapım-onarım çalışmaları ve sağlık personelinin el hijyeni kurallarına uyum oranı, ameliyat ve invaziv girişimler sırasında oluşan komplikasyonlar gibi hastane ile ilişkili risk faktörleri de infeksiyon oranının değişmesinde önemlidir. Bu faktörlerin yanı sıra etyolojik ajanların özellikleri büyük bir öneme sahiptir. SHİİ etkenleri genellikle hastanelerde yoğun olarak kullanılan antibiyotikler ile yer ve yüzey dezenfektan ve antiseptiklerine karşı direnç kazanmış mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmaların insidansı da kullanılan antibiyotik politikalarına göre zaman içerisinde değişimler gösterir.

Üriner kateterle ilişkili üriner sistem infeksiyonları (ÜKİ-ÜSİ), cerrahi alan infeksiyonu (CAİ), ventilatörle ilişkili pnömomi (VİP) ve santral venöz kataterle ilişkili kan dolaşımı infeksiyonları (SVKİ-KDİ) en sık karşılaşılan SHİİ olup, bu infeksiyonlara neden olan mikroorganizmaların oranları ise dönemsel farklılıklar gösterir^{27,28,29}.

Ventilatörle ilişkili pnömomilerin %60-90'ından; *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, ve Enterobacteriaceae ailesi üyesi gram negatif basiller, %10-30' undan da *S.aureus* ve Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) gibi Gram pozitif koklar etken patojenler olarak izole edilirler.^{30,31} National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) komitesinin 1986-2003' de yaptığı araştırmada YBÜ görülen pnömomilerde gram negatif basillerin insidansının arttığını tespit etmiştir⁵. Gram negatif bakteri kökenli SHİİ' da karbapenemlere karşı gelişen direnç nedeniyle tedavi zorlukları yaşanmaya başlamıştır. ABD merkezli bir çalışmada ventilatör bağımlı pnömomi etkenlerinden *P.aeruginosa*

izolatlarında karbapenemlere direnç oranları %26.4, *A.baumannii* izolatlarında ise %36.8' olarak tespit edilmiştir²⁹. En büyük kaygı *A.baumannii* gibi ventilatörle ilişkili pnömoni etkeni önemli gram negatif patojenler arasında polimiksinleri de içeren tüm antibiyotiklere dirençli klonların artmasıdır^{5,32,33}.

SHİİ' dan kan dolgıımı infeksiyonların (SVKİ-KDİ) etyolojisinden yaklaşık olarak %34 oranında koagülaz negatif stafilokoklar sorumlu bulunurken, yaklaşık olarak %9.9' undan *S.aureus*, %16' ından da enterokok türleri izole edilmektedir. Gram negatif çomaklardan klebsiella türleri, *E. coli*, enterobakter türleri ve *P. aeruginosa* olguların ancak %30 kadarında etken olarak görülür.^{28,34} ABD' de Hastane kökenli *K. pneumoniae* klinik izolatlarının % 27.1' i 3.kşak sefalosporinlere dirençliyen %10.8' i de karbapenem' lere karşı dirençli bulunmuştur. Avrupa ülkelerinde bu oranlar ABD' den bildirilen direnç oranlarından daha yüksektir³⁵.

Üriner sistem SHİİ genellikle kataterle bağımlıdır ve en sık karşılaşılan etkenler gram negatif çomaklardır. Kateterizasyonun ikinci gününden sonra, bakteriüri riskinin günlük olarak %5-10 oranında arttığı tahmin edilmektedir. *E.coli* en sık izole edilen gram negatif basil olup, bunu sırasıyla *P.aeruginosa*, klebsiella ve enterobakter türleri ve *A. baumannii* izlemektedir. Dünya genelinde özellikle bakteriler arasında CTX-M tipi GSBL'lerin yaygın olmasına rağmen ABD' de, SHV-tipi ve TEM tipi GSBL'lerin hastane kökenli organizmalar arasında baskın olduğu gösterilmiştir^{12,13,36}.

Diğer taraftan Sağlık Hizmeti ile İlişkili Cerrahi yara yeri infeksiyonlarında, ameliyatın lokalizasyonuna göre değişmekle beraber hala en sık karşılaşılan patojenlerin *S.aureus*, koagülaz-negatif stafilokoklar olduğu, ancak intra-abdominal cerrahiye takiben infeksiyonlarda Gram-negatif basiller ve enterokokların daha sık izole edildiği bilinmektedir. Transplantasyon sonrası CAİ' m yaklaşık üçte birinden ise enterokoklar sorumludur.³⁷

National Healthcare Safety Network (NHSN), 2006-2007 yıllarında yapılan çok merkezli çalışmaların sonuçlarına dayanarak, hastane infeksiyonlarına neden olan antibiyotik dirençli en yaygın 10 mikroorganizmanın; koagülaz negatif stafilokoklar (%15), *S. aureus* (%15), enterokoklar (%12), *Candida* türleri (%11), *E. coli* (%10), *P. aeruginosa* (%8), *K. pneumoniae* (%6), enterobakter türleri (%5), *A. baumannii* (%3), ve *K. oxytoca* (%2) olduğunu duyurmuştur. . Bu mikroorganizmaların %16' ından çoğunda ÇİD gösterilmiştir. ÇİD oranı; methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)

suşlarında %8 , vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*,(VRE) suşlarında %4, carbapenem-resistant *P.aeruginosa* suşlarında %2, extended-spectrum cephalosporin-resistant *K.pneumoniae* suşlarında %1, extended-spectrum cephalosporin-resistant *E.coli* suşlarında %0.5 ve carbapenem resistant *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, ve *E.Coli* suşlarında da %0.5 olarak tespit edilmiştir³⁹.

Latin Amerika, Asya, Afrika ve Kosova, Litvanya, Makedonya, Türkiye ve Yunanistan'ın da dahil olduğu Avrupa ülkelerinde 2003-2008 yılları arasında toplam 173 YBÜ' nün verilerinin değerlendirildiği INICC (İnternational Nosocomial Infection Control Consortium) raporu verileri ile NHSN' nin 2006 -2007 yılları arasındaki ikinci raporuna ait verilerin karşılaştırılmasında iki dönem arasında kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu hızlarının yaklaşık üç kat, kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonu hızlarının yaklaşık iki kat ve VİP hızlarının ise yaklaşık dört kat arttığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmaların sonuçlarına göre direnç oranlarında; *S.aureus*' ta metisilin direncinin %56.8 den %84.1' e *K. pneumoniae*' de seftazidim veya seftriakson direncinin %27.1den %76.1' e, *A. baumannii*' de imipenem direncinin %29.2' den %46.3' e ve nihayet *P. aeruginosa* suşlarında piperasilin direncinin %20.2' den %78.0' e çıktığı, gelişmiş ülkelerle gelişmemiş veya gelişmekte olan ülkeler arasında direnç oranlarında ciddi farklar olduğu dikkati çekmiştir³⁹.

2.1.4. SHİİ'nin Kontrolü

SHİİ'ı önlemek için yapılan çalışmaların en önemli ayağını enfeksiyonun kaynak ve bulaş yollarını belirleyen hastane enfeksiyonları surveyansı oluşturur. Bir merkezdeki hastane enfeksiyon oranı sağlık hizmetlerindeki kalite ve güvenilirliğin önemli bir göstergesidir. Bu oranı izlemek için surveyans çalışmalarının geliştirilmesi, enfeksiyon kontrol çalışmalarının etkinliğinin değerlendirilmesi ve öncelikleri tanımlamada ilk ve önemli bir adımdır. Surveyans, hastalıklara ait verilerin düzenli olarak toplanması, bu verilerin analiz edilerek değerlendirilmesi ve ilgili birimlere dağıtılması işlemlerinin toplamıdır. İyi işleyen bir hastane enfeksiyonu surveyans sistemi hastane enfeksiyonlarının dağılımını ve sıklığını gösterebilmeli, dünyadaki eğilimleri izleyebilmeli ve önleyici çalışmaların etkinliğini değerlendirebilmelidir

Hastane enfeksiyonları surveyans programının amaçları; hastane içi veya hastaneler arası karşılaştırma yapabilmek amacıyla hastane enfeksiyonları insidans,

prevalans ve dağılımını izlemek, salgınların erken tanımlanmasını sağlamak, salgının kaynağını göstermek, hastanedeki tüm personelin antimikrobiyal direnç hakkında farkındalığını geliştirmek, yeni ve yoğunlaştırılmış önlem programları ihtiyacını tanımlamak, bu programların etkisini değerlendirmek ve ileri epidemiyolojik çalışmalar için risk faktörlerini analiz etmektir. Tüm bu çalışmalarda, Mikrobiyoloji laboratuvarının rolü oldukça büyüktür. Fenotipik ve genotipik epidemiyolojik tiplendirme çalışmaları ile hastaların yatış süresinin uzamasına ve ek tedavi masraflarının artmasına neden olan bu infeksiyonların önlenmesine, hasta, hastane personeli ve ülke ekonomisine büyük katkılar sağlayacaktır.

Amerika Birleşik Devletlerinde hastane infeksiyonları surveyansı 1960' ılı yıllardan beri infeksiyon kontrolünün temel bileşenidir.²⁵ 1970' li yıllarda kurulan ulusal hastane infeksiyonları sürveyans sistemi (NNIS) ile ülke genelinde 300' den fazla hastaneden veri toplanması ve her kurumun kendini benzer hastanelerle kıyaslaması sonucunda. kateter ilişkili kan dolaşımı infeksiyonu, kateter ilişkili üriner sistem infeksiyonu, CAİ gibi sık görülen hastane infeksiyonlarında %30-40' a varan azalmalar sağlanmıştır. Center for Disease Control-Study on the Efficacy of Nosocomial Infections Control (CDC-SENIC), hastane sürveyansı, 250 yatağa bir kontrol hemşiresi hastane epidemiyoloji ve geri bildirim komponentlerine uyulduğu takdirde toplam infeksiyon oranında %32 azalma olduğunu bildirmiştir.³ Avrupa ülkelerindeki ulusal sürveyans sistemleri de benzer azalmalar bildirmiştir. Ancak özellikle son on yılda yapılan çalışmalar, etkinliği bilimsel olarak kanıtlanmış önlemlerin eş zamanlı olarak (bundle approach=bütünleşik, paket önlemler) uygulamaya konulması ile çoğu hastane infeksiyonunun ve özelliklede invaziv araçlarla ilişkili hastane infeksiyonlarının (üriner kateter, endotrakeal tüp, santral kateter uygulamaları esnasında oluşan komplikasyonlar) ciddi oranlarda azaldığı gözlenmiştir^{40,42,44}. 2006 yılında ABD Sağlık Hizmetlerinin İyileştirilmesi Enstitüsü (Institute for Healthcare Improvement) 100.000 Yaşam Kampanyası Müdahalelerine, santral kateter VAP ve SVKİ-KDİ infeksiyonlarının paket önlemlerle azaltılmasını eklemişlerdir³⁴.

Damar içi kateter infeksiyonları için oluşturulan önlem paketlerinin uygulamaya konulduğu tek merkezli ve çok merkezli çalışmaların sonucunda, el hijyeni, santral kateter takarken maksimum bariyer önlemlerine uyum, klorheksidinle cilt antisepsisi sağlanması, femoral kateter kullanımından kaçınılması ve günlük bakım, gereksiz

kateterlerin hemen çekilmesinden oluşan paketin uygulanması ile SVKİ-KDE hızlarında %66 oranında kalıcı bir azalma sağlanmıştır⁴³.

Ülkemizde tüm kamu ve özel yataklı tedavi kurumları, SHİİ'nin sürveyansını yapmak ve bildirimde bulunmakla yükümlüdür. SHİİ tanısı CDC' nin 2008 yılında güncellenen standart tanı kriterlerine göre konulmakta ve sürveyans verileri, standart formlarla web tabanlı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) üzerinden toplanmaktadır. Sonuç olarak surveyans çalışmalarında artık hedef sadece hastaneler arası kıyaslama yaparak SHİİ'nin hızlarını azaltmak değil, “ sıfır tolerans” ve “ sıfır SHİİ” hedefini yakalamaktır^{4,40,42,44}.

2.2. Asinetobakterler

Asinetobakterler (*A.baumannii*), oksidaz negatif, nonfermentatif gram-negatif kokobasiller olup doğada toz ve toprakta, organik atıkların üzerinde saprofit olarak yaşayan mikroorganizmalardır. *A. calcoaceticus* su, toprak ve sebzelerde; *Acinetobacter genomik tür 3* su, toprak, sebze ve insan derisinde; *A. johnsonii* su, toprak, insan derisi ve gaitasında; *A. lwoffii* ve *A. radioresistens* insan derisinde, *Acinetobacter genomik tür 11* su, toprak, sebze ve insan gastrointestinal sistem florasında gösterilirken, *A.baumannii* çevresel örneklerde nadiren de insan derisinden izole edilir^{15,46}. Uzun yıllar tıbbi yönden ihmal edilebilir mikroorganizmalar olarak kabul edilirlerken ilk olarak *A.lwofi* türleri hastanelerde hem çevresel örneklerden, hem tıbbi enstrumanlardan hem de hastaya ait klinik materyallerden giderek artan sıklıkla izole edilmeye başlamıştır. Ancak düşük prevalansları sebebi ile klinik önemleri çok iyi anlaşılamamış olmakla beraber 1990'lı yılların başlarından itibaren hastanelerde immün suprese hastalarda görülen hastane infeksiyonlarında daha sık rapor edilmeye başlanmaları ve *A. lwofi* izolatları ile daha yüksek oranda tedavi başarısızlıklarına sebep olan *A. baumannii* izolatlarının yer değiştirmesi türe olan ilgiyi iyice artırmıştır.^{47,48,49,98} Günümüzde tüm dünyada, ciddi tıbbi uygulamaların yapıldığı bütün büyük hastanelerde, beta laktam grubu antibiyotikler, aminoglikozidler ve kinolonların yanı sıra kısa sürede son seçenek antibiyotikler olan karbepenem grubuna karşıda direnç gelişmiş ve *A.baumannii* suşları major sağlık problemi haline gelmiştir⁵⁰.

2.2.1. A.baumannii

A.baumannii tipik bir çevresel organizma olarak görünmemektedir. *A. baumannii*'ye normal florada da nadiren, %0.5-1 gibi düşük oranda rastlanmaktadır^{51,52}. Hastanede yatan hastalarda ise kolonizasyon oranı sağlıklı bireylere göre oldukça yüksektir¹⁵.

2.2.2. Tarihçe:

Hollanda' ıl bir mikrobiyolog olan Beijerinck, 20. yüzyılın başlarında, kalsiyum asetatla zenginleştirilmiş bir besiyerinde topraktan izole ettiği bir organizmayı tanımlamış ve “*Micrococcus calco-aceticus*” ismini vermiştir. Daha sonraki yıllarda benzer organizmalar tanımlanmış ve en az 15 farklı cins ve tür (*Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha* , *Moraxella lwoffii* ,*Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum* ve *Achromobacter mucosus*) ismi verilmiştir.¹⁵ 1954 yılında Brisou ve Prevot benzer morfolojik özellik gösteren bu bakterileri, *Achromobacter* cinsi içerisindeki hareketli mikroorganizmalardan ayırmışlar ve yunanca hareketsiz anlamına gelen Akinetos sözcüğünden esimlenerek *Acinetobacter* adını önermişlerdir. Ancak bu cins ismi 1968' lere kadar geniş çapta benimsenmemiştir. Baumann ve ark 1968' de yapıları morfolojik ve biyokimyasal çalışmalar sonucu, tek bir cinse ait bu farklı türleri *Acinetobacter* olarak yayınlamış ancak fenotipik özelliklerine dayalı daha ileri bir sınıflandırma mümkün olamamıştır. Bu çalışmalar 1971 de *Moraxella* ve ilişkili bakterilerin taksonomisi altkomitesi tarafından bu bakterilerin *Acinetobacter* cinsi olarak kabul edilmesiyle sonuçlanmıştır. “Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology” 1974 başında *Acinetobacter* cinsi ve içerisinde tek tür olarak da *A. calcoaceticus* yayınlanmıştır^{15,46}.

2.2.3. Taksonomi:

Acinetobacter cinsi *A. calcoaceticus* adlı tek tür ile *Neisseriaceae* ailesi içinde incelenmektedir. Taksonomik çalışmalar sonucu *Acinetobacter* cinsi günümüzde Gammaprotobacteria takımında, *Moraxellaceae* ailesi içinde *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilgili diğer cinslerle birlikte yer almaktadır⁵³ (Tablo 1). Bu cinsin uzun ve karmaşık tarihinde en büyük buluş 1986' da Bouvet ve Grimont tarafından başarılmış ve DNA-

DNA hibridizasyon çalışmalarına göre 12 genomik türe ayrılmıştır⁵⁴.Günümüze kadar yapılan DNA benzerlik çalışmaları sonucunda en az 32 genomik tür belirlenmiştir. Bunların 17'sine onaylanmış tür isimleri verilirken, diğerleri henüz isimlendirilememiştir^{15,46} (Tablo 2).

Tablo 1. Asinetobakterlerin sınıflandırılması

Alem:	Bacteria
Şube:	Proteobacteria
Sınıf:	Gamma Proteobacteria
Takım:	Pseudomonadales
Familya:	Moraxellaceae
Cins:	<i>Acinetobacter</i>

Asinetobakter türlerinden *A.calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter genomic tür 3* ve *Acinetobacter genomic tür 13* TU çok yakın ilişkili dört türdür ve fenotipik özellikleriyle birbirinden ayrılması güçtür.Bu nedenle *A. calcoaceticus – A. baumannii complex* olarak isimlendirilir. *A. calcoaceticus* hariç ,bu gruptaki mikroorganizmalar hem toplum kaynaklı hem de nozokomiyal enfeksiyonların çoğundan sorumludur. *A calcoaceticus* ise çevresel türdür ve ciddi klinik hastalıklarda izole edilmemiştir. Bu komplekse ismini veren çevresel tür olduğundan *A. calcoaceticus – A. baumannii complex* ismi yanıltıcı olabilmektedir^{15,46}.

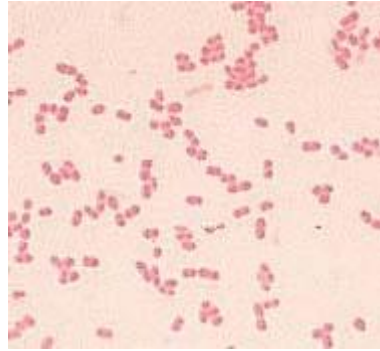
Tablo 2. *Acinetobacter* spp. için çeşitli araştırmacılara göre genomik tür ve sus tipleri

Tür Adı	Genomik Tür	Referan suş	Referans*
<i>A.calcoaceticus</i>		ATCC 23055T	1,2
<i>A.baumannii</i>		ATCC 19606T	1,2
<i>A.haemolyticus</i>		ATCC 17906T	1,2
<i>A.juni</i>		ATCC 17908T	1,2
<i>A.johnsonii</i>		ATCC 17909T	1,2
<i>A.lwoffii</i>	8,9	ACTC 15309T	1,2
<i>A.radioresistens</i>	12	IAM 13186T	1,2,3
<i>A.ursingii</i>		LMG 19575T	4
<i>A.schidleri</i>		LMG 19576T	4
<i>A.parvus</i>		LMG 21765T	5
<i>A.bouvetii</i>		DSM 14964T	6
<i>A.baylyi</i>		DSM 14961T	6
<i>A.towneri</i>		DSM 14962T	6
<i>A.tendoi</i>		DSM 14970T	6
<i>A.grimanti</i>		DSM 14968T	6
<i>A.tjernbergiae</i>		DSM 14971T	6
<i>A.gernerii</i>		DSM 14967T	6
<i>A.venetianus</i>		ATCC 31012	7
	3	ATCC 19004	1,2
	6	ATCC 17979	1,2
	10	ATCC 17924	1,2
	11	ATCC 11171	1,2
	13BJ,14TU	ATCC 17905	2,8
	14BJ	CCUG 14816	8
	15BJ	SEIP 23.78	8
	16	ATCC 17988	8
	17	SEIP Ac87.314	8
	13TU	ATCC 17903	2
	15TU	151a	2
	1 ve 3 arasında	10095	9
	13 TU benzeri	10090	9

*1, Bouvet ve Grimont 1986; 2, Tjernberg ve Ursing 1989; 3, Nishimura ve ark. 1988; 4, Nemec ve ark. 2001; 5, Nemec ve ark. 2003; 6, Carrve ark. 2003; 7, Vaneechoutte ve ark. 1999; 8, Bouvet ve Jeanjean 1989; 9, Gerner-Smidt veTjernberg 1993.

2.2.4. Morfoloji

Asinetobakterler 1-1.5µm x 1.5-2.5 µm boyutlarında gram negatif, kokobasil şeklinde görülen hareketsiz bakterilerdir(Şekil 1). Seçici olmayan katı besiyerinde yavaş üreme fazında genellikle kokoid formundadırlar. Sıklıkla çiftler halinde bulunmaları ile *Neisseria* türlerine benzemektedir. Pozitif kan kültür tüpünden hazırlanan preparatlarda silik olarak gram pozitif olarak da görülebilmektedir^{15,46,55,56,57}.



Şekil 1: Asinetobakterlerin Gram boyama görüntüsü

2.2.5. Üreme ve fizyolojik özellikleri

Asinetobakterler zorunlu aerobik, nonfermentatif mikroorganizmalardır. Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan kanlı agar, triptik soy agar ve macconkey besiyerinde kolaylıkla ürerler. Ancak miks floralı örneklerden izolasyonu için Leeds Acinetobacter besiyeri veya Herelleae agar (Difco, ABD) gibi seçici besiyerlerin kullanılması önerilmiştir. Asinetobakterlerin çevresel örneklerde ve deri kolonizasyonunu göstermek amacıyla alınan deri sürüntü örnekleri gibi klinik materyalden üretilmesi için, pH' ı düşük, asetat veya diğer uygun karbon kaynaklar ve/veya nitrat ile zenginleştirilmiş, sıvı mineralli besiyerinin kullanılması ve besiyeri kuvvetlice sallayarak inokülasyonun yapılması ve ekili besiyerlerinin 30°C de inkübasyonu uygun olur. Üreme ısıları değişkendir. Genellikle 20 ile 35 derece arasındadır. Klinik olarak önemli türlerin optimum üreme ısısı 37°C' dir. Daha yüksek sıcaklıklarda da üreyebilirler^{15,46,55,56,57}.

Katı besiyerinde koloniler 1-2 mm. çapında, düzgün, opak ve bazen mukoiddir (Şekil 2). Mc. Conkey agarda renksiz ya da hafif pembemsi koloniler oluştururlar. *A.calcoaceticus-A.baumannii* kompleks kolonileri *Enterobacteriaceae* kolonilerine

benzer ve bir gecelik inkübasyondan sonra 1.5-3 mm çapa ulaşırlar. Ancak kompleks dışı türlerin çoğu daha küçük ve yarı saydam koloniler oluşturur. *Enterobacteriaceae*'ların aksine, kompleks dışı türlerin bazıları McConkey Agarda üremezler. *A. haemolyticus* ve *Acinetobacter genomik tür 6, 13BJ, 14 BJ, 15 BJ, 16 ve 17* gibi iyi tanımlanmamış türler koyun kanlı agarda hemoliz oluşturur. Bu özellik komplekse ait izolatlarda hiçbir zaman bulunmaz. *A.baumanii* sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturarak ürerler^{15,46}.



Şekil 2: Kanlı Agarda Asinetobakter kolonileri

Asinetobakter türlerinin oksidaz testi negatif, katalaz testi pozitifdir. Tween 80 esteraz aktivitesi vardır, hemolizin ve jelatinaz üretimi değişkendir. Nitrat redüktazı çoğunlukla bulunmamaktadır. Hareketsiz bakterilerdir ancak yumuşak agarda kıpırtı şeklinde bir hareket ara sıra görülebilir.⁵⁵ *Acinetobacter* türlerini diğer gram negatif nonfermentatif bakterilerden basit bir metabolik testle ayırt etmek mümkün değildir. Bu amaçla konvansiyonel testleri yanı sıra otomatize ve yarı otomatize sistemler de birlikte kullanılmalıdır. Böylece identifikasyonda %90' m üzerinde özgüllük yakalanabilir¹⁵.

2.2.6. Direnç

Asinetobakterler toprak kökenli verzalit ve kozmopolit bakterilerdir. Düşük beslenme ihtiyaçları sebebi in-vitro şartlarda ısı, kuruluk ve geniş pH aralıklarında yıllarca canlılıklarını korurlar. Hastanelerde kullanılan kimyasal toksik maddeler, dezenfektan

ve antibiyotiklere kısa sürede direnç geliştirirler veya mobil elementler yolu ile direnç genlerini transfer ederek yaşamaya devam ederler. Hastane ortamında 13-30 gün canlılıklarını korudukları görülmüştür. Ancak asinetobakterler antibiyotik dirençleri ile yol açtıkları tedaviye cevap vermeyen infeksiyonlar sebebi ile dikkatleri üzerine çekmiştir⁵⁸.

2.2.7. Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri

Tüm gram negatif bakterilerde olduğu gibi *A.baumannii* dış membranında da lipopolisakkaridler (LPS) yer almaktadır. LPS lerin polisakkaridlerine lipid A denen lipid komponentleri sıkıca bağlı olarak bulunur. Enterobacteriaceae’lerde polisakkaridler kor oligosakkaridi ve O polisakkaridi (O Antijeni) olarak ayrılmıştır. Bu tip LPS ler smooth (S tipi) olarak adlandırılırlar. O Antijenleri LPS’ ler için karakteristiktir. Yapılan araştırmalarda tüm Acinetobacterlerin LPS’ lerinin smooth olduğu gösterilmiştir^{59,60} Bu nedenle Acinetobacterlerin serotiplendirilmesi yapılabilmektedir. Acinetobacterler LPS’ lere ek olarak kapsul yada K antijeni adı verilen kalın bir polisakkarid tabaka (L-ramnoz, D-glukoz, D-glukronik asit, D-mannoz) ile kaplıdır. *A. baumannii*’ nin dış membranında çeşitli proteinler (porinler, integral proteinler) yer almaktadır. Bu proteinler hücre duvarına seçicilik kazandırmakta, bazı moleküllerin hücre içine girişini; bazılarının da (hidrolitik enzimler vb.) hücre dışına çıkışını engellemektedir. *A. baumannii*’ nin ana porini, dış membranda yer alan 35.6 kDa’ ık ısıya duyarlı bir protein olan ‘ heat-modifiable protein’ dir (HMP-AB). Bu porin Enterobacteriaceae ailesi üyelerinin OmpA ve *P. aeruginosa*’ nın OprF porinleri ile yakın benzerlik göstermektedir. *A. baumannii*’ deki diğer dış membran proteinlerinden bazıları ise 29 kDa’ ık porin yapısında CarO proteini ve 43 kDa’ ık bir proteindir. 29kDa’ ık CarO, özgül olmayan monomerik bir kanal proteini; 43 kDa’ ık protein ise karbapeneme özgü OprD benzeri bir porin proteinidir^{61,62}.

