



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN VE SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ACINETOBACTER BAUMANNII SUŞLARININ FENOTİPİK VE
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. PINAR BEKDEMİR

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2011



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN VE SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ACINETOBACTER BAUMANNII SUŞLARININ FENOTİPİK VE
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. PINAR BEKDEMİR

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof.Dr. AYŞEGÜL KARAHASAN

İSTANBUL 2011

ÖN SÖZ

Mikrobiyolojinin büyüdü dünyasına adım attığım uzmanlık eğitimim sürecinde, yetişmemde emeği geçen başta tez danışmanım Prof. Dr. Ayşegül Karahasan olmak üzere değerli hocalarıma ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Dr. Pınar Bekdemir

ÖZET

Acinetobacter baumannii, dünya genelinde hastane enfeksiyonlarının en sık etkenlerinden biridir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) gelişen çoklu antibiyotiğe dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarının klinik öneminin bilinmesine karşın, bakterinin virulans özelliklerine dair bilgimiz henüz temel düzeydedir. *Acinetobacter baumannii*'nin kapsül, lipopolisakkarit tabaka ve dış membran proteini Omp A dışında, peptidleri hidrolize ederek doku hasarı oluşumunda etkili olan jelatinaz enzimini üretebildiği ve demirin sınırlı olduğu enfeksiyon bölgelerinde siderofor üreterek üreme yeteneğine sahip olduğu bilinmekte, cansız yüzeylerde uzun süre hayatta kalabilme özelliği biyofilm üretimi ile ilişkili bulunmaktadır.

Çalışmamızda 2005-2010 yılları arasında yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen *A. baumannii* kökenleri ile iki çalışma grubu oluşturulmuştur. Derin trakeal aspirat (DTA) ve kan kültürlerinde üreme olan 41 hastanın DTA ve kan kökenleri ile sadece DTA'da üreme olan 40 hastanın kökenleri antibiyotik duyarlılıkları ve virulans faktör üretimleri (biyofilm üretimi, jelatinaz üretimi ve sınırlı demir içeren ortamda üreme yeteneği) bakımından karşılaştırılmış; aynı hastaya ait kökenler *Repetitive Extragenomic Palindromic PCR* (REP-PZR) ile genotiplendirilerek hastaların DTA ve kan kökenleri arasında klonal ilişki araştırılmıştır. Tüm kökenler çoklu ilaca dirençli olup, sınırlı demir içeren ortamda üreyebilmişlerdir. Kan kökenlerinde biyofilm üretimi (%61), DTA kökenlerinden (%47.5-51) daha yüksek oranda saptanmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kökenlerin sadece %11'inde jelatinaz üretimi saptanmış olup, örnek cinsine göre bir farklılık gözlenmemiştir. Kırk bir hastada DTA ve kandan izole edilen kökenlerin (n=82) bant profilleri birbirleriyle karşılaştırıldığında 32 hastada kökenlerin birbiriyle aynı, 9 hastada ise kökenlerin farklı profil sergilediği gözlenmiştir. REP-PZR ile aynı bant profilini sergilediği halde, 4 hastanın DTA ve kan kökenlerinde, biyofilm ve jelatinaz üretimi farklı saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamız, kan ve DTA örneklerinden izole edilen *A. baumannii* kökenlerinin virulans faktörleri üretimi açısından anlamlı bir farklılık göstermediğini ortaya koymuştur. Ayrıca REP-PZR ile elde ettiğimiz sonuçlar *A. baumannii*'nin YBÜ'de poliklonal enfeksiyona yol açabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *A. baumannii*, REP-PCR, biyofilm, jelatinaz, siderofor

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is one of the most frequent pathogen triggering hospital acquired infection, worldwide. Although the clinical importance of *A.baumannii* multidrug resistant infection in intensive care unit (ICU) has been well known, the knowledge of *Acinetobacter* virulence factors is still at an elementary stage. In addition to already known properties of *A.baumannii* such as the capsule, lipopolysaccharide and outer membran protein, *A. baumannii*'s ability to produce the gelatinase enzyme which is effective in tissue damage by hydrolising peptides, ability to grow under iron-deficient conditions, are also defined as virulence factors. Ability of *A. baumannii* to survive on dry surfaces for prolonged periods has been explained with its ability to form biofilms.

In this study *A.baumannii* strains isolated from patients in the intensive care unit during the period 2005-2010 were divided into two groups. First group included patients (n:41) with *A. baumannii* strains isolated from both deep tracheal aspirate (DTA) and blood cultures and the second group (n:40) where *A. baumannii* was isolated from DTA only. Two groups have been compared to each other in terms of their antibiotic susceptibility and virulence factors (biofilm production, gelatinase production and the ability of growth under iron limiting conditions), furtherly *A.baumannii* strains of the same patient have been genotyped in order to search the clonal relationship between DTA and blood isolates in the first group. All isolates were multi drug resistant and were able to grow under iron-deficient condition. Even though the biofilm production rate of blood isolates has been found higher than that of DTA isolates either from same patients or from patients with DTA isolates only, the difference was not statistically significant. Gelatinase production has been detected only in 11% of isolates and there was no difference by type of specimen. When band profiles of DTA and blood strains from 41 patients (n=82) were compared to each other; 32 patients strains from different samples were same, whereas 9 patients strains different profile were exhibited. Although in 4 patients DTA and blood strains were exhibiting the same band profile, biofilm formation and gelatinase production were different. As a result this study found no statistically significant difference in virulence factors between DTA and blood isolates. Furtherly REP-PCR results suggest that *A. baumannii* could lead to polyclonal infections in ICU.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, REP-PCR, biofilm, gelatinase, siderophore iii

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFALAR</u>
Ön Söz	i
Özet	ii
İngilizce Özet(Abtract).....	iii
İçindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	v
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	3
2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.3 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi ve Klinik Önemi.....	6
2.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> Enfeksiyonlarının Patogenezi.....	9
2.5. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Virulans Faktörleri.....	11
2.5.1.Hücre yüzeyi ile ilişkili virulans faktörleri.....	11
2.5.2. Hücre dışına salgılanan virulans faktörleri.....	14
2.6. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de demir alım mekanizmaları.....	16
2.7.Biyofilm ve <i>Acinetobacter baumannii</i> Enfeksiyonlarındaki Yeri.....	17
2.8. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	21
2.9. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri.....	22
3.Gereç ve Yöntem.....	24
3.1.Gereçler.....	24
3.1.1.Standart Kökenler.....	24
3.1.2.Besiyerleri.....	24
3.1.3.Kimyasal Maddeler.....	24
3.1.4.Antibiyotik Diskleri.....	25
3.1.5.PCR Malzemeleri.....	25
3.1.6.Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri.....	26
3.2.Yöntemler.....	28
3.2.1.Çalışma Kökenleri.....	28
3.2.2.Jelatinaz Üretiminin Belirlenmesi.....	29
3.2.3.Sınırlı Demir İçeren Ortamda Üremenin Belirlenmesi.....	30
3.2.4.Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi.....	31
3.2.5.Kökenlerin REP-PZR İle Genotiplendirilmesi.....	32
3.2.6.Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	33
3.3.İstatistiksel Değerlendirme.....	33
4.Bulgular.....	34
5.Tartışma ve Sonuç.....	39
6.Kaynaklar.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP	:Amplified fragment Lengths Polymorphism
AP-PCR	:Arbitrarily Primed PCR
ATCC	:American Type Culture Collection
CDC	:Centers for disease control and prevention
CLSI	:Clinical Laboratory Standards Institute
DIP	:2,2-dipiridil
DTA	:Derin trakeal aspirat
Fur proteini	:Ferric iron uptake regulator proteini
LPS	:Lipopolisakkarit
PFG E	:Pulsed field jel elektroforezi
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD-PCR	:Randomly Amplified Polimorphic DNAs PCR
REP-PCR	:Repetitive extragenomic palindromic PCR
YBÜ	:Yoğun bakım ünitesi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Acinetobacter baumannii özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen ve en sık solunum yolu enfeksiyonu olmak üzere; kan dolaşımı, idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açabilen fırsatçı bir patojendir [1].

Acinetobacter baumannii, merkezlere göre değişmekle birlikte, hastane kaynaklı pnömoni etkenleri arasında *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile birlikte ilk sıralarda izole edilen türlerden biridir [2]. Ülkemizde 12 hastanede yapılan çok merkezli bir çalışmada, *Acinetobacter* türlerinin solunum cihazı ilişkili pnömoni etkenleri arasında ilk sırada yer aldığı gösterilmiştir [3].

Acinetobacter baumannii'ye bağlı alt solunum yolu enfeksiyonu gelişiminin ilk basamağı, orofarengeal bölgenin kolonizasyonudur. YBÜ'lerde tedavi gören hastaların bağışık yanıtındaki yetersizlik, mukosilyer etkinliğin bozulması ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi etkenler, orofarengeal floranın silinmesine yol açarak, bu bölgenin gram negatif bakteriler ile kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Orofarengeal bölgede kolonize olan mikroorganizmaların aspirasyonu sonucu alt solunum yolu enfeksiyonları gelişmektedir [4].

Acinetobacter baumannii enfeksiyonları arasında ikinci sıklıkta görülen kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık kaynaklarından biri, solunum yolu enfeksiyonlarıdır [5]. Pnömoni sırasında alveolar alanda çoğalan bakteriler doku hasarına yol açarak kan dolaşımına yayılabilmektedirler [6].

Acinetobacter baumannii'nin 1970'li yıllardan beri hastane enfeksiyonlarına yol açtığı bilinmesine karşın, virulans özelliklerine ilişkin literatürde yer alan veriler sınırlıdır. *Acinetobacter* türlerinin yaklaşık üçte biri bakteriyi fagosit ik hücrelerin sitotoksitesinden koruyan eksopolisakkarit yapıda bir kapsül üretmektedir. Lipopolisakkarit tabaka ile birlikte eksopolisakkarit kapsül, bakterinin komplemanın litik etkinliğine direnç göstermesinden sorumludur [1]. Bir dış membran porin proteini olan OmpA *Acinetobacter baumannii* patogeneğinde epitel hücreleri ile etkileşim, konak

hücrelerinin apoptozunun tetiklenmesi ve kan dolaşımına yayılım gibi çok yönlü etkilere sahip olduğu bilinmektedir [7]. Bakterinin salgıladığı enzimlerden fosfolipaz C epitel hücrelerine sitotoksik etki göstererek, esteraz enzimi ise lipit dokulara hasar vererek virulansta etkili olmaktadır [1]. *Acinetobacter baumannii*'nin hastane enfeksiyonlarına yol açmasında etkili olan cansız yüzeylerde uzun süre hayatta kalabilme özelliği, biyofilm üretimi ile ilişkili bulunmaktadır [8]. Bakterinin peptidleri hidrolize ederek doku hasarı oluşumunda etkili olan jelatinaz enzimini üretebildiği ve demirin sınırlı olduğu vücut bölgelerinde, siderofor molekülleri sayesinde demir alım yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir [1].

Biyofilm üretiminin kistik fibroz hastalarında gözlenen *Pseudomonas aeruginosa* kolonizasyonunda, jelatinaz üretiminin özellikle enterokok ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli olduğu bilinmektedir [9-12]. Ancak klinik *A. baumannii* kökenlerinde biyofilm ve jelatinaz üretimi ile sınırlı demir içeren ortamda üreme yeteneği sıklığı ve bu virulans faktörlerinin enfeksiyon bölgeleri ile ilişkisi henüz netlik kazanmamıştır.

Çalışmamıza; 2005-2010 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi dahili ve cerrahi yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen *A. baumannii* kökenleri dahil edilerek iki çalışma grubu oluşturulmuştur:

- i. Aynı hastanın derin trakeal aspirasyon(DTA) ve kan kültüründe üreyen kökenler
- ii.Sadece DTA örneğinde üreyen kökenler

Birinci gruptaki kökenler *Repetitive extragenomic palindromic PCR* (REP-PZR) ile genotiplendirilerek aynı hastalara ait solunum yolu ve kan örneğinden izole edilen kökenler arasında klonal ilişki araştırılmıştır. Her iki grupta yer alan kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları ve virulans faktör üretimleri incelenmiştir. Tüm kökenlerde biyofilm üretimi, jelatinaz üretimi ve sınırlı demir içeren ortamda üreme yeteneği araştırılarak, bu virulans faktörlerinin oranları ve enfeksiyon bölgesi ile virulans faktör üretimi ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Acinetobacter cinsinin keşfi 19.yüzyılın sonlarında Morax ve Axenfeld adlı iki bilim insanının konjunktivit etkeni olarak gram negatif diplobasiller izole etmelerine dayanmaktadır. Bir süre Morax-Axenfeld diplobasilleri olarak anılan bu mikroorganizma, ilerleyen yıllarda pek çok farklı adla anılmıştır. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak; boyutu nedeniyle *Micrococcus*, diplokok görünümü ile *Neisseria gonorrhoeae*'ye benzediği için taklitçi anlamında *Mima*, şeffaf kolonileri nedeniyle renksiz anlamına gelen *Achromobacter* ve nitratı indirgememesi nedeniyle *Bacterium anitratum* bakteriyeye verilen adlardan bazılarıdır [13].

Yunanca *akinetos* sözcüğünden türetilen, hareketsiz anlamına gelen günümüzdeki adına ise 1954'de Brisou ve Pre'vot'in *Achromobacter* cinsinde yer alan hareketsiz mikroorganizmaları, hareketli olanlardan ayırması sonucu kavuşmuştur [1].

Renkli bir taksonomik geçmişe sahip olan *Acinetobacter* cinsinde, *Acinetobacter calcoaceticus* bir dönem *Neisseriaceae* ailesinde sınıflandırılmıştır. Hibridizasyon çalışmalarının sonucunda ise *Acinetobacter* cinsi, cins içinde yer alan tüm türleri ile birlikte *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilişkili mikroorganizmaları içeren yeni bir ailede, *Moraxellaceae* ailesinde sınıflandırılmıştır [14].

Bakterinin tarihçesinde 1986 yılında Bouvet ve Grimont'un bu cins içinde DNA-DNA hibridizasyonuna dayalı olarak 12 DNA grubu, bir başka deyişle genomik tür tanımlaması, bir diğer kırılma noktasını oluşturmuştur [15]. Jeanjean, Tjenberg, Ursing ve Nishimura isimli araştırmacılar da 31'e ulaşan genomik tür keşfine katkıda bulunmuşlardır. Bu türlerden 18 tanesi adlandırılmış, gerisi sadece numaralandırılmıştır.

