

BİR ÜNİVERSİTE HASTANESİNDE YATAN HASTALARDAN ÜRETİLEN ACINETOBACTER BAUMANNİİ İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARI VE KLONAL İLİŞKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İD Seher Durukan, İD Cem Çelik, İD Ayşe Hümeysra Taşkın Kafa, İD Mürşit Hasbek

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas

ÖZET

Amaç: Acinetobacter baumannii hastane ortamında ve genellikle yoğun bakım ünitelerinde mortalite ve morbidite artışına sebep olan, hastane kökenli enfeksiyonların en önemli nedenlerindedir. Bu çalışmada A.baumannii izolatlarının klonal ilişkilerinin epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilerek yorumlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde 2012-2018 yılları içerisinde Yoğun Bakım Üniteleri ve çeşitli servislerde yatarak tedavi gören hastaların çeşitli örneklerinden üretilen 179 A. baumannii izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik örneklerde üreyen A.baumannii izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları laboratuvar veri analiz sisteminden elde edilmiştir. Bu izolatlardan, DNA izolasyonları sonucu kalite ve kantite tayinleri uygun olduğu görülen 132 DNA örneğinin klonal ilişkileri ise "repetitive extragenic palindromic" (REP)-PCR yöntemi ile çalışılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Klonal ilişkilerin incelenmesi sonucunda A. baumannii'ye ait 24 küme tespit edilmiştir. Gruplar içerisinde küme 8, küme 15 ve küme 24 baskın gruplar olarak tespit edilmiştir. Yoğun bakım üniteleri kümelerin en yoğun olarak bulunduğu servisler olarak göze çarpmaktadır.

Sonuç: Bu çalışmada A. baumannii kümelerinin hastanemizde belirtilen yıllar içerisinde varlığını sürdürdüğü tespit edilmiştir. Özellikle dirençli salgın kümelerinin önlem alınmadığı durumda hastane ortamında uzun yıllar kalabileceği ve hastadan hastaya taşınabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, Acinetobacter enfeksiyonlarının hastane ortamlarında yayılımlarının önlenmesi için hastanelerin sürekli güncellenen sürveyans programları bulunmalı, enfeksiyon kontrol protokollerinin sıkı bir şekilde uygulanması ve denetlenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Acinetobacter baumannii, nozokomiyal enfeksiyon, klonal ilişki.

C	İLETİŞİM İÇİN: Cem Çelik Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 058040, İmaret/Merkez, Sivas cemcelik58@gmail.com				
ORCID	SD https://orcid.org/0000-0002-8212-8678	ORCID	CÇ https://orcid.org/0000-0002-7141-5874	ORCID	AHTK https://orcid.org/0000-0002-7282-4928
ORCID	MH https://orcid.org/0000-0002-5217-8607				
✓	GÖNDERİLDİĞİ TARİH: 24 / 12 / 2019	•	KABUL TARİHİ: 15 / 10 / 2020		

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND CLONAL RELATIONSHIPS OF ACINETOBACTER BAUMANNII ISOLATES PRODUCED FROM PATIENTS IN A UNIVERSITY HOSPITAL

ABSTRACT

Objective: *Acinetobacter baumannii* is one of the most important causes of hospital-acquired infections that cause increased mortality and morbidity in hospital settings and intensive care units. In this study, it was aimed to interpret the clonal relationships of *A.baumannii* isolates by evaluating them together with epidemiological data.

Material and Method: A total of 179 *A. baumannii* isolates produced from various samples of inpatients in Intensive Care Units and different wards in Sivas Cumhuriyet University Application and Research Hospital between 2012-2018 were included in the study. Antimicrobial susceptibilities of *A.baumannii* isolates were obtained from the laboratory data analysis system. From these isolates, clonal relationships of 132 DNA

samples, which were found to be suitable for quality and quantitation were evaluated by repetitive extragenic palindromic (rep-PCR) method.

Results: As a result of the examination of clonal relations, 24 cluster belonging to *A. baumannii* were determined. Within the groups, cluster 8, cluster 15, and cluster 24 were identified as dominant groups. Intensive care units stand out as the most intensive services in clusters.

Conclusion: In this study, it was established that *A. baumannii* clusters continued to exist in our hospital within the specified years. Especially if precautions are not taken, it should be kept in mind that resistant epidemic clusters can remain in the hospital environment for long years and can be transported from patient to patient. Therefore, to prevent the spread of *Acinetobacter* infections in hospital settings, hospitals should have continuously updated surveillance programs, and infection control protocols should be strictly implemented and supervised.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, nosocomial infection, clonal relationship.

GİRİŞ

Sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonlar, hem sağlık hizmeti çalışanları hem de hastalar için önemli bir güvenlik sorunudur. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yüksek gelirli ülkelere göre 3-20 kat daha yüksek enfeksiyon oranları ile endişe verici bir hızla artmaya devam etmektedir.¹

Hastanede yatan hastaların kolonizasyon ve enfeksiyonunda *Acinetobacter* türlerinin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.² En önemli nozokomiyal patojenlerden biri olarak kabul edilen *Acinetobacter baumannii*, çoklu ilaç direnci nedeniyle son yıllarda yeniden önem kazanan enfeksiyon etkenleri arasında yer almaktadır. Hastane ortamında yaygın olarak bulunan ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olan bu bakteri giderek artan ilaç direnci nedeniyle tedavi açısından ciddi sorunlara yol açmaktadır.³ Özellikle bu patojen mikroorganizmaların hastane ortamlarında çeşitli yüzeylerde uzun süre canlı kalması, eller ve hastane ekipmanları aracılığıyla rahatlıkla taşınarak septisemi, pnömoni, yara enfeksiyonları ve menenjit gibi oldukça ciddi hastalıklara neden olabilmesi bu bakterinin önemini daha da artırmaktadır.^{2,4,5}