A. baumannii’de dış membran ile sitoplazmik membran arasında yer alan periplazmik aralıkta, fosfataz, lipaz proteaz, nükleaz gibi hidrolitik enzimler ve penisilin bağlayıcı proteinler gibi çok sayıda protein bulunmaktadır

2.2.8. Genom Özellikleri

A.baumannii 3 940 614 bp lik sirküler bir kromozoma sahiptir ve genomun G-C oranı %39.2 dir. Genomun % 88' i kodin bölgelerden oluşup toplam 3715 ORF (open reading frame) ye sahiptir.Genomda tahminen18 rRNA geni ve 71 tRNA geni vardır. *A.baumannii* 2656-2 suşunun iki plasmid içerdiği gösterilmiş olup bunlar, 101 ORF içeren 74 451 bp lik **p1 plasmidi** ve 8 ORF içeren 8041 bp lik **p2 plasmidi**'dir.İki plasmidin de GC oranı % 33.5' tir^(63,60).

A. baumannii suşlarında *AbaR1* olarak tanımlanan 86.2 kb'lık bir direnç adası bulunur. Bu ada ATPase genine integre haldedir ve kodladığı 45 direnç geni ile bilinen en büyük adadır. Bu genlerden 25' i tetrasiklin, aminoglikozit, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametaksazol gibi pek çok antibiyotiğe karşı direnç kodlar. Direnç adaları sadece antibiyotiklere değil civa ve arsenik gibi biosidlere de direnç gelişimine sebep olur^{64,65}.

Ayrıca genoma aynı pozisyonda integre olan, çeşitli ilişkili sekanslarda bulunmuştur ve bu sekanslar Tn7 ile ilişkili atasal transpozondan kaynaklanmaktadır. Bu sekanslardan sadece ikisi -*AbaR3* ve *AbaR5*- direnç genleri ve kompozisyon yönünden *AbaR1*' e benzer.*AbaR1*, *AbaR3* ve *AbaR5* içeren suşlar, 1997 ve 2004 arasında, üç kıtada da izole edilmiştir ve Avrupa klon I' e ait olduğu bulunmuştur⁶⁴.

2.2.9. Virulans Faktörleri

Diğer gram negatif organizmalara oranla pseudomonaslardaki gibi *A.baumannii*' nin konak patojen ilişkisi hakkında çok az bilgi vardır. Bir genelleme olarak *A. baumannii*' de de bilinen en önemli virulans faktörü hücre duvarına somatik antijenik özellik de kazandıran bir endotoksin olan LPS dir. Daha spesifik virulans mekanizması çalışmaları hücre yüzeyinde yer alan adeziv fimbriaların ve OMP' lerinin, hücre duvarında yer alan kapsül polisakkaritlerinin, siderefor kökenli demir kazanım sistemleri ve lipaz enzimlerinin, biofilm oluşumunun, virulansa katkı sağladığını göstermiştir¹⁵.

2.2.9.1. Hücre duvarı Lipopolisakkaridi (LPS)

Bütün gram negatif bakterilerde olduğu gibi asinetobakterler de de LPS güçlü antijenik özelliği ile bakteriyi immun sistemin hedefi haline getirirken aynı zamanda endotoksin özelliği ile güçlü bir modülatör/mediatördür.

A.baumannii LPS leri major immün stimulan faktör olarak tanımlanmıştır. İmmun cevabın şekillenmesinde, lipopolisakkaritlerin TLR-4' e bağlanmasını sağlayan, CD14 molekülleri önemlidir. *A.baumannii*'ye karşı doğal immün cevap ve Toll- like reseptör (TLR) lerinin rolünün araştırıldığı fare pnömoni modeli çalışmalarda TLR 4 gen defisitli farelerde bakteri sayısı ve bakteriyemi riskinin arttığı buna karşılık sitokin/kemokin cevabı azaldığı ve akciğer inflamasyonunun geciktiği görülmüştür^{66,67}. CD14 defisiti olan farelerde de *A.baumannii*' nin immuncevap üzerine etkisinin azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular son zamanlarda insan hücrelerinde de doğrulanmıştır. Fare modeli deneylerde TLR-2' nin de immün cevabın şekillenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. İleri çalışmalarda *A.baumannii* LPS' sinin güçlü endotoksik potansiyeli olduğu ve proinflamatuvar sitokin IL-8 ve TNF- α ' y stimüle ederek toksik şok tablosunun gelişimine yol açabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar *A.baumannii* endotoksininin infeksiyon sırasında güçlü inflamatuvar cevabı indüklediğini, yani immunopatogenezin önemini düşündürmektedir⁶⁸.

A.baumannii infeksiyonları esnasında gelişen humoral immün cevapta tanımlanmıştır. LPS' in O komponentine ve demir bağlayabilen OMP' ye karşı hasta serumunda ölçülebilir düzeylerde antikor cevabı ortaya çıkmaktadır⁶⁹ Son yıllarda yapılan bir çalışmada, demir eksikliği olan bir ortamda eksprese edilen *A.baumannii* OMP' sine karşı oluşan fare kökenli monoklonal antikorların bakterisidal ve opsonizan oldukları gösterilmiştir. Ayrıca bu antikorların siderefor kökenli demir alımını da durdurabildiği ispatlanmıştır¹⁵.

2.2.9.2. Fimbrialar ve adeziv OMP' leri

A. baumannii LPS' si hidrofobik özellik gösterir. RAG-1 şşu kullanılarak yapılan çalışmalarda ağız içi epiteline bakterinin LPS aracılığı ile tutunduğu gösterilmiştir.⁶⁶ Bu tutunmada hücre duvarında yer alan ince mannoz dirençli fimbria, polisakkarid kapsül benzeri yapıların ve glikokaliksi oluşturan diğer membran komponentleri, Omp38 gibi dış membran proteinlerinin rolü olduğu, bakterinin insan

eritrositleri ve bronşiyal epitel hücrelerine bu moleküller aracılığı ile tutunduğu belirlenmiştir^{66,70}.

2.2.9.3. Kapsül

A.baumannii suşlarının fagositozdan korunmasında L-ramnoz, D-glukoz, D-glukoronik asit ve D-mannoz yapısındaki kapsülün etkili olduğu gösterilmiştir. Kapsülün hücre yüzeyi hidrofobisitesini artırdığı ve medikal aletlere yapışarak biyofilm oluşumunda da rol oynadığı gösterilmiştir.

2.2.9.4. Biyofilm Oluşumu

A.baumannii' nin canlı obje ve yüzeylerde biyofilm oluşturma ve adhezyon yeteneği, onun hastane ortamında yaşama başarısını izah edebilir. *A.baumannii*' de biyofilm formasyonunun fenotipik olarak daha yüksek oranda su içeren ekstrasellüler mukopolisakkarit matriks ve pilus oluşumu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir^{66,71}. Random mutasyon ve genetik tamamlanma yoluyla *A.baumannii* suşlarında, *V.parahaemolyticus* “*csuE*” geni ile kodlanan bir protein’ e oldukça benzeyen, pilus ve biyofilm oluşumunda anahtar faktör olan bir protein tanımlanmıştır. İleri sekans analizleri ile beş ORF bölgesine sahip “*csu* polisistronik operon” u tanımlanmıştır. Bunların bazılarının diğer Gram negatif bakterilerde pilus oluşumunda yer alan ve şaperon ilişkili proteinleri kodlayan genlerle homolog oldukları gösterilmiştir. Daha önce de bahsedildiği gibi *A.baumannii*' nin bronş epitel hücreleri ve eritrositlere pilus benzeri adherensinler ile bağlandıkları gösterilmiştir. İlginç olarak, kantitatif adherenste de suşlar arasında farklılık olduğu, Avrupa klon II' nin klon I' den daha fazla adherens gösterdiği gözlenmiştir. Ancak salgın ve salgın dışı suşlar arasında adezyonda hiçbir farklılık izlenmemiştir^{71,72}. *A.baumannii* insan hücrelerine adherensten sonra Omp38 yoluyla apoptozisi indükleyebilir. *A.baumannii* OmpA (AbOmpA), 38 kDa moleküler ağırlığına sahip bir yüzey proteini olup küçük maddelerin geçişinde rol almaktadır. Omp38 olarak adlandırılan bu protein, *A.baumannii*' nin epitelyal hücrelere yapışmasından ve invazyonundan sorumludur. Bu protein mitokondrilerde yerleşmiştir ve kaspas bağımlı veya bağımsız bir yolla apoptozise yol açar fakat tek faktör değildir ve Omp 38 mutant suşlar da hücre ölümüne sebep olabilir. Sonuç olarak quorum sensingin, özellikle *P.aeruginosa* gibi pek çok Gram negatif bakteride virulans

mekanizmalarını düzenlediği gösterilmiştir. Asinetobakter'lerde pek çok virulans faktörünün otoindüksiyonu için santral bir mekanizma olabildiği gösterilen dörtten fazla farklı quorum sensing (QS) sinyal molekülü tanımlanmıştır. *A.baumannii*'nin QS genlerini (*abaI* ve *abaR*) horizontal olarak *H. neapolitanus*'tan kazandığı bildirilmekte ve bu sistemin, bakterinin biyofilm oluşturmada katkıda bulunduğu ifade edilmektedir^{71,72,73}.

2.2.9.5. Demir Kazanım Mekanizmaları ve Lipid yıkımına neden olan enzimler.

Asinetobakter türlerinin konağın defans mekanizmalarından korumak ve enfeksiyonun devamlılığını sağlayabilmek amacı ile konak lipidlerini hedef alan ve demir kullanımında rol oynayan çok sayıda ekstraselüler enzim üretebilme özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bakterilerin çoğalmaları sırasında ihtiyaç duydukları demiri konak ile yarışarak sağlayabilmesi, enfeksiyonun devamı açısından önemlidir. *A.baumannii*, çoğalması sırasında demir olmayan ortamda üremek için, düşük moleküler ağırlıklı demir bağlayan bileşikler veya siderefor sekrete eder. Bunlar balık patojeni *V. anguillarum* tarafından üretilen bir siderefora yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik gösterir. Bakterinin demir kazanımının yanı sıra, infekte konakta hücre hasarına neden olarak ek bir virülans faktörü özelliği gösterir. Bu elementlerin ekspresyonu *A.baumannii* klinik suşları arasında değişkenlik gösterebilir ve farklı demir kaynaklarını kullanabilme yeteneğine ve konağa kolonize olmayı sağlayan bağımsız demir kazanım sistemine sahip olmalarını sağlar^{66,74,75}.

Bunların dışında, *A.baumannii* ATCC 17978 suşunda genoma rastgele mutasyonlardan sonra, *Caenorhabditis elegans* ve *Dictyostelium discoideum*, ökaryot ve nematodlardan köken alan, transkripsiyon faktörleri, çoklu ilaç efluks sistemleri ve bir üreazı kodlayan 6 farklı patojenite adası (**PIs**) yerleştiği tespit edilmiştir. Orjinal konakdaki fonksiyonları tam olarak aydınlatılamayan bu **PIs** genleri ürünlerinin *A.baumannii*'de virulansa ciddi katkı sağladıkları gösterilmiştir⁷⁶. *A.baumannii* genomu nonpatojen tür olan *A.baylyi* ile karşılaştırıldığında, *A.baumannii*'ye özgü 16'ının virulans rolü olduğu gösterilen 28 gen kümesinin olduğu bulunmuştur. Bunların en ilginç olanlarından biri, 133 740 bp lik bir patojenite adasıdır. Bu adada sadece transpozon ve integrazlar değil aynı zamanda *Legionella/Coxiella* Tip IV sekresyon

sistemine benzer bir sekresyon sistemi genleri de kodlanır. Diğer ilişkili genler hücre duvarı, pilus biyogenezi ile demir alımı ve metabolizmasında yer almaktadır. *A. baumannii*' de transpozon mutagenезinin ilk olarak tanımlandığı bir çalışma metabolik ve global düzenleyici fonksiyonları değişmiş birkaç mutanlığı göstermiştir. Bu mutantlar *Pseudomonas* gibi diğer Gram negatif organizmalarda adherens, biofilm oluşumu ve virulansda önemli rol oynayan sensör kinazları kodlayan “*gacS-like*” geni içermektedir⁷⁶.

A.baumannii' nin tüm genom analizi çalışmaları sonucunda genomda **PIs** dışında muhtemelen *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp ve *E.coli* gibi diğer patojen organizmalardan köken alan, antibiyotiklere, antiseptik bileşiklere ve ağır metallere direnç sağlayan önemli sayıda transfer edilebilir antibiyotik direnç determinantlarına sahip oldukları da gösterilmiştir⁷⁷. Ancak virulansın en önemli komponenti olan direnç gelişimi ayrı bir başlık olarak değerlendirilecektir.

2.2.10. *Acinetobacter baumannii* İnfeksiyonları

A.baumannii özellikle yoğun bakım üniteleri olmak üzere hastane kaynaklı infeksiyonlara neden olan ve önemi giderek artan bir mikroorganizmadır. Hastanelerde kullanılan antibiyotiklerde dahil olmak üzere bütün kimyasal toksik maddelere karşı kısa sürede direnç geliştirmeleri veya direnç genleri transfer edebilmeleri, kuru ve cansız yüzeylerde uzun süre canlılıklarını koruyabilmeleri bu bakterileri hastaneler için yok edilmesi güç bir risk haline getirmiştir. *A. baumannii* infeksiyonlarının sporadik vakalar şeklinde görülmekten çok hastanelerde salgınlar halinde görülmeleri ve salgın suşlarının sıklıkla aynı klonun üyeleri olup özellikle karbapenem gibi kritik antibiyotiklere direnç göstermeleri, bu bakteri infeksiyonlarında tanı ve tedavi kadar kontrol programlarını ve dolayısı ile epidemiyolojik sürveyansın önemini öne çıkartmıştır^{58,78,79}.

2.2.10.1. *A.baumannii* infeksiyonlarının Epidemiyolojik özellikleri

Aslında toprak kökenli olan bu bakterilerin sınırlı besin şartlarında yaşamaya alışkın olmaları hastanelerdeki inatçı kolonizasyonlarını kolaylaştırmaktadır.¹⁵ Doğadaki yaygın direnç ve dağılım asinetobakterlerin hastane dışında da insan ile teması şansını artırmaktadır. Avrupa’ da yapılan çok sayıdaki çalışmada diğer

asinetobakter türlerinin aksine toplumda *A.baumannii* taşıyıcılık oranının son derece düşük olduğunu göstermiştir.⁸⁰ Epidemiyolojik çalışmalar da hastane ile ilişkisi olmayan insanların %43' ünün deri ve muköz membranların asinetobakter türleri ile kolonize olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda en sık izole edilen türlerin *A.lwoffii* (%58) *A. johnsonii* (%20), *A. junii* (%10), ve *Acinetobacter genomik tür 3* (%6) olduğu, fekal taşıyıcılığında, en sık görülen türler *A.johnsonii* ve *Acinetobacter genomik tür 11* olmak üzere, %25' e ulaştığı tespit edilmiştir⁸¹. Ancak *A.baumannii*'nin deride %0.5 ve %3, fekal örneklerde ise %0.8 oranında kolonize olduğu, *Acinetobacter genomik tür 13 TU* hiçbir lokalizasyonda kolonizasyonunun tespit edilemediği bildirilmiştir. Buna karşılık hastanede yatan hastalarda özellikle salgın dönemlerinde asinetobakter taşıyıcılık oranı %75 gibi yüksek rakamlara ulaşmakta ve türler arasında *A baumannii* dominant olarak yer almaktadır^{81,82,83}. Yine Avrupa ' da yapılan çalışmalarda hastane de izlenen hastalarda boğaz sürüntülerinde kolonizasyon oranının %7-18, trakeostomi sürüntülerinde %45, ellerde %26, kasık bölgesinde %25, ayak parmak arasında %24, alın bölgesinde %23 ve dış kulak yolu sürüntü örneklerinde %21 oranında *A baumannii* kolonizasyonu tespit edilmiştir⁸³. Ayrıca bu bakterinin hastane havası, buhar makinesi, periton diyalizat banyoları, tansiyon aletleri, anjiyografi kateteri ve ekipmanı, solunum tedavisi solüsyonları ve mekanik ventilasyon cihazı gibi hastaya direk temaslı yüzeyler ile yataklar, yastık, çarşaf, musluk, odalarının perdeleri, telefon ahizeleri, kapı kolları, hasta tabelaları gibi indirekt temaslı yüzeylerden yüksek oranlarda izole edildiği ve bu yüksek oranlı kolonizasyonun salgınların ortaya çıkışını kolaylaştırdığı söylenmiştir^{84,85,86,87}. *A baumannii*'nin çevresel kontaminasyonunun kültür ve PFGE ile araştırıldığı bir çalışmada hastanelerde yer yüzeyinde %16, infüzyon pompalarında %14, ventilatör pedinde %11.4 oranında kolonize olduğu ve 21-30 gün arasında kolonizasyonun devam ettiği gösterilmiştir^{88,103}. Ortam kolonizasyonunun kolonize hasta veya personel varlığı ile ilişkili olduğu, özetle asinetobakter türleri hem hastane çevresinde hemde personelinin derisinde sürekli taşınan en yaygın Gram negatif mikroorganizma olma özelliğine sahiptir.

2.2.10.2. *A.baumannii* infeksiyonlarında klinik tablo

A.baumannii hastane kökenli infeksiyonlara sebep olan bir fırsatçı patojendir. Bu bakteriler diğer hastane kökenli infeksiyonlara sebep olan bakterilerden farklı kılan ve hastane ortamındaki inatçı kolonizasyonları sağlayan, antimikrobiyal ilaçlara, dezenfektanlara ve kuruluğa karşı gösterdikleri dirençtir^{58,83,87}. Bu kimyasal toksik maddelerin yoğun olarak kullanıldığı üniteler *A.baumannii* için seçilmiş hayat alınıdır. Nitekim salgın suşlarının sporadik suşlara göre çoklu ilaç direnci gösterdikleri, florokinolon kullanımının da çoklu ilaç direnci için belirleyici olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda özellikle yoğunbakım üniteleri, transplantasyon üniteleri ve yanık üniteleri gibi immun sistemi baskılanmış hastaların takip edildiği kliniklerde, sıklıkla enstruman kullanımı ile ilişkili olmak üzere, solunum yolu infeksiyonları, bakteriyemi, üriner sistem infeksiyonlar (UTI), menenjit ve diğer retiküloendotelial doku tutulumlu, uzun süren ve yüksek mortalite hızına sahip infeksiyonlar oluşturlar^{78,79,84}.

2.2.10.3. Solunum Yolu İnfeksiyonları

A.baumannii hastanede yatan, özellikle ventilasyon bağımlı, immun sistemi baskılanmış hastalarda görülen trakeobronşit ve pnömonilerden izole edilen en önemli patojenlerden birisidir. Hastada gelişen alt solunum yolu tutulumunun klinik ve radyolojik olarak diğer tipik pnömoni ve hastane kökenli gram negatif bakteri pnömoni tablolarından ayırt edilmesi zordur.^{89,93} Hastalar genellikle tedaviye cevap vermezler ve bu sebeple tedavi ve bağı olarak yatış süresi uzar. Çok sayıdaki izlem çalışması sonuçları *A. baumannii*' nin etken olduğu alt solunum yolu infeksiyonu olan hastalar diğer mikroorganizmaların sebep olduğu pnömonili hastalara göre ortalama 7 gün daha fazla hastanede yatmakta ve tedavi almaktadır.⁹⁰ Pnömoni riski ventilasyon kullanımı, trakestomi veya entübasyon uygulamaları, hastanın yaşı, immunsupresyon, kemoterapi veya cerrahi girişimler, uzun süreli antibiyotik kullanımı veya altta yatan kronik hastalık öyküsüne bağlı olarak değişir^{89,90,92}. Son yıllarda ventilatör bağımlı hastaların kontrolünde büyük ilerlemelere ve solunum ekipmanlarının dezenfeksiyonunda etkili yöntemlerin kullanımına rağmen insidansta artışlar devam etmiştir. İngiltere' de yapılan surveyans çalışmalarında yoğun bakım ünitelerinde yatan ventilatör bağımlı pnömonili hastalarından %5-10' unda etken olarak *A. baumannii* izole edilmektedir⁹³. Bir başka çok merkezli çalışma sonucuna göre de *A. baumannii* pnömonilerinde ölüm oranının

%75 iken sadece trakeobronşiti olan hastalarda ölüm oranının %28 olduğu bildirilmiştir⁹⁴.

A.baumannii'nin Asya ve Avusturalya' m tropikal bölgelerinde toplum kaynaklı pnömonilerde neden olduğu bildirilmiştir. Ancak bu hastalarında immunsistemde depresyona sebep olabilecek alkol kullanımı veya daha önceden en az bir kez yoğun bakım ünitesinde yatış hikayelerinin oluşu dikkat çekicidir. Toplum kökenli pnömonilerinde fulminant seyirli olduğu ve mortalite oranının %40-60' lara çıktığı bildirilmiştir^{95,96}.

2.2.10.4. Bakteriyemiler

A. baumannii hastane kökenli bakteriyemilerde en sık izole edilen 10. patojen olup monomikrobiyal nozokomiyal bakteriyemilerin en az %1.3 ünde etyolojiden sorumlu tutulmuştur. (1995 -2002 US) Yoğun bakım ünitesinde yatanlarda *A. baumannii* bakteriyemisi insidansı ve mortalite oranı daha yüksektir. Bu hastalar arasında %34-%43.4 olan mortalite oranı ünitelerde görülen bakteriyemili hastalar arasında %16.3 olarak bildirilmiştir⁹⁷. *A. baumannii* bakteriyemisinde; hastalarda immun yetmezlik, malignensi, yanık ve tramva' m en önemli risk faktörleri olduğu bildirilmiştir. Aslında bu hastalarda polimikrobiyal bakteriyemide siktir. Bakteriyemide odak sıklıkla solunum yoludur. Bunu santral kateter gibi iyatrojenik yol, UTI, cerrahi infeksiyonlar takip eder. Ancak hastaların bir kısmında belirgin bir odak bulunamayabilir. *A. baumannii* bakteriyemilili hastalardan izole edilen suşların çoğu çoklu ilaç dirençli olup, bu suşların sadece imipenem, amikasin ve kolistine duyarlı oldukları tespit edilmiştir⁸⁹.

2.2.10.5. Üriner Sistem İnfeksiyonları

A. baumannii tipik olarak kateter bağımlı üriner sistem infeksiyonlarına veya üretral kolonizasyonlara sebep olur. YBÜ lerinde yapılan bir çalışmada %1.6 oranında infeksiyon etkeni olarak gösterilmiştir³⁶. Ancak katater kullanılmayan hastalarda da sık olmamakla beraber üriner sistemde infeksiyona yol açtığı bildirilmiştir^{15,36}.

2.2.10.6. Menenjit

Beyin Cerrahisi veya kafa travması sonrası görülen menenjitlerde düşük insidans da ancak % 70 lere varan yüksek mortalite ile seyreden klinik tablolardan etken olarak izole edildiği bildirilmiştir⁹⁹. Hastane kökenli menenjitlerde gram negatif bakterilerin sıklıkla etken olarak görülmesi asinetobakterinde bu endikasyonda görülmesini izah eder. Ventrikülostomi, serebrospinal fistül, bes günden daha fazla süreli ventriküler kateter varlığı ve yoğun antibiyotik kullanımı *A. baumannii* menenjitleri için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır^{99,100}.

2.2.10.7. Diğer İnfeksiyonlar:

Çok nadir olarak *A. baumannii* endokarditi rapor edilmiştir. Bu olgularda infeksiyonun bir genelleme olmamakla birlikte prostetik kalp kapağı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.^{A57} Diğer taraftan kontakt lens kullanımı veya cerrahi sonrası *A. baumannii* endoftalmiti veya keratiti de görülebilir¹⁰³.

. Devamlı peritoneal diyaliz olan hastalarda *A. baumannii* peritonite neden olmaktadır. Hastaların çoğu diyalizi sonlandırmaya gerek kalmadan antibiyotik tedavisine cevap vermektedir. Dizanterili 3 aylık bir bebekte şiga toksin üreten *A.hemolyticus* nedenli kanlı ishal bildirilmiştir¹⁰¹.

2.3. Tanı

2.3.1. Klinik tanı

A.baumannii infeksiyonları akut başlangıçlı olup hızlı şekillenir. Hastada ilk bulgular prodromal olup, spesifik bulguya rastlanmaz. Klinik tablo diğer gram negatif bakteri infeksiyonlarında karşılaşılan tablo ile benzerdir. Bu sebeple tanı laboratuvarında, enfekte materyalden *A baumannii* suşlarının izolasyonu ve identifikasyonu ile konur.

2.3.2. Laboratuvar tanı

A.baumannii infeksiyonlarında laboratuvar tanı etkenin izolasyon ve identifikasyonuna dayalı direkt tanı yöntemleri ile konur. *A baumannii* gram negatif bir mikroorganizma olması sebebi ile hücre yüzeyinde prognostik veya diagnostik öneme sahip antijenik yapılara sahip olmadığı için hasta serumlarında bu bakterinin spesifik

herhangi bir antijenine karşı antikor cevabı gelişmez. Kısaca tek tanı bakterinin uygun besiyerleri kullanılarak izole edilmesi ve identifikasyonudur.

2.3.2.1..A.baumannii izolasyonu

A baumannii aerobik ve kozmopolitan bir bakteri olup aerop şartlarda laboratuvarlarda kullanılan bütün besiyerlerinde kolaylıkla üretilir. Gram negatif bakteri izolasyonunda kullanılan Endo agar, XLD agar, Mc Concey agar gibi besiyerlerinde aerop şartlarda 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda 0.5-1 mm çapında düzgün kenarlı hafif konveks koloniler oluşturarak ürerler. Besiyerlerinde renk değişimine sebep olmazlar. Kanlı besiyerlerine yapılan ekimler aynı şartlarda inkübe edildiğinde yine 0.5-1 mm çaplı non-hemolitik koloniler oluşturarak üredikleri görülür. Kolonileri oluşturan gram negatif koko basil görünümlü suşların oksidaz aktivitelerinin olmaması ve belirgin bir pigment sekresyonunun görülmemesi *A baumannii* lehine yorumlanmalıdır. Kesin tanı identifikasyon testlerinden sonra konur. Ancak tür düzeyinde identifikasyon salgın epidemiyolojisi yönünden yeterli olmayacağı için *A baumannii* olarak tanımlanan türlerin mutlaka ileri identifikasyonları yapılarak klonal düzeyde yani tip düzeyinde irdelenmeleri gereklidir.

