Research of Acinetobacter Baumannii Isolation From Clinical Samples in Second Step Hospital

İkinci Basamak Hastanede Klinik Örneklerden Acinetobacter Baumannii İzolasyonunun Araştırılması

Artan Acinetobacter Sıklığı / Growing Acinetobacter Frequency

Kerамettin Yanık[1], Rıdvan Güçkan[2], Kemal Bilgin[3], Mustafa Arslan[2], Emre Yüksel[4]
[1]Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun,
[2]Amasya Üniversitesi Şerafeddin Sabuncuoğlu Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Amasya,
[3]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Samsun,
[4]Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye

Özet

Giriş: Acinetobacter cinsi bakterilerin var olan çoklu ilaca dirençli olmaları ve sonradan direnç kazanmaları bu bakterilerin sürekli gündemde kalmalarına sebep olmuştur. Bunun yanında tedavi maliyetlerini, hasta yatış sürelerini ve mortalite, morbitide artışına neden olması diğer özelliklerindendir. Hastanede uzun yatış, altta yatan immün sistem bozuklukları gibi risk faktörleri bu bakterilerin hastalardan izolasyon sıklığını arttırmaktadır. Bu risk faktörlerinden en önemlisi geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı olduğu bilinmektedir. Çalışmamızın amacı, bir devlet hastanesinde izolasyon sıklığı giderek artan A.baumannii suşlarının nedenini araştırmak ve bu izolatlar arasında çapraz kontaminasyon olup olmadığını ortaya koymaktır. Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada ikinci basamak bir hastanede Acinetobacter suşlarının yıllara göre artan izolasyon sıklığı ve izole edilen örneklerin dağılımı incelendi. Aynı zamanda son üç yıllık hastanede kullanılan imipenem ve meropenem sayısı çıkarıldı. 2013 yılının son aylarında yoğun bakım ve göğüs servisindeki hastaların solunum ve balgam örneklerinden izole edilen A.baumannii suşlarına PFGE yöntemi uygulanarak genotipik benzerlikleri incelendi. Bulgular: Acinetobacter'lerin yıllara göre izolasyon sıklığı ve karbapenem kullanımı giderek arttı. Örnekler genelde solunum yolu örneklerini ihtiva ediyordu. Çalışılan 6 A.baumannii suşuna ait PFGE görüntüsünde, genotipik benzerlik tespit edilmedi. Bu durum, bu suşların çapraz kontaminasyondan kaynaklanmadığı olarak yorumlandı.

Anahtar Kelimeler

A.Baumannii Sıklığı; Karbapenem Direnci; Uygunsuz Antibiyotik Kullanımı

Abstract

Aim: Due to existing multi drug resistance and subsequently acquired resistance Acinetobacter genus bacteria continuously actual. Other characteristics are increasing treatment costs, patient hospitalization period, mortality and morbidity. Risk factors like extended hospitalization period, background immune system disorders are increasing isolation frequency of this bacteria from patients. Extended spectrum antibiotic usage is known to be a major risk factor. Aim of our study is to investigate cause of growing A.baumanii isolation rate and cross contamination between this isolates in a state hospital. Material and Method: In this study analysed increasing isolation frequency by years and specimen occurrence in level 2 hospital. At the same time detected amount of used imipenem and meropenem in hospital during last three years. A.baumanii strains isolated from respiratory and sputum specimens of patients from intensive care unit and thoracal departament during last month of 2013 year's were tested using PFGE method for genotypic similarity. Results: Acinetobacters isolation frequency in years and carbapenem usage are subsequently increased. Specimens are generally from respiratory tract. Genotypic similarity not detected on studied 6 A.baumanii strain's PFGE image. This condition interpreted like this strains origins not from cross contamination.