Acinetobacter cinsi içinde *A. calcoaceticus* ve *A. baumannii* ile genomik tür 3, 13TU, 13TU benzeri tür ve 1 ile 3 arasındaki tür genotipik ve fenotipik özellikleri bakımından benzerlikleri nedeniyle *A.calcoaceticus-baumannii* complex adı altında sınıflandırılmıştır [16].

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex; hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlardan en sık izole edilen *A. baumannii*, genomik tür 3 ve genomik tür 13TU ile birlikte toprak ve sudan izole edilen *A. calcoaceticus* türünü de içermektedir. Kompleks üyelerinin epidemiyolojik ve antimikrobiyallere duyarlılık farklarını gözardı eden bu tanım, klinik anlamda yanıltıcı bulunmakta, kompleks tanımı yerine klinik önemi olan 3 türün dahil olduğu *A. baumannii* grup tanımı önerilmektedir [17].

Günümüzde bu cins içinde yer alan bakterilerin tür adları ve numaraları tabloda gösterilmiştir [17].

Tablo 1. *Acinetobacter* cinsi içinde yer alan bakterilerin tür adları ve genomik tür numaraları.

Tür adı	Genomik tür	Tür adı	Genomik tür
<i>A. calcoaceticus</i>	1	<i>A. ursingii</i>	-
<i>A. baumannii</i>	2	<i>A. venetianus</i>	-
<i>A. haemolyticus</i>	4	-	1 ile 3 arasındaki tür
<i>A. junii</i>	5	-	3
<i>A. johnsonii</i>	7	-	6
<i>A. lwoffii</i>	8,9	-	10
<i>A. radioresistens</i>	12	-	11
<i>A. baylyi</i>	-	-	13TU*
<i>A. bouvetii</i>	-	-	13TU benzeri
<i>A. gernerii</i>	-	-	14BJ**, 14TU
<i>A. grimontii</i>	-	-	14BJ
<i>A. parvus</i>	-	-	15BJ
<i>A. schindleri</i>	-	-	15TU
<i>A. tandoii</i>	-	-	16
<i>A. tjenbergiae</i>	-	-	17
<i>A. townneri</i>	-	-	

*TU: Tjenberg ve Ursing **BJ: Bouvet ve Jean Jean

2.2. *Acinetobacter baumannii*'nin Mikrobiyolojik Özellikleri

Acinetobacter türleri sporsuz, kimi zaman kapsüllü, 35-37°C'de üreyen, hareketsiz, karbonhidratları fermente etmeyen gram negatif bakterilerdir [13].

İdeal olarak aerop ortamda ürerler. Oksidaz negatif, indol negatif katalaz pozitif ve nitratları indirgemeyen mikroorganizmalardır. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex içinde yer alan türler, diğer türlerin aksine

sakkaroliktir ve Hugh Leifson oksidasyon fermentasyon buyyonda yer alan karbonhidratların çoğundan asit oluşturabilirler [18].

Bakterinin gram boyama morfolojisi yaşam döngüsündeki evresine göre değişkenlik gösterir. Üremenin logaritmik evresinde basil, durağan evresinde ise kokobasil-diplokok şeklinde görülür. Bu nedenle ilk izolasyondan elde edilen kültürler ile sıvı besiyerinde bulunan taze kültürler kok-kokobasil, subkültürler ile katı besiyerindeki eski kültürler ise basil görünümündedir [13].

İnsandan izole edilen *Acinetobacter* türleri klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan koyun kanlı agar, triptik soy agar gibi zengin besiyerlerinde 37°C ısıda inkübasyon ile ürerler. *Acinetobacter* cinsi bakteriler koyun kanlı agarda 24. saatin sonunda 0,5-2mm çapında saydam veya mat, yüzeyden kabarık S tipi koloniler oluşturur. *Acinetobacter haemolyticus* koyun kanlı agarda hemolize neden olurken, diğerleri hemoliz yapmaz. *Acinetobacter lwoffii* dışındaki *Acinetobacter* türlerinin çoğu MacConkey agarda üreyebilir ve hafif pembemsi renkte koloniler oluştururlar. Glikozdan asit oluşturabilen *A. baumannii* gibi türler tirozin içeren kalp infüzyon agarda ve glukoz katkılı kanlı agarda kahverengi koloniler oluştururlar [18].

Acinetobacter türlerinin ayırımında kullanılan fenotipik tanımlama şeması üreme derecesi, hemoliz oluşturma, jelatin hidrolizi, glukozdan asit oluşturma ve farklı karbon kaynaklarının asimilasyonuna dayanmaktadır [15]. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında zahmetli ve uzun sürede sonuç veren bu geleneksel fenotipik testlerin yerini, karbon kaynaklarının asimilasyonuna dayanan ticari otomatize ve yarı otomatize tanımlama sistemleri almıştır. *Acinetobacter* türlerinin genotipik yöntemler ile tanımlanmasında ise tüm genomun *Amplified Fragment Lengths Polymorphism* (AFLP) analizi, tRNA parmak izi, 16SrDNA dizisinin *Restriction Fragments Lengths Polymorphism* (RFLP) ile analizi, ribotipleme, oligonükleotid probu ile hibridizasyon ve özgül bölgelerin DNA dizi analizi (16S rDNA, 16-23S rDNA, gyr B, rec A, rpo B, efp) kullanılabilir [1].

2.3. *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi ve Klinik Önemi

Acinetobacter cinsi bakteriler; 1970 öncesinde özellikle cerrahi girişim sonrası enfeksiyonlara ve YBÜ'de yatan hastalarda idrar yolu enfeksiyonlarına yol açıyor iken, günümüzde tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların %5-10'undan sorumlu olup sıklıkla solunum yolu enfeksiyonlarına yol açmaktadırlar [1, 19].

Amerika Birleşik Devletleri'nin sürveyans verilerinin incelendiği bir çalışmada; hastane kaynaklı pnömoniden izole edilen *Acinetobacter* türlerinin oranının 1986'da %4 iken, 2003 yılında %7'ye yükselerek anlamlı oranda artış gösteren tek gram negatif bakteri olduğu bildirilmektedir [19].

Acinetobacter baumannii, hastane kaynaklı pnömoni etkenleri arasında ilk sıralarda izole edilen türlerden biridir [2]. Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışma *Acinetobacter* cinsinin özellikle solunum cihazı ilişkili pnömonide en sık etken olduğunu göstermektedir [3].

Acinetobacter baumannii YBÜ'lerde endemik enfeksiyonlara yol açmasının yanısıra salgınlara da yol açabilmektedir. Bakterinin salgınlara yol açabilmesi kuru ortamlarda uzun süre canlılığını sürdürebilmesi ve antibiyotik direnci ile ilişkili bulunmaktadır. *Acinetobacter baumannii* salgınlara yol açmış kanıtlanmış bazı kaynaklar arasında hasta yatakları, resustasyon çantaları, solunum cihazı boruları, eldivenler, yastıklar, bilgisayar klavyeleri, tansiyon aleti manşeti, cep telefonları ve parenteral beslenme solüsyonları sayılabilir [20].

Acinetobacter baumannii ile kolonizasyon ve enfeksiyon için risk faktörleri uzamış hastanede yatış süresi, YBÜ'de yatış, mekanik solunum cihazı desteği, enteral beslenme, 3.kuşak sefalosporin kullanımı, santral venöz kateterizasyon gibi girişimsel uygulamalar ile geçirilmiş cerrahi ve eşlik eden ciddi hastalıklardır [5].

Acinetobacter baumannii'nin etken olduğu pnömoni diğer bir çok gram negatif bakterinin etken olduğu pnömonilerden klinik olarak ayırdedilemez. Multilobar karakterde, efuzyon ve bronkoplevral fistül ile komplike olabilen pnömonilere yol açar. Ateş, lökositoz, pürülan balgam, radyografi veya

bilgisayarlı tomografide yeni gelişen enfiltrat etkenin mikrobiyolojik incelenmesini gerektirmektedir. Pnömoninin en ciddi formu eşlik eden hastalıklar, genel durum bozukluğu ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi gibi risk faktörleri olan hastalarda şok ve sepsise yol açabilen bakteriyemik pnömonidir [1].

Acinetobacter baumannii solunum yolu enfeksiyonlarından sonra en sık kan dolaşımı enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Bu enfeksiyonlar polimikrobiyal olabilmekte, bakteriye en sık olarak koagülaz negatif stafilokoklar ve enterokoklar eşlik etmektedir [21].

Acinetobacter baumannii ile diğer gram negatif etkenlere bağlı kan dolaşımı enfeksiyonları karşılaştırıldığında YBÜ'de tedavi görme ve mekanik ventilasyon *A. baumannii* ile enfekte hastalarda anlamlı olarak daha sık görülmüştür [22]. *Acinetobacter baumannii* bakteriyemisinin kaynaklarının en sık intravenöz kateterler ve solunum sistemi olduğu belirtilmekte ancak bakteriyemilerin çoğunda kaynak belirlenememektedir [5].

Bakteriyemi hastane enfeksiyonları arasında en yüksek mortaliteye sahip olan enfeksiyondur. *Acinetobacter baumannii* ile gelişen enfeksiyonun ciddiyeti, enfeksiyon bölgesi ve hastanın altta yatan hastalıkları ile ilişkili olarak bağışıklık sisteminin durumuna bağlıdır. *P.aeruginosa* ve *Candida* türleri ile gelişen bakteriyemilerin mortalitesinden daha düşük olmakla beraber *A. baumannii* bakteriyemisinin mortalitesi çeşitli çalışmalarda %26-68 oranında bildirilmiştir. Ancak *Acinetobacter* enfeksiyonları altta yatan ciddi hastalıklara sahip hastalarda gözleendiği için, bu enfeksiyonun bağımsız bir risk faktörü olup olmadığı konusunda farklı görüşler ortaya konmaktadır [23].

Acinetobacter baumannii en sık hastane enfeksiyonlarına yol açmakla birlikte, 1990'lı yıllardan beri toplum kaynaklı enfeksiyon olguları bildirilmektedir. Bu olgular özellikle ülkemiz de dahil olmak üzere Avustralya, Kuveyt, Tayvan, Tayland, Papua Yeni Gine gibi tropikal veya subtropikal iklim kuşağında yer alan ülkelerde görülmektedir. Bu enfeksiyonların çoğu pnömonidir. Özellikle diabetes mellitus, alkolizm, kronik obstruktif akciğer hastalığı gibi eşlik eden hastalıkların ve ağır sigara içiciliğinin varlığında geliştiği bilinmektedir. Enfeksiyonlar aynı zamanda yılın en sıcak ve nemli

aylarında özellikle nisan-ekim ayları arasında yoğunlaşmaktadır. Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan daha yüksek mortaliteye sahiptir, mortalitesi %40-64 arasında değişmektedir. Süregelen küresel iklim değişikliği nedeniyle toplum kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonlarının, dünyanın diğer bölgelerinde daha sık ortaya çıkma tehlikesi olduğu bildirilmektedir [24].

Acinetobacter baumannii YBÜ'lerde salgınlara yol açması, toplum kaynaklı mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olması ve afetler sırasında sıklığının artmasının yanı sıra çoklu antibiyotik direnci ile de büyük bir klinik önem kazanmaktadır. Çoklu ilaca dirençli kökenler son on yılda belirgin bir biçimde artmıştır. Çoklu ilaç direnci için kullanılan standart bir tanım olmamakla beraber, en sık tercih edilen tanım aksi halde tedavi seçeneği olabilecek 5 antimikrobiyal sınıftan 3 veya daha fazla sayıda antimikrobiyal sınıfa direnç bulunmasıdır. Antipseudomonal sefalosporinlerden seftazidim ve sefepim, karbapenem grubundan imipenem ve meropenem, beta laktamaz inhibitörü ampicilin-sulbaktam, florokinolonlardan siprofloksasin ve levofloksasin ile aminoglikozidlerden gentamisin, tobramisin, ve amikasinin bulunduğu antibiyotik sınıfları direnç bakımından değerlendirilir [24-25].

Avrupa antimikrobiyal direnç surveys sistemi verileri 2000-2003 yılları arasında Türkiye'den izole edilen 779 *A. baumannii* kökeninde antimikrobiyal direnç sıklıklarını seftazidim için %84, sefepim için %76, siprofloksasin için %79, piperasilin için %82, tobramisin için %57, meropenem %42, imipenem için %48 olarak bildirmektedir [26].

Dünyanın pek çok ülkesinden toplanan kökenlerin dahil edildiği antimikrobiyal surveys programı *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (MYSTIC) 1997-2000 verilerine göre *A. baumannii* enfeksiyonlarında değerli bir tedavi seçeneği olan meropenem ve imipenemin duyarlılığı genel olarak yüksek (%97-100, %93-100) saptanırken Türkiye'nin (%66, %62) en düşük duyarlılık oranına sahip olduğu ortaya konmuştur [27]. 12 ülkenin katıldığı 2006 yılı MYSTIC verileri ise meropenem ve imipenem direncinin Avrupa genelinde (%43.4, %42,5) arttığını göstermektedir [28]. Türkiye'de gram negatif hastane kaynaklı kökenlerin beta-laktam antibiyotiklere direncinin araştırıldığı çok merkezli HİTİT çalışması 2005

verileri *A. baumannii* kökenlerinin en duyarlı bulunduğu sefaperazon-sulbaktama %41.3, imipeneme %52.2 direnç saptanmıştır; 2007 yılı HİTİT 2 verileri SCF direncinin %52, imipenem direncinin ise %55'e yükseldiğini göstermektedir [29-30].

2.4. *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonlarının Patogenezi

Acinetobacter baumannii ile kolonizasyon ve enfeksiyon cerrahi girişim ve tıbbi alet kullanımı ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle endotrakeal tüp, damar içi, ventriküler veya üriner kateter kullanımı gibi işlemlerin uygulandığı YBÜ'lerde daha sık görülmektedir [31].

Acinetobacter baumannii'nin en sık enfeksiyona neden olduğu vücut bölgesi olan alt solunum yollarında normal konak direnci anatomik hava yolu bariyerleri, üst solunum yolundaki silyalı mukoza ve öksürük refleksinin dahil olduğu mekanik savunma ile alveolar makrofajlar, polimorf nüveli lökositler, immunglobulin, laktoferrin, kompleman gibi hücresel ve humoral bağışıklık sistemi elemanlarından oluşur [32-33].