2.3.2.2. A.baumannii İdentifikasyonu

Klinik ve çevresel örneklerden izole edilen *A.baumannii* suşlarının tür tayini kadar tip düzeyinde de tespitleri, tedavisinde zorluk yaşanan ve yüksek mortalite ile seyreden SHİİ' lara yol açan bu mikroorganizmam hastane içerisinde izlenmesinde ve epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinde önemli ip uçları verecektir. Asinetobakterlerin tiplendirilmesinde fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmıştır.

2.3.2.2.1. Fenotipik yöntemler

Bu yöntemler mikroorganizmanın kültür ve morfolojik karakterleri, biyokimyasal, fizyolojik metabolik özellikleri, enzim çeşitliliği, antibiyotik duyarlılık kalıpları, antijenik özellikleri sorgulayan klasik testlerin yanı sıra mono veya multivalan enzim elektroforezi (MVEE) gibi elektroforez bazlı daha kompleks yöntemleri de içermektedir¹¹⁴.

Asinetobakter türlerini diğer gram negatif non-fermentatif bakterilerden ayırmak tek bir metabolik testle mümkün değildir. Negatif sitokrom oksidaz testi tanıda ilk adımdır. Rutin laboratuvar uygulamalarında klasik testler ile GNNFB' in tanımlanmasında API-20NE, Vitek 2, Phoenix ve Microscan Walk Away otomatize ve yarı otomatize sistemler geliştirilmiş ve tüm dünyada yaygın olarak kullanıma sunulmuştur.^{108,109} Bu testlerde temel Bouvet ve Grimont ' un 1986' da önerdiği 28 fenotipik özelliğin sorgulandığı identifikasyon şemasıdır. Bu şema 14 farklı karbon kaynağı asimilasyonu, jelatin hidrolizi, glukozdan asit üretimi ve 37, 41 ve 44 derecede üreme gibi bazı testler eklenerek yeniden düzenlenmiştir. Bu şema 12 genomik türün 11' i arasında ayırım yapabilirken, insan derisinden üretilen 136 asinetobakter izolatını tür düzeyinde %95.6 oranında doğru olarak tanımlamıştır^{105,106}. Ancak son zamanlarda tanımlanan türlerde yeterli olmamıştır. *A. calcoaceticus* ve *Acinetobacter genomik tür 3* ise sadece farklı ısılarda üreme özellikleri ile ayrılabilirken, özellikle yakın ilişkili ve klinik olarak en önemli türler *A.baumannii* ve *Acinetobacter genomik tür 13 TU* ayırtedilememiştir^{105,106,107,111,112,113}

Otomatize ve yarı otomatize sistemlerin güvenilirliğinin %90' ın üzerinde olduğu bildirilmesine rağmen bu sistemler ile tür tanımlamasında hala istenen duyarlılığa ulaşılamamıştır. Karşılaştırmalı bir çalışmada Vitek 2 ,5 ve Phoneix ile 76 isolatın sadece 19' u aynı bulunmuştur. Yine bir başka API 20 NE ve Vitek 2 ile isolatların %43' ü tür seviyesinde identifiye edilebilmiştir. Bu düşük duyarlılık kısıtlı bir veri tabanı olmasıyla ve kullanılan substratların asinetobakter türlerinin identifikasyonu için yetersizliği ile açıklanmaya çalışılmıştır. Özellikle kompleksin klinik öneme sahip üç üyesinin ticari identifikasyon sistemleri ile birbirlerinden ayırt edilemediği gösterilmiştir^{111,112,113}. Bu identifikasyon sistemleri ile *A.baumannii*, *Acinetobacter genomik tür3* ve *Acinetobacter genomik tür 13 TU*, *A.baumannii* olarak tanımlanır. Bu yüzden bu sistemlerde *A.calcoaceticus-A.baumannii kompleks* yerine *A. baumannii grup* teriminin kullanımı daha uygun görülmüştür¹¹⁰. Oysa *A. baumannii grup* ile diğer asinetobakterleri ayırt etmek infeksiyon kontrolü için son derece önemlidir. Çünkü; genellikle antimikrobiyallere duyarlı olup genellikle daha benign seyreden infeksiyonlara yol açan diğer asinetobakterler için infeksiyon kontrol tedbiri nadiren gerekli olur.

A.baumannii salgınlarının epidemiyolojik özelliklerinin irdelenmesinde fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri baz alan nümerik biyotiplemenin zaman alıcı ve düşük ayırım gücüne sahip olması sebebi ile daha hızlı, güvenilir ve yüksek ayırım gücüne sahip tiplendirme yapabilen yöntemler de denenmiştir^{110,114,115}. Bunlar;

a-SDS PAGE: Hücre duvarı ve/veya tüm hücre proteinlerinin mobil bir matriksde elektrik akımı altında moleküler ağırlıklarına göre göç ettirilerek ayrıştırılmalarını esas alan SDS-PAGE yöntemi, *A.baumannii* tiplendirilmesinde sık olarak denenmiştir.¹¹⁵ Bu yöntemle çok sayıda suşun hızlı şekilde taranmasını sağlamış ve tür ve/veya alttür seviyesinde güvenilir sonuçlar elde edilebilmiştir. Ancak yöntemin başarısı kusursuz standardizasyona bağlıdır¹¹⁶.

b:MLEE: Multilokus enzim elektroforezis yöntemi, ökaryotik canlıların populasyon genetiği ve sınıflandırılmasında uzun bir süreden beri kullanılmakta olan standardize edilmiş bir metoddur. Son 20 yıldır da giderek artan yoğunlukta bakteriyel sınıflandırma için kullanılmaya başlamıştır. MLEE' nin sınıflandırma ve epidemiyolojik ilişkiyi tespitiye yönelik diğer fenotipik yöntemlerden farkı, allel profillerinin tamamını elektroforetik tip olarak verebilmesidir. Bu yöntem hücre içi enzimlerin elektroforetik hareket yeteneğine göre karakterize edilmesidir. Bu yöntem mikroorganizmaları oluşturdıkları elektromorfo tiplerine göre diğerlerinden ayırır. Bu elektroforetik tiplerden popülasyon karakterizasyonu için objektif bir veritabanı oluşturulabilir. Genellikle, MLEE ile 20 kadar housekeeping enzimde doğal olarak yüksek değişkenlik gösteren lokuslar hedef alınır, bu sebeple teknik monolokus enzim elektroforezinden çok daha yüksek ayırım gücüne sahiptir^{115,117}.

c:Antibiyotipleme: Bu tiplendirme, bir dizi standart antibiyotiğe karşı farklı izolatların gösterdikleri duyarlılık farklılıklarını baz alır. Farklı hastaların klinik örneklerinden izole edilen suşlar arasında yeni bir antibiyotik duyarlılık kalıbı ile karşılaşılması halinde bu yeni bir salgının habercisi olarak değerlendirilir. Bu yöntemle düşük sensitivitede de olsa bütün izolatlar tiplendirilebilir. Yöntem rutin uygulanan bir işleme dayandığı için fazla tecrübeyi gerektirmeyen kolay bir tekniktir. *A. baumannii*' de, bazı antibiyotiklere karşı görülen intrinsik direncin yanı sıra, konjugatif plazmidlerde veya transpozonlarda kodlanan çok sayıdaki mekanizma ile çok sayıdaki antibiyotiğe karşı direnç görülür^{118,119,120}. Antibiyotik duyarlılığını belirlemede CLSI tarafından önerilen disk difüzyon, agar dilution ve broth mikrodilüsyon yöntemleri veya

E test kullanılmaktadır¹¹⁹. *A. baumannii*'ye karşı etkili olduğu düşünülen ajanlar antibiyotik panelinde kullanılır. Florokinolonlar 3. veya 4. kuşak sefalosporinler, sulbactam, ureidopenisilinler, karbapenemler, aminoglikozidler ve tetrasiklinler genellikle bu panelde yer alır. Pan-ilaç dirençli *A.baumannii* suşların tanımı için kullanılan polimiksinlere duyarlılığı tespitinde agar difüzyon yöntemi uygun olmayıp bu amaçla ya E test ya da broth dilusyon yöntemi kullanılır^{119,120}. Bu tekniğin en belirgin dezavantajı; aynı antibiyotiğe farklı genetik mekanizmalarla direnç geliştiren izolatları birbirinden ayırt edememesidir. Bu eksiklik epidemiyolojik izlemde ayırım gücünü düşürür. Karbapenem direnci varlığında direncin epidemiyolojisini daha iyi anlamak için direnç genlerinin spesifik PCR yöntemiyle belirlenmesi gerekir.

d-Antijenik tiplendirme-Serotiplendirme-: Bir dizi spesifik antikor kullanılarak bakterilerin yüzeyindeki antijenik çeşitliliğin gösterilmesi amaçlanır. Bazı çalışmalarda suşların serotipleme ile salgınların tanımlanmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Fakat serotiplemenin DNA-DNA hibridizasyon yöntemi gibi bir genotipleme yöntemi ile desteklenmesinin gerektiği vurgulanmıştır. Bu yöntem tür içi farklı izolatlar arasında “çapraz reaksiyon” görülmesi ve emek yoğun olmasına rağmen salgın epidemiyolojisinin araştırılmasında kullanılabilir bulunmuştur^{111,121}.

e. Faj Tipleme : Fajlar belli bakterileri infekte edip lizise uğratan viruslerdir. Belirli faj gruplarına duyarlılık ve direnç paternlerine göre izolatların tiplendirilmeleri yapılır. Fransa ve diğer Avrupa ülkelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda asinetobakter faj tipleri-17 ve 124' ün salgın susu olduğu belirlenmiştir^{111,122}. Bununla birlikte bu yöntem sadece Paris Pasteur Enstitüsünde yapılmaktadır. Yöntemin dezavantajı biyolojik olarak aktif fajların, yaygın olarak görülmesi ve yöntemin teknik olarak uygulanmasının ve standadizasyonunun zor olmasıdır. Zaman alıcı olmasına rağmen diğer yöntemlerle birlikte çalışıldığında kullanışlı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır

f. Bakteriosin Tiplemesi: Bakteriyosinler bakteriler tarafından salınan, yakın ilişkili türlerin üremesini inhibe eden proteinlerdir. Tiplendirmede kullanımı sınırlıdır¹¹¹. Diğer yöntemlerle birlikte çalışılması uygundur. Faj tiplendirme ile benzer dezavantajları vardır.

2.3.2.2.2. Genotipik yöntemler

A.baumannii infeksiyonlarında tip düzeyinde tanımlamanın infeksiyon kontrolü ve infeksiyonun epidemiyolojik özelliklerinin anlaşılması açısından fenotipik yöntemlerdeki yetersizlikler genotipik yöntemler ile aşılmaya çalışılmıştır.

Asinetobakterlerin tür tanımlanmasında ilk kullanılan genom bazlı yöntem DNA-DNA hibridizasyonu olup standart referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Ancak yöntemin zorluğu ve özel ekipmana ihtiyaç duyulması kullanımını referans laboratuvarları ile sınırlandırmıştır. Son yıllarda giderek artan önem sebebi ile asinetobakterleri tip hatta klonal düzeyde tanımlamaya yönelik; Amplified 16S rRNA gene restriction analysis (ARDRA), high-resolution fingerprint analysis by amplified fragment length polymorphism (AFLP), ribotipleme, tRNA spacer fingerprinting, restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences, sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region ve *rpoB* (RNA polymerase-subunit) gibi çok sayıda yöntem geliştirilmiştir.

2.3.2.3. DNA-DNA hibridizasyon yöntemi

Bu yöntem tür tanımında hala “ altın standart” ır. Bu metodoloji ile suşların tüm genom G+C oranı karşılaştırılır ve benzerlik yüzde olarak hesaplanır. Bakteriyel taksonomide DNA hibridizasyonun büyük değeri olmasına rağmen, farklı metotlarla farklı hibridizasyon sonuçları alınabilmesi, uygulamanın yorucu ve teknik olarak zorluklar içermesi, yöntemin dezavantajıdır. Asinetobakter türleri için beş farklı metot veya protokol kullanılmıştır. Yöntem sınırlı laboratuvarlarda kullanım alanına sahiptir ki bu bakteriyel taksonomi gelişimini geciktirir. Mesela bir cins içerisinde ilişkiyi çözümlmek için tüm türlerin DNA’ ı ve yeni türlerin temsilcileri karşılıklı olarak hibridize edilmelidir. Pratikte yalnız seçilmiş suşlar 16S rDNA sekans benzerliği yönünden araştırılır ve %97 den fazla benzerlik varsa DNA-DNA hibridizasyon yöntemi uygulanır^{15,56,111}.

DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile, yeni asinetobakter türlerini belirlemenin yanında türler arasındaki ilişkiyi değerlendirmekte mümkündür. Bu yöntemle *A.calcoaceticus*, *A.baumannii*, genomik tür 3 ve 13TU yakın ilişkilidir ve taksonomide tek tür olarak değerlendirilir. Ayrıca DNA-DNA hibridizasyonla hemolitik genomik tür 13-15BJ ve 16-17 nin oldukça ilişkili olduğu görülür.^{15,56} Sonuç olarak DNA-DNA

hibridizasyonu sadece tür identifikasyonu ve yeni türlerin tanımlanmasında kullanılan bir seçenek olmalıdır.

2.3.2.4. Plasmid tipleme

Bakterilerde plazmid DNA' ı elde edildikten sonra agaroz jel elektroforezi ile plazmitlerin sayı ve büyüklükleri irdelenir. Büyük plazmitlere sahip bakteri suşları için, yöntemle plazmit izoslayonunu takiben bir spesifik bir enzimle hidrolize aşaması da eklenir ve hidroliz sonrası oluşan fragmentlerin polimorfizmi agaroz jelde moleküler ağırlıklarına göre tespit edilir.

Asinetobakter türlerinin çoğu endojen plasmidler taşırlar. Plasmid analizi *A.baumannii* suşlarının epidemiyolojik tiplendirmesinde başarılı şekilde kullanılmaktadır¹²⁹. Yöntem *A.baumannii* grup dışındaki türlerini epidemiyolojik özelliklerini belirlemek kullanılan birkaç metoddan birisidir. Bu metod oldukça etkin olsa da sonuçların yorumlanması, pek çok plasmidin kolayca transfer edilebildiği, kazanılabildiği veya kaybedilebildiği göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Aynı profili gösteren ve PFGE ya göre diğer yöntemlerle klonal ilişki bulunmayan izolatlarda plazmid yayılımından şüphelenilebilir Bu yüzden daha etkin moleküler metodlarla birlikte kullanılması önerilmektedir^{56,129}.

2.3.2.5. Ribotipleme

Kromozomal DNA' ın *EcoR1*, *Cla1* ve *Sal1* gibi restriksiyon enzimleri ile kesimini takiben elektroforez işlemi ile fragment separasyonunun yapılması, fragmentlerin immobil bir matrise blotlanması ve 23S, 16S ve 5S rRNA genlerindeki hedef dizileri tanıyan işaretli problarla hibridizasyon basamaklarından oluşan bu metod asinetobakter suşlarının tiplendirilmesinde birkaç çalışmada kullanılmıştır. Ancak ribotiplemenin ayırım gücü sınırlıdır. Otomatize ribotipleme sistemi kullanılarak, PFGE ile karşılaştırılabilir ayırım gücüne sahip, daha kesin tipleme sonuçları elde edildiği bildirilmiştir^{122,124}. Otomatize ribotipleme PFGE' den daha hızlı sonuç vermesine karşılık daha pahalıdır ve özelleşmiş ekipman gerektirir. Sınırlı sayıdaki laboratuvarlarda kullanılmaktadır^{56,123}.

2.3.2.6. MLST

Epidemiyolojik ilişki ve popülasyon yapısını incelemede, bir tür içindeki house-keeping gen sekanslarının karşılaştırılması önemli bir yöntemdir. Bu sistemin avantajı, bilgilerin taşınabilir olması ve klinik önemi olan türlerin uluslararası veri bankasının bulunmasıdır.¹²⁴ *A.baumannii* için 2 MLST sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemlerden ilkinde *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* ve *rpoD*- 305-513 bp den oluşan 7 housekeeping genin internal fragmanları hedef olarak kullanılır¹²⁴ Test sonuçları AFLP ve PFGE sonuçları ile uyumludur.¹²⁷ Bu metod *A.baumannii* popülasyon çalışmalarında faydalı bulunmuştur. İkinci metod da ise, ki çok hızlı ve büyük potansiyeli olan MLST sistemidir, *trpE*, *adk*, *mutY*, *fumC* ve *ppa* geninin spesifik ve konservatif bölgelerinin amplifikasyonu ve elektrospray ionization mass spektrometri (PCR/ESI_MS) ile değerlendirilmesi yapılır. Bu metod PFGE ile iyi uyum gösterir ve *A.baumannii*, genomik tür 3 ve 13TU nun doğru olarak tanımlanmasını sağlar. Majör avantajı 4 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesidir^{15,56,124}.

2.3.2.7. Parsiyel dizi analizi

Mikroorganizmalar arasında filogenetik ilişkinin tespitinde kısmi DNA sekanslarının kullanımı son yıllarda giderek artmıştır. Genel kabul; bu sekansların filogenisi organizmanın filogenisiyle uyumludur. Bu yüzden uygulamalı mikrobiyolojide, lokal izolatların tanımlanmasında artan oranda kullanılmaktadır.

Asinetobakterler için, türler arası ilişki ve/veya tür tanımlamasın da; 16SrDNA, 16S-23S spacer bölge, *recA* proteinin kodlayan *recA* geni, DNA Giraz B subunitini kodlayan *gyrB* geni ve RNA polimeraz beta subunitini kodlayan *rpoB* genileri dizi analizi için tercih edilen gen bölgeleridir. **16S rRNA** geni dizi analizi mikrobiyal sınıflandırmada ve filogenetikte en yaygın kullanılan analizdir⁵⁶ Fakat diğer iyi korunmuş proteinleri kodlayan genler de yakın ilişkili türlerin sınıflandırmasında fayda sağlayabilir.

16S-23S rDNA gen intergenik spacer bölge (ITS) sekansı, ABC içindeki suşlar için identik bir marker olup tanı değeri %96.2 olarak verilmiştir.

16S rDNA, 16S-23S rRNA gene spacer, *recA* ve *gyrB* sekanslarının ise sonuçları itibarı ile stabil olmadığı gösterilmiştir. *rpoB* gen sekansı ise asinetobakter türlerinin identifikasyonu için ümit verici bulunmuştur¹²⁴. Son yıllarda 16S rRNA sekans analizi

klirik mikrobiyolojide identifikasyon için yeni altın standart yöntem olarak kabul edilmeye başlanmıştır.^{15,56,128}

2.3.2.8. Random Amplified Polimorphic DNA-RAPD

Genomik DNA ‘m random fragmantlerinin amlifikasyonuna dayalı bir yöntemdir. Klasik PCR’ dan farklı olarak 2 yerine tek primer kullanılır ve bağlanma ısısı düşük tutulur. Kullanılan bu kısa ve tek primerler DNA ya rastgele bağlanırlar. Suş ilişkisini araştırmada yapılması en kolay genotipik metotlardan birisi RAPD analizidir¹²⁵. PCR için, genomda primer bağlanma bölgelerin sayısı ve yerleşimi değişik olabilir ve amplifiye fragmanların sayısı ve büyüklüğü de buna göre polimorfizm gösterir. Bu yüzden elektroforetik RAPD profilleri suş tiplendirmede kullanılabilir. Asinetobakterlerin epidemiyolojik tiplendirmesinde değişik primerler ve protokoller kullanılarak yapılan çalışmalar başarılı olmuştur. RAPD analizi, hastane düzeyinde az sayıda suşların muhtemel epidemiyolojik ilişkisini göstermede yararlı bir yaklaşımdır. Ancak longitudinal veya labratuvarlar arası çalışmalar için yararlı değildir.¹²⁵

2.3.2.9. ARDRA

Bu method 16s Rrna geninin veya rDNA geninin amplifikasyonu, amplikonların restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elektroforez aşamalarından oluşur. Farklı ve çok sayıda restriksiyon enzimleriyle oluşturulan restriksiyon paternleri ve bu paternlerin kombinasyonu restriksiyon profilini oluşturur. Her enzim için oluşan paternlere keyfi olarak numara verilir ve bu numaraların kombinasyonları yapılır. İdentifikasyonda oluşan paternlerin kombinasyonlara olan benzerliğine göre tanımlama yapılır.^{56,126} Bir çok bakterinin tanımlanması için kullanılabilen bir yöntem olduğu gibi Asinetobakterlerin tür tayininde de kullanılabilmektedir. *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* complexi içindeki 4 Asinetobakter türünü kolaylıkla birbirinden ayırtedebildiği gösterilmiştir.¹²⁵ Hızlı ve pratik bir yöntem olması nedeniyle taksonomik çalışmalarda alternatif yöntem olarak kullanılabilir.¹²⁶

2.3.2.10. Repetitive Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rep-PCR)

Repetitive-PCR metodu bakteriyel genomda dağılmış olarak bulunan tekrarlayan DNA dizilerinin kopyalarının PCR ile gösterimine dayalıdır. Bu tekrarlayan DNA elementleri cins ve türlere göre değişmek üzere genomda farklı uzaklıklar da yerleşmiştir. Bu tekrarlayan elementleri hedef alan primerlerin kullanıldığı amplifikasyon sonucunda değişik uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur. Bu fragmentlerin polimorfizmi spesifik DNA fingerprinting parmak izi- olarak değerlendirilir.^{15,56,110}

2.3.2.11. PFGE

PFGE oldukça yüksek ayırım gücü olan, sonuçları tekrarlanabilir ve kolay yorumlanabilir bir yöntem olduğu için genotipik identifikasyonda, özellikle hastane infeksiyonlarının sürveyansında referans yöntem olarak kabul edilmektedir.^{15,56,110} Bu yöntem, total genomik DNA' m kontrollü olarak restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu oluşan büyük DNA fragmentlerinin elektrikli ortamda belirli açılarla verilen elektrik akımı altında moleküler separasyonunu amaçlayan bir elektroforez yöntemidir. Restriksiyon büyük tanıma bölgesine oturan enzimlerle ve tüm genomu yapıldığı için elde edilen fragmentler, PCR-RFLP yönteminden sonra elde edilen fragmentlere göre daha büyük olup geleneksel jel elektroforez yöntemiyle ayrıştırılamazlar. PFGE' de elektrik akım yönünün periyodik olarak değiştirilmesi ve geldeki DNA fragmentleri üzerine belirlenen aralıklarla farklı güçlerde düz akım gönderilebilmesi, 50kb' dan daha büyük DNA molekülleri bile kolaylıkla ayrıştırılabilmesine ve genomun tamamını değerlendirilmesine imkan sağlamaktadır. En yaygın kullanılan PFGE uygulaması, Contour– Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) elektroforezidir.¹³⁰ Bu sistemde, elektrik akımının yönünün genellikle 120° değiştirilmesiyle fragmanlar zigzag şeklinde hareket ederek, agaroz matrikste büyüklüklerine göre ayrışırlar. Elektroforez sonrası jelin Ethidiumbromid ile boyaması jeldeki DNA fragmentlerinin UV ışıktaki görüntülenmesini sağlamaktadır. Elde edilen bant polimorfizmi gözle veya bilgisayar programları kullanılarak değerlendirilir. PFGE ile elde edilen bant paternlerine göre hem kromozomal DNA' m büyüklüğü tahmin edilebilmekte, hem de suşların klonal olarak ilişkilendirilmeleri mümkün olmaktadır. Hastane epidemiyolojisinde, Tenover

kriterlerine göre, salgın sırasında PFGE’ de 3 bant farklılığı olan suşlar “ yakın ilişkili” , 4-6 bant farklılığı olanlar da “ muhtemel ilişkili” olarak değerlendirilmektedir.¹³¹

DNA sekansına dayalı teknikler hızla gelişmesine rağmen, PFGE hala pek çok mikroorganizmanın epidemiyolojik tiplendirilmesinde seçilen metottur. Asinetobakter suşlarının tiplendirmesinde genellikle Apa1 veya Sma1-PFGE yöntemi kullanılmıştır.^{132,133}

2.3.2.12. AFLP

AFLP yüksek rezolüsyonlu, PCR temelli, genomik fingerprinting metotudur. Jansenn ve ark. Bu metod ilk olarak 1996 yılında da Asinetobakterler de dahil diğer bakteriler önemli patojenler için kullanmıştır.^{135,136} AFLP, DNA’ m bir veya iki restriksiyon enzimi ile açık uçlu kesimi, amplifikasyon için açık uçlara uygun çift zincirli adaptörlerin bağlanması, adaptörlere komplementer primerler ile presellektif ve sellektif amplifikasyon, elektroforez ve profillerin görüntülenmesi adımlarından oluşur.¹³⁷

AFLP prosedürü, Koeleman ve ark. tarafından 1998’ de EcoR1 ve Mse1 restriksiyon enzimleri kullanarak restriksiyon ve ligasyonun tek adımda gerçekleştirilmesi ile uygulanabilir hale geldi.¹³⁸ Yöntemin uygulama aşamalarının ilkinde hedef DNA uygun bir yöntemle izole edilir. Yöntemin ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği açısından PCR şartlarını etkileyecek kontaminant ve inhibitörlerin uzaklaştırılması ve elde edilen DNA’nın yüksek kaliteli olması istenir. Restriksiyon için daha önceden belirlenmiş enzim kombinasyonları kullanılır. Bu enzimlerden biri genellikle DNA’yı ortalama sıklıkta keserken diğerinin kesim sıklığı daha fazladır. Enzimle kesimin ardından restriksiyon bölgesindeki açık uca anahtar kilit şeklinde uyum gösteren çift zincirli oligonükleotidler, yani adaptörler, eklenir. Adaptör eklenmesinin amacı DNA’ m çoğaltılması işlemi sırasında kullanılacak primerler için hedef dizileri oluşturmaktır. Bu fragmanların amplifikasyonu için adaptörlere komplementer 3’ ucunda fazladan 1 yada 2 baz daha uzun olan primerler eklenir ve böylece sadece bu bazlara komplementer fragmanlar amplifiye edilir. Seçiciliği artırmak için amplifikasyon aşaması preselektif ve selektif primerler kullanılarak iki aşamalı yapılabilir. Bu pimerlerden biri radyoaktif yada flöresan ile işaretlenebilir. PCR termal döngü cihazında, annealing ısısı önce yüksek tutulur ve her siklusta 0.7-1 derece

düşürülerek amplifikasyon tamamlanır. Amaç bağlanmanın artırılmasıdır. Amplifiye fragmanlar konvansiyonel agaroz jel elektroforezi ile veya işaretlenmiş primerler kullanıldıysa otoradyografi veya flöresan sistemler ile görüntülenir. Elde edilen bantların sayısı 40-200 arasındadır. Son yıllarda, en sık flöresan işaretli primerler kullanılarak yarı-otomatize sistemlerde yapılmaktadır. Oluşan karmaşık bant profilinin bilgisayar programları ile dendrogram analizi oluşturulup bant paternlerindeki benzerliğe göre değerlendirilmektedir. AFLP nin ayırım gücü yüksek ve güvenilirdir çünkü RFLP tekniğinin güvenilirliği PCR'ın gücüyle kombine edilmiştir. Tekrarlanılabilirliği oldukça yüksektir. Laboratuvarlar arası verilerin tekrarlanılabilirliği farklı yöntemler kullanıldığında azalabilir. Az miktarda DNA (10-50ng)' m yeterli olması yöntemin avantajlarındanıdır.^{135,136,137,138}

AFLP analizinin bir veribankası oluşturmaya uygun olduğundan güçlü bir metot olduğu sonucuna varılabilir. Böyle bir sistem çok sayıda suşun longitudinal karşılaştırılması ve tür, klon ve suş identifikasyonu için güçlü bir araçtır. Deneyimli ellerde daha kısa olmasına rağmen, yaklaşık 30 suşun işlem süresi bilgisayar analizi dahil 4 gün sürmektedir. Farklı sekans platformlarından dolayı, laboratuvarlar arası bilgi aktarımının zor olması sistemin dezavantajıdır.⁵⁶

AFLP *Acinetobacter* cinsi içerisindeki farklılıkları göstermede en önemli teknik olarak ortaya çıkmaktadır Ayrıca AFLP analizi *A.baumannii* salgınlarının tanımlanmasında da yararlıdır.^{134,135,136}

2.3.3. Tedavi ve Antibiyotik direnci

Asinetobakter infeksiyonlarında tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. *A.baumannii*'de doğal ve kazanılmış direnç determinantlarının ortaya konması ile dikkatler bu konu üzerine çekilmiştir. “ Infectious Diseases Society of America” *A.baumannii*’ nin şimdiki antibakteriyel donanımımızı büyük ölçüde tehdit eden “ kırmızı alarm” veren patojenlerden biri olduğunu bildirmiştir.¹⁴⁰

2.3.3.1. Antibiyoterapi

A.baumannii, 1970' lerden önce beta laktamlar, aminoglikozid ve tetrasiklin gibi çok sayıda antibiyotiğe duyarlıyken, son yıllarda bilinen bütün antibiyotiklere direnç geliştirmiştir. Özellikle Gram negatif organizmalar için etkili antibiyotiklerin yokluğu

pek çok araştırmacının dikkatini bu konuya vermesine sebep olmuş, ancak çok az aşama kaydedilmiştir. Yeni ajanlar var olan sınıfların modifikasyonlarıdır ve yeni antibiyotik hedefleri ve mekanizmalarının bulunması acilen gerekmektedir¹¹⁰.