Keywords

A.Baumannii Frequency; Carbapenem Resistance; Unsuitable Use of Antibiotics

DOI: 10.4328/JCAM.2679 Received: 14.07.2014 Accepted: 09.08.2014 Printed: 01.02.2015 J Clin Anal Med 2015;6(suppl 1): 42-5
Corresponding Author: Kerамettin Yanık, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 55139, Samsun, Türkiye.
T.: +90 3623121919 F.: +90 3624576091 E-Mail: keramettinyanik@omu.edu.tr

Giriş

Acinetobacter cinsi bakteriler son yıllarda özellikle yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere hastane enfeksiyonlarında en sık izole edilen etkenlerin başında gelmektedir[1]. Neden oldukları enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı giderek artan direnç tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir[2]. En sık izole edilen tür olan A.baumannii sonradan kazanılan ve var olan çoklu ilaca dirençli olmaları bu bakterilerin sürekli gündemde kalmalarına sebep olmuştur[3]. Bunun yanında tedavi maliyelerini, hasta yatış sürelerini ve mortalide, morbitide artışına neden olması diğer özelliklerindendir. Kolay antibiyotik direnç geliştirme özelliğinden dolayı hastanede bu bakteriler yayılma eğilimindedir[2-3]. Hastanede uzun yatış, altta yatan immün sistem bozuklukları gibi risk faktörleri bu bakterilerin hastalardan izolasyon sıklığını arttırmaktadır. Bu risk faktörlerinden en önemlisi karbapenemler, sefalosporinler, kinolonlar gibi geniş spektrumlu antibiyotik kullanımıdır[4]. Dirençli bakteri türlerinin hastane ortamında yayılması, kullanılan antibiyotiğin çeşidine bağlıdır. Karbapenemler, dirençli Acinetobacter enfeksiyonlarını tedavi etmede kullanılan en efektif antimikrobiyal ajanlardır[5]. Ancak bu ajanların kullanımı çoklu ilaca dirençli Acinetobacter suşlarının hastane ortamında yayılmasına katkı sağladığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır[3].

Çalışmamızın amacı, bir devlet hastanesinde izolasyonu giderek artan A.baumannii suşlarının artışında karbapenem kullanımının etkisini araştırmak ve bu izolatlar arasında genotipik benzerliğin olup olmadığını ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem

Çeşitli kliniklerden mikrobiyoloji laboratuarına gönderilen örnekler %5 koyun kanlı agar ve eosin methylene blue agara ekildi ve inkübasyon sonrasında değerlendirildi. Suşların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları Vitek2 (Biomeriux, Fransa) otomatize cihazında çalışıldı ve sonuçlar Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda değerlendirildi[6].

Genotiplendirme için 2013 yılının son aylarında yoğun bakım ve göğüs servisinde yatan hastaların solunum ve balgam örneklerinden izole edilmiş olan 6 hasta çalışmaya alındı. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile yapılan incelemede Durmaz ve arkadaşları [7]'nın önerdiği modifiye edilmiş protokolden derlenen yöntem kullanıldı. Özetle bu aşamalarda izolatlar hazırlanıp agaroza gömüldü. Agaroz içindeki hücreler parçalanıp hücre lizisinden sonra agaroz kalıpları yıkandı. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesilmesi, elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi işlemleri yapıldı. CHEF MAPPER (Bio-Rad, Fransa) sisteminde elektroforeze tabii tutuldu.

Elektroforezden sonra jel, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınıp 20 dakika boyandı. Sonra UV ışığı altında görüntülendi. Gel/ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Fransa), görüntüleme cihazı ile DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilerek fotoğraflar kaydedildi. Bionumerics (Applied Maths, Belgium) programı kullanılarak bant düzeyleri arası normalizasyon yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %1.5 olarak alındı. Unweighted Pair Group Method With Mathematical Averaging (UPGMA) kullanılarak PFGE bant profillerinin dendogramı oluşturuldu. Bant profilleri incelenerek Tenover kriterlerine göre yorumlama yapıldı[8].