Alt solunum yolu enfeksiyonu en sık orofarengeal mikroorganizmaların aspirasyonu sonucu gelişir. Plevral bir enfeksiyondan devamlı yayılım, kontamine tıbbi cihazlar ile aerosollerin inhalasyonu ve kateter ilişkili bakteriyemiden hematogen yol ile yayılım bakterilerin alt solunum yollarına diğer ulaşma mekanizmalarıdır [32].

Acinetobacter baumannii ye bağlı solunum yolu enfeksiyonlarında ilk basamak orofarengeal bölgenin kolonizasyonudur. YBÜ'lerde tedavi gören hastaların yarısından fazlası gram negatif bakteriler ile kolonize olmaktadır. Yüksek oranlardaki bu kolonizasyondan patojenlerin temizlenme kapasitesindeki azalma ile mikroorganizmaların artmış aderansı sorumludur [32].

Konağın bağışıklık yanıtındaki azalma, epitel hücrelerinde hasar, mukosilyer etkinliğin bozulması ve fibronektinin azalması bakterinin aderansının artmasına yol açmaktadır. Fibronektin ağızda normal flora üyesi gram pozitif bakteriler için bir reseptör görevi görürken, gram negatif bakterilerin kolonizasyonunu önlemektedir. Bu glikoprotein azalması ve

YBÜ'lerde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, orofarengial floranın silinmesine yol açarak, antibiyotiklere dirençli patojenlerin kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır [32-33].

İnvaziv mekanik solunum desteği alan hastalarda uygulanan endotrakeal entübasyon bakterilerin alt solunum yollarına ulaşması için bir kanal oluşturmasının yanı sıra, hastanın öksürük refleksinin baskılanmasına, mukosilyer etkinliğin ve trakeal epitel yüzeyinin bozulmasına yol açarak pnömoni gelişimine zemin hazırlamaktadır. Ek olarak YBÜ'de yatan pek çok hastada görülen azalmış mide asit sekresyonu aşırı bakteriyel üremeye neden olarak mide içeriğinin reflusu ile mikroorganizmaların orofarenksten aspire edilmesine yol açabilmektedir [34].

Akciğerlere nötrofil göçü ,nitrik oksit artışı ve IgA salgılanması solunum yolu enfeksiyonlarına karşı konak savunmasını başlatmak için önemli mekanizmalardır. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar *A. baumannii*'nin intranasal veya intratrakeal yolla verilmesinin ardından akciğerlere hızlı nötrofil göçü geliştiğini göstermiştir. Nötropenik hastalarda enfeksiyon daha akut ve letal seyretmektedir. Nötrofilerin *A. baumannii* pnömonisine karşı konak yanıtında oynadıkları önemli rol, enfeksiyonun bağışıklığı baskılanmış hastalardaki sıklığını ve şiddetini açıklamaktadır [35].

Hayvan çalışmaları CD14 ve Toll benzeri reseptör 4 eksikliğinin bakteriyemi gelişimine yol açtığını göstermiştir. *Acinetobacter baumannii* patogeneğinde CD14 ve TLR 4'ün lipopolisakkarit (LPS) tabakaya karşı oluşan duyarlılıkta önemli rol oynadığı ve bakterinin akciğerlerden etkin temizlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir [36].

Acinetobacter baumannii ile gelişen kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık kaynağı solunum sistemi ile damar içi kateterlerdir. Cerrahi yara, yanık ve idrar yolları daha az sıklıkta, endokardit ise nadir saptanan kaynaklardır. Bakteriyemi episodlarının %21-70'inin kaynağı ise belirlenememektedir. Bu bakteriyemilere tanı konamamış vasküler kateter enfeksiyonları veya barsaktan bakteriyel translokasyonun yol açtığı düşünülmektedir [5].

2.5. *Acinetobacter baumannii*'nin Virulans Faktörleri

Acinetobacter baumannii YBÜ'lerde 1970'li yıllarda salgınlara yol açmaya başlamasına ve son 20 yılda giderek artan bir öneme sahip olmasına karşın, virulans faktörlerine dair bilgiler sınırlıdır [1]. *Acinetobacter baumannii* genel olarak düşük virulanslı bir mikroorganizma olarak kabul edilmekle birlikte, toplum kaynaklı, yüksek mortalite ile seyreden pnömoniler bu organizmanın bazen yüksek patojeniteye sahip olabileceğini de göstermektedir [31].

Kolonizasyon ve enfeksiyonun ilk basamağı konak savunmasını aşan bakterinin epitel hücrelerine tutunmasıdır. Bu aşamada bakterinin fimbriyaları ve biyofilm oluşturabilme yeteneği önemli bir rol oynar. Enfeksiyon süreci bakterinin çoğalarak dokulara yayılması ve dokularda hasar oluşturması ile devam eder.

Acinetobacter baumannii'nin virulans faktörlerinin bir kısmı hücre yüzeyi ile ilişkili ve hücre dışına salgılanan virulans faktörleri olmak üzere iki grupta incelenebilir.

2.5.1. Hücre yüzeyi ile ilişkili virulans faktörleri

PİLİ (Fimbriya): Bakterinin hedef dokulardaki hücrelere bağlanmasını sağlayan kısa ve düz yüzey yapılarıdır. Ayrıca nemli yüzeylerde gerçekleşen seğirme(twitching) hareketinden sorumludur.

Acinetobacter cinsi bakteriler hareketsiz olarak kabul edilip buna göre adlandırılmış olmalarına karşın, aslında seğirme hareketi kavramı ilk defa 1961 yılında, o zamanlar *Bacterium anitratum* adıyla bilinen *A. baylyi*'nin yüzey hareketini tanımlamak için kullanılmıştır.

Acinetobacter baumannii ATCC 19606 referans kökeninde swimming, swarming, sliding ve twitching hareketlerinin olmadığı bildirilmiştir [8]. Ancak yeni çalışmalar, bazı klinik kökenlerde yüzey ilişkili seğirme hareketinin varlığını ortaya koymaktadır [37].

Bakterilerin fimbriyaları aracılığı ile yüzeylere tutunduğu bilinmekle birlikte *A. baumannii*'nin tutunma mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir.

Bakterinin trakeal epitel hücrelerine tutunmasında fimbiyaların etkili olmadığı gösterilmiştir. Bakterinin eritrositlere ise ince ve uzun fimbriyaları ile bağlandığı gösterilmiştir [38]. Eritrositler fimbriya benzeri yüzey reseptörleri içerdiği için fimbriyal ve afimbriyal adezinler eritrositleri aglutine etme yeteneğine sahiptir. Adezinlerin hemaglutinasyon etkinliği ortama mannoz eklenmesi ile engelleniyorsa mannoz dirençli, devam ediyorsa mannoz duyarlı hemaglutinasyon olarak adlandırılır. İdrar yolu enfeksiyonlarına yol açan *E.coli* kökenlerinin üroepitelyal hücrelere tutunmasının mannoz dirençli hemaglutinasyon yeteneği ile ilişkili olduğu bilinmektedir. *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin fimbriya yapısı elektron mikroskopisi ile incelendiğinde kökenlerin hemaglutinasyon aktivitesinin mannoz veya galaktoz ile inhibe olmadığı gösterilmiştir [39]. Braun tarafından mannoz dirençli hemaglutinasyon doğrulanmış fakat P,Dr ve S adezinlerini kodlayan genler PCR ile saptanamamıştır. Ne var ki, kobay mesane dokusunda yapılan bir çalışmada eksopolisakkarit sentezinin inhibe edilmesi aderansı değiştirmemiştir, bu fimbriyaların ve eksopolisakkaritin aderans ile ilişkisi gösterilmemiştir [39-40].

EKSOPOLİSAKKARİT: *Acinetobacter* türlerinin yaklaşık %30'u bakteriyi fagositik hücrelerin sitotoksitesinden koruyan ve ramnoz, mannoz, glukoz ve glukuronik asitten oluşan eksopolisakkarit kapsül üretir. Bakteri konakta tutunduktan sonra kapsüler polisakkarit, mikroorganizmanın hücre duvarına komplemanın ulaşmasını engeller ve alternatif kompleman aktivasyonunu önler. Humoral bağışıklık sisteminden kaçan bakteri, hücreleri istila ederek yayılmaya ve çoğalmaya başlar. Yayılımda kapsül ile fagositozdan korunma da önemli bir yer tutmaktadır [1].

DeneySEL çalışmalarda eksopolisakkarit üreten *Acinetobacter* türlerinin üretmeyenlere göre daha patojen olduğu ve daha yüksek virulansa sahip bakteriler ile polimikrobiyal enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir [31].

LİPOLİSAKKARİT: Dış membranın en dış yüzeyinde yer alan lipopolisakkarit tabaka; endotoksin etkisinden sorumlu lipit A, tüm gram negatif bakterilerde ortak polisakkarit yapı olan kor a ve türe özgü somatik O antijeninden oluşur.

Acinetobacter baumannii tarafından üretilen lipopolisakkarit (LPS), diğer gram negatif bakteriler tarafından üretilenler gibi letal toksisiteden ve septisemi sırasında endotoksini saptayan pozitif amebosit-lizat testinden sorumludur. LPS tabakasının lipit A bileşeni, CD14 ve TLR4/MD-2'ye bağlanarak proenflamatuvar sitokinlerin salınımını tetiklemekte ve sepsis patogenezinde önemli yer tutmaktadır.

Bakteriyemik hastalardan izole edilen gram negatif bakterilerin komplemanın litik etkinliğine direnç gösterme dereceleri ile vücut sıvılarında canlı kalabilme yetenekleri arasında ilişki olduğu ortaya konmuştur. *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde saptanmış serum direnci adı verilen bu özelliğe kapsüler eksopolisakkarit ile birlikte LPS yol açmaktadır [41]. LPS'nin mitojenik özellikleri ve TNF alfa'yı indüklemeye potansiyeli patojenitesine ayrıca katkıda bulunmaktadır [42].

DIŞ MEMBRAN PROTEİNİ OmpA: Bir porin olmasının yanısıra OmpA *Acinetobacter baumannii* patogenezinde epitel hücreleri ile etkileşim, konak hücrelerinin apoptozunun tetiklenmesi, kan dolaşımına yayılım gibi çok yönlü etkilere sahiptir [43].

Acinetobacter baumannii dış membran proteinin poliakrilamid jel elektroforezindeki major bandı 38 kDA olan bir porin proteindir ve AbOMP 38 olarak adlandırılır. AbOMP 38 mitokondride yerleşerek, sitozole sitokrom c ve apoptoz indukleiyici faktör salınımını sağlar. *Acinetobacter baumannii*'nin insan larengeal Hep-2 hücrelerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır, bulgular bakterinin in vitro hem caspas bağımlı caskad, hem de apoptoz indükleyici faktör yolu ile Hep 2 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini göstermiştir. Epitel hücrelerinin apoptozu mukozal bütünlüğün bozulmasına neden olarak bakteri ve bakteri ürünlerinin derin dokulara geçmesini sağlamaktadır [1].

Solunum yolundaki epitel hücrelerinde bulunan *A. baumannii* dış membran proteini reseptörünün (rAbOmp A) bağlama kapasitesi, diğer epitel

hücrelerinden daha yüksektir. Bu nedenle solunum yolu epitel hücreleri diğer epitel hücrelere göre *A. baumannii* yayılımına daha duyarlıdır. Bronşial epitel hücrelerine invazyonda dış membran proteinlerinin önemli bir rol oynadığı ve pnömoni gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Hayvan modelinde yapılan bir çalışmada sokak tipi köken ve dış membran proteini mutant köken ile geliştirilen pnömonide farklı akciğer patolojilerinin geliştiği görülmüştür. Ayrıca mutant kökenlerin kan dolaşımına yayılım kapasitesinin azaldığı gösterilmiştir [7].

2.5.2. Hücre dışına salgılanan virulans faktörleri

JELATİNAZ: Jelatin, kollojen, kazein, hemoglobin ve diğer peptidleri hidrolize edebilen bir proteazdır. Doku hasarı oluşumunda etkilidir. Enzimin patogenezdaki önemi özellikle Enterokok enfeksiyonlarında ortaya konmuştur. Hayvan modellerinde ve *in vitro* translokasyonda *Enterococcus faecalis*'e bağlı peritonit, endokardit ve endofitalmit enfeksiyonlarında virulansı etkilediği gösterilmiştir.

Jelatinaz, bakteri hücre duvarını yanlış katlanmış proteinlerden temizleyerek ve otolizini aktive ederek *E.faecalis* kökenlerinin yüksek dansiteli ortamda yayılımını kolaylaştırmaktadır [44]. Serumdaki komplemana karşı etkinlik göstererek opsonizasyon ve membran atak kompleksinin oluşumunu engelleyebilmektedir. Serum direncine yol açmasının yanı sıra enzim C5a'ya bağlanarak proteoliz oluşturmakta ve bölgeye nötrofil gelişimini azaltmaktadır. Enterokok cinsi bakterilerin yol açtığı kan dolaşımı ve endokardit enfeksiyonlarında jelatinazın bu mekanizmalar ile etkili olduğu gösterilmiştir [10, 45].

Enterococcus faecalis kökenlerinde çoğunluk algılama sistemi tarafından düzenlenen jelatinaz enziminin biyofilm oluşumuna dahil olduğu iddia edilmiş ancak çok sayıda köken ile yapılan bir başka çalışmada biyofilm oluşumu ile jelatinaz üretimi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiştir [46-47].

Çeşitli *P.aeruginosa* kökenlerini virulans özellikleri bakımından karşılaştıran bir çalışmada; kistik fibroz hastalarının mukoid, non mukoid

pnömoni kökenleri ile ekstrapulmoner enfeksiyon gelişen hastaların kökenleri arasında jelatinaz üretimi bakımından anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir. Bu bulgu pek çok *P.aeruginosa* kökeni tarafından üretilen jelatinaz enziminin mukoid fenotip için genel bir virulans faktörü olmadığı ancak patogeneizde yardımcı rolünün olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Enzimin kolonizasyon sürecinde bakterinin konak dokularında hayatta kalmasında etkili olduğu öne sürülmektedir [48]. *Pseudomonas aeruginosa*'nın etken olduğu kontakt lens ilişkili keratit enfeksiyonlarında ise jelatinaz üretiminin patogeneizde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [11].