A. baumannii enfeksiyonları kontrolü ve tedavisi zor enfeksiyonlardır.⁵ Bu nedenle bu bakterilerin

hastaneler içindeki dağılımlarının tespit edilerek klonal ilişkilerinin ortaya konması ve servisler arası yayılımlarının önlenmesi oldukça önemlidir. *A. baumannii* enfeksiyonlarının bulaş kaynaklarının belirlenmesi için klonal ilişki sonuçlarının değerlendirilmesi, bu enfeksiyonlar ile mücadelede enfeksiyon kontrol önlemlerinin yeterince uygulanabilmesi açısından büyük önem taşıyacaktır. Bu çalışmada *A. baumannii* izolatlarının klonal ilişkilerinin epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilerek yorumlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde 2012-2018 yılları içerisinde, Yoğun Bakım Üniteleri ve çeşitli servislerde yatarak tedavi gören hastaların çeşitli örneklerinden üretilen *A. baumannii* izolatları bu çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik örneklerde üreyen *A.baumannii* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları otomatize sistem ile Epicenter (Becton Dickinson, ABD) veri analiz sisteminden elde edilmiş, klonal ilişkileri ise "repetitive extragenic palindromic" (Rep)-PCR yöntemi ile çalışılarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalardan birden fazla izolasyon gerçekleştirildiyse, bu hastalardan izole edilen sadece bir *A. baumannii* izolatu çalışmaya dahil edilmiş, tekrarlayan örnekler çalışma dışı bırakılmıştır.

İzolatların Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya dahil edilen izolatların tanımlamaları mikrobiyoloji laboratuvarınca Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) cihazı kullanılarak, matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi yöntemi ile üretici firma çalışma prosedürlerine göre yapılmıştır. Tanımlanan suşların antimikrobiyal duyarlılık testleri Phoenix 100 (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) cihazında, gram negatif test panelleri (NMIC/ID-82® ve UNMIC/ID83®, Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) kullanılarak üretici firma çalışma prosedürlerine göre mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yapılmıştır.

İzolatların Saklanması ve Yeniden Canlandırma

Hastanede yatan 179 hastanın çeşitli örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi kullanılarak *A. baumannii* olarak tanımlanan izolatlar, yağsız süt ve gliserol içerisinde -80°C'de çalışmanın gerçekleştirileceği zamana kadar bekletilmiştir. Böylece DNA izolasyonu aşamasına kadar izolatların tekrar canlandırılarak üretilmesi sağlanabilmiştir. Çalışma öncesinde ise kanlı agar besiyerine ekimi yapılarak 35,5°C'de 18-24 saat inkübe edilerek koloni oluşumları gözlemlenmiştir. Bu aşamadan sonra üremenin gerçekleştiği izolatlar ikinci kez pasajlanarak tek koloni ekimleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kolonilerin Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) cihazı ile tanımlama işlemleri üretici firma çalışma prosedürlerine göre yapılarak *A. baumannii* oldukları doğrulanmıştır. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz *A. baumannii* doğrulamaları 2.0 ve üzeri güvenilirlik skorları elde edilen tanımlamalardan elde edilmiştir.

Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu yapılacak bakteri kolonileri test tüpüne 100 µl steril distile su (dH₂O) eklenerek 10 dakika süreyle kaynatılmıştır. Daha sonra 13000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. DNA içeren süpernatant PCR yapılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.⁶ DNA izolasyonu yapılan toplam 179 *A. baumannii* izolatından, Nanodrop (Maestrogen mn-913, Tayvan) cihazı kullanılarak kalite ve kantite tayinleri uygun olduğu görülen toplam 132 DNA örneği Rep-PCR uygulamaları için seçilmiştir.

Rep-PCR'in Yapılışı ve Analizi

Rep-PCR primerleri olarak bakteri genomunun REP dizilerine uyan 18-mer çift oligonükleotid kullanılmıştır. REP primerleri, Rep 1 (5' IIIIGCGCCGICATCAGGC 3') ve Rep 2 (5' ACGTCTTATCAGGCCTAC 3') kullanılmıştır.⁷ PCR reaksiyonu sırasında primer bağlanma sıcaklığı (TA, annealing) TM değerlerinden hareket edilerek gradient PCR uygulamasıyla belirlenmiştir.

Amplifikasyon reaksiyonları, Rep 1 ve Rep 2 primerleri (20 pmol/µL), PCR nükleotid karışımı (dNTPs), (0,2mM), MgCl₂ (3mM), Taq DNA polimeraz (Promega, Madison, ABD) (1,5 U), ve kalıp bakteriyel DNA (100 ng)'dan oluşan 50 µl'lik son hacimli bir reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. PCR uygulamalarında Bio-Rad T100™ Thermal Cycler kullanılmıştır.

PCR sıcaklık profilleri; 10 dakika boyunca 94°C'de başlangıç denatürasyonu, 1 dk boyunca 94°C'de 33 döngü denatürasyonu, 1 dakika boyunca 42,8°C'de primer bağlanma, 6 dakika boyunca 68°C'de uzama ve 10 dakika boyunca 68°C'de son uzama şeklinde uygulanmıştır. Rep-PCR amplifikasyon ürünleri, 1,5 saat boyunca 100 V'da 1×TAE tamponunda (Tris-base, asetik asit, EDTA pH 8,0) agaroz jel (%1) elektroforez ile ayrılmıştır. Toplam 7 adet jel UV ışık altında görüntülenmiş ve jel fotoğrafları tiff formatında bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Analizler için BioNumerics V7.5 (AppliedMaths) programı kullanılmıştır. Programa yüklenen fotoğraf dosyaları üzerinde, belirteç ve PCR ürünlerinin bant profilleri otomatik olarak belirlenmiş ve bantlar kontrol edilerek düzenlenmiştir. Jel nedeniyle konumlarda oluşan hatalar iki belirtecin birbirine göre konumu ile normalize edilmiş ve tüm örneklerle ait bant paterni verileri birleştirilerek analiz edilmiştir. *A. baumannii*'nin REP-PCR DNA bant profillerinin karşılaştırılması benzerlik katsayısı (Similarity coefficient) olarak Dice, optimizasyon %1, tolerans %1 ve diğer parametreler değiştirilmeden, Dendro-UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean; Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Yöntemi) programı kullanılmış ve dendogramlar oluşturulmuştur.⁸