Antibiyotiklere duyarlılık, ülkeler, şehirler hatta hastaneler arası farklılık göstermektedir. Bu nedenle tedavi protokolleri oluşturulurken, Uluslararası rehberler yerine, lokal sürveyans verilerinin göz önüne alınmasının ve antibiyotiklerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Genel olarak, *A. baumannii* infeksiyonlarında tedavi, antimikrobiyal duyarlılık testlerine göre düzenlenmelidir. Ampirik tedavide ise rehber o merkezdeki duyarlılık paternlerini gösteren epidemiyolojik sürveyans sonuçları dikkate alınmalıdır. Klasik tedavi tek başına veya bir aminoglikozidle beraber β -laktam grubu bir antibiyotiğin kombinasyonu şeklindedir. YBÜ'lerinde hastalığın başlangıçtaki ampirik tedavisinde özellikle kombinasyon tedavileri tercih edilmektedir.

2.3.3.2. Antibiyotik Direnci

A.baumannii suşları arasında çoklu ilaç direnci giderek artmaktadır. Diğer NFGN patojenlerde tanımlanan direnç mekanizmalarının tamamı *A.baumannii* suşlarında da tanımlanmıştır. Karbapenemler ve tüm beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli *A.baumannii* suşlarının ortaya çıkışı organizmanın çevresel değişikliklere hızlı cevap verebildiğini göstermektedir. Farklı antibiyotiklere karşı direnç oranları *A.baumannii* suşlarının izole edildiği farklı hastane ve bölgelere veya suşların endemik ve epidemik kökenli suşlar olmalarına bağlı olarak değişmektedir. Bu sebeple direncin mekanizması kadar epidemiyolojik özellikleri de önemlidir.

2.3.3.2.1. Antibiyotik direncinin mekanizması

A.baumannii suşlarında; enzimatik yıkım, hedef bölge modifikasyonları, içe alım ve atılım pompası modifikasyonlarına bağlı olarak direnç gelişir.¹⁴³ Bu bilinen mekanizmaların dışında da dirence yol açabilecek yeni mekanizmaların varlığından şüphelenilmektedir. *A.baumannii* suşlarında direnç genleri genoma entegre direnç adalarında, integron ve transpozonlarda veya insersiyon segmentleri gibi mobil elemanlarda kodlanmakta ve kolaylıkla transfer edilmektedir. Doğal ve kazanılmış

direnç mekanizmalarının upregülasyonu *A.baumannii* suşlarındaki direncin en önemli özelliğidir.

***α-A.baumannii* suşlarında β-laktam direnci:**

β-laktamlar, özellikle de karbapenemler ciddi *A. baumannii* infeksiyonlarında ilk tercih edilecek ajanlardır. Bu ilaçlar, hala dünyada pek çok *A. baumannii* suşuna karşı etkin olmasına rağmen, enzimatik ve membran kaynaklı direnç mekanizmalarının ortaya çıkışı tehlike arz etmektedir. İn-vitro çalışmalarda imipeneme aminoglikozid eklenmesinin sinerjik etkili olduğu tespit edilmiştir. Karbapenemlerin amikasinle kombine edilmesi bu ilaçların MDR suşlarına karşı etkinliklerini %38-46 oranında artırmaktadır Bununla birlikte deneysel çalışmalarda aminoglikozid eklenenlerle tek başına imipenem kullananların sonuçları farklı bulunmamıştır. İmipeneme duyarlılık başlangıçta %100 iken, nozokomiyal salgınlar sebebi ile imipenemin yaygın kullanımı sonucu son yıllarda dirençli suşlar artış göstermektedir. MDR suşlarda sulbaktamla kombinasyonun tek başına meropenem kullanımından daha iyi sonuç verdiği bildirmiştir ^{142,144} *A.baumannii* suşlarında β-laktam grubu antibiyotiklere direnç i- β-laktamazlar ile enzimatik yıkım, ii-PBPs' lerde modifikasyon ve iii- çoklu ilaç eflux pompaları ile geri atım mekanizmaları ile ortaya çıkar.

i-Enzimatik Mekanizma : β-laktam grubu antibiyotiklere karşı *A.baumannii* suşlarında görülen en yaygın direnç mekanizması β-laktamazlarla enzimatik yıkımdır¹⁴³. Ambler klas A grup ESBL genellikle plasmid kaynaklıdır ve bu grupta yer alan VEB-1, VEB-1a PER-1 PER-2 salgın suşlarında gösterilmiştir.^{144,145} Tanımlanan diğer ESBL' ler TEM-92 ESBL ,TEM-116, SHV-12, J CTX-M-2 CTX-M-43 çeşitli ülkelerden bildirilmiştir. Ayrıca TEM-1 ve TEM-2 gibi dar spektrumlu β-laktamazların da klinik önem taşımalarında *A.baumannii* suşları arasında yaygın olduğu tespit edilmiştir bütün *A.baumannii* suşlarında Amblerin C grubunda yer alan ve sefalosporinase özelliğe sahip olan Acinetobacter Derived Cephalosporinase (ADC) olarak da bilinen *AmpC* sefalosporinazlar kromozomal olarak kodlanır.⁵⁶

Ambler D sınıfı Serin oksasilinaz ve Ambler B sınıfı olan metallo β-laktamazlar (MBL) gibi karbapenemaz aktivitesi olan β-laktamazlar da direnç fenotipinin belirlenmesinde önemlidir. Karbapenemaz aktivitesi tespit edilen ilk enzim, OXA tipi enzim, 1985 te Edinburg-Scotland da klinik bir *A.baumannii* suşundan izole edilmiş ve

ARI-1 (Acinetobacter Resistant to Imipenem) olarak tanımlanmıştır. Bu plasmid kökenli mobil direnç elemanı sekanslanmış ve *blaOXA-23* olarak isimlendirilmiştir. Karbapenemaz aktivitesi olan diğer OXA tipi enzimler OXA-24, 25, 26 ve 40, *blaOXA-24-like* ve *blaOXA-58-like* gen kümelerinde kodlanırlar. *blaOXA-58*, *blaOXA-23* e benzer ve sıklıkla plasmid kökenlidir. En son gen klusteri OXA-51, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 78, 79, 80 ve 82' nin kodlandığı *blaOXA-51-like* genleri doğal olarak *A.baumannii* de bulunurlar ve kromozomda yerleşirler.¹⁴⁶ Diğer D sınıfı enzimlere benzer olarak imipeneme meropenemden daha fazla afinite gösterirler. Ancak karbapenem direncindeki rolleri upstream yerleşimli ISAb-1 mobil gen elementinin varlığına bağlıdır. Bu elementin yokluğunda karbapenem duyarlılığında minimal değişiklik görülürken, bu elementin varlığında çoklu ilaç efluks sistemi genleri (AdeABC) aktive edilir ve güçlü direnç gelişir.

İlginç olarak belirli IS elementleri özellikle ISAb-1 (*bla OXA-51-like*), *A.baumannii* için spesifiktir ve bu bakterinin identifikasyonunda kullanılabilir¹⁴⁷ IS elementleri *A.baumannii* de diğer antibiyotiklere direnç ekspresyonu için de önem arz ederler.

Metallo- β -laktamazlar (MBL) aztreonam hariç, bütün karbapenem ve β -laktamları hidrolize edebilirler. Beş MBL grubundan sadece üçü, IMP, VIM ve SIM, *A.baumannii* suşlarında gösterilmiştir^{148,149}. β -laktamaz enzimlerine karşı ilaç direncini ve etkinliğini artırmak için kullanılan sulbaktamın, duyarlılığı coğrafik bölgelere göre değişiklik gösterir. Bu yüzden monoterapi olarak kullanmadan önce, disk difüzyon testinden çok broth bazlı dilüsyon metodları ile duyarlılık testi yapılması önerilmektedir.

Karbapenem, aminoglikozid ve diğer beta laktamlara dirençli *A. baumannii* salgını sırasında sulbaktamın etkinliğini araştırıldığı bir çalışmada, ampisilin-sulbaktam tedavisi alan on hastanın dokuzunda klinik ve mikrobiyolojik iyileşme sağlanmıştır¹⁵⁰.

Daha hafif enfeksiyonlarda sulbaktam içeren bir tedavi kullanımı karbapenem kullanımının kısıtlanması için uygun bir strateji olabilir. Ampisilin-sulbaktam özellikle imipenem dirençli ve sulbaktam duyarlı organizmalarla gelişen enfeksiyonlarda önerilmektedir¹⁴¹. *A. baumannii*'nin sebep olduğu bakteriyemilerde de sulbaktamın imipeneme eşdeğer olduğu gösterilmiş. Buna benzer çalışmalar bize, *A. baumannii* sulbaktama duyarlı bulunduğu diğer ajanlar kadar etkin olduğunu göstermektedir¹⁴².

A. baumannii menenjit tedavisinde de ampicilin-sulbaktam kullanılmış, ümit verici sonuçlar olmasına karşın başarısız sonuçlar da alınmış.

ii-PBPs mutasyonlarına bağlı β -laktam direnci: Karbapenem direncini de içine alan β -laktam direnci PBPs ve dış membran proteinlerindeki (OMP) mutasyonlara bağlı olarak affinite azalması veya ekspresyonun azalması yolu ile de ortaya çıkabilir. *A.baumannii*'nin dış membran porinleri hakkında çok az bilgi edinilebilmiştir. Son yıllarda 29 kDa luk bir protein olan CarO' nun kaybının imipenem ve meropenem direncine yol açtığı gösterilmiştir.¹⁵¹

iii-Çoklu ilaç eflüks pompaları: Çoklu ilaç direnci gösteren *A.baumannii* suşlarında çoklu ilaç eflüks sistemi kodlandığı göstermiştir^{61,62} Bu bağlamda üzerinde en çok çalışılan sistem “ Resistance-nodulation- division (RND) family type pump AdeABC” dir⁶² Bu eflüks pompasının substratları karbapenem dahil bütün β -laktamlar, aminoglikozidler, eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin, florokinolonlar, trimetoprim ve ethidium bromide olup sistem sayesinde suşlar bu ajanlara karşı direnç kazanılmaktadır.

b-Aminoglikozidlere direncin mekanizması :

Aminoglikozidler *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi birçok gram-negatif basilin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yoğun bakım hastalarında yapılan çalışmalar *Acinetobacter* klinik izolatlarında aminoglikozid direncinin arttığını göstermektedir.

Çoklu ilaç direnci gösteren *A.baumannii* sınıf 1 integronlarda kodlanan *A.baumannii* modifiye eden enzim kodlayan genler oldukça yaygındır. Bu enzimler; a-asetil transferaz, b-nükleotidil transferaz ve c-fosfotransferazlardır. Japonya, Kore ve ABD’ de izole edilen MDRA.*baumannii* suşlarında 16S rRNA metilasyonu (armA) sonucu da aminoglikozidlere direncin geliştiği gösterilmiştir¹⁵².

c-Kinolonlara karşı direncin mekanizması:

Fluorokinolonlar 1988 yılına kadar Asinetobakterlere karşı en etkili antibiyotiklerdir. Ancak bu ilaçların yaygın kullanımına bağlı olarak özellikle *A.baumannii* salgın suşlarında florokinolon direncinin prevalansı artmıştır. Kinolon dirençli *A.baumannii* suşlarında, *gyrA* ve *parC* genlerinde mutasyon sonucu DNA giraz

veya ortotopoizomeraz-IV da görülen modifikasyonlar ilk olarak *E.coli*' de tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar ilacın hedef bölgeye bağlanmasını önler¹⁴³.

d-Tetrasikline direncin mekanizması:

Tetrasiklin direnci efluks veya ribozomal korunma ile ortaya çıkar. *tetA-E* elemanları ile kodlanan tetrasiklin efluks pompaları bir çok gram negatif bakteride gösterilmiştir.

e- Polimiksinler' e karşı direncin mekanizması:

Polimiksinler 1940' ıl yıllarda tanımlanmasına karşın ciddi toksisitesi nedeniyle kullanım dışı kalmıştır. “ Kolistin” veya “ polimiksinE ve polimiksin B” diye bilinen bu pozitif şarjlı polipeptid antibiyotikler Gram negatif bakterilerde dış membranda anyonik LPS moleküllerini hedef alırlar. İç ve dış membran arasında etkileşime yol açarak lipit değişimi, membran hasarı, osmotik dengesizlik ve bağlı olarak hücre ölümüne sebep olur¹⁵³. Oral veya topikal kullanılan kolistin sülfat ve parenteral kullanılan sodium colistin methanesulfonate veya colistin sulfomethate sodium olarak iki ticari formu bulunur. Her iki formda nebulizasyon için uygundur. 50 yıl önce keşfedilmesine karşın polimiksinler hakkında titiz bir çalışma yoktur. Kolistin kullanımı ile ilgili başarılı sonuçlar bildirilmekle beraber; nefro ve nörotoksikite ve nöromuskuler blokaj gibi ciddi yan etkileri sebebi ile kullanımı problemlili bir antimikrobiyaldir.

A.baumannii'de polimiksinlere karşı in- vitro şartlarda gösterilen direncin mekanizması bilinmemektedir ancak Lipopolisakkarit hedef bölgeye bağlanmanın azalmasının dirence yol açtığı *E.coli*, *Salmonella spp* ve *P. aeruginosa*' da gösterilmiştir. Ayrıca *P. aeruginosa*' da OMP' deki değişikliklerin de duyarlılığı azalttığı bilinmektedir.

f-Yeni ve/veya diğer antibiyotiklere karşı direncin mekanizması:

Son yıllarda lisans alan semisentetik minosiklin türevi olan tigesiklin, dirençli suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisinde ümit vermektedir. Ancak klinik veriler hala sınırlıdır. Tigesiklin 30S ribozomal üniti inhibe ederek antimikrobiyal etki gösterir. *A.baumannii*'ye karşı tigesiklin aktivitesi MIC testiyle değerlendirilmelidir. Eğer başka bir seçenek varsa, *A.baumannii* bakteriyemilerinde tigesiklin kullanımı önerilmemektedir

Glisilsiklin olarak bilinen tigesiklin efluks ile geri atılabilir ve direnç gelişir. *adeB* geni eksprese eden izolatlarda tigesiklin direnci gösterirler.⁵⁶

Gram negatiflere karşı lisans alan diğer bir ajan doripenem, yani yeni bir karbapenem türevidir. *A.baumannii*' ye karşı doripenem meropenemden biraz daha avantajlıdır ancak klinik veriler hala beklemektedir.

2.3.3.2.2. Antibiyotik direncinin epidemiyolojik özellikleri

Mobil elementler yolu ile yayılan direncin suşlar arası dağılımı kadar, klonal ekspansiyon ile özellikle çoklu ilaç direnci gösteren karbapenem dirençli bazı suşların tüm hastanelere hakim olmaya başladıkları yapılan moleküler epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir.

Yeni antibiyotik geliştirmenin zamana bağlı, yüksek maliyetli ve selektif toksisite özelliklerinin iyi programlanması gibi zorluklarının yanı sıra, bu antibiyotiklerin yoğun kullanımına bağlı olarak ortaya çıkacak baskının kısa sürede bu antibiyotiklere karşı da direnç geliştirileceği korkusunu taşımaktadır

Başta İngiltere, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya ve Hollanda olmak üzere Avrupa' nın pek çok bölgesinde 1980' lerin başından beri *A. baumannii* kökenli hastane salgınları moleküler yöntemlerle izlenmektedir. Bu çalışmalar salgınların çoğundan bir veya 2 genomik kolonun sorumlu olduğunu ve klonların giderek tüm hastaneler yayıldığını göstermiştir. İspanya' da çeşitli bölgelerdeki 9 hastanede amikasin dirençli bir *A.baumannii* klonunun, Fransa' da kuzey ve güneydeki bölgelerinde 55 merkezde VEB-1 ESBL üreten *A.baumannii* klonunun, İngiltere' nin güneydeki bölgesinde OXA23 klon-1 ve klon-2' nin, Portekiz' de yine bir çoklu ilaç direnci gösteren MDR *A.baumannii* klonunun salgınlardan sorumlu olduğu gösterilmiştir.^{56,110} Kolonize hastaların ülkelerarası seyahatleri, MDR *A.baumannii* suşlarının güney Avrupadan Belçika ve Almanya gibi kuzey Avrupa ülkelerine yayılımını sağlamıştır. Kıtalararası MDR- *A.baumannii* geçişi ise Avrupa ve diğer ülkeler arasında havayolu seyahati ile olmuştur. Bu bulgular yüksek oranda dirençli organizma içeren ülkelere gelen kişilerin taranarak şüpheli olguların izolasyonunun önemini göstermektedir. Farklı ülke ve enstitülerde çoğu MDR olup salgınlardan izole edilmiş *A.baumannii* izolatlarının çeşitli genotipik metodlar kombine edilerek yapılan genetik sınıflandırılmasında suşların 3 major grup, Avrupa klon I , II ve III, altında toplandığı gösterilmiştir¹³⁹. İlk

olarak AFLP ile %80' den fazla klonal benzerlik gösteren şırlar daha sonra Ribotipleme, PFGE ve MLST yöntemleri kullanılarak klonal gruplara ayrılmışlardır.¹³⁹ Bu *A.baumannii* klonal gruplarının kuzey Avrupa' daki ülkelerinin yan sıra İtalya, İspanya, Yunanistan ve Türkiye gibi güney ve doğu Avrupa ülkelerinde de yaygın oldukları gösterilmiştir.

2.3.4. *A.baumannii* İnfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri

Sağlık hizmeti verilirken bulaşın en yaygın sebepleri *A.baumannii* ile kontamine deri,vücut sıvıları, hasta bakımında kullanılan pek çok araç-gereç, mobilya ve diğer yüzeyler iken en önemlisi sağlık personelinin elleridir. SHİİ önlemek amacıyla 1996 – HICPAC/CDC yeni izolasyon önlemleri rehberini tanımladı ve 2007' de HICPAC/CDC tarafından rehberdeki öneriler güncellendi¹⁶⁰, buna göre; Standart önlemler ve Bulaşma yoluna yönelik önlemler alınmalıdır. Standart önlemler; kan, tüm vücut sıvıları, bütünlüğü bozulmuş deri, mukoz membranlar için el hijyeni,eldiven kullanımı,önlük,maske kullanımı,güvenli enjeksiyon uygulması ve kontamine ekipmanların uygun şekilde yönetilmesini gerektirmektedir. Hastalarla temas etmeden önce,temastan sonra, aynı hastanın kontamine bölgesinden temiz vücut bölgesine geçerken ve hastalar arası geçişte el hijyeni ve eldiven giyme kurallarına uyulmalıdır.Özellikle hasta bakımı alanlarında sık temas edilen çevresel yüzeylerin rutin bakımı,temizlenmesi ve dezenfeksiyonu düzenli şekilde yapılmalıdır.Yatak çarşafı da uygun şekilde çamaşırhaneye gönderilmelidir.Hastanın bulaş riski fazlaysa tek kişilik odaya alınmalıdır. Bulaşma yoluna yönelik önlemler ise bilinen veya şüpheli enfeksiyon etkeni ile enfeksiyon ve kolonizasyon durumunda temas önlemleri alınmalı tek kişilik odalar kullanılmalı,hasta yada çevresindeki cansız yüzeylerle temas ederken eldiven ve önlük giyilmeli,odalar ve hastalar arası eşya ve tıbbi malzeme transferinden kaçınılmalıdır. Hastane enfeksiyonlarının en sık görüldüğü yoğun bakım ünitelerinde el yıkama için her odada bir lavabo bulunmalı, hastaya temas etmeden önce ve temas sonrası el yıkama-el dezenfeksiyonu uygulaması yapılmalıdır.Enfeksiyon komitesi hemşiresi günlük ziyaretlerini yaparken enfeksiyon kontrol kurallarına uyum açısından gözlem yapmalı ve bu kayıtlar birim sorumlusuna geri bildirim ile iletilmelidir.Yoğun bakım ünitelerinin fiziksel koşulları da çok önemlidir.. YBÜ leri mikroorganizmaların yaşamasına ve taşınmasına engel olacak şekilde düz, uygun malzemeden, kolay

temizlenebilen ve dezenfekte edilebilen birimler olarak tasarlanmalıdır. Hastaya müdahale ve temizlik alanlarının ayrılması, uygun ventilasyon stratejileri, hasta bakım alanının uygun büyüklükte olması, yeterli sayıda ve özellikle lavabo bulunması ve tek yataklı ayrı odalarda hasta bakımı sağlanması, uygun havalandırma ve basınç sistemlerinin olması mikroorganizma geçişine engel olarak hastane infeksiyonlarını azaltmaktadır¹⁵⁸.

Tüm bu uygulamalar salgın sırasında her zaman yeterli olmamaktadır. Bu durumlarda servis kapatılmalı, alet ve çevre temizliği etkili dezenfektanlarla yapılmalı ve terminal dezenfeksiyon yapılmalıdır.Yine salgın öncesinde ve sonrasında alınan çevre kültürleri değerlendirilmelidir¹⁵⁹.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Ç. Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez laboratuvarında Aralık-2011 ile Aralık-2012 tarihleri arasında farklı kliniklerden gönderilen klinik materyallerden izole edilen 49 *A.baumannii* suşu arasındaki klonal ilişki, hastane infeksiyonlarına yönelik moleküler epidemiyolojik çalışmalarda yeni yeni kullanılmaya başlanan ve ülkemizde bu alanda henüz denenmemiş olan AFLP yönteminin, yine bu alanda “ altın standart” olarak kabul edilen PFGE yöntemine göre ayırt etme gücünü tespit amacı ile her iki yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.1. Mikroorganizmanın izolasyonu ve tür tayini

Farklı klinik ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen klinik materyallerden izole edilen, katalaz pozitif, oksidaz negatif, %7 koyun kanlı besiyerinde hemoliz oluşturmayan, EMB besiyerinde de renksiz koloniler oluşturarak üreyip mikroskopik olarak Gram negatif basil veya kokobasil görünümüne sahip olanlar, *A.baumannii* yönünden şüpheli kabul edilerek saf koloni elde etmek amacı ile %7 koyun kanlı agar besiyeri ve EMB besiyerlerine pasajlanmıştır. II.pasaj ile elde edilen saf koloniler Merkez laboratuvarında Vitek-2 otomatize sistemi (BioMerieux, Durham, North Carolina, USA) ile biyokimyasal ve enzimatik özelliklerine göre tür düzeyinde *A.baumannii* olarak tanımlanmış, aynı cihaz ile yapılan antibiyogram testleri sonucunda Karbepenem dirençli olarak tespit edilen suşlar, test suşu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Test suşları salgın veya ispatlanmış hastane infeksiyonu suşları olmayıp tek ortak özellikleri karbepenem duyarlılıklarının kaybıdır. Bu suşlar genotipleme çalışmalarında kullanılmak üzere, %10 gliserol ve %10 kan içeren Beyin-kalp infüzyon buyyona (Brain-Heart infusion broth: BHIB-BBL) pasajlanarak -20C’ de, saklanmıştır.

Test suşlarının 19’ unun (%38.77) en çok Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi olmak üzere Çocuk, Cerrahi ve Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitelerinden izole edildiği görüldü (Tablo 3).

Tablo 3- *A.baumannii* test suşlarının kliniklere göre dağılımları

Klinik	Suş sayısı
Yenidoğan Ünitesi	13
Dahiliye Yoğun Bakım	11
Yanık Ünitesi	7
Beyin Sinir Cerrahi Yoğun Bakım	4
Reanimasyon Ünitesi	5
Çocuk Yoğun Bakım	3
Cerrahi Yoğun Bakım	1
Diğer Klinikler	5
Toplam	49

Bu test izolatlarının %59,18 inin Erkek hastalara,%40.8 inin Kadın hastalara ait olduğu, büyük çoğunluğunun da trakeal aspirasyon (%26.53) örneklerinden izole edildiği görülmüştür (Tablo 4).