Enterokok ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinde önemi ortaya konmuş jelatinaz enziminin *A. baumannii* kökenlerindeki sıklığı, önemi ve diğer virulans özellikleri ile ilişkisi ise net olarak bilinmemektedir. Literatürde klinik *A. baumannii* kökenlerinde jelatinaz üretiminin çalışıldığı iki yayında Sechi ve ark. inceledikleri klinik kökenlerde jelatinaz aktivitesi saptanmadığını, Cevahir ve ark. ise %14 sıklıkta jelatinaz aktivitesinin varlığını bildirmişlerdir [49-50].

FOSFOLİPAZ C: Fosfolipitleri parçalayan bir enzimdir. *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde Plc1 mutanı ile yapılan çalışmalar fosfolipaz C'nin virulansda önemli olduğunu göstermiştir. Mutant kökenin epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin azaldığı saptanmıştır [51].

ESTERAZ: Kısa zincirli yağ asitlerini hidrolize eden bir enzimdir. *Acinetobacter baumannii*'nin güçlü esteraz aktivitesinin lipit dokulara verdiği hasar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [52].

2.6. *Acinetobacter baumannii*'de Demir Alım Mekanizmaları

Demir; elektron transportu, metabolizma, oksidatif hasardan korunma, DNA metabolizması ve gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Hemen tüm organizmalar, metabolizma ve üreme için demire ihtiyaç duyduklarından bu değerli kaynağın kontrolü patojen ile konak arasında mücadeleye neden olmaktadır. Kan; demir için zengin bir kaynak olmakla birlikte, demir bu vücut sıvısında bakterinin kullanımına hazır şekilde, serbest olarak bulunmaz. Kanda bulunan demirin çoğu, ya eritrositlerde hemoglobine ya da plazmada transferrine bağlı haldedir. Benzer bir şekilde gözyaşı, bronşiyal mukus, safra ve gastrointestinal sıvıda da demir laktoferrine bağlı halde bulunur [53].

Bakteriler konakta büyük kısmı proteinlere bağlı halde bulunan demire ulaşabilmek için karmaşık yöntemler geliştirmişlerdir [53]. Demirin bakteriler tarafından alınması, demir veya demir bağlayan proteinlere doğrudan bağlanma veya demir şelatörleri üretimi gibi farklı mekanizmalar yolu ile gerçekleşmektedir. Pek çok patojen, demiri doğrudan transferrin ve laktoferrin gibi demir bağlayan proteinlerden veya hemoglobinden dolaylı olarak hem yoluyla sağlamaktadır. Çözünmeyen ferrik iyonu özellikle anaerobik ortamda bakterilerin ürettiği redüktazlar yardımı ile indirgenmiş formu olan ferröz halinde de bulunabilmektedir. Böylelikle bakteri çözünmüş demire doğrudan ulaşabilmektedir. Bir diğer yöntem ise demiri yüksek afinite ile bağlayabilen siderofor moleküllerinin üretimidir. Siderofor demir ile şelat oluşturarak demir iyonlarının çözünmesini sağlayan ve demiri bakteri hücresi içine aktif transport ile taşıyan bileşiklerdir. Demirin sınırlı olduğu ortamlarda siderofor üretimi üzerindeki baskılama kalkar ve bakteri siderofor moleküllerini hücre dışına salgılar. Demire kuvvetle bağlanan siderofor, özgül dış membran protein reseptörlerine bağlanarak hücre içine taşınır [33].

Bakteriyemi ve üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *E.coli* kökenlerinde siderofor üretiminin yüksek oranda saptanması, siderofor sentezleme yeteneğini yitiren *Salmonella* mutantlarının virulansının azalması, bu moleküllerin bakteriyel patogenezdeki önemine işaret

etmektedir [54].

Akciğer, kan dolaşımı, idrar yolları gibi demirin sınırlı olduğu bölgelerde enfeksiyon gelişimine yol açması *Acinetobacter* türlerinde bir demir alım mekanizması olduğunu göstermektedir. Echenique ve ark. tarafından *A. baumannii* süpernatantlarında katekol yapıda sideroforların varlığı gösterilmiştir [55]. Yamamoto ve ark. ise *A. baumannii* ATCC 19606 referans kökeninde hem katekol, hem de hidroksamat fonksiyonel gruplarını içeren siderofor saptamışlardır. Kimyasal yapısı *Vibrio anguillarum* tarafından üretilen anguibactin demir şelatörüne benzeyen siderofor Acinetobactin olarak adlandırılmıştır [56].

Acinetobacter baumannii kökenlerinde çevresel türler ile karşılaştırıldığında çok sayıda demir alım geninin yer aldığı gösterilmiştir [57]. Demir alımını düzenleyen *ferric iron uptake regulator* (fur) proteini ve fur benzeri proteinlerin, diğer bakterilerde virulansı belirleyen genleri düzenlediği bilinmektedir. *A. baumannii* fur benzeri proteinlerinin de patogeneizde önemli rol oynayan genleri düzenliyor olabileceği düşünülmektedir [1].

2.7. Biyofilm ve *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonlarındaki Yeri

Mikroorganizmalar, çevresel uyaranlara bağlı olarak serbest planktonik hücreler veya yüzeye tutunmuş sesil hücreler halinde bulunurlar. Biyofilm oluşumu; bir bakterinin göçebe, tek hücreli bir yaşamdan, yerleşik, çok hücreli bir yaşama geçişini ifade etmektedir [9].

Biyofilm, mikroorganizmalar tarafından oluşturulup içinde gömülü olarak buldukları ve bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan bir kalıptır. Hücre dışı polimerik maddeden oluşan bu kalıp içinde yer alan sesil hücreler büyüme oranları ve gen transkripsiyonları bakımından biyofilm dışındaki planktonik hücrelerden farklı bir fenotip sergilerler [58].

Bu korunaklı yapı başlıca mikrobiyal hücreler ve hücre dışı polimerik maddeden oluşur. Biyofilmin organik karbonlarının %50-90'ını oluşturan ekstraselüler polimerik madde kalıbın ana maddesidir. Hücre dışı polimerik

madde polisakkaritlere ek olarak çeşitli proteinler, glikoproteinler, glikolipid ve hücre dışı DNA içermektedir [59].

Biyofilmin oluşum süreci, yüzeylere geri dönüşümlü tutunma, geri dönüşümsüz tutunma ve olgunlaşma aşamalarından oluşur. Bakteri hücresi ile yüzeyin etkileşimi sırasında, yüzey alanında fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçler işler. Bakterinin cansız yüzeylere tutunmasını elektrostatik, hidrofobik ve Van der Waals gibi özgül olmayan kuvvetler yönlendirirken; canlı yüzeylere tutunma adezin, lektin gibi özgül moleküler kenetlenme mekanizmaları ile gerçekleşir. Planktonik hücreler rastlantısal olarak veya kemotaksis ve motilite ile yüzeylere temas ederler. Araştırmalar bakterilerin adezyon oranının, bakteri yüzey ilişkili protein tarafından belirlenen hidrofobisite gibi yüzeyin fiziksel özelliklerinden etkilendiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca motilitenin planktonik hücrelerin cansız yüzeylere temasında ve bakterinin yüzeye yayılımında çok önemli olduğu gösterilmiştir. *Twitching* (seğirme) olarak bilinen yüzey ilişkili hareketten sorumlu olan tip 4 pili, ökaryotik hücre yüzeylerine adezyondan sorumludur. Flagella oluşturamayan, mutant *P.aeruginosa* kökenlerin plastik yüzeye zayıf da olsa tutunabildikleri, ancak tip 4 pili oluşturamayan mutantların plastikte tek katman oluşturabildikleri halde mikrokoloni geliştiremedikleri gösterilmiştir [60]. Genel olarak gram negatif organizmalarda motilite, yüzeylere kolonizasyonda önemli olmakla birlikte *Acinetobacter* ile stafilokok, streptokok, mikobakteri gibi hareketsiz mikroorganizmaların da biyofilm oluşturabilmesi, hareket yeteneğinin biyofilm oluşumu açısından bir ön koşul olmadığını göstermektedir [61].

Bakteri hücreleri yüzeye bağlandıktan sonra geri dönüşümsüz olarak tutunma, çoğalma, çok katmanlı hücre kümeleri halinde birikme süreci gerçekleşir. Kovalent bağlar ve hidrojen bağları ile yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunan hücreler fenotipik değişikliklere uğrarlar ve biyofilmin olgunlaşma aşaması başlar. Bakteri, tutunan hücrelerin kümelenmesi ile hücre bölünmesi veya planktonik hücrelerin bir araya gelmesi ile mikrokoloni oluşumuna başlar [60].

Olgunlaşmış biyofilmin üç boyutlu yapısı incelendiğinde mercan kayalıklar üzerinde, birbirlerinden su kanalları ile ayrılmış mantar benzeri yapılar görülmektedir. Mikrokoloniler biyofilmin temel yapısını oluşturmakta, biyofilm içinde yer alan su kanalları ise yüksek organizmalardaki yapıları taklit eden bir dolaşım sistemine benzemektedir.

Bakterilerin bir sağkalım stratejisi olarak geliştirdikleri bu çok hücreli topluluklar içinde yer alan sesil bakteriler serbest planktonik hücreler ile kıyaslandığında pek çok avantaja sahiptir. Biyofilm topluluğunda birarada yaşayarak kaynaklarını paylaşan bakteriler; hem besinlere daha kolay ulaşmakta, hem de kuruluğa, bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere daha dirençli hale gelmektedirler. Opsonik antikorlar ve makrofajlar planktonik hücrelere etkili iken, biyofilm içine gömülü bakterilere ulaşamadıkları için yeterli etkinlik gösteremezler. Antibiyotik direnci gelişiminde ise; biyofilmin filtre görevi görmesi, biyofilm içindeki bakterilerin üreme hızlarının planktonik hücrelere kıyasla daha yavaş olması, biyofilm oluşumunda etkili mikroçevre değişkenlerinin antibiyotiklerin etkisini azaltması, biyofilm içinde antibiyotik direnç genlerinin salınımının ve plazmid transferinin artması ve hipermutasyonların gelişmesi etkili olmaktadır [60].

Mikroorganizmalarda biyofilm üretimi çeşitli yöntemler ile saptanabilmektedir. Mikrotitrasyon plak yöntemi bakteriyel tutunmayı, plağa tutunan biyofilm kütlelerinin boyanarak ölçülmesi yolu ile saptar. Mikroplaklar, çok sayıda kökenin çalışılmasına imkan verir. *Air liquid interface* deneyi ise plağa tutunan kütlelerin mikroskopik incelenmesini sağlar. Koloni biyofilm deneyi, özellikle antimikrobiyal ajanlar ile muamele edilen biyofilm içindeki hücrelerin ölümünü monitörize edebilmektedir. Kökenlerin inoküle edildiği kabinlere devamlı taze besiyeri akışının sağlandığı *flow cell* kabin sistemi biyofilm gelişimini gerçek zamanlı olarak saptayabilmektedir. Biyofilm üretimini saptamakta kullanılan yöntemler arasında altın standart olarak değerlendirilen bir yöntem olmamakla birlikte yöntemlerin birbirini tamamladığı düşünülmektedir [9, 62].

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) verileri bakteriyel ve fungal biyofilmler ile gelişen enfeksiyonların tüm

enfeksiyonların %65-80'ini oluşturduğunu göstermektedir. Biyofilm, yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere pek çok kronik enfeksiyonda önemli bir rol oynamaktadır. Doğal kapak endokarditi, otitis media, osteomyelit, kronik tonsilit ve kronik bakteriyel prostatitin yanısıra kistik fibrozlu hastalarda *P.aeruginosa* ile gelişen alt solunum yolu enfeksiyonlarının biyofilm ile ilişkisi gösterilmiştir. Santral venöz kateterler, üretral kateterler, yapay kalp kapakçıkları, periton diyaliz kateterleri, ortopedik protezler, endotrakeal tüpler gibi yabancı cisimler biyofilm ilişkili enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır [58, 60].

Acinetobacter baumannii kökenlerinin uzun süre cansız yüzeylerde yaşamını sürdürebildiği bilinmektedir [63]. Bakterinin hastane ortamında aylarca hayatta kalabilmesine; biyofilm üretimi sayesinde, dehidratasyona direnç gösterebilmesinin neden olabileceği öngörülmüş ve biyofilm üretimini inceleyen az sayıda çalışma olmakla birlikte *A. baumannii*'nin biyofilm oluşturabildiği kanıtlanmıştır. Vidal ve ark. tarafından 1996 yılında bir solunum yolu kökeninde biyofilm üretimi gösterilmiştir [64].

Klinik *A. baumannii* kökenlerinde biyofilm üretimini inceleyen az sayıda çalışma yapılmıştır. Bir çalışmada tüm kateter ilişkili üriner ve kan dolaşımı enfeksiyonları ile şant ilişkili menenjit kökenlerinin biyofilm ürettiği gösterilmiştir [65]. Biyofilm üretiminin bakterinin virulansına katkısını değerlendiren Wroblewska ve ark. biyofilm üretimi ile hastalığın ciddiyeti arasında ilişki olmadığını bildirmiştir [66].

Beij ve ark. *A. baumannii* kökenleri ile daha az sıklıkla enfeksiyona yol açan *Acinetobacter* türlerini solunum yolu epiteline tutunma, biyofilm oluşumu ve enflamatuvar sitokin yanıtı bakımından karşılaştırdıkları çalışmalarında, *A. baumannii*'nin konağın solunum yolu epitelinde varlığını koruyabilmesinde, epitele tutunma ve biyofilm oluşumundan çok, bu türe karşı gelişen enflamatuvar sitokin yanıtının zayıf olmasının anahtar rol oynadığını savunmuştur [67].

2.8. *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter baumannii'nin pek çok antibiyotiğe karşı sergilediği doğal dirence, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı da eklendiğinde, bakterinin tüm dünyada, ürkütücü oranlarda çoklu ilaç direnci kazanması şaşırtıcı bulunmamaktadır [68].