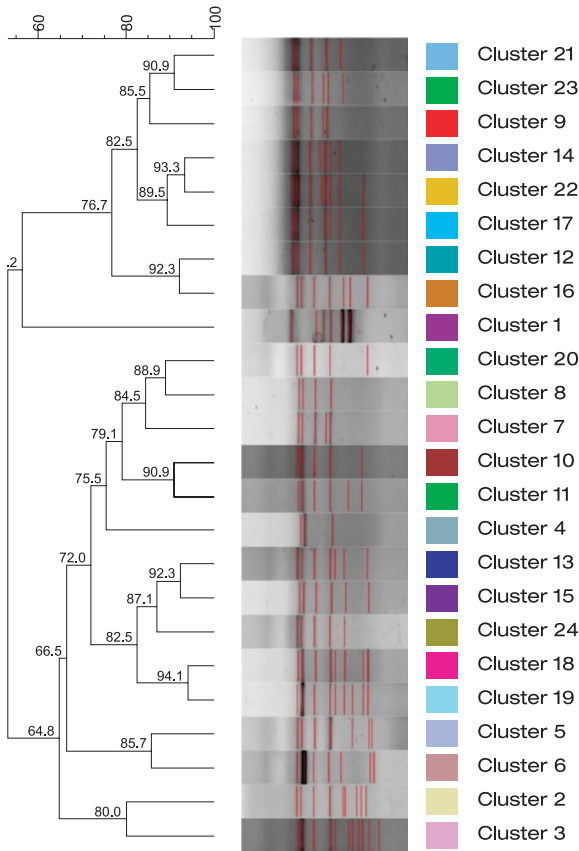
Araştırmanın her aşaması etik ilkelere uygun olarak yürütülmüştür. Uygulamaya geçmeden önce Sivas Cumhuriyet Üniversitesi girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulundan (2018-03/13 sayılı) yazılı izin alınmıştır.

Tablo. 2012-2018 yılları içerisinde izole edilen <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarının antimikrobiyal direnç oranları.		
Antimikrobiyal madde	Direnç oranı (n=179) (%)	Direnç oranı (n=179) (%)
Kolistin	4,4	8
Gentamisin	97,7	175
Sefepim	98,3	176
İmipenem	100	179
Meropenem	100	179
Amikasin	88,8	159
Siprofloksasin	100	179
Trimetoprim-sülfametoksazol	88,2	158

BULGULAR

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden üretilen 179 *A. baumannii* bakterisinin tedavide kullanılan antimikrobiyallere karşı direnç durumları belirlenmiş sonuçlar olup Tablo'da verilmiştir.

Şekil 1'de, çalışılan bakteri izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koyan aritmetik ortalama ile ağırlıklandırılmamış çift grup yöntemi (UPGMA) dendogramı görülmektedir. Bu dendogram çalışmaya ait jel görüntüleri ve bakteri izolatları arasındaki



Şekil 1. İzolatların % 95'lik benzerlik oranına göre oluşturulan kümelerinin arasındaki yapılanma UPGMA dendogramı ile gösterilmiştir. Dendogram üzerinde verilen değerler yüzde benzerlik oranlarını göstermektedir.

%95'lik benzerlik oranı esas alınarak yapılmıştır. Sonuçta *A. baumannii*'ye ait 24 küme oluşmuştur. Bu kümeler içerisinde izolat sayısı açısından en baskın gruplar küme 8, 15 ve 24 olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Toplam 132 izolatın 35'i küme 8'de, 32'si küme 15'de 20'si küme 24'de bulunmaktadır (Şekil 3).

Şekil 4'de, 2012-2018 yıllarını içeren yedi yıllık sürede, *A. baumannii* bakteri izolatlarının yıllara göre dağılımı görülmektedir. 8, 15 ve 24. kümelerin yoğun izolat içerdiği görülmekle birlikte özellikle 8. kümenin yedi yıllık süre boyunca varlığını sürdürdüğü dikkat çekmektedir. 2013 yılında ortaya çıkan 15. ve 24. kümelere bakıldığında, 15. Küme altı yıllık sürede görülürken, 24. küme 2018 yılında görülmemiştir.

Şekil 5'te *A. baumannii* izolatlarına ait kümelerin örnek tiplerine göre dağılımı görülmektedir. Çalışmada incelen örnekler içerisinde balgam örnekleri, %50,7 (n=67) ile ilk sıradadır. Onu sırasıyla yara, idrar, kan, aspirat ve katater örnekleri takip etmektedir.

Şekil 6'da *A. baumannii* izolatlarına ait kümelerin kliniklere göre dağılımı görülmektedir. Yoğun bakım üniteleri tüm servislerin neredeyse yarısını oluşturmaktadır. Onu sırasıyla genel cerrahi, plastik cerrahi, enfeksiyon hastalıkları ve dahiliye servisleri takip etmektedir.