Bulgular

Hastanemizde 2007-2013 yılları arasında alınan kültür sayısı 12842'dir. Bu üremelerde Acinetobacter sayısı 658(%5) olup, 358(%54) A.baumannii, 293(%45) A.baumannii complex ve 7(%1) A.lwoffii olarak tiplendirilmiştir. İzole edilen 658 Acinetobacter cinsine ait suşların yıllara göre dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Acinetobacter'lerin yıllara göre izolasyon sıklığı

Yıllar	n	N	%
2007	2	90	2.2
2008	4	942	0.4
2009	16	1439	1.1
2010	79	2628	3.0
2011	162	2529	6.4
2012	163	2386	6.8
2013	232	2828	8.2
Toplam	658	12842	

n:Yıllara göre Acinetobacter sayısı verilmiştir.
N:Kültürde üreyen toplam bakteri sayısı

Acinetobacter'ler en fazla solunum yolu örneklerinden izole edilmiş olup dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Acinetobacter cinsi bakterilerin klinik örneklere göre dağılımı

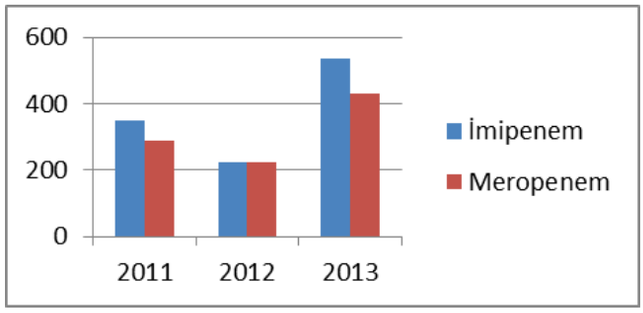
Yıllar	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Toplam
Balgam	2(%50)	10(%62.5)	24(%33)	66(%44.59)	51(%35.92)	59(%26.7)	212
Kan	2(%50)	0(%0)	33(%46)	38(%25.68)	26(%18.31)	55(%24.88)	154
İdrar	0(%0)	2(%12.5)	4(%6)	24(%16.22)	32(%22.54)	21(%9.5)	83
Yara	0(%0)	4(%25)	11(%15)	19(%12.83)	29(%20.42)	15(%6.79)	78
Solunum	0(%0)	0(%0)	0(%0)	1(%0.68)	3(%2.11)	71(%32.13)	75
Kulak	0(%0)	0(%0)	0(%0)	0(%0)	1(%0.7)	0(%0)	1
Toplam	4	16	72	148	142	221	

Hastanede giderek artan karbapenem direnci tespit edilmiştir. Yıllara göre artış Tablo 3'de ve Grafik 1'de verilmiştir.

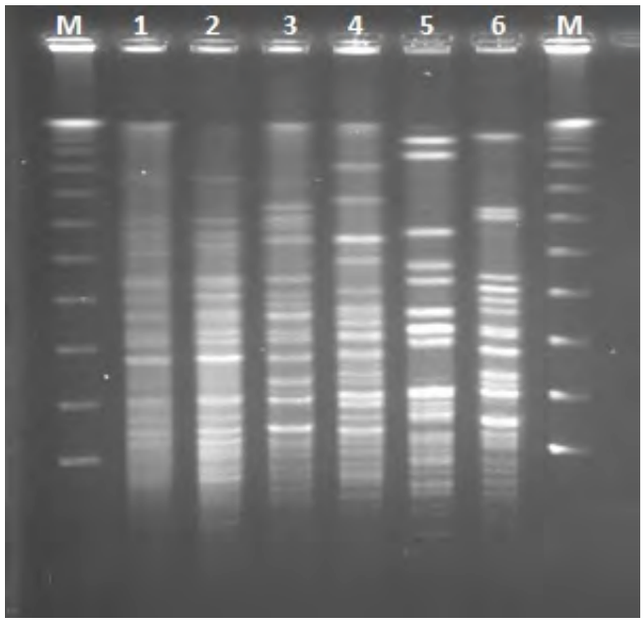
Tablo 3. Hastanede üç yıllık İmipenem ve Meropenem kullanımı