Acinetobacter baumannii aminopenisilinlere, 1.kuşak ve 2.kuşak sefalosporinler ile kloramfenikole doğal dirençlidir. *Acinetobacter baumannii* antibiyotik direncinde rol alan mekanizmalar, diğer bakterilerde olduğu gibi ilacın enzim ile etkisizleştirilmesi, bağlanacağı reseptörlerin değişmesi ve hücreye taşınmasının engellenmesi veya hücre dışına atılmasıdır.

İlacın enzim ile etkisiz hale getirilmesi *A. baumannii*'nin beta laktam antibiyotiklere direnç geliştirmesinde ana mekanizmadır. Bakteri kromozom veya plazmid tarafından kodlanan bir dizi beta laktamaz üretir. TEM-1 ve TEM-2 gibi dar spektrumlu beta laktamazların yanısıra VEB-1, PER-1, PER-2, SHV-12, CTX-M-2 gibi genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ile karbapenem direncinden sorumlu OXA cinsi (oksasilinaz) karbapenemazlar ve IMP, VIM ve SIM gibi metallobeta laktamazlar örnek verilebilir [69].

Genişlemiş spektrumlu bir beta laktamaz olan PER-1'in bir virulans faktörü olduğu gösterilmiştir. Vahaboğlu ve ark. PER 1 üretiminin bağımsız bir kötü prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir [70]. Lee ve ark. ile Sechi ve ark. çalışmalarında PER 1 üretimi ile epitel hücrelerine tutunma arasında anlamlı ilişki saptamışlar ancak enzimin biyofilm üretimi ile ilişkisi konusunda farklı görüşler bildirmişlerdir [50, 71].

Ayrıca tüm *A. baumannii* kökenleri *Acinetobacter derive cephalosporinase* (ADCs) olarak adlandırılan kromozomal Amp C enzimine sahiptir. Ancak diğer gram negatif bakterilerin aksine, indüklenebilir enzim üretimi gerçekleşmez. *Acinetobacter baumannii*'de kromozomal sefalosporinaz Amp C'nin yüksek düzeyde salınmasının beta laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir rol oynayabileceği ortaya konmuştur.

Acinetobacter kökenlerinde beta laktamaz enzimlerinin dışında aminoglikozid modifiye edici enzimlerin her üçü de (asetiltransferaz, nukleotidiltransferaz, fosfotransferaz) saptanmıştır [69].

DNA giraz veya topoizomeraz 4 yapısındaki değişiklikler ile florokinolonlara, ribozomal protein değişikliği ile aminoglikozidlere direnç gelişimi, penisilin bağlayan proteinlerde oluşan değişiklikler ile beta-laktamlara ve sulbaktama karşı gelişen direnç bakterinin hedef reseptörlerde değişikliğe yol açarak geliştirdiği direnç örnekleridir.

Bakteri, dış membran geğirgenliğini azaltarak ilacın hücre içine alınmasını engeller. Özellikle beta-laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir ek mekanizmadır.

İlacın hücreden atılmasında etkili olan aktif pompa mekanizması ise *A. baumannii*'de çoklu ilaç direncinde asıl mekanizma olarak işlev görmektedir. RND ailesine ait kromozomda kodlanan AdeABC pompası karbapenemler dahil beta laktam antibiyotikler, aminoglikozidler, kloramfenikol, tetrasiklin, tigesiklin, florokinolonlar ve trimetoprim'e etkili bulunmuştur [24].

2.9. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

Epidemiyolojik ęalıřmalarda *Acinetobacter* türlerinin tiplendirilmesi amacıyla biyotipleme, faj tipleme, serotipleme gibi fenotipik yöntemler yıllar boyu kullanılmış ancak ayırım güçlerindeki yetersizlik nedeniyle yerini genotipik yöntemlere bırakmıştır.

Bir kökene özgü genetik profil parmak izi (fingerprint) olarak adlandırılmaktadır. Aynı türe ait kökenler arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koymak amacıyla uygulanan moleküler tiplendirme yöntemlerinde, kökenlerin DNA parmak izleri tür içinde değişken ancak kökenlerde sabit olan belirli bir genetik gösterge kullanılarak belirlenmektedir. DNA parmak izleri aynı olan kökenlerin klonal yönden ilişkili oldukları ve bu kökenlerin ortak bir kaynaktan köken aldıkları kabul edilmektedir [72].

Bakteri kökenlerini en doğru biçimde tiplendirmek için kullanılabilir yöntem, kökene ait tüm genomun dizi analizini ęıkartmaktır. Zahmetli ve pahalı olan bu yöntem yerine, kromozomal DNA polimorfizmine dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Türe özgü ve korunmuş bölgelerin çoğaltılmasına dayanan *Repetitive extragenomic palindromic PCR* (REP-PZR) ile rastgele seğilmiş primerlerin kullanılarak reaksiyonun geręekleřtirildiđi *Randomly*

Amplified Polimorphic DNAs PCR (RAP-D PZR) ve *Arbitrarily Primed PCR* (AP-PZR), restriksiyon fragmanlarının spesifik amplifikasyonuna dayanan AFLP gibi polimeraz zincir reaksiyonu bazlı genotiplleme yöntemleri ile *pulse field-gel* elektroforezi ile makro-restriksiyon (PFGE) ve ribotiplleme *A. baumannii* kökenlerinin tiplendirilmesinde uygulanan yöntemlerdir. Tiplendirme yöntemlerini karşılaştıran çalışmalarda *A. baumannii-calcoaceticus* kompleksi üyelerinin %20-30'unun saptanabilir plazmid DNA'sı içermediği gösterilmiş ve plazmid analizi yönteminin ancak diğer yöntemler ile birlikte uygulanabileceği belirtilmiştir [1].

Tiplendirme yöntemleri; yöntemin bir tür içindeki tüm mikroorganizmaları tiplendirebilme yeteneğini gösteren tiplendirebilirlik, bir türün farklı kökenleri arasında ayırım yapabilme yeteneğine işaret eden ayırım gücü, aynı klondan gelen kökenlerin hep aynı tipi gösterebilme olasılığını tanımlayan stabilite ile tekrarlanabilirlik, tekniğin kullanım kolaylığı, fiyatı, sonuç verme süresi, sonuçların kolayca yorumlanabilir olması gibi kriterlere göre karşılaştırılmakta ve kullanım alanı bulmaktadır. PZR bazlı genotiplleme yöntemlerinden biri olan REP-PZR diğer genotiplleme yöntemleri ile karşılaştırıldığında; stabilitesi mükemmel, ayırım gücü yüksek, laboratuvar içi tekrarlanabilirliği iyi, uygulaması ve yorumlaması kolay, aynı gün içinde sonuç verebilmesi nedeniyle hızlı ve test başı maliyeti düşük bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu yöntemin tiplendirebilirliği değişken ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği orta düzeydedir [73].

Makro-restriksiyon endonükleaz enzimleriyle oluşturulmuş kromozomal DNA parçalarının PFGE ile agarozda ayrıştırılmasından elde edilen DNA parmak izi, genel olarak tüm türlerde kökenlerin klonal ilişkisini değerlendirmede referans yöntem olarak kabul edilmektedir [72]. *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin moleküler epidemiyolojisinde ise PFGE ile birlikte AFLP yöntemi de altın standart olarak kabul görmektedir. *Acinetobacter* türlerinin tanımlanması amacıyla 1990'lı yıllarda geliştirilmiş bu yöntem, genomik DNA'nın kesimi sonucu oluşan DNA parçalarının seçici amplifikasyonuna dayanan bir genotiplleme yöntemidir [1].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Standart kökenler

Acinetobacter baumannii ATCC 19606

Escheria coli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Enterococcus faecalis ATCC 29212

3.1.2. Besiyerleri

1. MacConkey Agar (bioMérieux)
2. Luria Bertani Sıvı Besiyeri (Sigma)
3. Luria Bertani Agar (Sigma)
4. Mueller-Hinton Agar (Oxoid)
5. Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri (Oxoid)
6. Beyin Kalp İnfüzyon Agar(Oxoid)
7. Stok besiyeri (Cryobank, Mast Diagnostics)
8. Agar agar (Oxoid)

3.1.3. Kimyasal maddeler

1. Kristal Viyole (Merck)
2. Tris-HCl (Sigma)
3. CaCl₂ (Merck)
4. Saf Etanol (Merck)
5. MgSO₄ (Merck)
6. K₂HPO₄ (Merck)

7. HCl (Merck)
8. NaCl (Merck)
9. NH₄Cl (Merck)
10. FeCl₃ (Merck)
11. Glikoz (Merck)
12. Jelatin (Sigma)
13. 2,2- Dipiridil (Sigma)

3.1.4. Antibiyotik diskleri

1. Amikasin (30 µg) (Oxoid)
2. Seftazidim (30 µg) (Oxoid)
3. Sefepim (30 µg) (Oxoid)
4. Sefotaksim (30 µg) (Oxoid)
5. Piperasilin/Tazobaktam (100/10 µg) (Oxoid)
6. Siprofloksasin (5 µg) (Oxoid)
7. Tetrasiklin (30 µg) (Oxoid)
8. Ampisilin-sulbaktam (30 µg) (Oxoid)
9. Trimetoprim-sulfometoksazol (1.25/23.75 µg) (Oxoid)
10. İmipenem (30 µg) (Oxoid)

3.1.5. PZR malzemeleri

1. Oligonükleotid primerler (Fermentas)
2. dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas)
3. PCR buffer (Fermentas)
4. Taq polimeraz (Fermentas)
5. Agaroz (Prona)

6. Beyaz pipet ucu, DNaz ve RNaz içermeyen (USA-Scientific)
7. Sarı ve mavi pipet ucu, DNaz ve RNaz içermeyen (Axygen)
8. PZR tüpü, DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen, 0.2 ml (Axygen)
9. Mikrotüp, DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen, 1.5 ml (Axygen)
10. Lambda DNA (Fermentas)
11. Trizma Base (Sigma)
12. EDTA (Sigma)
13. Etidyum bromür (Merck)

3.1.6. Cihazlar ve laboratuvar malzemeleri

1. Manyetik karıştırıcı (Yellow Line)
2. Kaba terazi (Scaltec)
3. Hassas terazi (Sartorius)
4. Etüv (Memmert)
5. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal)
6. Buzdolabı (Arçelik)
7. Derin Dondurucu (Ilshin)
8. pH Metre (WTW Wissenschaftlich)
9. Otoklav (HV-85 Hirayama)
10. Pastör Fırını (Elektro-Mag)
11. Cam petri kutusu (MedLab)
12. Cam pipetler (1, 2, 5 ml ölçekli) (MedLab)
13. Cam deney tüpleri (12x75 mm ve 16x100 mm) (MedLab)
14. Otomatik pipetler (10, 20, 50, 200, 1000 µl) (Finnpipette, Pipetman)
15. Polistiren 96 kuyucuklu plak (TPP)
16. ELISA plak okuyucu (Labsystems Multiskan MS)
17. UV Lamba (Vilbert Lourmant)

18. Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Biometra)
19. Vorteks karıştırıcı (Yellow Line)
20. Termal döngü cihazı (Techne)
21. Mikrodalga Fırın (Beko)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Çalışma kökenleri

Çalışmamızda, 2005-2010 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi dahili ve cerrahi YBÜ' de yatan hastalardan izole edilen *A. baumannii* kökenleri iki grup olarak çalışılmıştır:

- i. Aynı hastaya ait DTA ve kan örneklerinden izole edilen kökenler (n:82)
- ii. Sadece DTA örneklerinden izole edilen kökenler (n:40)

Aynı hastaya ait DTA ve kan kültürü örneklerinin eş zamanlı veya önce DTA örneği olmak kaydıyla en fazla bir hafta arayla gönderilmiş olması ve her iki gruptaki DTA örneklerinde, direk incelemelerinde lökosit görülmesi ve en az 100 000 kob/ml üreme olması koşulu aranmıştır.

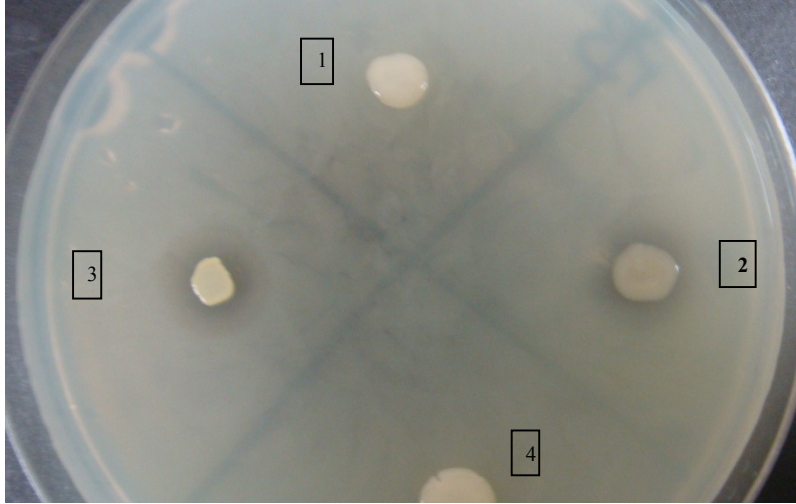
Çalışma hasta kaynaklı kökenler kullanılması sebebiyle Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirilmiştir (06.06.2008, MAR.YÇ.2008.0127). Kökenlerin tanımlama işlemleri Phoenix (Becton Dickinson) veya Vitek 2 (bioMérieux) otomatize sistemleri ile gerçekleştirilmiştir. Kökenlere ait hasta bilgileri (hasta yaşı ve cinsiyeti, örneği gönderen birim, örneğin alınış tarihi, klinik bilgiler hastane bilgisayar sistemi kullanılarak elde edilmiştir (CorTTex Entegre Hastane Bilgi Yönetim Sistemi, Sürüm 4.4.19, Tepe Teknolojik Servisler A.Ş.).

Gliserollü skim milk stok besiyerinde -20°C'de saklanan kökenler çalışma öncesi MacConkey agara pasajlanmış ve ikinci pasajın ardından ilgili deneyin gerektirdiği işlemler yapılmıştır.

3.2.2. Jelatinaz üretiminin belirlenmesi

Jelatinaz üretiminin saptanması amacıyla, kökenler önce beyin kalp infüzyon agara pasajlanarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Jelatin önce distile suda karıştırılarak 56°C'de eritilmiş, ardından %3 oranında Luria Bertani agara ilave edilip, otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Beyin kalp infüzyon agarda üreyen kolonilerin jelatin içeren Luria Bertani agara nokta ekimi yapılmış ve petriler bir gece 37°C'de inkübasyonu takiben, 4°C'de 5 saat süreyle soğumaya bırakılmıştır.