Şekil 7'de, *A. baumannii* bakteri izolatlarına ait kümelerin antibiyotik duyarlılığına göre dağılımı görülmektedir. En fazla duyarlılığın olduğu antibiyotik kolistindir. Ayrıca en yoğun izolat içeren 8, 15 ve 24. kümeler içerisinde, kullanılan tüm antibiyotiklere direnç gösteren bakterilerin bulunduğu tespit edilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Hastane enfeksiyonları yüksek maliyeti ve mortalitesi nedeni ile tüm dünya için önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Yüksek gelirli ülkelerde dahi hastanede yatan hastaların %5-15'i, yoğun bakım ünitelerine başvuranların %9-37'si sağlık bakım hizmetleri aldıkları sırada hastane enfeksiyonlarına maruz kalabilmektedirler.¹

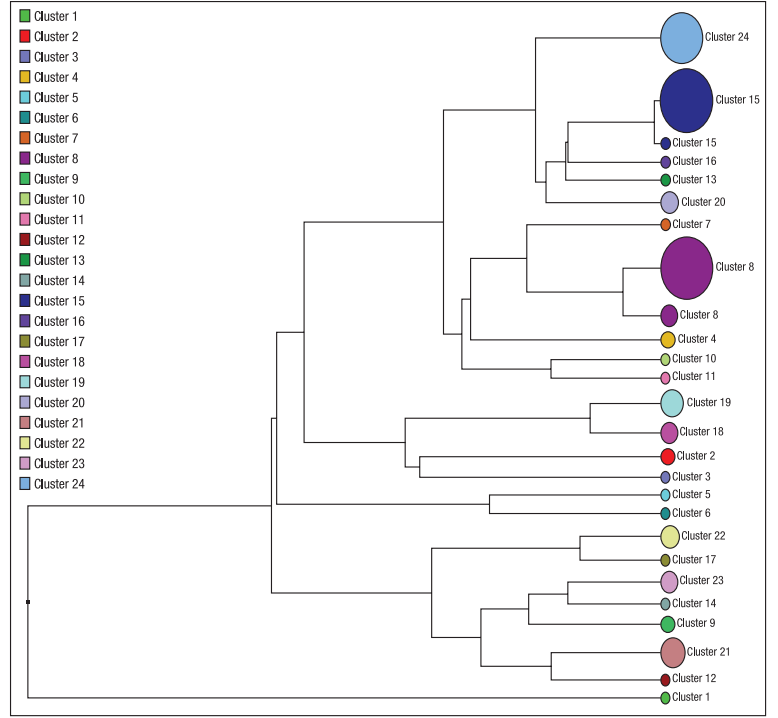
A. baumannii, hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biridir. Özellikle çoklu antibiyotige dirençli *A. baumannii*, günümüzde büyük bir klinik öneme sahiptir. Çok sayıda rapor, *A. baumannii*'nin hastane ortamlarında yayılmasının, yüksek ölüm oranlarıyla ilişkili hastane salgınlarında artışa yol açtığını göstermektedir.^{9,10} *A. baumannii*

bakterileri'nin hasta yatakları, kapı kolları, klimalar ve mekanik ventilasyon ekipmanları gibi cansız yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmesinin yanı sıra, hastaların servisler arası transferleri, sağlık personeli ve hastalar aracılığıyla gerçekleşen çapraz bulaşlar sonucu kolayca yayıldığı ve hastane içinde uzun süre varlığını sürdürdüğü eskiden beri bilinmektedir.¹¹⁻¹³ Bu durum bu bakterilerin hastanelerde kolayca yayılabilmesine olanak sağlamaktadır.

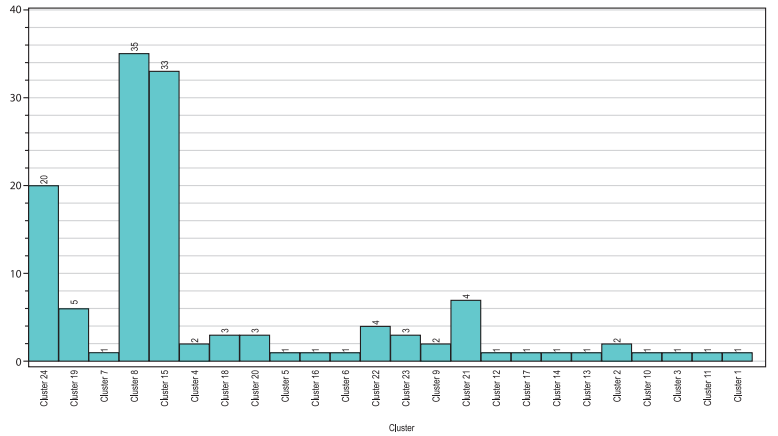
Çalışmamızda *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin tespit edilmesi için rep-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem klonal ilişkinin tespit edilmesi açısından diğer yöntemlerle, özellikle altın standart olarak kabul edilen Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi ile karşılaştırılabilir düzeyde güvenilir bir metot olarak kullanılmaktadır.¹⁴⁻¹⁶ Bou ve ark.'ı *A.baumannii*'nin nozokomiyal salgınlarının araştırıldığı çalışmalarında bu iş için rep-PCR kullanmayı tercih etmelerinin nedenini, bant profilleri karşılaştırıldığında Rep-PCR'in Arbitrary primer sequence-based PCR'dan (AP-PCR) daha fazla ayırt edici olduğu ve PFGE tekniği gibi yüksek performans göstermesi olarak açıklamışlardır.¹⁷ Deplano ve ark.'da rep-PCR'nin tekrarlanabilirlik ve performans yönünden en uygun yöntemlerden biri olduğunu bildirmişlerdir.¹⁸ Bayık ve ark. ise yayınlanan çalışmalarında rep-PCR yöntemini epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir ve enfeksiyon kontrol önlemlerine yardımcı olabilecek hızlı, uygulaması ve değerlendirmesi kolay bir yöntem olduğu için tercih ettiklerini bildirmişlerdir.¹⁹

Bu çalışmada 132 izolat ile %95 benzerlik oranına göre yapılan gruplandırma sonucu oluşturulan dendrogram analizinde, hastanemizin farklı servislerinde *A. baumannii*'ye ait 24 küme tespit edilmiştir. Gruplar içerisinde küme 8, küme 15 ve küme 24 baskın gruplar olarak göze çarpmaktadır. Tespit edilen 24 grup içerisinde 8. küme 35 izolatla, 15. küme 32 izolat ve 24. küme ise 20 izolat ile en yoğun gruplar olarak görülmektedir.