Tablo 4. *Acinetobacter baumannii* test suşlarının izole edildikleri klinik materyallere göre dağılımı

İzole edilen klinik materyal	Suş sayısı	Suş %
Trakeal Aspirasyon	17	34.69
Kan	11	22.44
Yara	7	14.28
Kateter ucu	4	8.16
BAL	3	6.12
İdrar	3	6.12
BOS	2	4.08
Püy	1	2.04
Dren	1	2.04
Toplam	49	100

Fenotipik yöntemlerle Karbepenem dirençli *A. baumannii* olarak tanımlanan test suşlarının genetik olarak ilişkilerini klonal düzeyde değerlendirmek amacıyla önce bu bakteriler için altın standart yöntem olarak kabul edilen ApaI-PFGE yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen band polimorfizminin dendogramı yapılmadan, eş zamanlı olarak duyarlılığını ve hastane infeksiyonlarının sürveyansında kabul edilebilirliğini araştırdığımız EcoRI-MseI-AFLP yöntemi ile test suşlarının fragment polimorfizmleri değerlendirilmiş ve son olarak her iki yöntemle elde edilen polimorfik bandların kendi içlerinde dendogramları yapılarak elde edilen küme sayıları ve farklılıkları değerlendirilmiştir. Küme sayısının çokluğu yöntemin ayırım gücünün yüksekliği lehine yorumlanmıştır.

3.2.1. PFGE

ApaI-PFGE işlemi, Rıza Durmaz ve arkadaşlarının (2009) protokolüne uygun şekilde yapıldı ve elektroforez için CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) cihazı kullanıldı (Şekil 3).



Şekil 3. CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) cihazı

3.2.1.1. Örneklerin hazırlanması

1. Tür düzeyinde tanımlanan bakterilerden kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı.
2. Bir gece 37°C' de inkübasyona bırakıldı ve kültürün saflığı kontrol edildi.

3. Besiyerindeki tek koloniden tekrar kanlı agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak 37°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı.
4. Saf kültür olarak üreyen kolonilerden 1ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içerisinde süspanse edildi.
5. Bakteri yoğunluğu yaklaşık 5 McFarland olacak şekilde ayarlandı.
6. Bu bakteri solüsyonundan 1ml ependorfa aktarıldı.
7. 12000g de 4°C’ de 3 dakika santrifüj edildi.
8. Ependorf içerisindeki süpernatant kısım atıldı ve pellet üzerine 1ml HST eklendi

3.2.1.2. Örneklerin agaroz gömülmesi

1. Balon içerisine 9ml HST (100Mm Tris-HCL, 100Mm EDTA, Ph8.0) ilave edildi ve içerisine %2 lik (0,2g) düşük erime ısıları agaroz (BIO-RAD Low melting agar 161-3113EDU) eklendi. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz çözündükten sonra balon 45-50°C’ lik su banyosuna konuldu daha sonra içerisine %1 sodyum dodesil sülfat eklendi ve stok solüsyondan 1,5ml lik ependorflara 200µl dağıtıldı kuru ısı bloğunda 45-50°C’ de kullanıma hazır bekletildi.
2. Her suş için bir agaroz kalıbı belirlenir buz kalıbı üzerinde bekletildi.
3. Bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50°C’de içerisinde 200 µl düşük erime ısıları agaroz bulunan tüpe eklendi. Agarın homojen yayılması için birkaç defa pipetaj yapıldı.
4. Karışım bekletilmeden agaroz kalıbına (10mm x 5mm x 1,5mm, Bio Rad Laboratories) konuldu.
5. Kalıplar +4 °C’ de 20 dakika bekletildi.(Bu kalıpların +4 °C’ de bekletilmesi daha kaliteli DNA hazırlamak için önemlidir)

3.2.1.3. Örneklerin agaroz içinde parçalanması

Hazırlanan lisis- 1 (50 mMTris-HCL) solüsyonu 1-5ml lik steril kapaklı tüplere 500 µl dağıtıldı.

1. +4°C’ deki kalıplar lisis-1 solüsyonu içerisine yerleştirildi.
2. Çalkalamalı su banyosunda 37°C’ de 1 saat bekletildi.
3. Su banyosunda 1 saat bekletildikten sonra çıkarılan tüplerin içindeki lisis-1 solüsyonu döküldü.
4. Lisis-2 (0.5M EDTA , %1 sarkozil,400µg/ml proteinaz K) solüsyonu hazırlandı 500 µl tüplere dağıtıldı.
5. Çalkalamalı su banyosunda 55°C’ de 2 saat bekletildi.

3.2.1.4. Lisis işlemlerinden sonra kalıpların yıkanması

1. Lisis aşamalarında sonra kalıpların zarar görmemesi ve katılaşması için 15 dakika +4°C’ de bekletildi.
2. Kalıplar önce yaklaşık 6ml 3defa ultrapür su ile yıkandı ve sonra 6ml TE tamponu ile 3 defa 15’ er dakika yıkandı.

Yıkama işlemleri ile saflaşmış olan DNA kalıpları restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

3.2.1.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA’ ın RE ile kesilmesi

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi.Restriksiyon enzimi olarak Apa1 kullanıldı.Parçalardan biri 100 µl buffer solüsyonu içerisine konularak oda sıcaklığında bekletildi.
2. Daha sonra her kalıp için aşağıdaki karışım hazırlandı.Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 30 ünite Apa1 enzimi konuldu (Fermentase,lot:00053654).

- 10 µl Apa1 buffer (10x) (Fermentase)
- 3 µl Apa1 enzim (10 ünite/ul) (Fermentase)
- 87 µl steril distile su (Reagent Grade Type 1)

3. Agaroz kalıbının içerisinde bulunduğu buffer solüsyonu aspire edildi. Üzerine yukarıda hazırladığımız gibi enzim solüsyonu eklendi ve 37°C’ de çalkalamal su banyosunda 2 saat bekletildi.
4. Tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi ve kalıplar yüklemeye hazır hale geldi

3.2.1.6. Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

100 ml 0.5x TBE içinde %1.1’ lik agaroz (Pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı:

1. “ pulsed-field certified agarose” dan 1,1g balona konuldu
2. Agarozun üzerine 100ml 0,5x TBE tamponu eklendi ve karıştırıldı.
3. Balonun ağzı aliminyum folyo ile kapatılarak 60 saniye mikrodalga fırında tutuldu, karıştırılıp tekrar 15 saniye tutuldu iyice homojenize olması sağlandı.
4. Agarozun döküleceği aparat hazırlandı düz zemine yerleştirildi.
5. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıpları 15 dişli tarağın uç kısmına paralel olarak yerleştirildi.
6. Kurutma kağıdı veya kağıt havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı.
7. 45-50°C ye kadar soğuyan agar kasetin üzerine döküldü.
8. Oda sıcaklığında 20 dakika katılaşması için bekletildi, katılaştıktan sonra tarak çekildi.
9. Daha sonra agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve içinde 1900 mililitre 0,5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

3.2.1.7. Elektroforez

Elektroforez CHEFF-DR II cihazında (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) aşağıdaki elektroforez şartlarına göre yapıldı.

	BLOK
Başlangıç vuruş süresi	5sn
Bitiş vuruş süresi	30sn
Akım	6V
Sıcaklık	14°C
Süre	20 saat

3.2.1.8. Sonucun gözlenmesi

1. Elektroforezden sonra jel 5 µg/ml ethidium bromür içeren 400 ml ultra pure saf su içinde 20 dakika boyandı.
2. Sonra UV ışık altında görüntülendi.
- 3- Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak, DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.
4. GelCompar II yazılım sistemi (version 5.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart görüntü yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. UPGMA kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturuldu, kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1,5 olarak alındı. Bant profilleri %80 benzerlik gösteren izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve büyük harfle isimlendirildi. Aynı küme içerisindeki subtipler ise rakamlar ile gösterildi.

3.2.1.9. PFGE yönteminde kullanılan solüsyonlar.

3.2.1.9.1. TE buffer

TrisHCL 1,576gr

EDTA 0,0372gr

Ultra pure su ile 1 litreye tamamlandı.

Karışım homojenize edildi, NaOH ile pH 7.6' ya ayarlandı

3.2.1.9.2. Hücre Süspansiyon Tamponu(HST)

Tris HCL(SIGMA T-3253) 15,76gr

EDTA (AMRESCO 0105-50) 37,22gr

Ultra pure su ile 1lt ye tamamlandı.

Karışım homojenize edildi, NaOH ile pH'sı 8.9' a ayarlandı

3.2.1.9.3. Lisis-1

Tris HCL (SIGMA T-3253) 7,88 gr

EDTA (AMRESCO 0105-50) 18,61gr

Ultra pure su ile 1lt ye tamamlandı.

Karışım homojenize edilir NaOH ile pH 8,26' ya ayarlandı

3.2.1.9.4. Lisis-2

EDTA (AMRESCO 0105-50) 186,1gr

N-lauryl Sarcosine (AMRESCO 0719-500) 10gr

EDTA Ultra pure su ile 1lt ye tamamlanır çözüldükten sonra üzerine sarkosine eklendi. NaOH ile pH 8,22' ye ayarlandı

3.2.1.9.5. 0,5x TBE

Tris base (SIGMA T-1503) 5.3845 gr

Borik asit (MERCK 1.00165.0500) 2.75 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500) 0.3722 gr

Ultra pure su ile 1lt ye tamamlanır. Karışım homojenize edilir.

3.2.1.9.6. 20mg/ml proteinase K solüsyonu

Proteinaz K (Roche, Lot 11207200)	100 mg
Distile su	5 ml

3.2.1.9.7. %10 sodium dodecyl sulfate solüsyonu

Sodium dodecyl sulfate (SIGMA L-5750)	10gr
Ultra pure saf su	100ml

3.2.2. Amplified Fragment Length Polimorfizm

AFLP yöntemi Dijkshoorn ve arkadaşlarının (1996) metodunu referans alan ticari AFLP Mikrobial fingerprinting kiti (Applied Biosystems) kullanılarak 1-Test suşlarının DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve açık uçları tanıyan ve amplifikasyon için hedef dizileri taşıyan adaptörlerin bağlanması, 2-Preselektif ve Selektif amplifikasyon, 3-Amplikonların tespiti için elektroforez ve görüntüleme olmak üzere üç aşamada tamamlanmıştır.

Öncelikle test suşlarının genomik DNA'ını elde etmek için glass milk yöntemi (Mickle cihazıyla) aşağıdaki gibi uygulandı.

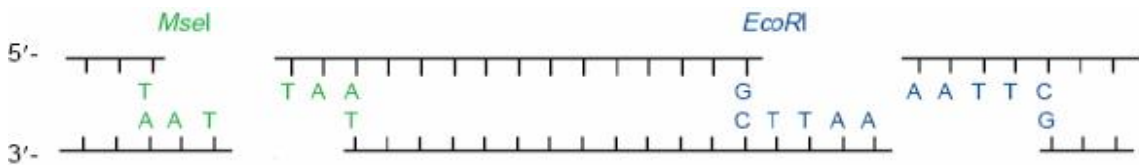
Test suşlarının DNA ekstraksiyonu

1. Tür düzeyinde tanımlanan bakterilerden kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı.
2. Bir gece 37°C' de inkübasyona bırakıldı ve kültürün saflığı kontrol edildi.
3. Besiyerindeki tek koloniden tekrar kanlı agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak 37°C' de bir gece inkübasyona bırakıldı
4. Saf olarak elde edilen *A.baumannii* kolonilerinden distile su ile Mc Farland 5 bulanıklığında süspansiyonlar elde edildi.
5. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500µl ependorf tüpe alınarak, 8000 xg de 3dakika santrifüj edildi

6. Üst sıvı atılıp ve pelletin üzerine 250 µl 1X TE buffer (20mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) eklendi.
7. Daha sonra 100°C' de, 10 dakika kurusı bloğunda (BİOSAN Termoblock TDB-120) tutuldu.
8. Bakteri süspansiyonuna 250 µl alınarak üzerine 100 µl boncuk (SIGMA) ilave edildi ve Mickle cihazında (Mickle Tissue Disintegrator, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) maksimum hızda (10), 7 dakika mekanik lizise uğratıldı.
9. 12.000 xg de 10 dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatantdan 100 µl alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı. Spektrofotometre (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) ile DNA kantitasyonu yapıldı.
11. Kantitasyon sonucunda DNA miktarı 50 ng/mikrolitrenin altında bulunan örneklerin ekstraksiyon işlemi tekrarında 5 Mc Farland bulanıklığı 8 Mc Farlanda çıkarıldı ve spectro-fotometrede ölçümden sonra istenen miktarın olduğu görüldü.

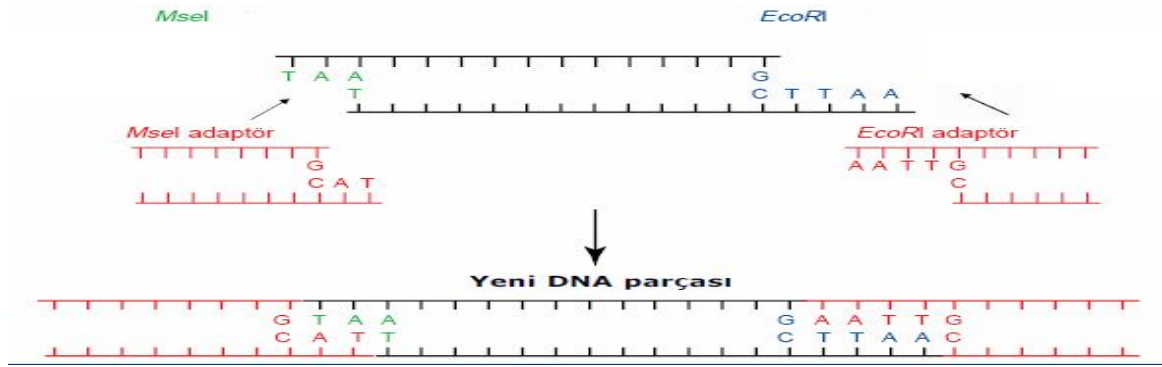
3.2.2.1. Restriksiyon-ligasyon işlemi

Restriksiyon ve ligasyon aşamaları AFLP Microbial Fingerprinting (Applied Biosystems) kit protokolüne uygun olarak aynı tüpte gerçekleştirildi. Genomik DNA kesiminde kullanılan Restriksiyon enzimleri EcoRI ve MseI' dir. Genomik DNA'y açık uçlu olarak kesen bu enzimlerden EcoRI (Fermentas 10u/µl) enzimi 6 bazı tanıyarak (G' AATTC), MseI enzimi (Fermentas 10u/ µl) 4 baz tanıyarak (T' TAA) keser (Şekil 4).



Şekil 4. EcoRI ve MseI enzimlerinin farklı bazları tanıyan kesim bölgeleri

Tek tüpte gerçekleştirilen Enzimlerle kesim ve ardından oluşan bu açık uçlu DNA fragmentlerine kesilen iki bölge için farklı adaptor olan EcoRI ve MseI adaptörlerinin bağlanması için kullanılan ligasyon enzimi T4 DNA ligaz (NEB)' dir. Ligasyon sonrası yeni bir DNA parçası oluşur (şekil 5)



Şekil 5: Açık uçlara adaptörlerin bağlanması sonucu oluşan yeni DNA parçası

Öncelikle bu üç enzimin master mix' i kit protokolüne uygun bir şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

a)Enzim Master Mix (100 örnek için)

1. 10µl 10X T4 DNA ligaz buffer (50mM Tris-HCL (PH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, 1 mM ATP,25µg/ml bovine serum albumin(BSA))
2. 10µl 0.5 M NaCL
3. 100 U MseI (10u/ µl)
4. 500 U EcoRI (10u/ µl)
5. 100 U T4 DNA ligaz (400ceu/ µl) (NEB)

Toplam hacim steril distile su ile 100 µl ye tamamlandı.Mikrosantrifüjde 10sn spin yapıldı ve restriksiyon ligasyon aşaması için hazır hale getirildi.

b) Restriksiyon- ligasyon

Restriksiyon – ligasyona başlamadan önce kullanılacak adaptor çiftleri denatürasyon için 95 C 5 dk bekletilip oda ısısında soğumaya bırakıldı.

Restriksiyon-ligasyon tek tüpte gerçekleştirildi. Steril 0.5ml mikrosantrifüj tüpüne 50 ng DNA örneği eklendi ve üzerine, 1 µl 10X T4 DNA ligaz buffer, 1 µl 0.5 M NaCL, 0.5 µl 1mg/ml BSA(Promega), 1.0 µl MseI adaptor (MseI enziminin kestiği açık uca anahtar kilit uyumu gösteren çift zincirli sentetik nükleotid dizisi P/N 402942) , ve 1.0 µl EcoRI adaptor (EcoRI enziminin kestiği açık uca anahtar kilit uyumu gösteren çift zincirli sentetik nükleotid dizisi P/N 402941) eklendikten sonra yukarıda hazırlanan enzim master mixinden 1.0 µl alınarak hazırlanan karışıma eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra mikrosantrifüjde 10 sn spin yapıldı ve restriksiyon enzimleri ve ligasyon enziminin en iyi aktiviteyi gösterdikleri ortak sıcaklık olan 37 C de 4 saat thermal cycler da bekletildi.

Restriksiyon-ligasyon işleminin başarısının tespiti için; 4. saat sonunda toplam 11 µl olan restriksiyon ligasyon ürünleri 2' ye ayrıldı. RL ürününün 5.5 µl kısmı restriksiyon- ligasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için elektrikli ortamda ethidium bromidli agaroz jel içerisinde migrasyonel seperasyona tabii tutuldu ve görüntülendi. Bu işlem aşağıdaki şekilde yapıldı

1. Elektroforez matriksi olarak kullanılmak üzere % 1.5 ' lik agaroz jel 0.5xTBE solüsyonu ile hazırlandı.
2. Bir balon içerisine tartılarak konulan 1.5 gr agaroz (Sigma Agarose A5093-500G) üzerine 100 ml 0.5xTBE ilave edildi.
3. Karışım homojenizasyon sağlanana kadar mikrodalga fırında eritildi.
4. Oda ısısında 60 C' nin altına düşmeyecek şekilde bekletilerek soğutuldu.
5. Eriyik haldeki agaroz içerisine 10 mg/ml' lik etidyum bromid stok solüsyonundan 5 µl eklenerek, % 0,5 mg/ml son konsantrasyon elde edildi.
6. Hazırlanan % 0,5 ethidium bromid içeren % 2' lik agaroz jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
7. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek jel kalıbının katılaşması sağlandı.
8. Jel kalıbı elektroforez tankına (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.

9. Örneklerden 5.5 µl alınarak parafilm üzerinde % 20 süzkroz, % 0,25 brom fenol mavisini ile hazırlanmış 6x konsantrasyondaki 2 µl yükleme tamponuna karıştırıldı. İlk ve son kuyuya DNA markeri (Fermentas O' Range Ruler, 100bp Ladder, Lot: 0302) ve diğer kuyulara her birine bir örnek olacak şekilde bu karışımdan 7.5 µl yüklendi.
10. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak 120 V akım verildi. Brom fenol mavisinin jeldeki migrasyonu takip edilerek, boya jelin 2/3' lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.
11. Elektroforezden sonra jel UV ışığa altında görüntülendi. Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi.

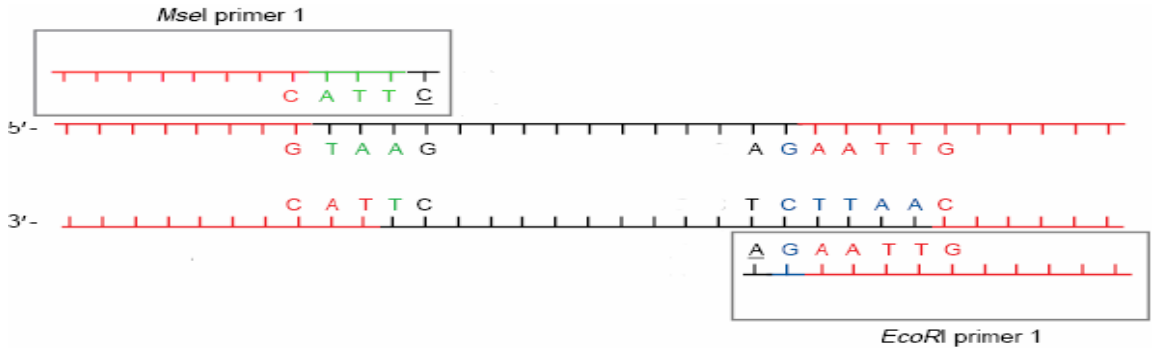
Elde edilen görüntü sonucunda sürüntü tespit edilen ve restriksiyonun gerçekleştiğine karar verilen RL ürünlerinin ayrılan 5.5 µl' si PCR aşaması için 94.5 µl 1XTE 0,1 (20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0), solusyonu ile dilüe edildi. Daha sonra PCR' a geçildi. Ön seçici PCR yani preselektif PCR ve Seçici yani Selektif PCR olmak üzere 2 aşamada tamamlandı.

3.2.2.2. Preselektif ve Selektif PCR – Amplifikasyon

Adaptörlerin bağlanmasından sonra oluşan fragmanların amplifikasyonu adaptörlere komplementer 3' ucunda fazladan 1 yada 2 baz daha uzun olan primerler eklenerek yapıldı ve böylece sadece bu bazlara komplementer fragmanlar amplifiye edildi. Seçiciliği artırmak için amplifikasyon aşaması preselektif ve selektif primerler kullanılarak 1. Preselektif amplifikasyon ve 2. Selektif amplifikasyon olarak iki aşamalı yapıldı

1. Preselektif amplifikasyon

Bu aşamada adaptör DNA lara komplementer, 3' uçları kalıp adaptör sekansından 1 baz uzun primerler kullanıldı. (şekil 6) 4 µl dilüe RL ürünü, 0.5 µl işaretsiz EcoRI preselektif primer, 0.5 µl işaretsiz MseI preselektif primer ve 15 µl amplifikasyon core mix (Buffer, nükleotidler, AmpliTaq DNA Polimeraz, Applied Biosystems P/N 402005) ile PCR karışımı oluşturuldu



Şekil 6: Adaptörlere komplementer preselektif primerler

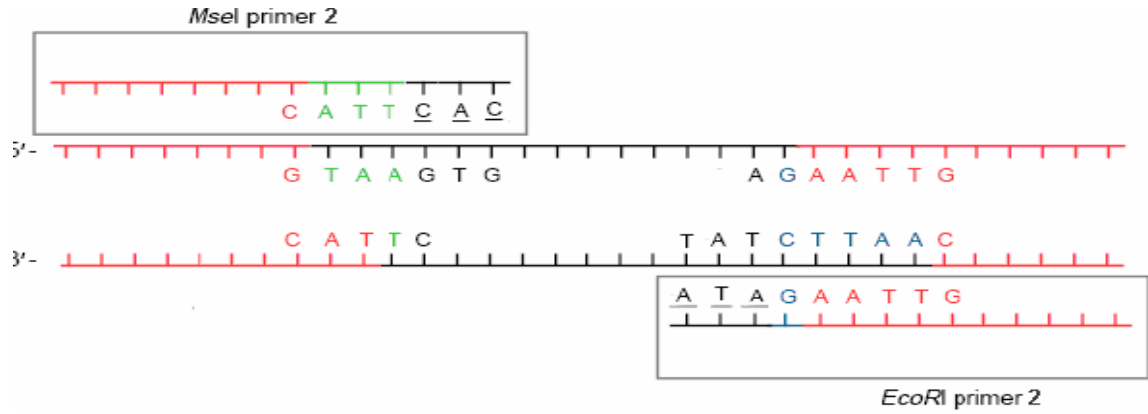
PCR aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı

72 °C de	2 dak	İlk denatürasyon	} 20 siklus
94 °C de	20 sn	Denatürasyon	
56 °C de	30sn	Bağlanma annealing	
72 °C de	2 dak	Uzama extension	

Preselektif amplifikasyonun başarısını görmek için amplifiye ürünler elektrikli ortamda ethidium bromidli agaroz jel içerisinde migrasyonel seperasyona tabii tutuldu ve görüntülendi. Daha sonra selektif amplifikasyon aşamasına geçildi.

2-Selektif amplifikasyon

Selektif PCR da kullanılan primerlerden sadece EcoRI primeri otomotize sistemde görünebilmesi için 5-carboxyfluorescein işaretli olarak seçildi. Kullanılan ticari kitteki 9 farklı EcoRI primeri ve 9 farklı MseI primerlerinin farklı kombinasyonları denendi (Şekil 7).



Şekil 7: Adaptörlere komplementer selektif primerler

Sonuçta kittede önerildiği üzere en uygun kombinasyon bulundu. Selektif PCR için dilüe preselektif PCR ürününden 1.5 µl, 0.5 µl MseI-T primeri (P/N 402942), 0.5 µl floresan işaretli EcoRI-C primer (P/N402941) ve 7.5 µl amplifikasyon core mix alınarak karıştırıldı ve aşağıdaki döngü sırasına göre PCR tamamlandı.

94°C de 2 dak	İlk denatürasyon
94°C de 20 sn	Denatürasyon
66°C de 30 sn	Bağlanma
72°C de 2 dak	Uzama
60°C de 30 dak	Son uzama

İlk siklusta 66°C olan bağlanma ısısı her siklusta 1°C düşürülerek en son 56°C' de 20 siklusa tamamlandı

3.2.2.3. Fragmentlerin analizi.

Presellektif ve sellektif primerler kullanılarak tamamlanan amplifikasyon sonunda üretilen ampikonların fragment uzunluklarına göre polimorfizmlerinin tespiti iki aşamalı işlem ile gerçekleştirildi

a-Kapiller elektroforez ile polimorfik DNA fragmentlerinin gösterilmesi.

Selektif PCR ürünleri 47 cm uzunluğunda PoP4 (MCLAB) jel ile dolu kapiller içeren ABI PRISM 310 cihazında kapiller elektroforez ile separe edildi (Şekil 8). Elektroforezden önce 1 µl amplifie ürün üzerine 24 µl formamid ve 1 µl GeneScan 500 Liz size standart (Applied Biosystems) eklendi. Her örnek için bu karışım hazırlandı ve 95 derecede 5 dakika bekletilip denatüre edildikten hemen sonra buz üzerinde de kısa bir süre tutuldu ve örnekler ABI PRISM 310 cihazı için üretilen tüplere (ABI 310, 0.5 ml) aktarıldı.Daha sonra ABI PRISM 310 cihazındaki pleyte elektroforez için yüklendi.Elektroforez parametreleri aşağıdaki gibi ayarlandı.