Yıllar	İmipenem	Meropenem
2011	349(%31,4)	290(%30,6)
2012	225(%20,3)	225(%23,8)
2013	537(%48,3)	432(%45,6)
Toplam	1111	947

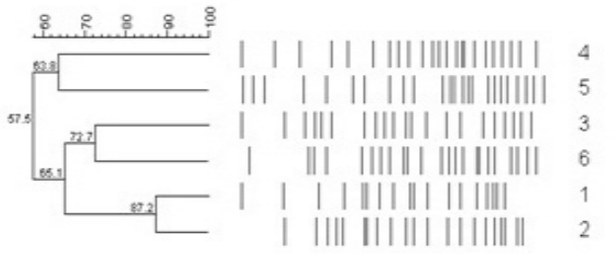
PFGE çalışılan suşların görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir. Suşların birbirlerine yakınlık derecesini gösteren dendogram Şekil 2'de verilmiştir. PFGE çalışılan suşların dendogram çizimi sonucunda 1 ve 2 numaralı suşların birbirine yakınlığı %87.2 olarak görülmüştür. Bunu takiben 3 ve 6 numaralı suşların yakınlığı %72.7, 4 ve 5 numaralı suşların yakınlığı %63.8 olarak görül-



Grafik 1. Hastanede üç yıllık İmipenem ve Meropenem kullanım grafiği



Şekil 1. PFGE çalışılan 6 Acinetobacter baumannii suşuna ait bant görüntüsü
M: Marker, 1:Nöroloji Yoğun Bakım-Solunum Örneği, 2:Genel Yoğun Bakım-Solunum Örneği, 3:Genel Yoğun Bakım-Solunum Örneği, 4:Göğüs Hastalıkları-Balgam Örneği, 5:Göğüs Hastalıkları-Balgam Örneği, 6:Göğüs Hastalıkları-Balgam Örneği



Şekil 2. "Dice" benzerlik katsayısı ve UPGMA yöntemi kullanılarak oluşturulan PFGE modelinin dendogramı

müştür. Bantlar arasında 7 veya daha fazla farklılık olduğu için suşların birbiri ile ilgisiz olduğu tespit edilmiştir[8].

PFGE çalışılan 6 suşun antibiyotik duyarlılıkları Tablo 4'de verilmiştir. Kolistin en etkili antibiyotik olurken; AN (Amikasin) ve SXT (Trimetoprim Sulfametoksazol) de kısmen duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Tartışma

Klinisyenlerin hastanelerinde kısıtlı antibiyotik değil, geniş spektrumlu alternatifli ilaçları tercih etmeleri hastanede yatan hastlarda A.baumannii izolasyon sıklığını artırmaktadır. Ülkemizde özellikle üçüncü basamak hastanelerde tedavileri sorunlu olan ve izolasyonu giderek artan A.baumannii ile ilgili çeşitli çalışmalar vardır. Ancak ikinci basamak hastanelerde bu konuyu irdeleyen çalışmaların sayısı ise sınırlıdır. Çalışmamızda bu suşların devlet hastanesindeki kliniklerde izolasyon sıklığının zamanla arttığı saptandı. Bunun nedenlerinden biri hastanede kullanılan karbapenem oranının üç yıl içinde 1,5 kat artması olarak yorumlanmıştır. Çalışmalarda geniş spektrumlu antimikrobiyal kullanımının Acinetobacter'lerin hastalarda kolonizasyonunu ve izolasyon sıklığını arttırdığını belirtmektedir. Bunun yanında özellikle aminoglikozidler, üreidopenisilinler, florokinolonlar ve üçüncü kuşak sefalasporinler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı Acinetobacter türlerini antibiyotiklere dirençli hale getirmiştir[9]. Çalışmamızda ise hastanede klinik örneklerde Acinetobacter izolasyon sıklığının yıllar içinde %2,2'den %8,2'ye çıktığı görülmüştür. Bunun yanında hastanede üç yıl içinde imipenem ve meropenem kullanım oranı ise yine %50'ye yaklaşmıştır. Bu oranın üç yıllık kullanımı kapsamış olması, diğer yıllara ait verilere ulaşılamaması çalışmamızın bir eksikliği olsa da dikkat çekicidir. Aynı zamanda Acinetobacter enfeksiyonlarında karbapenemlerin efektif tedavi sağlaması nedeniyle bu ajanların artan suş sayısına karşı fazlalaşan kullanımı söz konusu olacağından ve farklı klinik tablolardan ayırt edilememesi çalışmanın eksik yanlarındandır. Ancak izole edilen suşların genotipik benzerliklerinin olmaması, bu suşların çapraz kontaminasyondan kaynaklanmadığını düşündürmüştür[8]. Bu nedenle bu suşların izolasyon sıklığındaki artışın karbapenem kullanımından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir[3].