Eraç ve ark.'ları *A. baumannii* için yaptıkları bir klonal çalışmada, inceledikleri suşların yedi ana grup altında toplandığını, bunlardan en büyüğünün 56 izolatı içeren ve dokuz alt gruba ayrılan bir klon olduğunu bildirmişlerdir. Diğer klonların ise bir, iki ya da üç üyesi bulunan küçük gruplar olduğunu tespit etmişlerdir.²⁰ Bizim çalışmamızda da 24 farklı küme içerisinde iki kümede yoğunluğun daha fazla olduğu görülmüştür. Gülbudak ve ark.'ları rep-PCR yöntemi kullanılarak yapılan tiplendirme sonucuna göre: 75 *Acinetobacter* izolatı için 2'si ana klon (A ve B) olmak



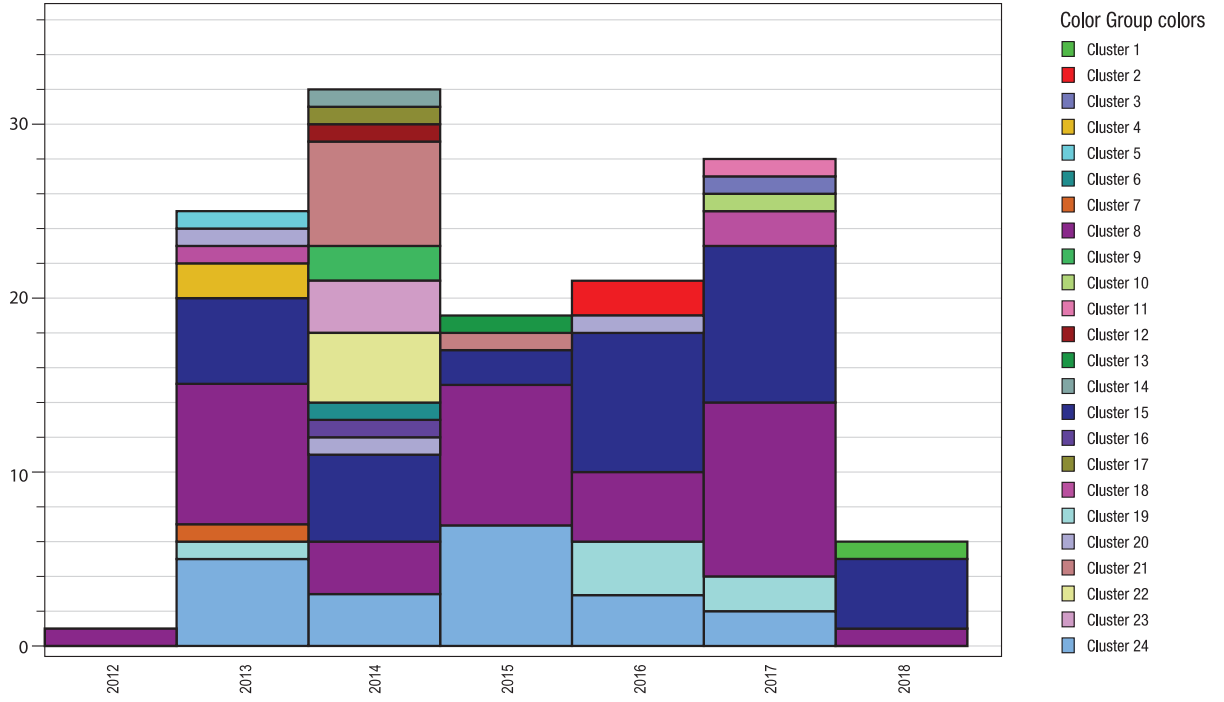
Şekil 2. İzolatların %95'lik benzerlik oranına göre oluşturulan kümelerinin arasındaki yapılanma UPGMA dendrogramı ile gösterilmiştir. Dendrogram üzerinde verilen her renk farklı bir kümeye ve daire büyüklüğü küme içinde yer alan izolat sayısına işaret etmektedir.



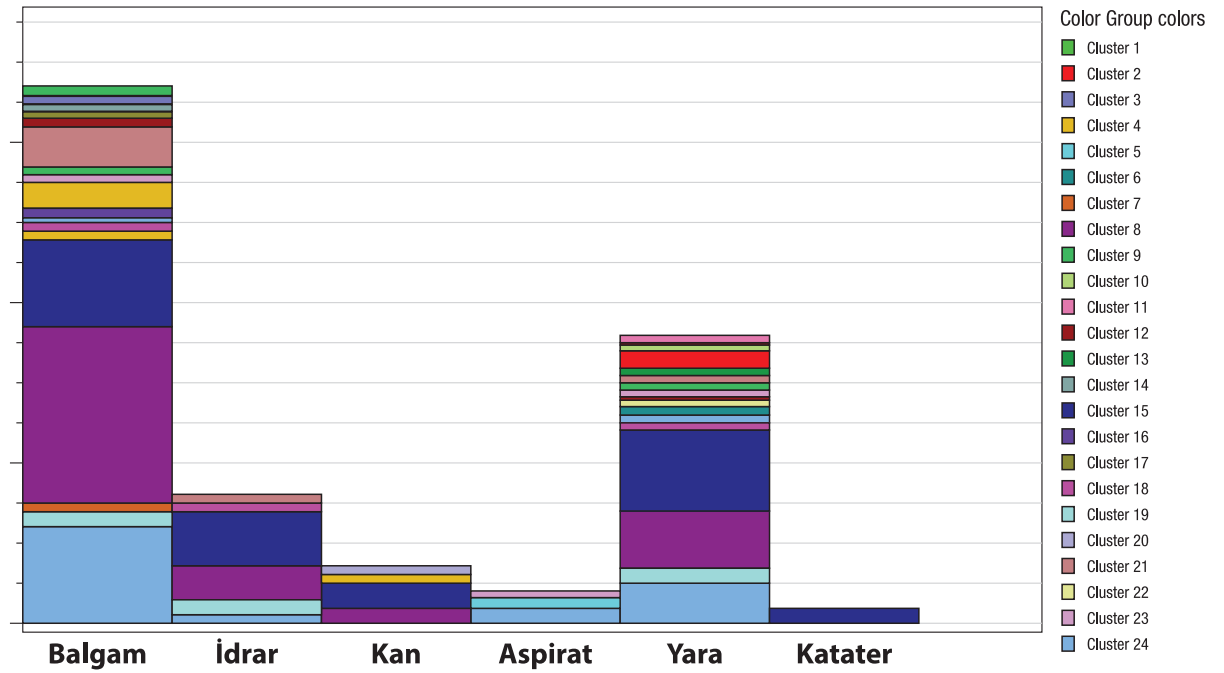
Şekil 3. Grafikte kümelerin içerdiği izolat sayıları gösterilmiştir. Yatay eksen kümeleri, dikey eksen ise izolat sayılarını temsil etmektedir.