Çevresinde bulanıklık oluşan koloniler jelatinaz üretimi bakımından pozitif, halo oluşturmeyen koloniler ise negatif kabul edilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923, negatif kontrol olarak ise *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır [49-50, 74].



Şekil 1. Jelatinaz üretiminin jelatin içeren LB agarda saptanması.

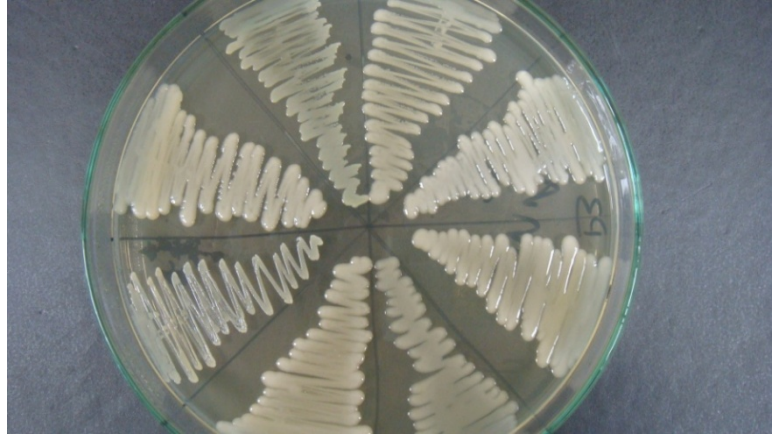
- 1; *Escheria coli* ATCC 25922 jelatinaz üretmeyen negatif kontrol kökeni.
- 2; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 jelatinaz üreten pozitif kontrol kökeni.
- 3; Klinik *Acinetobacter baumannii* kökeni jelatinaz pozitif.
- 4; Klinik *Acinetobacter baumannii* kökeni jelatinaz negatif.

3.2.3. Sınırlı demir içeren ortamda üreme yeteneğinin belirlenmesi

Sınırlı demir içeren ortamda üremeyi saptamak amacıyla, kökenler Luria Bertani agara pasajlanarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Bir demir şelatörü olan 2,2-dipiridil (DIP) etanolde çözülerek distile su içinde 20mM stok solüsyon olarak hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

Minimal agar besiyerini hazırlamak için 1 litre distile suya 22 mM K_2HPO_4 , 8.5 mM NaCl, 17 mM NH_4Cl , 48 mM Na_2HPO_4 , 15 gr agar-agar eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilip benmaride soğumaya bırakılmıştır. Besiyeri sıcaklığı 50°C'ye indiğinde 10 μ M $FeCl_3$, 2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 gr glikoz ve 50 μ M DIP filtreden geçirilerek besiyerine eklendikten sonra petrilere dökülmüştür.

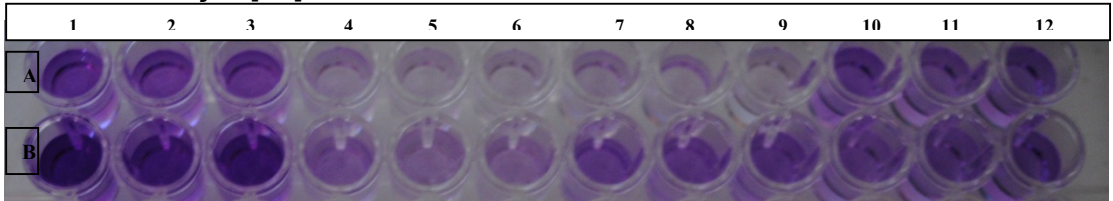
Tüm klinik kökenler demir şelatörü 2,2-dipiridil (DIP) içeren M9 minimal agar besiyerine ekilmiş, 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Besiyerinde üreyen kökenler sınırlı demir içeren ortamda üreyebilen kökenler olarak değerlendirilmiştir [40, 55].



Şekil 2. Sınırlı demir içeren minimal agar besiyerinde 8 klinik *A. baumannii* kökeninin üremesi.

3.2.4. Biyofilm üretiminin belirlenmesi

Biyofilm üretiminin saptanması amacıyla MacConkey'de üremiş olan *A. baumannii* kökenleri (n:122) ile kontrol kökenlerinden birer koloni alınıp, 5 ml Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri içeren tüplere ekim yapılarak, 35°C'de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. LB sıvı besiyerinde üreyen kökenler taze LB sıvı besiyeri içinde 1:100 oranında sulandırılıp vortekslenmiş ve her bir kökene ait sulandırmadan 100'er µl alınarak düz tabanlı 96 kuyucuk içeren mikropakta 3 kuyucuğa dağıtılmıştır. Plaklar 24 saat 35°C'de inkübe edildikten sonra 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa %0.1'lik kristal viyole çözeltilisinden 100'er µl eklenerek plaklar oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir. Ardından plaklar tekrar 3'er kez distile su ile yıkanarak serbest boya çözeltilisi uzaklaştırılmıştır. Oluşan biyofilmin kantitasyonu amacıyla kuyucuklara 200 µl %95'lik etanol eklenmiş, 5 dakika bekledikten sonra absorbans değerleri 550 nm'de optik okuyucu ile ölçülmüştür. Her köken için 3 kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve deney 3 defa tekrarlanmıştır [62-75]. Çalışmada pozitif kontrol olarak *A. baumannii* ATCC 19606 kökeni, negatif kontrol olarak ise steril LB sıvı besiyeri kullanılmıştır. Pozitif ve negatif kontrol absorbans değerleri arasındaki fark %100 aktivite olarak değerlendirilerek kökenler aktivitelerine göre 4 gruba ayrılmıştır. %20'nin altında aktivite gösteren kökenler negatif, %20'ye eşit ve %40'a kadar aktivite gösteren kökenler zayıf pozitif, %40'a eşit ve %70'e kadar orta pozitif, %70 ve üzerinde aktivite gösterenler ise güçlü pozitif olarak sınıflandırılmıştır [76].



Şekil 3. Biyofilm üretiminin mikropakta saptanması.

A1-3; *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 biyofilm üreten pozitif kontrol kökeni. A 4-6; Negatif kontrol olarak kullanılan sadece LB içeren kuyucuklar . A7-9; Biyofilm üretimi negatif klinik *A. baumannii* kökeni. A10-12/B1-3; Biyofilm üreten klinik *Acinetobacter baumannii* kökenleri. A4-6; Biyofilm üretmeyen klinik *Acinetobacter baumannii* kökeni. B7-9/B10-12; Biyofilm üreten klinik *Acinetobacter baumannii* kökenleri.

3.2.5. REP-PZR ile genotiplendirme

Aynı hastalara ait DTA ve kan kültürlerinden izole edilen *A. baumannii* kökenleri (n=82) REP-PZR ile genotiplendirilerek, aynı hastadan izole edilen kökenlerin klonal ilişkisi araştırılmıştır.

Bakteri DNA'sı kaynatma yöntemi ile ayrıştırılmıştır. MacConkey'den 1 koloni 50 µl steril distile su içeren ependorf içinde süspansiyon edilmiş, ısı bloğunda 95°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Süspansiyon daha sonra 6000 rpm devirde 60 saniye santrifüjlenmiş ve süpernatanı atılarak dipte kalan çökelti -20°C'de saklanmıştır.

REP-PZR, içinde 5µl 10xPCR buffer (Fermentas), 0.25 µl taq polimeraz, 200 µM (5 µl) dNTP, 0.5 µl forward primer (100 pmol), 0.5 µl reverse primer (100 pmol), 5 µl bakteri DNA' sı ve 34 µl steril distile su bulunan 50 µl reaksiyon karışımı içinde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu 94°C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonunun ardından, 94°C'de 1 dakika, 40°C'de 1 dakika ve 65°C'de 8 dakikadan oluşan 30 döngü ve son uzama için 65°C'de 16 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri aynı hastaya ait kökenler yan yana gelecek şekilde 65 voltta 1 saat süreyle elektroforezde yürütüldükten sonra %1'lik agaroz jelde incelenmiştir.

Aşağıda çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlerinin nükleotid dizilimleri verilmiştir:

REP-1 5'-III GCG CCG ICA TCA GGC -3'

REP-2 5'-ACG TCT TAT CAG GCC TAC -3'.

PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezini takiben oluşan bant profilleri karşılaştırılarak kökenlerin klonal ilişkisi belirlenmiştir. En az 8 bant elde etmek koşulu ile aynı veya 1 farklı bant profili gösteren kökenler aynı, 2 ve üzeri sayıda farklı bant profili gösteren kökenler ise farklı klon olarak değerlendirilmiştir [77-79].

3.2.6. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Acinetobacter baumannii kökenlerinin sefalosporinlere (seftazidim, sefotaksim, sefepim), imipeneme, aminoglikozid grubundan amikasine, florokinolonlardan siprofloksasine ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlardan piperasilin/tazobaktam ile ampisilin-sulbaktama duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile CLSI kriterlerine göre belirlenmiş, *E.coli ATCC 25922* kökeni kontrol olarak kullanılmıştır [80].

3.3. İstatistiksel değerlendirme

Çalışma verilerinin analizinde enfeksiyon bölgesi (DTA ve kan) ile virulans faktörlerinin üretimi (biyofilm üretimi, jelatinaz üretimi) arasındaki ilişki Fisher exact ve ki-kare testleri ile değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Dahili ve cerrahi yoğun bakım ünitelerinden 2005-2010 yılları arasında pnömoni ve bakteriyemi ön tanısıyla laboratuvara gönderilen DTA ve kan örneklerinden izole edilen toplam 122 kökenin tümü çoklu ilaç dirençli olup, örnek türlerine göre test edilen antibiyotiklere direnç oranları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin antibiyotik direnç oranları.

Antibiyotik	DTA ve Kanda Üreyenler		Sadece DTA’da Üreyenler
	DTA n: 41	Kan n: 41	DTA n: 40
	n(%)	n(%)	n(%)
CAZ	40(98)	40(98)	39(98)
CTX	41(100)	41(100)	40(100)
FEP	39(95)	39(95)	39(98)
SAM	38(93)	39(95)	37(93)
TZP	41(100)	41(100)	39(98)
CIP	41(100)	41(100)	39(98)
AK	36(88)	36(88)	35(88)
SXT	40(98)	40(98)	38(96)
TE	37(90)	33(80)	39(98)
IMP	37(90)	35(85)	29(73)

CAZ:Seftazidim CTX: sefotaksim FEP: Sefepim SAM: Ampisilin-Sulbaktam, TZP: Piperasilin-Tazobaktam CIP: Siprofloksasin AK: Amikasin SXT: Trimetoprim-Sulfometoksazol TE: Tetrasiklin IMP: İmipenem

Kökenlerin virulans faktör üretimleri Tablo 3 ‘de verilmiştir. Sınırlı demir içeren ortamda tüm kökenlerde siderofor üretimi saptanmıştır. Kökenlerde biyofilm üretimi %53 olup, %18’i güçlü pozitif olarak değerlendirilmiştir. Jelatinaz üretimi % 11 oranında kalmıştır (Tablo 3-Tablo 4). Virulans faktörlerinin üretimi ile örnek cinsi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0.05).

Tablo 3. Derin trakeal aspirat (DTA) ve kan örneklerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin çeşitli virulans faktör üretimleri.

Örnek Türleri	Biyofilm		Jelatinaz		Sınırlı demir	
	Pozitif n(%)	Negatif n(%)	Pozitif n(%)	Negatif n(%)	Pozitif n(%)	Negatif n(%)
DTA 1 ^a (n=40)	19(47,5)	21(52,5)	5(12,5)	35(87,5)	40(100)	0(0)
DTA 2 ^b (n=41)	21(51)	20(49)	4(10)	37(90)	41(100)	0(0)
Kan (n=41)	25 (61)	16(39)	2(5)	39(95)	41(100)	0(0)
Toplam	65 (53)	57(47)	11(9)	111(91)	122(100)	0(0)

a: Kan örneklerinde *A. baumannii* üremesi saptanmayan hastalara ait DTA kökenleri

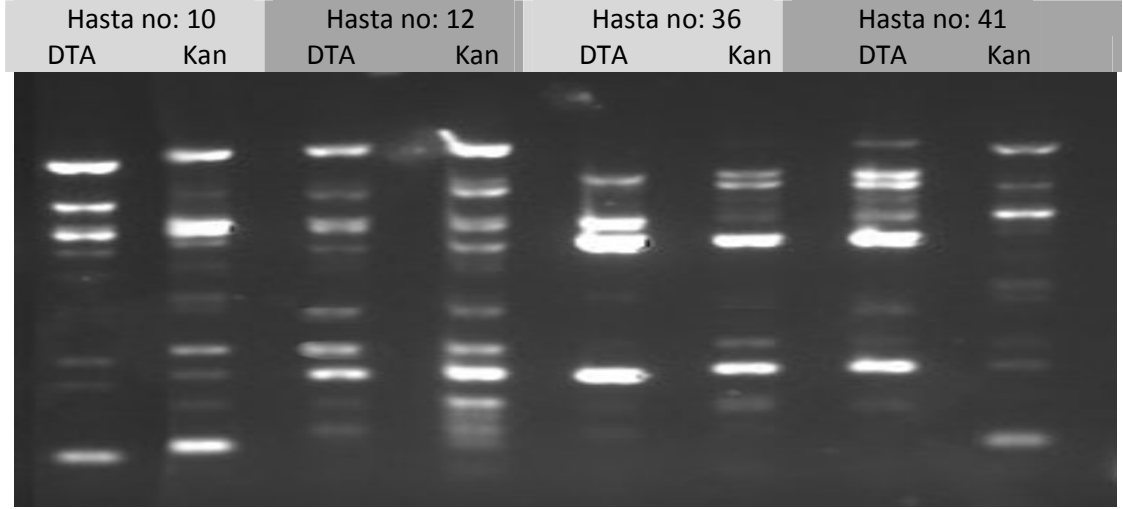
b: Kan örneklerinde *A. baumannii* üremesi saptanan hastalara ait DTA kökenleri

Kökenlerin biyofilm absorbans değerleri %100 aktivite üzerinden değerlendirilerek biyofilm üretimi negatif, zayıf pozitif, orta pozitif ve güçlü pozitif olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 4). Çalışmada klinik *A. baumannii* kökenlerinde; en düşük değer 0.048, en yüksek değer 0.872, ortalama±standart sapma 0.248±0.02, *A.baumannii* ATTC 19606 absorbans değeri ise 0.637 olarak saptanmıştır.