Tablo 4. PFGE çalışılan 6 suşun antibiyotik direnç oranları

Antibiyotik [n=6]	Direnç*[R]
SAM(Ampisilin/Sulbaktam)	6
CAZ (Seftazidim)	6
GM (Gentamisin)	4
AN (Amikasin)	2
FEP (Sefepim)	6
CIP (Siprofloksasin)	6
LVX (Levofloksasin)	6
IPM (İmipenem)	6
MEM (Meropenem)	6
TZP (Piperasilin Tazobaktam)	6
TE (Tetrasiklin)	5
SXT (Trimetoprim Sulfametoksazol)	3
CL (Kolistin)	0
TG (Tigesiklin)	4
SCF (Sefoperazon Sulbaktam)	5

*Orta duyarlı suşlar dirençli olarak kabul edilmiştir.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki çalışmamızda da saptadığımız gibi Acinetobacter suşları en fazla hastanelerin yoğun bakım ünite (YBÜ)'lerinden yatan hastalarda sıklıkla izole edilmiştir[10-11-12]. Çalışmamızda izole edilen A.baumannii suşlarının büyük çoğunluğu yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilmiştir. Bu türler hastanede yatan hastalarda tüm klinik örneklerde izole edilmekle birlikte en sık izole edildiği yerler solunum sistemi ve yara yeri infeksiyonlarıdır[13-14-15-16]. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak Acinetobacter suşları en sık solunum sistemi, ikinci sıklıkta ise kan örneklerinden izole edilmiştir.

Acinetobacter enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli problem çoğul dirençli suşların sayısında artma ve bunun sonucunda tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerinin azalmasıdır[17]. Çalışmada kullanılan suşlar, betalaktamlara, kinolonlara tamamen dirençliydi. Kolistine ise hepsi duyarlıydı. Literatürde imipenem %15-78, meropenem %36.3-55 olarak saptanmış-

tır[18-19-20]. Bu çalışmada tespit edilen imipenem direnci literatürle uyumlu ancak meropenem direnci oldukça yüksek saptanmıştır. Hastanelerde meropenem kullanımının akılcıl olması gerekliliğini akla getirmiştir.

Çalışmamızda duyarlılık belirtmek için oldukça az suş bulunmaktadır. Aynı zamanda genotipik tiplendirmek için daha fazla suş ile çalışma tekrarlanırsa konuyla ilgili daha fazla bilgi alınabilir. Biz kısıtlı zaman diliminde acilen bir çözüm oluşturmak için kısıtlı imkanlarla çalışmayı tamamladık.

Sonuç olarak kısıtlı antibiyotik kullanımı, antibiyotiklerin gerekli ve yerinde kullanımı dirençli suşların hastanelerde izolasyonunu azaltacağı, kontrol edilemeyen kullanımda ise bu suşların artmasının yanında daha fazla dirençli suşların gündeme geleceği kanaatindeyiz.