İnjesiyon zamanı:	5 sn
İnjesiyon voltajı:	13 kV
Elektroforez süresi:	26 dak
Elerktroforez voltajı:	15 kV



Şekil 8. ABI PRISM 310 cihazı

b.Fragment analizi

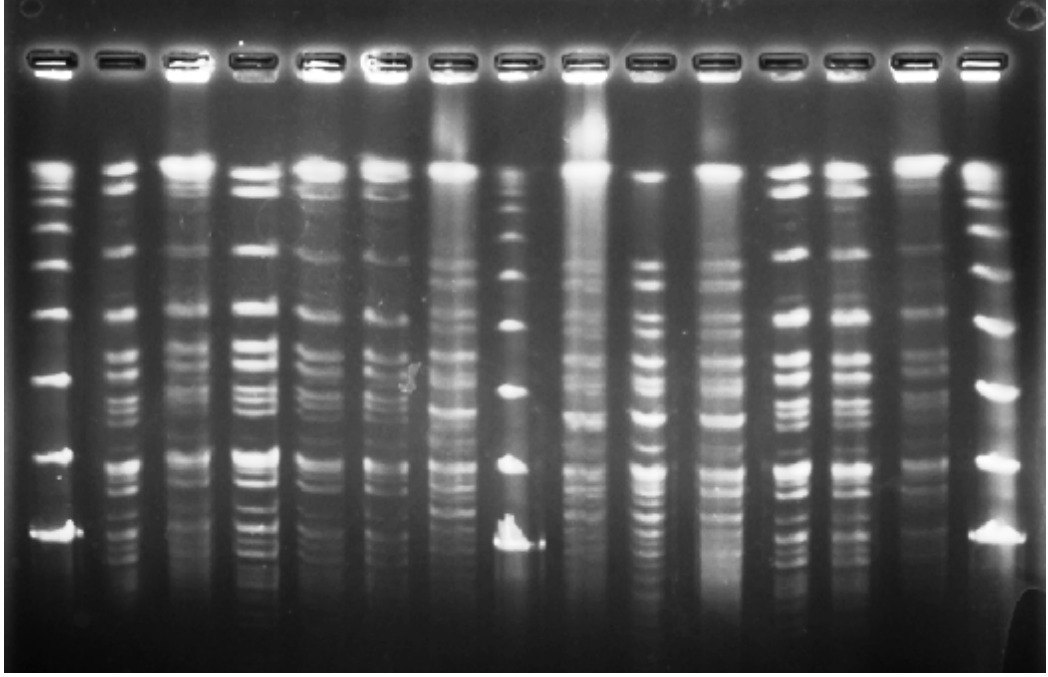
Elektroforez sonunda Fragmenler GeneMapper software version 4.0 programı ile analiz edildi.Fragmenlerin oluşturduğu Pik yüksekliklerinin threshold değeri 50 olarak ayarlandı ve bu değerin altındaki hiç bir pik analize dahil edilmedi.Elektroforez sonunda oluşan 50 -500bp arasında oluşan tüm pik paternleri değerlendirildi ve Exelde

bir tablo oluşturuldu.Bu tabloda her örnek için pikler var yada yok şeklinde değelendirildi.Pik varlığı durumunda 1 yokluğunda 0 değerleri verildi.Bu yolla elde edilen AFLP band profillerinin ‘ ’ Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)’ ’ kullanılarak dendogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “ Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Bant profilleri %80 benzerlik gösteren izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve küçük harflerle isimlendirildi. Aynı küme içerisindeki subtipler ise rakamlar ile gösterildi.

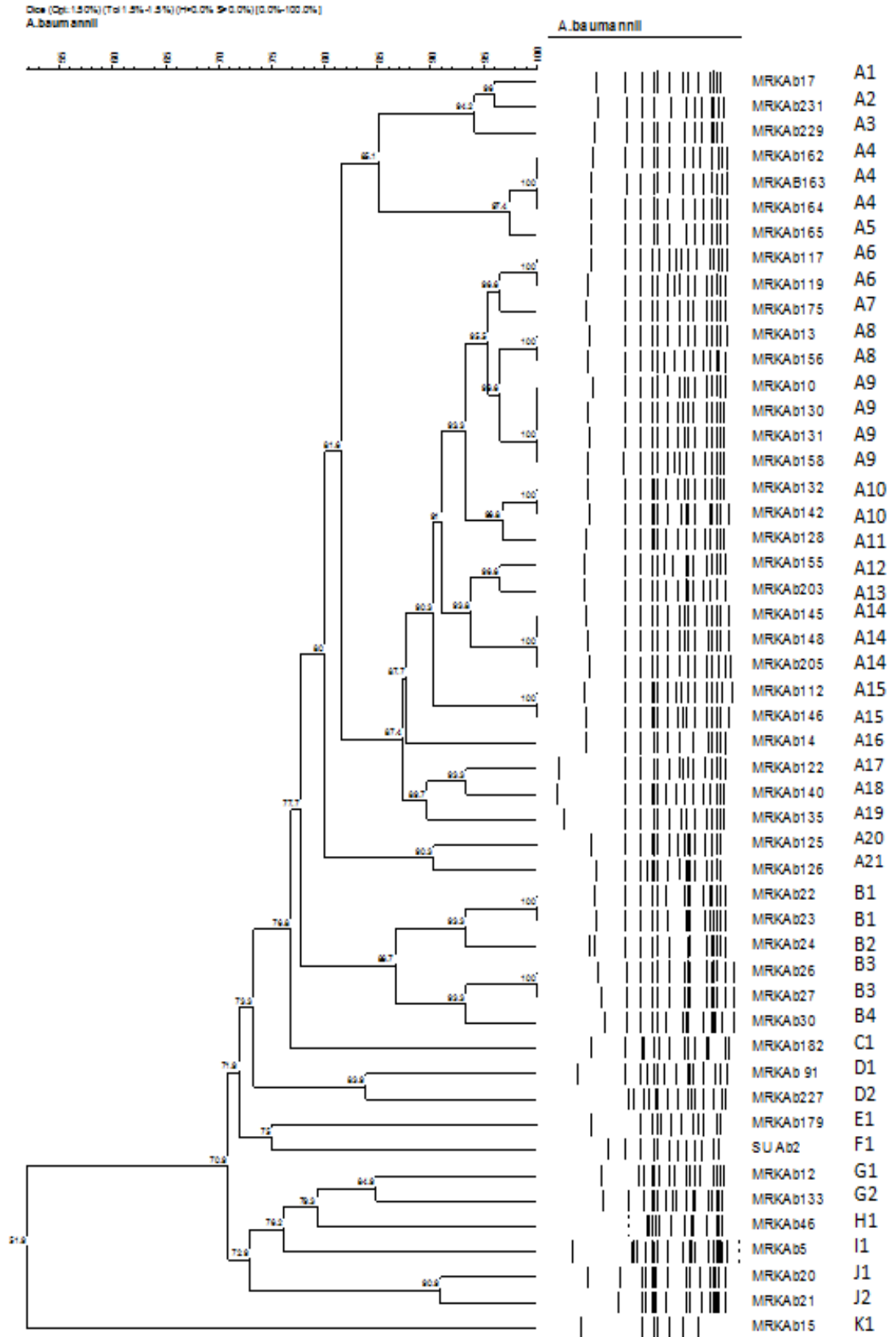
4. BULGULAR

Ç. Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarlarında çeşitli klinik materyallerden izole edilen karbapenem dirençli 49 *A. baumannii* izolatının; klonal özelliklerini belirlemek amacı ile; PFGE ve AFLP yöntemlerinin kullanıldığı çalışmada:

- a) Test suşu olarak imipenem (<16 µg/ml) ve meropenem (<16 µg/ml) dirençli olduğu tespit edilmiş 49 klinik *A.baumannii* izolatın kullanıldı.
- b) Fenotipik olarak aynı özelliğe sahip test suşları arasındaki muhtemel genotipik/klonal ilişkinin belirlenmesi amacı ile; bu bakteri türü için, süveyans çalışmalarında, altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi ile henüz değerlendirilme aşamasında olup ülkemizde etyolojisi ne olursa olsun hastane enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisinde hiç kullanılmamış olan AFLP yöntemi kullanılmış, sonuçlar GelComparII programı ve DİCE+UPGMA katsayıları ile değerlendirilmiştir.
- c). Test suşlarının PFGE yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda en az % 80 benzerlik esas alınarak yapılan dendogramında izolatların ilişkili 10 farklı gen kümesi ile 36 alt kümeye dağıldıkları (Şekil 9 Şekil 10)
- d) Bu kümeler içerisinde en büyüğünü 21 alt küme içerisine dağılmış 32 üyeli “ A ” kümesinin oluşturduğu, bunu 4 alt küme içerisinde 6 üyesi olan B kümesinin izlediği, buna karşılık C,E,G,H ve J kümelerinin birer üyeli kümeler olduğu (Şekil 10).
- d) A kümesi içerisinde yer alan 18 suşun % 100 benzerlik gösteren 7 alt kümeye (A4,A6,A8,A9,A10,A14 VE A15) dağıldıkları, bu alt kümeler içerisinde A9’ un 4 üyeli en büyük alt küme olmasına karşılık, A14 ve A4 alt kümelerinin de 3’ er üyeli kümeler oldukları
- e) B kümesi içerisinde de 4 suşun % 100 benzerlik gösterdikleri ve 2 şer üyeli 2 alt kümeye (B1 ve B3) dağıldıkları diğer 2 suşunda bağımsız tek üyeli alt kümeleri oluşturdukları görüldü. (Şekil 10 ve tablo-5)



Şekil 9. Test suşlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüsü



Şekil 10. Test suşlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı.

Tablo-5 Test suşlarının PFGE ile klonal küme dağılımı

Küme	Alt küme	İlişki oranı	
A	A1	96	Yanık ünitesi
	A2	96	Yanık ünitesi
	A3	94.2	Yenidoğan Ünitesi
	A4	85.1 100	Yanık ünitesi
	A4	100	Yenidoğan Ünitesi
	A4	100	Yenidoğan Ünitesi
	A5	85.1	Çocuk YBU
	A6	81.6 100	Süt çocuğu kln
	A6	100	BSC YBU
	A7	81.6	Dahiliye YBU
	A8	100	Dahiliye YBU
	A8	100	BSC YBU
	A9	100	Yenidoğan Ünitesi
	A9	100	İntaniye kliniği
	A9	100	Cerrahi YBU
	A9	100	BSC YBU
	A10	100	Dahiliye YBU
	A10	100	Yenidoğan Ünitesi
	A11	81.6	Yenidoğan Ünitesi
	A12	81.6	Yanık ünitesi
	A13	81.6	Dahiliye YBU
	A14	100	BSC YBU
	A14	100	Yanık ünitesi
	A14	100	Nefroloji kliniği
	A15	100	Yenidoğan Ünitesi
	A15	100	Yenidoğan Ünitesi

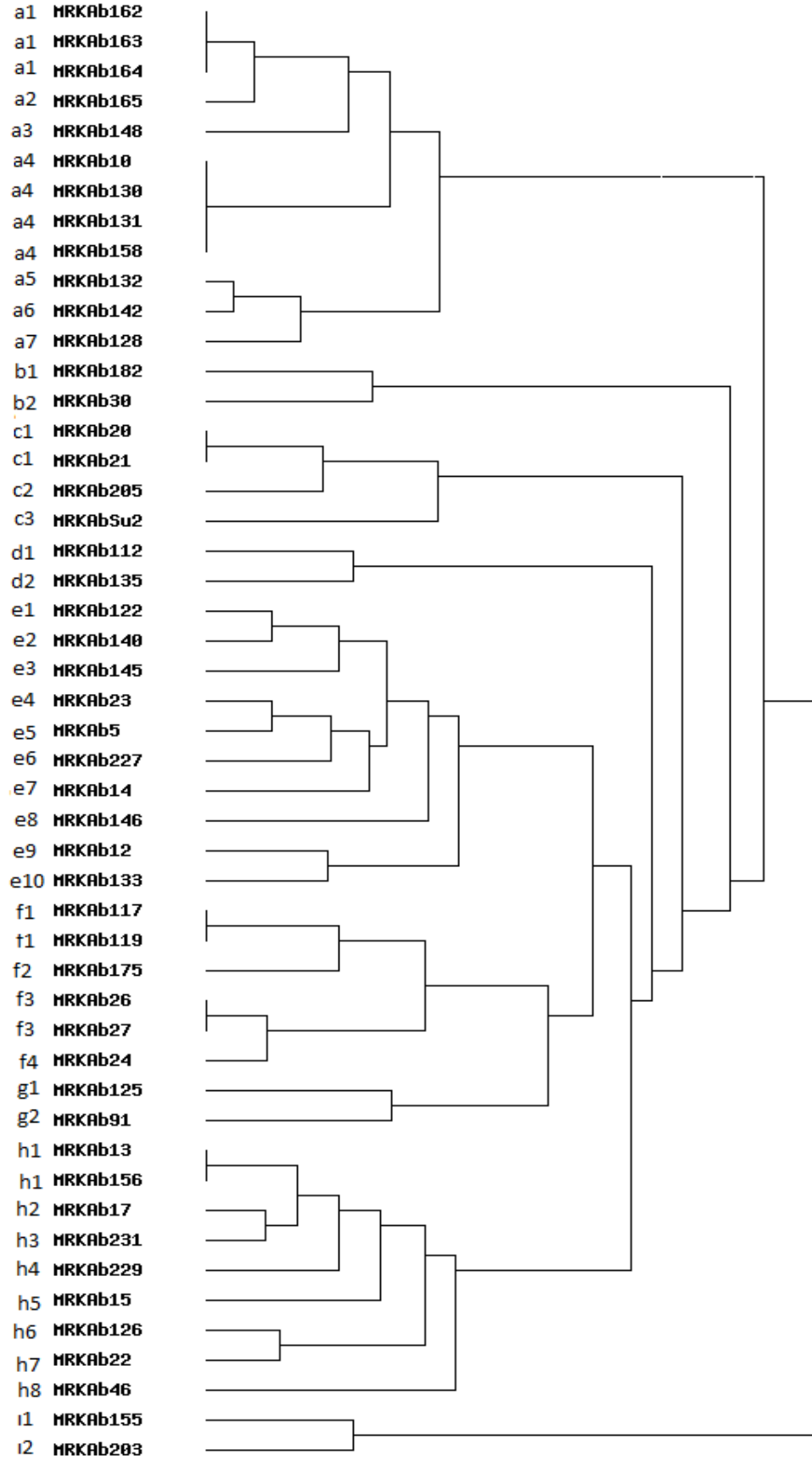
Küme	Alt küme	İlişki oranı	Kaynak
A	A16	81.6	Yenidoğan Ünitesi
	A17	81.6	
	A18	81.6	Yenidoğan Ünitesi
	A19	81.6	Yenidoğan Ünitesi
	A20	80.0	Yenidoğan Ünitesi
	A21	80.0	Yenidoğan Ünitesi
B	B1	77.7 100	Yanık ünitesi
	B1	100	Reanimasyon Ünitesi
	B2	77.7	Reanimasyon Ünitesi
	B3	100	Reanimasyon Ünitesi
	B3	100	Dahiliye YBU
	B4	77.7	Dahiliye YBU
C	C1	76.8	Yanık ünitesi
D	D1	73.3	Dahiliye YBU
	D2	73.3	Cerrahi YBU
E	E	71.9	
F	F1		Dahiliye YBU
	F2		Dahiliye YBU
G	G	70.9	Reanimasyon Ünitesi
H	H	70.9	Dahiliye YBU
I	I1		Çocuk YBU
	I2		Çocuk cerrahisi
J	J	70.9	Dahiliye YBU

Test suşlarının klonal ilişki yönünden AFLP yöntemi ile değerlendirilmesi sonunda ise;

- a) Test suşlarının fragment uzunluklarındaki polimorfizme göre % 80 benzerlik esas alınarak 9 küme ve 40 alt kümeye dağıldıkları (**Şekil 12**)
- b) En büyük kümeyi 7 alt küme içerisine dağılmış 12 üyesi olan “ a” kümesinin oluşturduğu, bunu 10 alt küme içerisinde yer alan 10 üyeli “ e” kümesinin izlediği, bu yöntem ile PFGE ile elde edilen tek üyeli küme tespit edilmediği,
- c) “ a” kümesi içerisinde yer alan “ a4” kümesinin 4 üyesi ile “ a1” alt kümesi içerisinde yer alan 3 suşun küme içerisinde % 100 benzerlik oranına sahip oldukları, buna karşılık 6 üyeli “ f” kümesinde % 100 içkili 4 suşun 2 alt kümeye (f1 vef3) dağıldıkları (**Tablo-6**)
- d) “ c” ve “ h” kümeleri içerisinde de % 100 benzerlik oranına sahip 2 şer üyenin yer aldığı 2 alt küme olduğu görülmüştür.(**Tablo-6**)



Şekil 11. Test suşlarının GeneMapper 4.0 ile analiz edilen pik görüntüsü



Şekil 12. Test suşlarının AFLP ile edilen klonal küme dağılımının dendogramı.

Tablo-6 Test suşlarının AFLP ile klonal küme dağılımı.

Küme	Alt küme	İlişki oranı	Kaynak
a	a 1	100	Yanık ünitesi
	a 1	100	Yenidoğan Ünitesi
	a 1	100	Yenidoğan Ünitesi
	a 2		Çocuk YBU
	a 3		Yanık ünitesi
	a 4	100	Yenidoğan Ünitesi
	a 4	100	İntaniye kliniği
	a 4	100	Cerrahi YBU
	a 4	100	BSC YBU
	a 5		Dahiliye YBU
	a 6		Yenidoğan Ünitesi
	a 7		Yenidoğan Ünitesi
b	b 1		Yanık ünitesi
	b 2		Dahiliye YBU
c	c 1	100	Çocuk YBU
	c 1	100	Çocuk cerrahisi
	c 2		Nefroloji kliniği
	c 3		
d	d1		Yenidoğan Ünitesi
	d2		Yenidoğan Ünitesi
e	e1		
	e2		Yenidoğan Ünitesi
	e3		BSC YBU
	e4		Reanimasyon Ünitesi
	e5		Dahiliye YBU

Küme	Alt küme	İlişki oranı	Kaynak
e	e6		Cerrahi YBU
	e7		Yenidoğan Ünitesi
	e8		Yenidoğan Ünitesi
	e9		Dahiliye YBU
	e10		Dahiliye YBU
f	f1	100	Süt çocuğu kln
	f1	100	BSC YBU
	f2		Dahiliye YBU
	f3	100	Reanimasyon Ünitesi
	f3	100	Dahiliye YBU
	f4		Reanimasyon Ünitesi
g	g1		Yenidoğan Ünitesi
	g2		Dahiliye YBU
h	h1	100	Dahiliye YBU
	h1	100	BSC YBU
	h2		Yanık ünitesi
	h3		Yanık ünitesi
	h4		Yenidoğan Ünitesi
	h5		Dahiliye YBU
	h6		Yenidoğan Ünitesi
	h7		Yanık ünitesi
	h8		Reanimasyon Ünitesi
i	i1		Yanık ünitesi
	i2		Dahiliye YBU

Tablo-7. Test suşlarının AFLP ve PFGE ile elde edilen dendogram kümelerinin karşılaştırılması

PFGE			AFLP			PFGE			AFLP		
Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı
A	A1		h	h2		A	A16		e	e7	
	A2			h3			A17			e1	
	A3			h4			A18			e2	
	A4	100	a	a 1	100		A19		d	d2	
	A4	100		a 1	100		A20		g	g1	
	A4	100		a 1	100		A21		h	h6	
	A5			a2		B	B1	100		h7	
	A6	100	f	f1	100		B1	100	e	e4	
	A6	100		f1	100		B2		f	f4	
	A7			f2			B3	100		f3	100
	A8	100	h	h1	100		B3	100		f3	100
	A8	100		h1	100		B4		b	b2	
	A9	100	a	a4	100	C	C1			b1	
	A9	100		a4	100	D	D1		g	g2	
	A9	100		a4	100		D2		e	e6	
	A9	100		a4	100	E	E		c	c3	
	A10	100		a5		F	F1		e	e9	
	A10	100		a6			F2			e10	
	A11			a7		G	G		h	h8	
	A12		i	i1		H	H		e	e5	
	A13			i2		I	I1		c	c1	100
	A14	100	e	e3			I2			c1	100
	A14	100	a	a3		J	J		h	h5	
	A14	100	c	c2							
	A15	100	d	d1							
	A15	100	e	e8							

Test suşlarının AFLP yöntemi ile elde edilen fragment uzunluk polimorfizmi baz alınarak yapılan dendogram sonuçlarının *A.baumannii* moleküler tiplendirmesinde altın standart olarak kabul edilen PFGE ile elde edilen dendogram sonuçları ile karşılaştırıldığında,

Test suşlarının PFGE ile 10 küme ve 36 alt küme içerisinde toplanmalarına karşılık AFLP ile suşların 9 küme ve 40 alt kümeye dağıldıkları görüldü. Yani AFLP alt küme sayısı PFGE ile elde edilen alt küme sayısından daha fazla bulundu. PFGE yöntemi ile suşların %65,3 (32/49)' ü 21 alt kümeli A kümesi içerisinde toplanırken AFLP ile elde edilen en büyük küme olan "a" kümesi 7 alt küme içerisinde suşların %24.4 (12/49)' ünden oluşmuştur.

Tablo-8 Her iki yöntem ile % 100 ilişkili oldukları tespit edilen suşların kliniklere göre dağılımları

Suş No	PFGE Küme	AFLP Küme	Klinik	Suş no	PFGE Küme	AFLP Küme	Klinik
MRKAb162	A4	a 1	Yanık ünitesi	MRKAb 145	A14		BSC YBU
MRKAb163	A4	a 1	Yenidoğan ünitesi	MRKAb 148	A14		Yanık ünitesi
MRKAb164	A4	a 1	Yenidoğan ünitesi	MRKAb 205	A14		Nefroloji kliniği
MRKAb117	A6	f1	Süt çocuğu kliniği	MRKAb 112	A15		Yenidoğan ünitesi
MRKAb119	A6	f1	BSC YBU	MRKAb 146	A15		Yenidoğan ünitesi
MRKAb13	A8	h1	Dahiliye YBU	MRKAb 22	B1		Yanık ünitesi
MRKAb156	A8	h1	BSC YBU	MRKAb 23	B1		Reanimasyon
MRKAb10	A9	a4	Yenidoğan Ünitesi	MRKAb 26	B3	f3	Reanimasyon
MRKAb130	A9	a4	İntaniye Kliniği	MRKAb 27	B3	f3	Dahiliye YBU
MRKAb131	A9	a4	Genel Cerrahi kliniği	MRKAb 20		c1	Çocuk YBU
MRKAb158	A9	a4	BSC YBU	MRKAb 21		c1	Çocuk cerrahisi kliniği
MRKAb132	A10		Dahiliye YBU				
MRKAb142	A10		Yenidoğan Ünitesi				

Test suşlarının klonal ilişkilerine göre dağılımında klinik materyalin alındığı servislerin önem arz edecek bir kümelenme göstermedikleri ancak Yenidoğan servisinden gönderilen örneklerden izole edilen 6 suşun PFGE ile A kümesi içerisinde A4 ve A15 kümelerinde % 100 ilişkili olarak yerleştikleri, A4 izolatlarının AFLP ile de % 100 ilişkili a1 kümesi içerisinde yer aldıkları görülmüştür.(Tablo-8)

PFGE ile elde edilen en büyük ilişki grubu olan “ A” kümesi içerisinde yer alan % 100 ilişkili “ A9” alt kümesine ait 4 suşun, AFLP ile elde edilen 4 üyeli “ a4” alt kümesi suşları ile, üç üyeli “ A4” alt kümesi suşlarının üç üyeli “ a1” altkümesi suşları ile, ikişer üyeli ‘ ‘ A6’ ’ ve ‘ ‘ A8’ ’ alt kümesinin suşları ile ‘ ‘ f1’ ’ ve ‘ ‘ h1’ ’ kümesinde yer alan suşlar ile aynı izolatlar oldukları görülmüş böylece PFGE yöntemi ile A kümesi içerisinde birbirleri ile % 100 ilişkili olup, 7 alt küme (A4,A6,A8,A9,A10,A14,A15) içerisinde toplanan 18 suşun 11 (%61.1)’ inin AFLP yöntemi ile 3 kümeye ait 4 altküme (A9-a4, A6-f1, A4-a1 ve A8-h1) içerisine dağıldıkları görülmüştür. Buna karşılık PFGE yöntemi ile A kümesi içerisinde 14 suşun tek üyeli 14 alt kümeye ayrıldıkları görülürken PFGE’ inde A küme ve alt kümeleri içerisinde yer alan suşların 21’ inin AFLP ile tek üyeli 21 alt kümeye dağıldıkları görülmüştür. Her iki yöntemle tek üyeli kümelere dağılan suş sayısı 14 dir. Böylece A kümesi suşların AFLP ile küme ve alt kümelere % 100 ilişki ve ilişkisizlik dağılımlarındaki tutarlılık oranının PFGE baz alındığında 25/32 (%78.1) olduğu görülmüştür.