Tablo 4. *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin biyofilm absorbans değerleri.

Biyofilm Absorbans değerleri			
Negatif <0.176 n (%)	Zayıf pozitif 0.176-0.291 n (%)	Orta pozitif 0.292-0.464 n(%)	Güçlü pozitif >0.464 n(%)
57(47)	18(15)	25(20)	22(18)

Kırk bir hastada DTA ve kandan izole edilen kökenler (n = 82) REP-PZR yöntemi ile birbirleriyle karşılaştırıldığında; 32 hastada (%78) farklı örneklerden izole edilen kökenlerin (n = 64) birbiriyle aynı, 9 hastadan (%22) izole edilen kökenlerin (n = 18) ise farklı bant profili sergilediği gözlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Dört hastaya (Hasta no 10, 12, 36, 41) ait DTA ve kan örneklerinden izole edilen *A. baumannii* kökenlerinin REP-PZR elektroforez görüntüsü.

Hasta no 10; DTA ve kan kökenlerinin farklı bant profili görünüşleri.

Hasta no 12; DTA ve kan kökenlerinin aynı bant profili görünüşleri.

Hasta no 36; DTA ve kan kökenlerinin farklı bant profili görünüşleri.

Hasta no 41; DTA ve kan kökenlerinin farklı bant profili görünüşleri.

Tablo 5’de aynı hastalara ait DTA ve kan kökenlerinin virulans faktörleri ve klonal ilişkilerine ait veriler görülmektedir. REP-PZR ile aynı bant profilini sergilediği halde, 4 hastada DTA ve kan kökenlerinin (Hasta no: 15, 19, 25, 31) biyofilm ve jelatinaz üretimleri birbirinden farklı saptanmıştır.

Tablo 5. Aynı hastalara ait derin trakeal aspirat (DTA) ve kan kültürlerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin (n=82) virulans faktörleri ve genotipleri.

Hasta no	Köken no	Örnek türü	Biyofilm	Jelatinaz	Genotip
1	1	DTA	Zayıf Pozitif	Negatif	Farklı
	2	Kan	Orta Pozitif	Negatif	
2	3	DTA	Zayıf Pozitif	Pozitif	Aynı
	4	Kan	Orta Pozitif	Pozitif	
3	5	DTA	Negatif	Pozitif	Farklı
	6	Kan	Negatif	Negatif	
4	7	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Aynı
	8	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
5	9	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Aynı
	10	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
6	11	DTA	Orta Pozitif	Negatif	Aynı
	12	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
7	13	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Farklı
	14	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
8	15	DTA	Orta pozitif	Negatif	Aynı
	16	Kan	Orta pozitif	Negatif	
9	17	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Aynı
	18	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
10	19	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Farklı
	20	Kan	Orta pozitif	Negatif	
11	21	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Aynı
	22	Kan	Orta pozitif	Negatif	
12	23	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Aynı
	24	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
13	25	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Aynı
	26	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
14	27	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Aynı
	28	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
15	29	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	30	Kan	Orta pozitif	Negatif	
16	31	DTA	Orta pozitif	Negatif	Aynı
	32	Kan	Zayıf Pozitif	Negatif	
17	33	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	34	Kan	Negatif	Negatif	
18	35	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	36	Kan	Negatif	Negatif	
19	37	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	38	Kan	Orta pozitif	Negatif	
20	39	DTA	Güçlü Pozitif	Negatif	Aynı
	40	Kan	Güçlü Pozitif	Negatif	
21	41	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	42	Kan	Negatif	Negatif	

Tablo 5 Devam. Aynı hastalara ait derin trakeal aspirat (DTA) ve kan kültürlerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin (n=82) virulans faktörleri ve genotipleri.

Hasta no	Köken no	Örnek türü	Biyofilm	Jelatinaz	Genotip
22	43	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	44	Kan	Negatif	Negatif	
23	45	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	46	Kan	Negatif	Negatif	
24	47	DTA	Orta pozitif	Negatif	Aynı
	48	Kan	Orta pozitif	Negatif	
25	49	DTA	Negatif	Pozitif	Aynı
	50	Kan	Negatif	Negatif	
26	51	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	52	Kan	Negatif	Negatif	
27	53	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	54	Kan	Negatif	Negatif	
28	55	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	56	Kan	Negatif	Negatif	
29	57	DTA	Negatif	Negatif	Farklı
	58	Kan	Orta pozitif	Negatif	
30	59	DTA	Orta pozitif	Negatif	Aynı
	60	Kan	Orta pozitif	Negatif	
31	61	DTA	Negatif	Pozitif	Aynı
	62	Kan	Orta pozitif	Negatif	
32	63	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	64	Kan	Negatif	Negatif	
33	65	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	66	Kan	Negatif	Negatif	
34	67	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	68	Kan	Negatif	Negatif	
35	69	DTA	Zayıf Pozitif	Negatif	Aynı
	70	Kan	Zayıf Pozitif	Negatif	
36	71	DTA	Zayıf Pozitif	Negatif	Farklı
	72	Kan	Zayıf Pozitif	Negatif	
37	73	DTA	Zayıf Pozitif	Negatif	Aynı
	74	Kan	Zayıf Pozitif	Negatif	
38	75	DTA	Zayıf Pozitif	Negatif	Farklı
	76	Kan	Negatif	Negatif	
39	77	DTA	Negatif	Negatif	Aynı
	78	Kan	Negatif	Negatif	
40	79	DTA	Negatif	Negatif	Farklı
	80	Kan	Orta pozitif	Negatif	
41	81	DTA	Negatif	Negatif	Farklı
	82	Kan	Negatif	Pozitif	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Acinetobacter baumannii enfeksiyonları, dünya genelinde hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biridir. Kuruluğa ve dezenfektanlara gösterdiği direnç nedeniyle; hastane yüzeylerinde ve tıbbi cihazlarda uzun süre canlılığını koruyabilmesi, karbapenem direnci dahil olmak üzere çoklu antibiyotik direncinin giderek artan oranlarda karşımıza çıkması ve özellikle yoğun bakım birimlerinde salgınlara yol açabilmesi, *A. baumannii*'nin sürekli gündemde olan bir patojen olmasına neden olmaktadır. İmipenem, dirençli kökenlerde en etkili antibiyotiklerden biri olmakla birlikte, karbapenemlerin yaygın kullanımı sonucu karbapenem direnci de ürkütücü boyutlara varmıştır. Avrupa antimikrobiyal direnç sörveyans sistemi verileri 2000-2003 yılları arasında Türkiye'den izole edilen 779 *A. baumannii* kökeninde imipenem direncini %48 olarak bildirmektedir [26]. Antimikrobiyal sörveyans programı *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (MYSTIC) 1997-2000 çalışmasında dünyanın pek çok ülkesinde *A. baumannii* kökenlerinin imipenem direnci %0-7 arasında değişirken, aynı çalışmada Türkiye'de izole edilen kökenlerde imipenem direnci %38 olarak saptanmıştır. Bu oran çalışmada elde edilen en yüksek direnç oranıdır [27]. Türkiye'de gram negatif hastane kaynaklı kökenlerin beta laktam antibiyotiklere direncinin araştırıldığı çok merkezli HİTİT çalışmasında da, *A. baumannii* kökenlerinin imipenem direnç oranlarının 2005'de %52.2, 2007'de ise %55 olduğu saptanmıştır [29-30].

Çalışmamızda yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *A. baumannii* kökenlerinin antibiyotik duyarlılık profilleri incelendiğinde, imipenem dışındaki diğer antibiyotiklere direnç oranları %88-100 aralığında değişirken, imipenem direnç oranı %82 olarak bulunmuştur. Kökenlerimizin büyük bir çoğunluğunun (%82) imipenem direncine sahip olması, çalışma kökenlerimizin tümünün YBÜ'de tedavi gören, dolayısıyla; mekanik solunum cihazı desteği, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, girişimsel uygulamalar, geçirilmiş cerrahi ve eşlik eden ciddi hastalıklar gibi çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* ile kolonizasyon ve enfeksiyon gelişimi için risk faktörlerini taşıyan

hastalardan izole edilmiş olmasına bağlanabilir [23]. Ayrıca bu bulgunun baskın bir veya birkaç klondan kaynaklanma olasılığı da gözardı edilmemelidir.

Literatürde, *A. baumannii* kökenlerinin virulans faktörlerine ilişkin az sayıda çalışma yer almaktadır. Bir başka hastane enfeksiyonu etkeni olan ve özellikle kistik fibroz hastalarındaki kalıcı kolonizasyonun biyofilm üretimiyle ilişkili olduğu bilinen *P. aeruginosa*'nın aksine *A. baumannii* kökenlerinde biyofilm üretimi ile enfeksiyon sıklığı ve enfeksiyon bölgesi arasındaki ilişki net değildir. Eveillard ve ark. tarafından deney hayvanlarında pnömoni modelinin oluşturulduğu bir çalışmada, *A. baumannii* kökenlerinin virulansının konak yanıtından bağımsız olarak mortaliteyi etkilediği gösterilmiştir [81]. Araştırmacılar, klinik kökenlerin virulansının bilinmesinin; yüksek virulanslı kökenler ile gelişen enfeksiyonda antibiyotik tedavisinin başlanmasını sağlayabileceğini, düşük virulanslı kökenlerde ise gereksiz antibiyotik kullanımını sınırlandırabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda aynı hastaya ait DTA ve kan kökenlerinin biyofilm üretimleri değerlendirildiğinde kan kökenlerinin (%61) DTA kökenlerinden (%51) daha yüksek oranda biyofilm ürettiği görülmektedir. Kan kültürlerinde üreme olmayan hastaların DTA kökenlerinde ise biyofilm üretim sıklığı %47.5'dir. Biyofilm, bir invazyon faktörü olmamasına rağmen uygun ortam sağlayarak gerekli invazyon faktörlerini salgılayacak kökenlerin toplanmasına yol açarak bakteriyemi gelişiminde etkili bir faktör olabilir. Ayrıca biyofilm topluluğunda yaşayan bakterilere opsonik antikolar ve makrofajlar ile antibiyotiklerin yeterli etkinlik gösterememesi sonucu solunum yolundaki bakterilerin kan dolaşımına yayılma olasılığı artabilir [60, 82]. Ne var ki; çalışmamızda iki hasta grubuna ait DTA kökenlerinin biyofilm üretimlerinde saptadığımız fark, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamış, biyofilm üretiminin kökenlerin solunum yollarından kan dolaşımına yayılımında etkili olmadığı belirlenmiştir.

Bano ve ark. tarafından klonal ilişkili olmayan 92 *A. baumannii* kökeninde biyofilm üretimi %63 olarak saptanmış ve tüm kateter ilişkili enfeksiyon kökenlerinin biyofilm ürettiği ancak solunum yolu kökenlerinin

biyofilm negatifliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [65]. Can ve ark. 17 kökünde %52.9, Sechi ve ark. 20 kökünde biyofilm üretimini %80 olarak raporlamıştır. Cevahir ve ark. 86 kökünde biyofilm üretimini %74 olarak saptamış ve biyofilm üretimi ile enfeksiyon bölgesi arasında bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir [49-50, 83]. Çalışmamızda ise tüm kökenlerden aynı hastaya ait, aynı klon olduğu bilinen DTA veya kan kökenleri çıkarıldığında, 90 *A. baumannii* kökeninde %52-%55 oranında biyofilm üretimi saptanmış olup, enfeksiyon bölgesi ile biyofilm üretimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda 5 hastanın DTA ve kan kökenlerinde biyofilm üretiminin farklı olduğu, hastaların DTA kökeninde biyofilm üretimi negatifken; kan kökenlerinde pozitif saptandığı görülmüştür. Hastalardan 2'sinde DTA ve kan kökenleri aynı genotipte saptanmıştır. Çalışma verilerimiz ile uyumsuz olarak Bano ve ark. çalışmalarında sayı vermeksizin aynı genotipte olan tüm *A. baumannii* kökenlerinin biyofilm aktivitelerinin de aynı saptandığını belirtmişlerdir. Wroblewska ve ark. ise *Acinetobacter baumannii* klinik kökenlerinin biyofilm üretimini inceledikleri çalışmalarında 1 hafta - 1 ay ara ile alınan örneklerden izole edilen aynı genotipteki kökenlerin biyofilm üretiminde artış saptanmış, daha geç izole edilen kökenlerin biyofilm üretiminin güçlü pozitif olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar aynı hastalardan daha geç izole edilen örneğin biyofilm pozitifliğinin zamanla artmasını, biyofilm üretiminin zamana bağlı olarak artışı ile açıklamışlardır [66]. Literatürde aynı genotipe sahip olan kökenlerin biyofilm üretimlerinin farklı saptandığı bir diğer çalışmada, kistik fibrozlu çocukların balgamlarından izole edilen *P. aeruginosa* kökenlerinin aynı genotipte olmasına karşın farklı derecelerde biyofilm pozitifliği sergileyebildiği, *twitching* ve *swimming* motilite özelliği gösteren kökenlerin daha kalın biyofilm ürettiği gösterilmiştir [84]. Lee ve ark. kistik fibrozlu hastalardan, hastalık süresince izole edilen aynı genotipe ait *P. aeruginosa* kökenlerinin virülans özelliklerinin üretiminin zamanla azaldığını belirtmişlerdir [85]. Hastalığın kronik döneminde motilitenin kaybolduğu, biyofilm üretimi ve proteaz ile piyosiyanın üretiminin azaldığı saptanmıştır. Motilitenin kaybı ve virülans faktör üretiminin

azalmasının minimal doku invazyonu sağlayarak enfeksiyonun kronikleşmesine katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Bazı çalışmalar *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin *twitching* motilite sergileyebildiklerini göstermektedir [37]. *Twitching* motilite biyofilm üretiminin başlangıç basamağında özellikle *P.aeruginosa* kökenlerinde önemli olmakla birlikte *A. baumannii* kökenlerinde bu hareket türü ile biyofilm üretiminin ilişkisi incelenmemiştir.