üzere toplam 8 farklı klon (A-H) tespit etmişlerdir. A ana klonunun, 54 (%72) izolatın toplandığı en büyük kümeyi oluşturduğu ve 7 alt tipe (A1-A7) ayrıldığı belirtilmiştir. İkinci büyük klon ise 13 (%17,3) izolat içeren B ana klonuna ait alt klonlar olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.²¹ Bu çalışmada bizim çalışmamıza göre daha az izolat kullanılmış ve daha az klon tespit edilmiş görünmektedir.

Salimizand ve ark.'nın rep-PCR ile klonal ilişkiyi ortaya koymak için yaptıkları çok merkezli bir çalışma sonucunda, *A. baumannii* izolatlarının üç ayrı kümeye (A, B ve C) ve 20 alt kümeye ayrıldığı en baskın kümenin A kümesi olduğu belirlenmiştir.²²



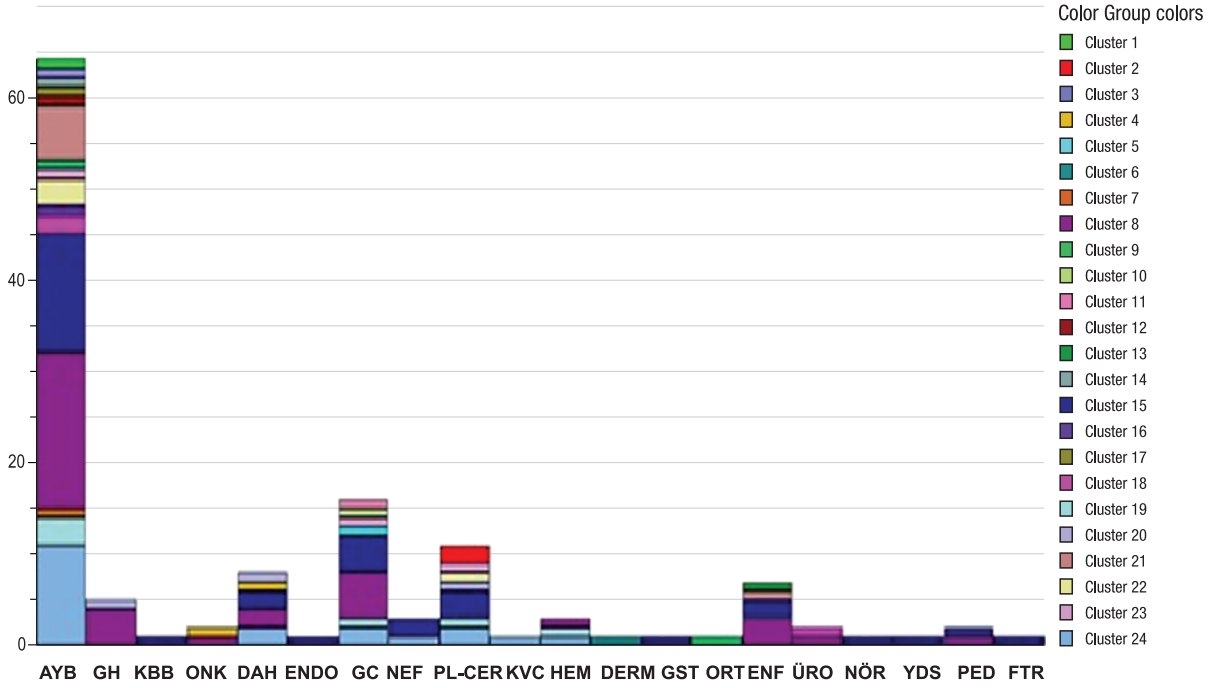
Şekil 4. Grafikte kümelerin içerdiği izolatların hangi yılda izole edildiğini göstermektedir. Yatay eksen yılları, dikey eksen ise izolat sayılarını temsil etmektedir.



Şekil 5. Grafikte kümelerin içerdiği izolatların hangi kaynaktan izole edildiğini göstermektedir. Yatay eksen kaynakları, dikey eksen ise izolat sayılarını temsil etmektedir.