Diğer taraftan genel olarak PFGE yöntemi ile suşların 22 sinin % 100 ilişkili 9 alt kümede toplandığı, bu sayının AFLP için 15 suş ve 6 altküme olduğu görülmüştür. Her iki yöntem ile % 100 ilişkili küme/alt kümelere dağılan aynı suş sayısı 13 olup PFGE baz alındığında AFLP’ nin % 100 ilişkili suşları küme/ alt küme içerisinde toplama oranının % 59 (13/22) olduğu görülmüştür (Tablo-9). Ancak yine genel dağılımda PFGE ile test suşlarının 27’ si tek üyeli küme/alt küme içerisine dğılırken AFLP ile tek üyeli küme/altküme içerisine dağılan suş sayısının 34 olduğu görülmüştür. (Tablo-10VF

Tablo 9. Test suşlarının her iki yöntemle % 100 ilişkili küme/alt kümelere dağılımı

PFGE			AFLP			PFGE			AFLP		
Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı
A	A4	100	a	a 1	100		A14	100			

	A4	100		a 1	100		A14	100			
	A4	100		a 1	100		A14	100			
A	A6	100	f	f1	100		A15	100			
	A6	100		f1	100		A15	100			
	A8	100	h	h1	100		B1	100			
	A8	100		h1	100		B1	100			
	A9	100	a	a4	100		B3	100	f	f3	100
	A9	100		a4	100		B3	100		f3	100
	A9	100		a4	100				c	c1	100
	A9	100		a4	100					c1	100
	A10	100									
	A10	100									

Genel olarak PFGE ve AFLP ile elde edilen küme (sırası ile 10 ve 9) ve alt küme sayıları (sırası ile 36 ve 40) birbirlerine benzerse de, kümelere dağılımın ilişki yönünden değerlendirilmesi halinde bu benzerliğin suşların ilişki dağılımını yansıtmadığı görülmüştür. Bu bağlamda PFGE' ile tek "A" kümesi içerisinde 21 alt küme içerisinde toplanan 32 suşun AFLP ile 8 küme içerisinde 28 alt küme içerisine dağıldıkları görülmüştür. Yani PFGE ile en az % 80 ilişkili bulunan bu suşlar kümeden kümeye değişmek üzere en az % 80' in altında ilişkili bulundukları görülür. Bu yöntemler arasında kabul edilebilir bir ayırım gücünden çok tutarsızlığı göstermektedir. Çünkü ' ' A ' ' kümesinin parçalayan AFLP kümelerinin ' ' a ' ' kümesinin 12 üyesinde ' ' A ' ' kümesinin 12 üyesinde yer alırken, ' ' e ' ' nin A, B, D, F ve H kümesinde, ' ' f ' ' nin ' ' B ' ' de, ' ' hh ' ' da B, G ve J kümesinde üyeleri olduğu görülmüştür. Sadece ' ' A ' ' kümesi ve bu kümenin AFLP karşılıkları dikkate alınırsa PFGE yönteminin ayırım gücünün A kümesi için %12.5 (1/8) olduğu görülür. Bu kadar düşük küme uyumu alt kümelerin uyumunun kıyasını da anlamsız hale getirir. Sadece "A" kümesi içerisinde üyesi bulunan 12 suştan oluşan "a" AFLP kümesinin PFGE "A" kümesi ile uyumunun % 37.2 olduğu görülür.

Tablo 10. Test suşlarının her iki yöntemle tek üyeli kümelere dağılımları

PFGE			AFLP			PFGE			AFLP		
Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı	Küme		İlişki oranı
A	A1			h2		D	D1			e2	
	A2			h3			D2			d2	
	A3			h4		E	E			g1	
	A5			a2			F1			h6	
	A7			f2		F	F2			h7	
	A11			a5			G			e4	
	A12			a6		H	H			f4	
	A13			a7			I1			b2	
	A16			i1		J	I2			b1	
	A17			i2			J			g2	
	A18			e3						e6	
	A19			a3						c3	
	A20			c2						e9	
	A21			e7						e10	
	B	B2		d1						h8	
B	B4			e8						e5	
	C	C1		e1						h5	

Her iki yöntem ile elde edilen küme ve alt kümeler arasında ayırım gücünün değerlendirilmesine katkı sağlayacak bazı ilişkiler dikkat çekici bulunmuştur. Bu bağlamda PFGE ile elde edilen B kümesinin B3 alt kümesi içerisinde yer alan ve kendi aralarında % 100 ilişkili 2 suşun, AFLP ile de f kümesi f3 alt kümesi içerisinde ve % 100 ilişkili bulunan suşlar oldukları görülmüştür. PFGE ile B3 alt kümesine en yakın ilişkili olan B2 (%86) alt kümesi suşunun, AFLP ile elde edilen f3 alt kümesi ile % 98 ilişki aynı suş (f4) olduğu görülmüştür. Yani B kümesi ve alt kümelerini oluşturan suşların sadece 3 (f3 f3 ve f4)' ünün AFLP ile ilişkili küme/altküme içerisinde

toplandıkları diğer 3 suşunda AFLP’ de ilişkisiz farklı kümelerle dağıldıkları görülerek bu küme için AFLP-PFGE uyumunun % 50 olduğu görülmüştür (Tablo 7).

Yine PFGE ile D kümesinin birbirleri ile % 83.9 ilişkili olan birer üyeli D1 ve D2 alt kümelerine ayrıldığı, bu alt kümelerde yer alan suşların, AFLP ile yapılan klonal ilişkilendirmede ilişki oranları % 63 olan ilişkisiz g2 ve e6 alt kümelerine dağıldıkları görülmüştür. Bu küme/alt küme sonuçları da istatistiki yönden anlam çıkartmaya yetecek sayıda suş olmamasına rağmen AFLP’ nin PFGE yöntemine göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir.

Oysa PFGE de F kümesi içerisinde yer alıp F1 ve F2 olmak üzere birer üyesi bulunan 2 alt küme elemanının ilişki oranı bu yöntem ile % 84.9 olarak bulunurken aynı iki suş AFLP ile yine birer üyeli e9 ve e10 kümeleri içerisine yerleştikleri ve bu yöntemle de benzerliklerini % 94, yani yakın ilişkili olarak tespit edildiği görüldü. Benzer şekilde PFGE ile %92 ilişkili bulunup “ I” kümesi içerisinde I1 ve I2 alt kümelerine yerleşen 2 suşun AFLP ile % 100 uyumlu olup c1 kümesi içerisine yerleştikleri görülmüştür. Diğer yandan AFLP de 2 altküme b kümesinde yer alan b1ve b2 suşları arasındaki ilişki % 92 olarak tespit edilirken bu iki suşun PFGE analizinde karşılıkları olan suşların C ve B kümeleri içerisinde yer alan % 76.8 benzerlik oranı ile ilişkisiz olarak belirlenen suşlar oldukları görüldü. Bu sonuçlar F1 ve F2 ile e9 ve e10 suşlarının, I1 ve I2 alt kümesi suşları ile c1 alt kümesi suşlarının ve nihayet b kümesi içerisinde yer alan b1 ve b2 alt kümesi suşları ile B4 alt kümesi ve C kümesi suşları arasındaki ilişki oranları her iki yöntem ile de birbirlerine yakın bulunmuş olsalar da matematiksel olarak bu kümelerin ilişkilerinin belirlenmesinde PFGE yönteminin ayırım gücünün daha yüksek olduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Hastane Enfeksiyonları, bir başka ifade ile Sağlık Hizmetleri ile ilişkili Enfeksiyonlar modern tıbbın önlenabilir en önemli handikabıdır. Özellikle kompleks invaziv işlemlerin yapıldığı büyük hastanelerde işlem yoğunluğu, kontrolsüz antibiyotik ve dezenfektan kullanımı, personelin iş yoğunluğundan kaynaklanan özensizliği bu tür enfeksiyonların prevalansını % 17-20 lere kadar çıkartmaktadır^{21,22,23}. Yüksek morbidite

ile seyreden SHİİ' lar yaratıkları maddi kayıpların dışında sağlık hizmeti veren kurum ve kuruluşlara güveninde erozyona uğramasına yol açmaktadır. Bu sebeple SHİİ' lar sağlık kurumlarının global problemidir.

SHİİ infeksiyonların kontrolüne yönelik hedefler bu infeksiyonların prevalansını düşürmek ve kontrol altında tutmaktan infeksiyonsuz hastaneler ve sağlık hizmeti yaratmaya odaklanmıştır. Bu hedef farkındalık yaratacak ödül ve cezalandırmaya dayalı eğitim, akılcı antibiyotik kullanımı ve sağlıklı Mikrobiyolojik analiz ve sürveyans ile sağlanacaktır. Son yıllarda SHİİ' ların sürveyansında klonal düzeyde ilişkinin belirlendiği moleküler bazlı yöntemler yoğun olarak kullanılmış ve bu yöntemlerin ayırım güçlerinin artırılarak salgın suşları ile münferit hasta suşlarının kesin olarak ayırımını yapabilecek metodların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, Ribotipleme, DRGT, PFGE, MLST gibi amplifikasyon bazlı olmayan yöntemlerin yanı sıra MLVA, AP-PCR, PCR-RFLP, REP-PCR, ERIC-PCR, M13-PCR ve AFLP gibi amplifikasyon bazlı yöntemler denenmiştir¹⁰. Bu yöntemler arasında yüksek ayırım gücü ve laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası yüksek tekrarlanabilirlik oranı sebebi ile PFGE yöntemi birçok önemli bakteriyel infeksiyonda genom düzeyinde ilişkinin tespitinde başarı ile kullanılmıştır^{10,15,56}. Yöntem standardize edilmiş değerlendirme kriterleri sayesinde genotipleme de taksonomik amaçla da kullanılabilir hale gelmiştir¹³².

PFGE yöntemi *A.baumannii* infeksiyonlarının tiplendirilmesi ve izlenmesinde de başarılı bulunmuştur. Seifert ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları bir çalışmada 9 hastaneden izole edilen 103 *A.baumannii* salgın suşunu epidemiyolojik olarak Plasmid profile analizi, Antibiyotik duyarlılığı, Biyotipleme ve PFGE ile değerlendirmişlerdir. PFGE yöntemi ile suşların 8 farklı kümeye dağıldıklarını, buna karşılık biyotipleme ile 4, antibiyotik direnç fenotipi ile 5 ve plazmid profili analizi ile de 6 farklı küme elde ettiklerini bildirmişler, salgın tanımlamasında PFGE yönteminin diğer yöntemlere göre ayırım gücünün oldukça yüksek olduğunu, yöntemin salgınlarda tekrarlanabilirliği ve kolay yorumlanabilirliği ile oldukça yararlı olduğunu iddia etmişlerdir¹²⁹.

PFGE yöntemi farklı çalışmalarda *A baumannii* sürveyansında çeşitli alternatif yöntemlerle birlikte denenmiştir. Bu bağlamda direnç kalıplarına ve mekanizmalarına göre izolatları identifiye eden DRGT veya antibiyotipleme ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, bu yöntemlerin kolay, daha ucuz ve tekrarlanabilir sonuçlar üretmesine

karşılık antibiyotik direncinde yaşanan hızlı değişiklikler uzun soluklu sürveyans çalışmalarında bu yöntemlerin duyarlılığını düşürmüştür. Diğer taraftan mikroorganizmaların tiplendirilmesinde kullanılan yüksek ayırım gücüne sahip bir yöntem olan MLST' nin klinik olarak önemli bakteriyel patojenlerin epidemiyolojik karakterizasyonunu belirlemede de oldukça başarılı olduğu, yöntemin elektronik bir platformda veri değişikliğine imkan vermesi, nükleotid sekans verilerinin kullanılabilir ve tekrarlanabilir olması gibi avantajlarına karşılık, çok maliyetli oluşu ve çok az sayıda örnekle çalışılmış olması PFGE karşısındaki en önemli dezavantajlarıdır¹²⁴. Ribotipleme yöntemi de PFGE ile kıyaslanmış, ancak, PFGE tüm genomu irdeliyor olmasına karşılık bu yöntemin sadece rRNA operonu çerçevesindeki değişkenlikleri baz alıyor olmasının ayırım gücünü düşürdüğü söylenmiştir.¹⁵⁶

PFGE yöntemi son yıllarda birçok mikroorganizmanın sürveyansında AFLP ile de kıyaslanmıştır. Enterokoklar ile yapılan çalışmalarda, PFGE yönteminin AFLP' ye göre daha fazla sayıda küme oluşturmaya karşılık alt küme dağılımlarının sayısal olarak benzerliğine vurgu yapılmış, ancak PFGE' nin bu mikroorganizmalar için hala altın standart olduğu belirtilmiştir. A.baumannii sürveyansında da her iki yöntemin kıyaslandığı sınırlı sayıda da olsa çalışma mevcuttur. Bartual ve arkadaşları 1990-2001 yılları arasında klinik örneklerden topladıkları 40 *A. baumannii* salgın suşunu MLST,PFGE ve AFLP yöntemlerini kullanarak değerlendirdikleri çalışmada, PFGE ile elde dendogram kümeleri ile MLST dendogram kümelerinin yüksek oranda uyumlu olduklarını, PFGE ile 13 küme elde ettiklerini buna karşılık AFLP küme sayısının 10 olduğunu, MLST' nin ayırım gücünün PFGE ye göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir¹²⁴.

Villalon ve arkadaşları da, İspanya da 19 hastaneden topladıkları 729 *A. baumannii* salgın suşu PFGE ve MLST yöntemleri ile ilişkilendirdikleri çalışmalarında PFGE' nin izolatlar 58 küme içerisinde topladığını, salgın ilişkili suşların izlenmesi ve kümelenmesi, hastaneler arası geçişin belirlenmesi ve uzun soluklu sürveyans için bu yöntemin MLST' den daha başarılı olduğunu söylemişlerdir¹²⁷.

Helke van D. ve arkadaşları Hollanda da Avrupa' da farklı bölgelerdeki hastaneler ile bir G. Afrika hastanesinden izole edilmiş ÇİD *A. baumannii* salgın suşlarını Ribotipleme, PFGE ve AFLP yöntemlerinin kullanarak tiplendirmişler, PFGE ile izolatların 20 küme içerisinde dağıldıklarını oysa AFLP ile elde edilen küme

sayısının 14 olduğunu tespit etmişler ve her iki yöntemin birlikte kullanılması halinde test suşlarının daha küçük kümelere ayrılarak süreyansın ayırım gücünün yükseltilebileceğine vurgu yapmışlardır¹⁵⁶.

Jin Hui ve arkadaşları' m Çin Halk Cumhuriyeti Ningbo şehrinde 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında 27 *Acinetobacter* suşunu antibiyotik duyarlılığı yönünden incelemişler, ayrıca PFGE, AFLP ve Drug Resistance Gene Based Genotyping (DRGT) yöntemi ile suşlar arasındaki genotipik ilişkiyi sorgulamışlardır. Genotiplendirmede referans yöntem olarak PFGE kullanan araştırmacılar DRGT' nin tiplene uyum oranını %88.9, AFLP nin tiplene uyum oranını ise %77.8 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre DRGT' nin PFGE ile karşılaştırılabilir, AFLP' den ise daha iyi olduğuna vurgu yapılmış, AFLP' nin suşlar arasında ilaç resistant ayırımında da zayıf kaldığı belirtilmiştir¹⁵⁴.

D' Agata ve ark.' ım 2001 yılında ABD' de yapıldığı bir çalışmada 17 *A.baumannii* izolatının AFLP ve PFGE yöntemleri ile genotiplenmeleri yapılmış ve AFLP sonuçlarının PFGE ile karşılaştırılabilir olduğu ve her iki yöntemle de ilişkili ve ilişkisiz izolatların ayrılabilceği sonucuna varmışlardır¹⁵⁷.

Nemec ve ark. 2008 yılında, Çek Cumhuriyeti' ndeki 12 şehirde bulunan 20 hastaneden izole edilen 150 *Acinetobacter* izolatını AFLP, PFGE ve MLST yöntemleriyle incelemiştir. Ayrıca 14 antimikrobiyal için duyarlılık testleri yapılmış ve antimikrobiyal direnç ile ilişkili 20 genin varlığını araştırılmıştır. 150 *Acinetobacter* izolatının 108' i *A.baumannii* olarak tanımlanmış ve bunların 66' ı EU Klon II , 5' i EU Klon I içinde yer alırken diğerleri ise unique /bağımsız izolatlar olduğu tespit edilmiştir. EU Klon II içerisinde yer alan izolatların üçte ikisinin AFLP ve PFGE paternleri benzer bulunmuştur¹⁵⁵.

Portekiz' de DaSilva ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise, 1998-2004 yılları arasında sekiz hastanedeki 10 salgında izole edilen *A.calcoaceticus-A.baumannii kompleks*' e ait toplam 264 izolat, AFLP, RAPD ve PFGE yöntemleri ile genotipik ilişkiler yönünden irdelenirken, suşlar PCR yöntemi ile blaOxa genlerinin varlığı yönünden de incelenmiştir. PFGE yöntemi ile bütün Portekiz izolatlarında üç banttı fazla farklılık bulunamamış ve M13 RAPD ve PFGE teknikleri birbiriyle uyumlu sonuçlar verdiği AFLP ve PFGE profilleri karşılaştırıldığında ise %84 benzerlik

gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçların da Portekiz hastanelerinde EU Klon II içinde yer alan bir klonun persistans gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır¹³⁴.

ARDRA, RAPD ve AFLP yöntemlerinin ayırım ve tiplendirme gücünü karşılaştırmak amacı 18' i *Acinetobacter genomic tür 3*, 13' ü de *A.baumannii* klinik izolatu olmak üzere toplam 31 suşu tiplendiren Johannes ve arkadaşları 5 farklı enzim kullanılarak uyguladıkları ARDRA yönteminin, *Asinetobakterlerin* tür ve suş düzeyinde ayırım gücünün düşük olduğu görülmüşler, RAPD analizi ile genomik türler ayırt edilebilirken *A.baumannii* izolatları arasında önemli polimorfizmler gördüklerini ancak AFLP ile hem 18 genomik türü hemde 13 klinik izolatların suş ve tür düzeyinde ayırımını mükemmel bir şekilde yapılabildiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak da AFLP yöntemi diğerleriyle kıyaslandığında hem hastane infeksiyonlarının epidemiyolojik çalışmalarında hemde salgın durumlarında en uygun sürveyans yöntemi olduğunu iddia etmişlerdir¹²⁵.

Biz çalışmamızda farklı klinik materyallerden izole edilmiş ve random saçılmış Karbepenem dirençli *A baumannii* suşlarının klonal ilişkilerinin yani genotipik benzerliklerinin tespitinde PFGE ile AFLP nin ayırım güçlerini kıyasladık. PFGE yöntemi bir çok merkezde olduğu gibi laboratuvarlarımızda da gerek *A.baumannii* gerekse *Enterokoklar* ve *Stafilokoklar* gibi bir çok önemli hastane infeksiyonu veya SHİİ salgınlarından sorumlu mikroorganizmanın gen düzeyinde tanımlanması ve sürveyansında başarı ile kullanılmıştır. Ancak bir çok mikroorganizma için referans sürveyans yöntemi olarak gösterilen *A baumannii* izolatları içinde kabul edilmiş Avrupa klonlarının oluşturulmasında referans yöntem olan AFLP laboratuvarımızda daha önce denenmemiştir. Bu çalışmada PFGE yönteminin baz alınmasının sebebi budur. Ancak literatürde de görüleceği gibi çalışmaların çoğunda bu yöntem tüm yöntemlerin ayırım güçlerinin tespitinde altın standart yöntem olarak refere edilir.

Biz Karbepenem dirençli test suşlarımızın PFGE yöntemi ile en büyüğü 32 üyeli A kümesi olmak üzere 10 küme 36 alt kümeye dağıldıklarını gördük (şekil 10, tablo 5) Suşların %65' ini oluşturan A kümesi kendi içerisinde 21 alt kümeden oluşmuştur. Buna karşılık AFLP ile aynı suşların en büyüğü 12 üyeli “ a” kümesi olmak üzere toplam 9 küme ve 40 alt kümeye dağıldıklarını gördük (Şekil 12, Tablo 6). AFLP' nin en büyük kümesi test suşlarının % 24.4' ünü içeriyor ve 7 alt kümeden oluşuyordu. Genel olarak PFGE yönteminin literatürde de Helke van D ve DaSilva ve arkadaşlarının belirttiği gibi

bizim sonuçlarımıza göre de AFLP den daha fazla sayıda küme oluşturduğunu gördük. Diğer taraftan PFGE yönteminin test suşlarını 36 alt küme içerisine dağıtmasına karşın AFLP nin test suşlarını daha az sayıda üyesi olan 40 alt küme içerisine dağıttığı görüldü. Bu sonuçlar Helke vanD' nin PFGE yöntemi salgın analizi ve salgın suşları arasındaki ilişkiyi tespitinde çok başarılı ancak salgın epidemiyolojisinde çok anlamlı olmayan suşlar arasındaki monovalan ayırmalar konusunda daha yetersiz iddiasını destekler mahiyettedir. PFGE ile salgın suşları bir küme ve alt kümeleri içinde yoğunlaşırken, ki burada ilişkinin belirlenmesinde 4 band farklılığı dikkate alınır, AFLP ile çok daha detaylı bir dağılım elde edilmiştir. Nitekim Çocuk Yoğun Bakım servisinin 6 izolatu A kümesi içerisinde yer alırken, bu suşlardan sadece 2'si 'A' kümesi içerisindeki alt küme dağılımı ile birebir uyumlu şekilde AFLP 'a' kümesi içerisinde yer almış, diğer 4 suş farklı küme ve alt kümelere dağılmıştır.

Yöntemlerin ayırım güçlerini karşılaştırırken % 100 ilişkili ve diğer kümeler ile ilişkisiz suşların sayısının kriter olarak kullanılabileceği varsayımından hareket edilirse, PFGE baz alındığında, ki PFGE ile 'A' kümesi içerisindeki 18 suşun AFLP 'a' kümesi içerisinde 11'i % 100 ilişkili alt kümelere yer almışlardır. Yani %100 ilişkili suş sayısı dikkate alındığında en büyük A kümesinde iki yöntem arasındaki uyumun % 61,1 olduğu, tüm kümelere ise bu oranın %59 olduğu görülmüştür. Bu oranlar birbirleri ile uyumsuz yani tek üyeli küme veya altkümelere dağılan suşlarında hesaplama dahil edilmesi ile, sırası ile %78.1 ve %81.6' ya çıkmaktadır. Bu son rakam yani tüm kümeler dikkate alınarak elde edilen PFGE-AFLP benzerlik oranı ilavesi ile % 100 ilişkili suşların iki yöntemle de aynı küme veya alt kümeler içerisinde yerleştirilme yüzdeleri dikkate alındığında da elde ettiğimiz %81.6 lik oranımız Jin Hui ve arkadaşları'nın %77.8' lik oranından biraz yüksek Da Silva ve arkadaşlarının % 84' lük bulgularından da çok az düşüktür. AFLP' nin daha kompleks bir yöntem olması, PFGE yönteminin prokaryotlar için total DNA eldesi için son derece uygun oluşu gibi sebeplerden dolayı literatürde de bu iki yöntemin *A baumannii* sürveyansında birlikte kullanıldığı veya karşılaştırıldığı fazla çalışma bulunmamaktadır.

Kanaatimizce PFGE yöntemi *A baumannii* long-term ve short-term sürveyans çalışmalarında hala altın standart olarak kullanılmaya devam edecektir. AFLP yönteminin ise özellikle klonal kümeler içerisindeki suşların daha detaylı genotiplemesinde PFGE yöntemine yardımcı bir yöntem olarak kullanılması uygun

olacaktır. Bu çalışma ile laboratuvarımızda uygulanabilirliği sağlanan AFLP' nin PFGE' nin yetersiz kalığı alt kúme çalışmalarında sadece *A baumannii* için değil fakat bütün problemli bakteriler için kullanılmaya devam edilmesi gereklidir.

6. SONUÇLAR

AFLP yönteminin hastane infeksiyonlarına sebep olan bakterilerin sürveyansında kullanılabilirliğinin PFGE yöntemi baz alınarak ve 49 Karbepenem dirençli *A baumannii* suşu kullanılarak irdelendiği bu çalışmada;

- a. AFLP yönteminin küme bazında ayırım gücünün PFGE yönteminden daha düşük
- b. Enfeksiyon sürveyansındaki önemi bilinmemekle beraber suşları monoklonal düzeyde yani bağımsız altküme oluşturma yeteneklerine göre dağıtmada AFLP' nin daha duyanı olduğu
- c. Uzun ve kısa soluklu salgın sürveyansında PFGE sonuçlarının yeterli olmasına karşılık AFLP' nin *A.baumannii* için destek amaçlı kullanılabileceği
- d. AFLP yönteminin epidemiyolojik amaçlı laboratuvarlarda mutlaka kurulup, geliştirilerek sürdürülmesinin faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- **Paterson DL, Lipman J.** Returning to the pre-antibiotic era in the critically ill: the XDR problem. *Crit.Care.Med.* **2007**; 35:1789– 1791.
- 2- **Bonomo RA.** Multiple antibiotic-resistant bacteria in long-term-care facilities: an emerging problem in the practice of infectious diseases. *Clin.Infect.Dis.* **2000**; 31:1414– 1422.
- 3- **Didier Pittet** Infection control and quality health care in the new millenium
- 4- **Pittet D.** The Lowbury lecture: behaviour in infection control. *J.Hosp. Infect.* **2004**; 58:1-13.
- 5- **Gaynes R, Richards C, Edwards J, Emori TG, Horan T, Alonso-Echanove J, Fridkin S, Lawton R, Peavy G, Tolson J,** and the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system.
- 6- **Şener K.** Hastane infeksiyonlarının kontrolünde Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü Bölüm 1.8 S.199-104(<http://www.gata.edu.tr/kitap/1-bolum/8-MİKROBİYOLOJİ-LABORATUVAR-son-D.pdf>) 2008hospitals. Feeding back surveillance data to prevent hospital acquired infections. *Emerg Infect Dis* **2001**; 7:295-298.
- 7- **Wilks M, Wilson A, Warwick S,** et al. Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*—calcoaceticus colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation. *Infect Control Hospt Epidemiol.* **2006**; 27:654– 658.
- 8- **Spelman DW.** Hospital-acquired infections. *MJA Practice Essentials.* **2002**;176:286-291.
- 9- **Danielle MZ, Garrison MM, Allpress AL, Heath J, Christakis DA.** Infection Control Policies and Hospital-Associated Infections Among Surgical Patients: Variability and Associations in a Multicenter Pediatric Setting. *Pediatrics.* **2005**; 115: 387-397.
- 10- **Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ.** Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**; 19: 512-530.
- 11- **Harbarth S.** What can we learn from each other in infection control? Experience in Europe compared with the USA Lowbury lecture **2012**.
- 12- **Anton Y. Peleg, M.B. B.S., M.P.H. and David C. Hooper, M.D.** Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria Division of Infectious Diseases, Massachusetts General Hospital, the Division of Infectious Disease, Beth Israel Deaconess Medical Center , and Harvard Medical School — all in Boston; and the Department of Infectious Diseases, Alfred Hospital both in Melbourne, Australia. **2008**.
- 13- **Vincent JL** Nosocomial infections in adult intensive care units. *Lancet.* **2003**; 61:2068-2077.
- 14- **Şener K.** Hastane infeksiyonlarının kontrolünde Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü Bölüm 1.8 S.199-104 (Erişim :<http://www.gata.edu.tr/kitap/1-bolum/8-MİKROBİYOLOJİ-LABORATUVAR-son-D.pdf>). **2008**.
- 15- **Anton Y. Peleg,1* Harald Seifert, 2 and David L. Paterson.** *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol. Rev,* **2008**; 538– 582.