Çıkar Çakışması ve Finansman Beyanı

Bu çalışmada çıkar çakışması ve finansman destek alındığı beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

1. Roberts SA, Findlay R, Lang SDR. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii in an intensive care burns unit. J Hos Inf 2001;48(3):228-32.
2. Chastre J. Infections due to Acinetobacter baumannii in the ICU. Semin Resp Crit Care Med 2003;24(1):69-77.
3. Ogutlu A, Guclu E, Karabay O, Utku AC, Tuna N, Yahyaoglu M. Effects of Carbapenem consumption on the prevalence of Acinetobacter infection in intensive care unit patients. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;13:7.
4. Young LS, Sabel AL, Price CS. Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infection in a surgical intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 2007;28:1247–1254.
5. Unal S, Garcia-Rodriguez JA. Activity of meropenem and comparators against Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. Diagn Microbiol Infect Dis 2005;53:265–271.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement (M100-S23). Wayne, PA: CLSI; 2013. p. 1-205.
7. Durmaz R, Otlu B, Koksal F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of Acinetobacter baumannii, Escherichia coli and Klebsiella spp. Jpn J Infect Dis 2009;62(5):372-7.
8. Tenover FC, Arbeit RD, Goening RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9.
9. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant Acinetobacter species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence, interinstitutional spread and relation to antibiotic usage. Clin Infect Dis 2000;31:101–6.
10. Özdem B, Gürelik FÇ, Çelikbilek N, Balıkçı H, Açıkgöz ZC. Çeşitli klinik örneklerden 2007-2010 yıllarında izole edilen Acinetobacter türlerinin antibiyotik direnç profili. Mikrobiyol Bul 2011;45(3):526-34.
11. Balcı M, Bitirgen M, Kandemir B, Arıbaş ET, Erayman İ. Antibiotic Susceptibility of Nosocomial Acinetobacter baumannii Strains. Ankem Derg 2010;24(1):28-33.
12. Mansur A, Kuzucu Ç, Ersoy Y, Yetkin F. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde 2008 yılında yatan hastalardan izole edilen Acinetobacter suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Ankem Derg 2009;23(4):177-81.
13. Çolpan A, Güngör Ş, Baykam N, Dokuzoğuz B. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Acinetobacter suşlarının antibiyotik direnç durumlarının araştırılması. İnfeksiyon Derg 2002;16:55-8.
14. Winn WJ, Allen S, Janda W et al. Then on fermentative Gram-negative bacilli. In: Winn WJ, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G (eds): Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed." Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. p. 303-91.
15. Aral M, Doğan S, Paköz NİE. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Acinetobacter baumannii suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. Ankem Derg 2010;24(4):215-9.
16. Aygun G, Dikmen Y, Mete B ve ark. Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen Acinetobacter baumannii kökenlerinin antibiyotik duyarlılığı. Ankem Derg 2002;16:85-8.
17. Maragakis LL, Perl TM. Acinetobacter baumannii: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. Clin Infect Dis 2008;46(8):1254-63.
18. Taşova Y, Yaman A, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH. Nozokomiyal Acinetobacter enfeksiyonları. Flora Derg 1999;4(3):170-6.
19. Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S, İnmez E, Dinç G, Özbakkaloğlu B. Yoğun bakım ünitesi ve diğer ünitelerde yatan hastalardan izole edilen Acinetobacter baumannii suşlarında in-vitro antibiyotik direnci. Ankem Derg 2005;19(3):115-8.
20. Bacakoğlu F, Korkmaz Ekren P, Taşbakan MS ve ark. Solunumsal yoğun bakım ünitesinde çoklu antibiyotik dirençli Acinetobacter baumannii enfeksiyonu. Mikrobiyol Bul 2009;43(4):575-85.

How to cite this article:
Yanık K, Güçkan R, Bilgin K, Arslan M, Yüksel E. Research of Acinetobacter Baumannii Isolation From Clinical Samples in Second Step Hospital. J Clin Anal Med 2015;6(suppl 1): 42-5.