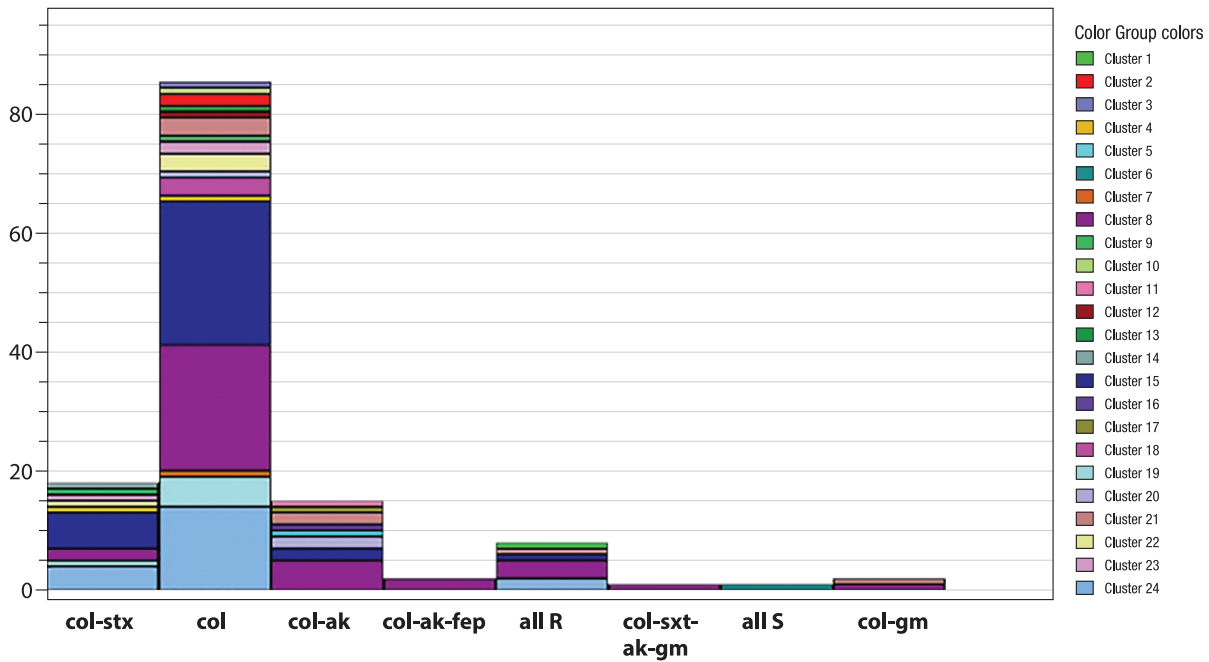
Misbah ve ark.'ları 1987 (n=21) ve 1996-1998 (n=88) yıllarında, 109 *Acinetobacter* suşunun antibiyotik duyarlılık profillerini ve rep-PCR ile klonal ilişkisini araştırmışlardır. Çalışılan suşların %92 benzerlikle 4 klona ayrıldığı, 1987 yılında baskın olan klonun, 1996-1998 yıllarındaki izolatlarla kıyasla imipenem, amikasin ve siprofloksasine karşı direnç ve antibiyotik toleransının arttığı, buna karşılık, 1996-1998 yılları arasında klon 1 izolatlarının antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca klon 1'in son yıllarda ortaya çıktığı da bildirilmiştir.²³

Yoğun bakım üniteleri hastane enfeksiyonlarının en sık görüldüğü birimlerdir. Ayrıca *Acinetobacter* enfeksiyonları en sık da yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir.¹⁰ Yaptığımız bu çalışmada da literatüre uygun olarak, değerlendirilen *A. baumannii* izolatlarının büyük bir kısmının yoğun bakım servislerine (%48,4) ait olduğu görülmüştür. Buna bağlı olarak da rep-PCR sonuçları ile elde edilen kümelerin kliniklere göre dağılımı ele alındığında yoğun bakım ünitelerinin 16 farklı küme içerdiği tespit edilmiştir. Fontana ve ark.'ı yoğun bakım servislerinde 13 farklı



Şekil 6. Grafikte kümelerin içerdiği izolatların hangi klinikten izole edildiğini göstermektedir. Yatay eksen klinikleri, dikey eksen ise izolat sayılarını temsil etmektedir. Kliniklere ait kısaltmalar:

AYB: Anestezi Yoğun Bakım, **GH:** Göğüs Hastalıkları, **KBB:** Kulak Burun Boğaz, **ONK:** Onkoloji, **DAH:** Dahiliye, **ENDO:** Endokrinoloji, **GC:** Genel Cerrahi, **NEF:** Nefroloji, **PL-CER:** Plastik Cerrahi, **KVC:** Kardiyovasküler Cerrahi, **HEM:** Hematoloji, **DERM:** Dermatoloji, **GST:** Gastroenteroloji, **ORT:** Ortopedi, **ENF:** Enfeksiyon Hastalıkları, **ÜRO:** Üroloji, **NÖR:** Nöroloji, **YDS:** Yenidoğan Servisi, **PED:** Pediatri, **FTR:** Fizik Tedavi Rehabilitasyon.



Şekil 7. Grafikte kümelerin içerdiği izolatların hangi antibiyotiklere duyarlı olduğu göstermektedir. Yatay eksen antibiyotikleri, dikey eksen ise izolat sayılarını temsil etmektedir. Antibiyotiklere ait kısaltmalar:

Col: Kollistin, **stx:** Sulfamethoxazole / Trimethoprim, **ak:** Amikasin, **fep:** Sefepim, **gm:** Gentamisin, **all R:** Hepsil dirençli, **all S:** Hepsil duyarlı.

klondan *A.baumannii* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Grisold ve ark.'ı farklı klonlardan oluşan *A.baumannii* bakterilerinin yoğun bakım servislerinde salgınlara neden olduğunu çalışmalarında bildirmişlerdir.^{14,16} Yine farklı çalışmalarda araştırmacılar yoğun bakım servislerinde üretilen *A.baumannii* izolatlarında bir çok farklı klon tespit ettiklerini bildirmişlerdir.^{24,25}

1970'lerin başlarına kadar *Acinetobacter* enfeksiyonları, monoterapi veya kombinasyon tedavileri ile tedavi edilebilirken, 1975'lerden sonra bu bakteri ile ilgili olarak yüksek direnç oranları fark edilmeye başlanmıştır. Günümüzde ise *Acinetobacter* tedavisinde güçlükler yaşanmakta, tedavide kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişmekte ya da MIC değerlerinde artışlar gözlenmektedir.²⁶

Çalışmamızda, 179 Acinetobacter izolatın 2012-2018 yılları içerisinde direnç durumlarını değerlendirdiğimizde; kolistin için %4,4, trimetoprim-sülfametoksazol için %88,2, amikasin için %88,8, gentamisin için %97,7, sefepim için %98,3 ve imipenem, meropenem ve siprofloksasin için ise %100 direnç tespit edilmiştir. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Acinetobacter spp.'de kolistin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)'un belirlenmesinde referans yöntem olarak standart sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemini önermektedir.²⁷ Ancak çalışmamızda kullandığımız antimikrobiyal direnç verileri geriye dönük olduğu için ilgili dönemlerde çalışılan kolistin sonuçları otomatize sistem sonuçlarıdır. Standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmış yeni kolistin duyarlılık çalışmaları bu konudaki literatüre katkı sağlaması açısından değerli olacaktır.