- 16- **Dijkshoorn, L. Aucken, H, Gerner-Smidt, P, Janssen, P, Kaufmann, M.E. Garaizar, J, Ursing, J. and Pitt, T.L.** Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* **1996**; 34: 1519– 1525.
- 17- **Victor D. Rosenthal, Dennis G. Maki, and Nicholas Graves, MA,** The International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC): Goals and objectives, description of surveillance methods, and operational activities. *Am J Infect Control.* **2008**; 36(9):1-12.
- 18- **Harris JS.** Unique Aspect of Infection Control in the NICU and PICU (Erişim :<http://www.shea-online.org/Assets/files/Harris-Monday.pdf>).
- 19- **Lawrence C.** Book Review: Medicine and Victory: British military medicine in the second World War medical history. **2005**; 49(3):372-373.
- 20- **Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM.** CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control.* **1988**; 16: 128-40.
- 21- **Horan TC, Gaynes RP.** Surveillance of nosocomial infections. In: Mayhall CG, editor. Hospital epidemiology and infection control. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; **2004**; 1659-702.
- 22- **Larson E, Horan T,Coopers B, Kotilainen HR, Landry S, Terry B** Study of the definition of nosocomial infections (SDNI). *Am J Infect Control* **1991**; 19:259-267.
- 23- **Howard D, Cordell R, McGowan JE Jr, Packard RM, Scott RD, Solomon SL .** Measuring the economic costs of antimicrobial resistance in hospital settings: summary of the Centers for Disease Control and Prevention- Emory Workshop. *Clin Infect Dis.* **2001**; 33:1573-8.
- 24- **Jarvis WR.** Infection control and changing health-care delivery systems. *Emerg Infect Dis.* **2001**; 7:170-3.
- 25- **E. Szilá'gyi , K. Bo'ro'cz , P. Gastmeier , A. Kurcz a, E. Horva'th-Puho'** National nosocomial surveillance network in Hungary: results of two years of surgical site infection surveillance. *Journal of Hospital Infection.* **2009**; 71: 74-80
- 26- **Blot S.** Limiting the attributable mortality of nosocomial infection and multidrug resistance in intensive care units. *Clin Microbiol Infect.* **2008**; 14 (1):5-13.
- 27- **Dudeck MA, Horan TC, Peterson KD, Allen-Bridson K, Morrell G, Pollock DA, .** National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2010, device-associated module. *Am J Infect Control.* **2011**; 39:798– 816.
- 28- **Anton Y, Peleg, M.B, B.S. M.P.H. ve David C. Hooper** Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negati ve Bacteria. *Engl J Med.* **2010**; 362(19): 1804– 1813.
- 29- **Hidron AI, Edwards JR, Patel J.** NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006– 2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2008**; 29:996– 1011.
- 30- **Rosenthal VD, Guzman S, Crnich C.** Impact of an infection control program on rates of ventilator-associated pneumonia in intensive care units in 2 Argentinean hospitals. *Am J Infect Control.* **2006**; 34:58-63.
- 31- **Fagon J.Y.J. Chastre A.J. Hance P. Montravers A. Novara and Gibert C.** Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am. J. Med.* **1993**; 94:281-288.

- 32- **Paterson DL, Lipman J.** Returning to the pre-antibiotic era in the critically ill: the XDR problem. *Crit Care Med.* **2007**; 35:1789– 1791.
- 33- **Güner R, Hasanoglu I, Keske S, Kalem AK, Tasyaran MA.** Outcomes in patients infected with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and treated with tigecycline alone or in combination therapy. *Infection.* **2011**; 39:515– 518.
- 34- **Güner R.** Kateter ilişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonlarından korunmada Paket Önlemler. *ANKEM Derg.* **2011**; 25(Ek 2):25-27.
- 35- **Souli M, Galani I, Giamarellou H.** Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* **2008**; 13(47):19045.
- 36- **Gaynes R, Edwards JR.** Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* **2005**; 41:848– 854.
- 37- **Rubin RH.** Surgical wound infection: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management. *BMC Infectious Disease*, **2006**; 6-17.
- 38- **D.Leaper J.Tanner, M.Kiernan.** Surveillance of surgical site infection: more accurate definitions and intensive recording needed *Journal of Hospital Infection* 83 201383-86.
- 39- **Alicia I. Hidron; Jonathan R. Edwards; Jean Patel; Teresa C. Horan, MPH; Dawn M. Siever; Daniel A. Polloc; Scott K. Fridkin;** Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections. *Infection control and hospital epidemiology.* November **2008**; 29: 11.
- 40- **Jarvis WR.** The Lowbury Lecture. The United States approach to strategies in the battle against healthcare-associated infections, transitioning from benchmarking to zero tolerance and clinician accountability. *J Hosp Infect.* **2007**; 65(2):3– 9.
- 41- **Rodriguez-Bano J, Garcia L, Ramirez E, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Fernandez-Cuenca F,** Long-term control of hospital-wide, endemic multidrug-resistant *acinetobacter baumannii* through a comprehensive “ bundle” approach *Am J Infect Control.* **2009**; 37:715-22.
- 42- **Jean Carlet, Jacques Fabry, René Amalberti, Laurent Degos** The “ Zero Risk” Concept for Hospital-Acquired Infections: A Risky Business *Clinical Infectious Diseases* **2009**; 49:747– 9
- 43- **Pronovost P, Needham D, Berenholtz S. et al.** An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU. *N Engl J Med.* **2006**; 355(26): 2725-32.
- 44- **Ted Pincock RN, Paul Bernstein RN, Shawn Warthman Elizabeth Holst** Bundling hand hygiene interventions and measurement to decrease health Care- associated infections. *Am J Infect Control.* **2012**; 40:18-20.
- 45- **WHO guidelines on Hand Hygiene in Health care (Advanced Draft):A Summary** Erişim:<http://who.int/patientsafety/events/05/HH-en.pdf> **2008**; 6-17.
- 46- **Lenie Dijkshoorn and Alexandr Nemec.** The diversity of the genus *acinetobacter*. *Acinetobacter Molecular Biology.* **2008**; Chaister Academic Press.1-35.
- 47- **Towner K.J.** Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp Review *J.Med Microbiol.* **1997**; 46:721-746.
- 48- **Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML.** An underestimated nosocomial pathogen, *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother.* **1985**; 16(5):535– 538.

- 49- **Acinetobacter.**In:Towner KJ, Bergogne –Berezin E,Fewson CA. The biology of Acinetobacter:taxonomy, clinical importance, molecular biology, physiology, industrial relevance. New York, *Plenum*. **1991**: 83-115.
- 50- **Fournier PE, Richet H.** The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*. **2006**; 42:692– 9.
- 51- **Berlau J.H, Aucken H, Malnick, and T. Pitt.** Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J.Clin. Microbiol.Infect.Dis*. **1999**; 18:179– 183.
- 52- **Seifert, H. L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg, and M. Vaneechoutte.** Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J.Clin.Microbiol*. **1997**; 35:2819– 2825.
- 53- **Rossau, R,A. van Landschoot., M. Gillis, and J. de Ley.** Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int.J.Syst.Bacteriol*. **1991**; 41:310– 319.
- 54- **Bouvet, P.J. and P.A. Grimont.** Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **1986**; 36:228– 240.
- 55- **Mario Vaneechoute,Lenie Dijkshoorn,Alexandr Nemec,Peter Kampfer,and Georges Wauters** *Acinetobacter*,*Chryseobacterium*,*Moraxella*,and Other Nonfermentative Gram – Negative Rods. *Manual of clinical microbiology*. **2011**; p.714-738
- 56- **Dijkshoorn, L., and A. Nemec.** The diversity of the genus *Acinetobacter*, In U. Gerischer (ed.), *Acinetobacter Molecular Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.**2008**; 1-34.
- 57- **G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J.T. Staley** *Bergey’ s Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2. Springer-Verlag, New York, NY. **2005**.
- 58- **Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM.** Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 2881– 7
- 59- **Eleonora Fregolino , Valentina Gargiulo , Rosa Lanzetta , Michelangelo Parrilli , Otto Holst , Cristina De Castro** Identification and structural determination of the capsular polysaccharides from two *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, MG1 and SMAL. *Carbohydrate Research*. **2011**; 346: 973– 977.
- 60- **Leann L. MacLean, Malcolm B. Perry, Wangxue Chen, Evgeny Vinogradov** The structure of the polysaccharide O-chain of the LPS from *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 17961 *Carbohydrate Research* 344 (2009) 474– 478.
- 61- **Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins,** Efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* . **2007**; 59:1210-1215.
- 62- **Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, et al.** Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*;the role of AdeABC (RND family) efflux pumpin resistance to antibiotics. *Folia Histochemicaet Cytobiologica* **2008**; 46:257-267.
- 63- **Jin Yeol Park, Shukho Kim, Sung-Min Kim, Sun Ho Cha, Si-Kyu Lim ve Jungmin Kim.** Complete Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain 1656-2, Which Forms Sturdy Biofilm. *J Bacteriol*. **2011**; 193(22): 6393– 6394.

- 64- **Fournier PE, Vallenet D, Barbe V.** Comparative genomic analysis of multidrug resistance in *A.baumannii* . *PLoS Genet.* **2006**; 2-7.
- 65- **Remy A. Bonnin, Laurent Poirel AND Patrice Nordmann.** AbaR-type transposon structures in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**; 413.
- 66- **Gülşah Aşık.** *Acinetobacter baumannii* Virülansının Açıklanmasında Güncel Yaklaşımlar. *Mikrobiyol Bul.* **2011**; 45(2): 371-380.
- 67- **Knapp, S. C.W. Wieland, S. Florquin, R. Pantophlet, L. Dijkshoorn, N. Tshimbalanga, S. Akira, and T. van der Poll.** Differential roles of CD14 and Toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. *Am.J.Respir.Crit. Care Med.* **2006**; 173:122– 129.
- 68- **Erridge, C. O. L. Moncayo-Nieto, R. Morgan, M. Young, and I. R. Poxton.** *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J. Med. Microbiol.* **2007**; 56: 165– 171.
- 69- **Smith, A.W, and K.E.Alpar.** Immune response to *Acinetobacter calcoaceticus* infection in man. *J. Med. Microbiol.* **1991**; 34:83– 88.
- 70- **Choi, C. H., E. Y. Lee, Y. C. Lee, T. I. Park, H. J. Kim, S. H. Hyun, S. A. Kim, S. K. Lee, and J. C. Lee.** Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **2005**; 7:1127– 1138,
- 71- **Tomaras, A. P., C. W. Dorsey, R. E. Edelman, and L. A. Actis.** Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacterbaumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology.* **2003**; 149:3473– 3484.
- 72- **Lee, J. C., H. Koerten, P. van den Broek, H. Beekhuizen, R. Wolterbeek, M. van den Barselaar, T. van der Reijden, J. van der Meer, J. van de Gevel, and L. Dijkshoorn.** Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res. Microbiol.* **2006**; 157:360– 366.
- 73- **Gonzalez, R. H., A. Nusblat, and B. C. Nudel.** Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol.Res.* **2001**; 155:271– 277.
- 74- **Dorsey, C. W., M. S. Beglin, and L. A. Actis.** Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2003**; 41:4188– 4193.
- 75- **Dorsey, C.W. A. P. Tomaras, P. L. Connerly, M. E. Tolmasky, J. H. Crosa, and L. A. Actis.** The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology.* **2004**; 150:3657– 3667
- 76- **Smith, M. G., T. A. Gianoulis, S. Pukatzki, J. J. Mekalanos, L. N. Ornston, M. Gerstein, and M. Snyder.** New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.* **2007**; 21:601– 614.
- 77- **Fournier, P. E., D. Vallenet, V. Barbe, S. Audic, H. Ogata, L. Poirel, H. Richet, C. Robert, S. Mangenot, C. Abergel, P. Nordmann, J. Weissenbach, D. Raoult, and J. M. Claverie.** Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* **2006**; 2: 7.
- 78- **Playford EG, Craig JC, Iredell JR.** Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J Hosp Infect.* **2007**; 65:204– 211.

- 79- **Zanetti G, Blanc DS, Federli I, et al.** Importation of *Acinetobacter baumannii* into a burn unit: a recurrent outbreak of infection associated with widespread environmental contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2007**; 28:723-735.
- 80- **Seifert, H., R. Baginski, A. Schulze, and G. Pulverer.** The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl. Bakteri.* **1993**; 79:544– 552.
- 81- **Berlau, J. H. Aucken, H. Malnick, and T. Pitt.** Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1999**; 18:179– 183.
- 82- **Dijkshoorn, L. E. van Aken, L. Shunburne, T. J. van der Reijden, A. T. Bernards, A. Nemec, and K. J. Towner.** Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* **2005**; 11:329– 332.
- 83- **Seifert, H., L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg, and M. Vaneechoutte.** Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* **1997**; 35:2819– 2825.
- 84- **Bernards, A.T., Harinck, H.I., Dijkshoorn, L., Van Der Reijden, T.J., and van den Broek, P.J.** Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2004**; 25: 1002– 1004.
- 85- **Bernards AT, Harinck HI, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, van den Broek PJ.** Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2004**; 25:1002– 4.
- 86- **Maragakis LL, Cosgrove SE, Song X, et al.** An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. *JAMA* **2004**; 292:3006– 11.
- 87- **Villegas MV, Hartstein AI.** *Acinetobacter* outbreaks, 1977– 2000 *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2003**; 24:284– 95.
- 88- **Javad A., Seifert H., Snelling A.M., Heritage J., Hawkwy P.M.** Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **1998**; 36: 1938-194.
- 89- **Levy and E. Rubinstein.** *Acinetobacter* – What’ on a Ghanaian’ s Mnd-infectious disease unit, Chaim Sheba Medical Center, Ramat Gan. Tel-hashomer, Israel. **1996**.
- 90- **Sunenshine RH, Wright MO, Maragakis LL, et al.** Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13:97– 103.
- 91- **Anstey, N. M., B. J. Currie, M. Hassell, D. Palmer, B. Dwyer, and H. Seifert.** Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; 40:685– 686.
- 92- **Leung, W. S., C. M. Chu, K. Y. Tsang, F. H. Lo, K. F. Lo, and P. L. Ho.** Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest.* **2006**; 129:102– 109.
- 93- **Garnacho-Montero, J., C. Ortiz-Leyba, E. Fernandez-Hinojosa, T. Aldabo-Pallas, A. Cayuela, J. A. Marquez-Vacaro, A. Garcia-Curiel, and F. J. Jimenez-Jimenez.** *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med.* **2005**; 31:649– 655.

- 94- **Fagon JY, Chaster J, Domant Y.** Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis* **1989**; 139:877-884
- 95- **Anstey, N. M., B. J. Currie, M. Hassell, D. Palmer, B. Dwyer, and H. Seifert.** Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; 40:685– 686.
- 96- **Leung, W. S., C. M. Chu, K. Y. Tsang, F. H. Lo, K. F. Lo, and P. L. Ho.** 2006. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest* **129**:102– 109.
- 97- **Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **2004**; 39:309– 317.
- 98- **Towner JK.** Clinical Importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *Med. Microbiol.* **1997**; 46:721-746.
- 99- **Metan, G. E. Alp, B. Aygen, and B. Sumerkan.** *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**; 60:197– 199.
- 100- **Metan, G. E. Alp, B. Aygen, and B. Sumerkan.** Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2007**; 29:112– 113.
- 101- **Grotiuz, G., A. Sirok, P. Gadea, G. Varela, and F. Schelotto.** Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **2006**; 44:3838– 3841.
- 102- **Menon, T., S. Shanmugasundaram, B. Nandhakumar, K. Nalina, and Balasubramaniam.** Infective endocarditis due to *Acinetobacter baumannii* complex—a case report. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **2006**; 49:576– 578.
- 103- **Corrigan, K. M., N. Y. Harmis, and M. D. Willcox.** Association of *Acinetobacter* species with contact lens-induced adverse responses. *Cornea* **2001**; 20:463– 466.
- 104- **Kerri A .Thom, J Kristie ,Mary S.Lee, Antony D. Harris** *Am infect control* **2011**; 39(9): 711-7715.
- 105- **Bouvet, P.J, and P. A. Grimont.** Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1986**; 36:228– 240.
- 106- **Bouvet, P. J., and P. A. Grimont.** Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **1987**; 138:569– 578.
- 107- **L.Dijkshoorn, H.Aucken, P.Gerner-Smidt, P.Janssen, M.E. Kaufmann, J.Garaizar, J.Ursing and T.L. Pitt.** Comparison of outbreak and non-outbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clin Microbiol.* **1996**; 1519-1525.
- 108- **Bernards, A. T, J. van der Toorn, C. P. A. van Boven, and L. Dijkshoorn.** Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **1996**; 15:303– 308.

- 109- **Bernards, A. T, L. Dijkshoorn, J. Van der Toorn, B. R. Bochner, and C. P. Van Boven.** 1995. Phenotypic characterisation of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridisation groups by means of the biolog system. *J. Med.Microbiol.* **1995**; 42:113– 119.
- 110- **Lenie Dijkshoorn and Alexandr Nemec.** The Diversity of the Genus *Acinetobacter* *Acinetobacter* Molecular Biology. Chaister Academic Press.**2008**; 1-35.
- 111- **Bergogne-Berezin E, Towner KJ.** *Acinetobacter* spp. As Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. *Clin Microbiol Rev.* **1996**; 9:148-65.
- 112- **Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J.** Reliability of phenotypic tests for Identification of *Acinetobacter* Species. *J Clin Microbiol.* **1991**; 29:277-82.
- 113- **Weaver R, Actis LA.** Identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* **1994**; 32:1833-1838.
- 114- **Bauvet PJM, Jeanjean S, Vieu JF, Dijkshoorn L.** Species biotype, and bacteriophage type determination compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J.Clin.Microbiol.* **1990**; 28:170-6.
- 115- **Bergogne-Berezin E. and Towner K.J.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. *Clin Microbiolo.Rew.* **1996**; 148-165.
- 116- **Dijkshoorn L. Michel M.F, Degener J.E.** Cell envelope protein profiles of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated in hospitals. *J.Med.Microbiol.* **1987**; 23: 313-319.
- 117- **Picard B., Goulet P., Bouvet P.J.M., Decoux G., Denis J.B.** Characterization of bacterial genomic species by computer-assisted statistical analysis of enzyme electrophoresis data. *Electrophoresis* **1989**; 10: 680-685.
- 118- **Adams, M. D., K. Goglin, N. Molyneaux, K. M. Hujer, H. Lavender, J. J. Jamison, I. J. MacDonald, K. M. Martin, T. Russo, A. A. Campagnari, A. M. Hujer, R. A. Bonomo, and S. R. Gill.** Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* **2008**; 190:8053– 8064.
- 119- **Swenson, J. M., G. E. Killgore, and F. C. Tenover.** Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. By NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. *J.Clin. Microbiol.* **2004**; 42:5102– 5108.
- 120- **Turton, J. F, M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M. Livermore, and T.L. Pitt.** The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**; 258:72– 77.
- 121- **Pantophlet R, Nemec A, Brade L, Brade H, Dijkshoorn L.** O-Antigen Diversity among *Acinetobacter baumannii* strains from the Czech republic and Northwestern Europe, as determined by Lipopolysaccharide-Specific Monoclonal Antibodies. *J Clin Microbiol.* **2001**; 39: 2576-2580.
- 122- **Joly-Guillou ML, Bergogne-Berezin E, Vieu JF.** A study of the relationships between antibiotic resistance phenotypes, phage-typing and biotyping of 117 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *J.Hosp. Infect.* **1990**; 16: 49.
- 123- **Seifert, H., and P. Gerner-Smidt.** Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J.Clin. Microbiol.* **1995**; 33:1402– 1407.
- 124- **Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A., Wisplinghoff, H., and Rodriguez-Valera, F.** Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J.Clin.Microbiol.* **2005**; 43: 4382– 4390.

- 125- **Johannes G.M. Koeleman, Jeron Stoof, Dennis J.Biesmans, Paul H.M. Savelkoul** Comparison of Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Identification of *Acinetobacter* Genomic Species and Typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin. Microbiol* **1998**; 2522-2529.
- 126- **Dijkshoorn, L., van Harselaar, B., Tjernberg, I., Bouvet, P.J., and Vaneechoutte, M.** Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst. Appl. Microbiol.* **1998**;21, 33– 39. ARDRA
- 127- **Pilar Villaon, Slvia Valdetaze, Maria J. Medina- Pascual, Virginia Rubio, Ana Vindel and Juan A. Saez-Nieto** Clonal Diversity of Nosocomial Epidemic *Acinetobacter baumannii* Strain Isolated in Spain. *J. Clin. Microbiol* **2011**; 875-882.
- 128- **Lu-Chend Kuo, Lee-Jene Teng, Chong-Jen Yu, Shen-Wu Ho** Dissemination of a Clone Of Unusual Phenotype of Pandrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* at a University Hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **2004**;1759-1763.
- 129- **H. Seifert,* A. Schulze, R. Baginski, G. Pulverer** Comparison of Four Different Methods for Epidemiologic Typing of *Acinetobacter baumannii*, *J. Clin. Microbiol.* **1994**; 1816-1819.
- 130- **Birren B.** Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Academic Press.* **1993**.
- 131- **Tenover FC et. al.** Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain. *J. Clin. Microbiol* **1995**; 33:3233.
- 132- **H. Seifert, Lucilla Dolzani, Raffaella Bressan, Tanny van der Reijden, Beppie van Strijen, Danuta Stefanik, Herre Heersma, Lnie Dijkshoorn** Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assesment of Pulsfield Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints. *J. Clin. Microbiol.* **2005**; 4328-4335.
- 133- **Ahmed Hamouda, Benjamin A. Evans, Kevin J. Towner, Sebastian G.B. Amyes** Characterization of Epidemiologically Unrelated *Acinetobacter baumannii* Isolates from Four Continents by Use of Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Sequence – Based Typing of bla_{XA}-51like Genes. *J. Clin. Microbiol* **2010**;2476-2483.
- 134- **Da Silva, G. Dijkshoorn, L. van der Reijden, T. van Strijen, B. and Duarte, A.** Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates as a subgroup of European clone II. *Clin. Microbiol. Infect.* **2007**; 13, 190– 195.
- 135- **P. Janssen, R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau, K. Kersters** Evaluaton of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiyology.* **1996**; 142:1881-1893.
- 136- **P. Janssen, K. Maquelin, R. Coopman, I. Tjernberg, P. Bouvet, K. Kersters, Dijkshoorn, L.** Discrimination of *Acinetobacter* Genomic Species by AFLP Fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **1997**; 1179-1187.
- 137- **P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Rijans, Theo van de lee, M. Horners, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Zabeau** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* **1995**; 23(21): 4407-4414.
- 138- **Koeleman, J.G., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.H., and Vandenbroucke-Grauls, C.M.** Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **1998**; 36: 2522– 2529.

- 139- **Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E., Garaizar, J., Ursing, J., and Pitt, T.L.** Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J.Clin. Microbiol.* **1996**; 34, 1519– 152.
- 140- **Talbot, G. H., J. Bradley, J. E. Edwards, Jr., D. Gilbert, M. Scheld, ve J. G. Bartlett.** Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2006**; **42**:657– 668.
- 141- **Urban, C., E. Go, N. Mariano, B. J. Berger, I. Avraham, D. Rubin, and J. J. Rahal.** . Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype anitratus. *J. Infect. Dis.* **1993**; 167: 448– 451.
- 142- **Corbella, X., J. Ariza, C. Ardanuy, M. Vuelta, F. Tubau, M. Sora, M. Pujol, and F. Gudiol.** . Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**; **42**:793– 802.
- 143- **Bonomo RA, Szabo D.** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* **2006**; **43**(2):49– 56.
- 144- **Ko WC, Lee HC, Chiang SR, et al.** In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Antimicrob Chemother* **2004**; **53**:393– 5.
- 145- **Naas, T., P. Bogaerts, C. Bauraing, Y. Degheldre, Y. Glupczynski, and P. Nordmann.** . Emergence of PER and VEB extended-spectrum betalactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**; **58**:178– 182.
- 146- **Vahaboglu, H., F. Budak, M. Kasap, G. Gacar, S. Torol, A. Karadenizli, F. Kolayli, and C. Eroglu.** . High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**; **58**:537– 542.
- 147- **Segal, H., S. Garny, and B. G. Elisha.** . Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**; **243**:425– 429.
- 148- **Thomson JM, Bonomo RA.** The threat of antibiotic resistance in gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol* **2005**; **8**:518– 24.
- 149- **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* **2005**; **18**: 306– 25.
- 150- **Urban, C., E. Go, N. Mariano, B. J. Berger, I. Avraham, D. Rubin, and J. J. Rahal.** Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype anitratus. *J. Infect. Dis.* **1993**;167:448– 451.
- 151- **Limansky, A. S., M. A. Mussi, and A. M. Viale.** . Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; **40**:4776– 4778.
- 152- **Doi, Y., J. M. Adams, K. Yamane, and D. L. Paterson.** . Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains. **2007**.
- 153- **Falagas ME, Kasiakou SK.** Colistin: the revival of polymyxins for themanagement of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* **2005**; **40**:1333– 41.
- 154- **JIN Hui, XU Xiao-min, MI Zu-huang, MOU Yi and LIU Pei** Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings. *Chinese Medical Journal* **2009**; **122**(3):301-306.

- 155- **Alexandr Nemec, Lenka Kr'í'z'ova' , Martina Maixnerova' , Laure Diancourt, Tanny J. K. Van der Reijden, Sylvain Brisse, Peterhans van den Broek and Lenie Dijkshoorn** Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrugresistant strains of European clone II *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2008**; 62, 484– 489.
- 156- **Helke van Dessel a, Lenie Dijkshoorn b, Tanny van der Reijden b, Nancy Bakker b, Armand Paauw a, Peterhans van den Broek b, Jan Verhoef a, Sylvain Brisse** Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Research in Microbiology*. **2004**; 155: 105– 112
- 157- **Erika M.C. D' Agata, Monique M. Gerrits; Yi Wei Tang, , M. Samore, Johannes G. Kusters.** Comparison of Pulsed Field Gel Electrophoresis and Amplified Fragment Length Polymorphism for Epidemiological Investigations of Common Nosocomial Pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*.**2001**; Vol.22, N0.9, 550-554.
- 158- **Ben-Abraham R, Keller N, Szold O, et al.** Do isolation rooms reduce the rate of nosocomial infections in the pediatric intensive care unit? *J Crit Care* **2002**; 17: 176-80.
- 159- **Aygün G, Demirkiran O, Utku T, Mete B, Urkmez S, Yilmaz M, Yaşar H, Dikmen Y, Oztürk R.** Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit *J Hosp Infect*. **2002** Dec;52(4):259-62.
- 160- **Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L.** Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in health care settings. *Am J Infect Control*. **2007** Dec;35(10 Suppl 2):S65– 164

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Işıl Gökçe BENK

Doğum Tarih ve Yeri: 15.06.1984 - Malatya

**Adres: Huzurevleri mahallesi, 77235 sokak, Lütfiye Tümer apartmanı,17/35
ADANA**

Telefon: 05464558303

E.posta: gokce-benk@hotmail.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi: İnönü Üniversitesi

Görev Yerleri: Divriği Merkez Sağlık Ocağı

Dernek Üyelikleri: KLİMUD

Alınan Burslar:Yok

Yabancı Dil(ler): İngilizce