Ergönül ve ark.'ları yaptıkları çok merkezli bir çalışmada A. baumannii için bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer direnç oranları bildirmişlerdir.²⁸ Yine dünyanın farklı yerlerinden yapılan çalışmalarda da bizim çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde yüksek direnç oranları dikkati çekmektedir.²⁹⁻³¹

Yaptığımız çalışma ile Acinetobacter kümelerinin hastanemizde 2012-2018 yılları arasında varlığını sürdürdüğü tespit edilmiştir. Belirtilen yıllar içerisinde

A. baumannii'ye karşı antimikrobiyal direnç profilleri belirlenmiştir. Özellikle dirençli salgın klonların önlem alınmadığı durumda hastane ortamında uzun yıllar kalabileceği ve hastadan hastaya taşınabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, Acinetobacter enfeksiyonlarının hastane ortamlarında yayılımlarının önlenmesi için hastanelerin sürekli güncellenen sürveyans programları bulunmalı, enfeksiyon kontrol protokollerinin sıkı bir şekilde uygulanması ve denetlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızdaki Sınırlamalar

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Acinetobacter spp.'de kolistin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)'un belirlenmesinde referans yöntem olarak standart sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir. Ancak çalışmamızda kullandığımız antimikrobiyal direnç verileri geriye dönük olduğu için ilgili dönemlerde çalışılan kolistin sonuçları otomatize sistem sonuçlarıdır.

*Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından T-784 nolu proje ile desteklenmiştir.

*Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Abu Bakar M. Health care-associated infections—an overview. Infect Drug Resist 2018; 11: 2321–2333.
2. Towner KJ. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect 2009; 73: 355–363.
3. Aşık G. Acinetobacter baumannii virülansının açıklanmasında güncel yaklaşımlar. Mikrobiyol Bul 2011; 45: 371–380.
4. Teare L, Martin N, Elamin W, et al. Acinetobacter - the trojan horse of infection control? J Hosp Infect 2019; 102: 45–53.
5. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents 2012; 39: 105–114.
6. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. Kuwait Med J 2009; 41: 117–122.
7. Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii complex. J Med Microbiol 1996; 44: 482–489.
8. Sokal RR, Michener C. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ Kansas Sci Bull 1958; 38: 1409–1438

9. Almasaudi SB. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J Biol Sci 2018; 25: 586–596.
10. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. As nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148–165.
11. Clark NM, Zhanel GG, Lynch JP 3rd. Emergence of antimicrobial resistance among Acinetobacter species: a global threat. Curr Opin Crit Care 2016; 22: 491–499.
12. Mulin B, Talon D, Viel JF. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant Acinetobacter baumannii. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14: 569–576.
13. Lortholary O, Fagon JY, Buu Hoi A. Nosocomial acquisition of multiresistant Acinetobacter baumannii: risk factors and prognosis. Clin Infect Dis 1995; 20: 790–796.
14. Fontana C, Favaro M, Minelli S, et al. Acinetobacter baumannii in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. BMC Infect Dis 2008; 8: 79.
15. Saeed S, Fakhri MG, Riederer K, Shah AR, Khatib R. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of Acinetobacter baumannii detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27: 981–983.

16. Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, et al. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J Infect* 2010; 60: 44-51.
17. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem-and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 635-643.
18. Deplano A, Denis O, Poirel L, et al. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1198-1204.
19. Bayık SA, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Aksu N. Vankomisin dirençli enterokok suşlarının rep-PCR yöntemi ile klonal analizlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2016; 73: 1-8.
20. Eraç B, Yılmaz FF, Hoşgör Limoncu F, Öztürk İ, Aydemir Ş. Çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında virülans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48: 70-81.
21. Gülbudak H, Aslan G, Tezcan S, et al. Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Acinetobacter baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin Rep-PCR ile araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48: 316-324.
22. Salimizand H, Menbari S, Ramazanzadeh R, Khonsha M, Saleh Vahedi M. DNA fingerprinting and antimicrobial susceptibility pattern of clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates: a multicentre study. *J Chemother* 2016; 28: 277-283.
23. Misbah S, AbuBakar S, Hassan H, Hanifah YA, Yusof MY. Antibiotic susceptibility and REP-PCR fingerprints of *Acinetobacter* spp. isolated from a hospital ten years apart. *J Hosp Infect* 2004; 58: 254-261.
24. Senok A, Garaween G, Raji A, et al. Genetic relatedness of clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates from an intensive care unit outbreak. *J Infect Dev Ctries* 2015; 9: 665-669.
25. Shoja S, Moosavian M, Peymani A, et al. Genotyping of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from tracheal tube discharge of hospitalized patients in intensive care units, Ahvaz, Iran. *Iran J Microbiol* 2013; 5: 315-322.
26. Asif M, Alvi IA, Rehman SU. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infect Drug Resist* 2018; 11: 1249-1260.
27. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 2.0, valid from 2012-01-01 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf. Erişim tarihi:08.11.2019
28. Ergönül Ö, Aydın M, Azap A, et al. Healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. *J Hosp Infect* 2016; 94: 381-385.
29. Keskin H, Tekeli A, Dolapçı İ, Öcal D. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında beta-laktamaz kaynaklı direncin moleküler karakterizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48: 365-376.
30. Gözütok F, Mutlu Sarıgül F, et al. Hastane enfeksiyonu etkeni *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması. *ANKEM Derg* 2013; 27: 7-12.
31. Şahin H, Önde U, Adiloğlu AK, et al. Ankara'daki çeşitli hastanelerden elde edilen *Acinetobacter baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2016; 73: 199-210.