Enfeksiyon sürecinde tutunma ve yayılmanın ardından bakteri çeşitli enzim ve toksinler ile doku hasarına yol açmaktadır. Jelatin, kollajen, kazein, hemogloblin ve diğer peptitleri parçalayan hücre dışı bir metalloendopeptidaz olan jelatinaz bu enzimlerden biridir. Jelatinazın bazı *E.faecalis* ile *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında patogenezdaki önemi gösterilmiş olmasına karşın, literatürde klinik *A. baumannii* kökenlerinde enzimin virulansa etkisinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır [10-12].

Cevahir ve ark. 86 *A. baumannii* kökeninde jelatinaz üretimini 12 (%13) kökende pozitif saptarken, Sechi ve ark. 20 kökenin hiçbirinde jelatinaz üretimi saptayamamıştır [49-50]. Çalışmamızda 122 kökenin 11'inde (%9) jelatinaz üretimi pozitif bulunmuş ancak bu pozitiflik örnek türüne göre farklılık göstermemiştir.

Demir, mikroorganizmaların metabolizma ve çoğalabilme için ihtiyaç duydukları en önemli elementlerden biridir. Ancak enfeksiyon sürecinde konakta gelişen akut faz yanıtı; serumda demirin saturasyonunun azalması ve transferrinin artmasına yol açarak bakterinin kullanabileceği demirin sınırlandırılmasını sağlar. Ayrıca laktoferrinin yoğunluğu hem kanda, hem de lökositlerden fagositoz sırasında apolaktoferrinin salınımı ile enfeksiyon bölgesinde artmaktadır [86]. Bununla birlikte pek çok bakterinin, sınırlı demir içeren vücut bölgelerinde çeşitli demir alım mekanizmaları ile çoğalabildiği bilinmektedir. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 referans kökeninin acinetobactin ürettiği bilinmekle birlikte çalışmalar klinik kökenlerin tümünün acinetobactin üretmediğini, farklı yapıda sideroforlar üretebildiğini göstermektedir [56, 87]. Klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* kökenlerinin sınırlı demir içeren ortamda üreme yeteneğini sınavan

çalışmalarda kökenlerin tümünün sınırlı demir içeren ortamda üreyebildiği gösterilmiştir [87-89]. Çalışmamızda kullandığımız yöntemde, besiyerine eklenen sentetik bir demir şelatörü olan dipiridil, ortamdaki demir ile şelat oluşturarak besiyerinde bakterinin kullanabileceği demiri sınırlandırmakta, sınırlı demir içeren bu ortamda *A. baumannii* kökenleri siderofor molekülleri ile metabolizmaları için gerekli demiri sağlayarak üreyebilmektedirler [88]. Çalışmamızda tüm kökenler sınırlı demir içeren ortamda üreyebilmiştir. Bu bulgu kökenlerimizin tümünün siderofor ürettiğini göstermekle birlikte, ekstraselüler bileşiklerin üretimi incelenmediği için üretilen siderofor moleküllerinin kimyasal yapısı kesin olarak bilinmemektedir.

Acinetobacter baumannii enfeksiyonlarının epidemiyolojisini araştırmak amacıyla yaygın olarak uygulanan moleküler yöntemlerden biri REP-PZR'dir. Bakteri DNA'sında tekrarlayan bölgelere yönelik primerlerin kullanılarak, düşük bağlanma derecesinde PZR amplifikasyonunun gerçekleştirildiği bu yöntemde, tekrar elementlerinin sayı ve lokalizasyonundaki farklılıklar tipe özgü bant profillerini oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar arasında klonal ilişkilerin belirlenmesinde PFGE yöntemi altın standart olarak kabul edilmekle birlikte REP-PZR ayırım gücü yüksek, uygulaması ve yorumlaması kolay ve PFGE'ye göre ucuz bir genotipleme yöntemidir [77-79]. Genotipleme yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda REP-PZR'nin PFGE ile iyi korelasyon gösterdiği bildirilmektedir [79].

Çalışmamızda 41 hastaya ait DTA ve kan örneklerinden izole edilen toplam 82 *A. baumannii* kökeni REP-PZR ile genotiplendirilerek aynı hastalara ait kökenler klonal ilişki bakımından karşılaştırılmıştır. Bant profillerine göre 32 hastanın her iki örneğinden izole edilen kökenlerin aynı, 9 hastanın kökenlerinin ise farklı klonlara ait olduğu saptanmıştır.

Hastaların DTA ve kan kökenlerinin aynı genotipe sahip olması, solunum sisteminin giriş kapısı olduğu bir bakteriyemiye düşündürmektedir. Orofarenkste kolonize olan bakteriler mukozal veya submukozal kan damarları yolu ile doğrudan veya bölgesel lenf nodlarına taşınarak lenfatikler yolu ile kan dolaşımına yayılabilmektedir [90]. Alt solunum yolu enfeksiyonu gelişiminde ise alveolar alana yayılan bakteriler intra-alveolar kapiller veya

diğer pulmoner damarlardan doğrudan veya pulmoner lenfatikler yoluyla kan dolaşımına geçebilmektedir [6]. Bakterinin pnömoni gibi bir odaktan kan dolaşımına yayılması mikrobiyal virulansın artması veya lokal antimikrobiyal mekanizmaların kaybı veya bu iki mekanizmanın birlikteliği ile gerçekleşmektedir [91]. Bakteriyemik pnömoni ile bakteriyemiye yol açmayan pnömoni olgularının karşılaştırıldığı çok merkezli bir çalışmada, hastane kaynaklı pnömoni sırasında bakteriyemi gelişimi için *A. baumannii* etyolojisinin bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir [92].

Çalışmamızda 41 hastanın 9'unda (%22) DTA ve kan kökenlerinin farklı genotiplerde olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu; bakteriyeminin, solunum yollarından farklı bir odaktan kaynaklandığını veya solunum yollarında birden fazla genotipin bulunabileceğini düşündürmektedir. Dokuz hastanın dosyaları incelendiğinde, 3 hastanın farklı vücut bölgelerinde *A. baumannii*'ye bağlı enfeksiyonlar geliştiği saptanmıştır. Bir hastanın DTA ve kan kültürü alınmasından üç hafta önce kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonu, bir hastanın iki hafta önce kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu, bir diğer hastanın ise iki hafta önce cerrahi girişim sonrası gelişen intraabdominal enfeksiyon tanısı aldığı görülmüştür. Bu hastalarda diğer vücut bölgelerinde gelişen enfeksiyonların bakteriyemiye yol açmış olması olası görünmektedir. Kalan altı hastanın ise başka bir enfeksiyon kaynağı saptanmamış ancak santral venöz kateterleri olduğu belirlenmiştir. *Acinetobacter baumannii* bakteriyemilerine solunum yollarından sonra en sık neden olan kaynaklar damar içi kateterlerdir. Santral venöz kateterler ise kateter enfeksiyonlarına en sık yol açan kateter türüdür. Öte yandan *A. baumannii* bakteriyemilerinde %20-%70 sıklıkta odağın belirlenemediği bildirilmekte ancak odağın saptanamadığı bakteriyemi olgularına yine kateter enfeksiyonlarının yol açtığı düşünülmektedir [5]. Wendt ve ark. tarafından gram negatif basiller ile gelişen bakteriyemi etkenlerinin klonal karakterinin araştırıldığı bir çalışmada 153 bakteriyemik hastanın %6.5'inde etkenin poliklonal olduğu belirtilmiş ve tüm poliklonal enfeksiyonların fermentasyon yapmayan bakteriler ile oluştuğu gözlenmiştir [93]. Bu nedenle araştırmacılar fermentasyon yapmayan gram negatif bakterilerin poliklonal bakteriyemi

gelişimi için bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda DTA ve kan kökenleri farklı genotip sergileyen hastalarda; DTA'da birkaç farklı kökenin bulunmasına rağmen, birinin saptanmış olması ve bir klonun diğerlerine üstün gelerek kan dolaşımına yayılması olasıdır. Poliklonal enfeksiyonlara yol açan kökenlerin antibiyotik duyarlılıklarının birbirinden farklı olmasının tedavi başarısızlıklarına yol açabileceği bilinmektedir [93]. Çalışmamızda aynı hastalara ait farklı genotipe sahip kökenlerin antibiyotik duyarlılık profilleri incelendiğinde; 4 hastada kandan izole edilen kökenler, DTA kökenlerine göre daha dirençli bulunmuştur. Bu bulgu DTA'da saptanamayan dirençli bir klonun, uygun olmayan antibiyotik tedavisi altında seçilerek bakteriyemiye yol açma olasılığı ile uyumlu görünmektedir.

Çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olarak Martin-Lozano ve ark. farklı klinik örneklerden *A. baumannii* kökeni izole edilmiş 30 hastanın %29'unda kan kültüründen izole edilen köken ile diğer bölgelerden izole edilen kökenlerin genotipik olarak birbirinden farklı olduğunu göstermiştir [94]. Araştırmacılar, hastane kaynaklı *A. baumannii* bakteriyemilerinin; enfeksiyonun endemik olduğu birimlerde poliklonal karakterde iken, *A. baumannii* salgınlarının genellikle baskın bir klondan kaynaklandığını belirtmişler ve hastaların %29'unda poliklonal *A. baumannii* kökenleri ile enfeksiyon gelişmesini birimlerinde enfeksiyonunun endemik olmasına bağlamışlardır. *Acinetobacter baumannii* salgınlarını araştıran ve sonuçları tek bir klonun hastadan hastaya geçerek oluşturduğu klasik salgın hipotezi ile uyumlu pek çok çalışma bulunmaktadır. New York'da 15 hastanede yapılan çok merkezli bir çalışmada kökenlerin %62'sinin tek bir klona ait olduğu belirlenmiştir [95]. Avrupa'da ise genel olarak salgınlardan sorumlu 3 majör klonun bulunduğu bilinmektedir [96-97]. Ancak A.B.D'de poliklonal salgınlar da bildirilmiş ve salgın olgusu ile çelişkili görünen bu durum endojen enfeksiyon ile faj, plazmid, transpozon gibi hareketli genetik elemanların kökenler arasındaki gen aktarımı ile açıklanmıştır [97]. Çalışmamızda REP-PZR ile hastaların %22'sinde DTA ve kan kökenlerinin farklı genotipe saptanmış olmasının, farklı hastalara ait kökenlerin klonal ilişki bakımından değerlendirilmemesi ve poliklonal salgınların mümkün olması nedeniyle,

YBÜ'lerimizdeki *A. baumannii* enfeksiyonlarının endemik veya epidemik karakteri hakkında fikir vermesi güç görünmektedir.

Sonuç olarak; özellikle altta yatan hastalığı olan kişilerde enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan *A. baumannii*'nin virulans faktörlerinin, bu enfeksiyonların gelişimindeki yeri konusunda bilgilerimiz temel düzeydedir. Yaptığımız çalışmada; her ne kadar virulans faktörleri ile enfeksiyon bölgesi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görülse de, literatürde bu türün virulansının konak yanıtından bağımsız olarak mortaliteyi etkilediği gösterilmiştir. Dolayısıyla *A. baumannii*'nin virulansında etkili faktörlerin bilinmesi; hem kökenlerin virulans derecesine göre, konak faktörünü de göz önünde bulundurarak, antibiyotik tedavisi kararını etkileyebilecek, hem de virulansda etkili faktörlerin sentezinin veya etkinliğinin engellenmesini hedefleyen ilaçların geliştirilmesini sağlayarak, tedavi edilmesi giderek imkansızlaşan *A. baumannii* enfeksiyonları için yeni ufuklar açacaktır [98].

Çalışmamızda; hem DTA, hem de kan örneklerinde üreme saptanan hastaların %78'inde izolatların aynı klonla ait olması, bakteriyemi gelişmesi halinde, DTA kültür sonuçlarının tedaviyi yönlendirmede kullanılabileceğini vurgulamaktadır. Ancak hastaların %22'sinde DTA ve kan kökenlerinin farklı genotipte saptanmış olması, YBÜ'lerimizde *A. baumannii* ile poliklonal enfeksiyonların gelişebildiğini de kuvvetle düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bergogne-Bérézin E, Friedman H, Bendinelli M. *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis. Springer, New York, USA, 2008.
2. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. 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(11):996-1011.
3. Leblebicioglu H, Rosenthal VD, Arikan OA et al. Device-associated hospital-acquired infection rates in Turkish intensive care units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *J Hosp Infect* 2007;65(3):251-257.
4. Lynch JP. Hospital-Acquired Pneumonia. *Chest* 2001; 119(2 suppl): 373.
5. Cisneros J, Rodriguez Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(11):687-693.
6. Donowitz GR, Mandell GL. Major clinical syndroms. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th Edition, pp. 540-555 Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2005.
7. Choi CH, Lee JS, Lee YC, et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol* 2008;8(1):216.
8. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, et al. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003;149(12): 3473-3484.

9. Lemon KE, Vlamakis A, Aguilar H, et al. Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. Ed: Romeo T. Bacterial biofilms pp. 2-14, Springer, Berlin, Germany, 2008.
10. Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, et al. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2010;78(11):4936-43.
11. Pinna A, Usai D, Sechi LA, et al. Detection of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Cornea* 2008;27(3):320-326.
12. Stehling EG, Silveira WD, Leite DS. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Braz J Infect Dis* 2008;12: 86-88.
13. Allen DM, Hartmann BJ. *Acinetobacter* Species. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th Edition, pp. 2632-2638 Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2005.
14. Rossau R, Landschoot AV, Gillis M, et al. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Evol Microbiol* 1991;41(2):310-319.
15. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Evol Microbiol* 1986;36(2):228.
16. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1991;29(2):277-282.

17. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21(3):538-582.
18. Winn Jr. W, Allen S, Janda W, et al. The nonfermentative Gram-negative Bacilli. Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology, pp.303-391 6th ed. Lippincott William and Wilkins, Baltimore, USA, 2006.
19. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005;848-854.
20. Fournier PE, Richet H, Weinstein RA, The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis 2006;42(5): 692-699.
21. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, et al. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis 2000;31(3):690-697.
22. Jung JY, Park MS, Kim SE, et al. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. BMC Infect Dis 2010;10(1):228-239.
23. Maragakis L, Perl T. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis 2008;46(8):1254-1263.
24. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21(3):538-582.
25. Marcella A, Klompas M. *Acinetobacter baumannii*: An Emerging and Important Pathogen. Journal of Clinical Outcomes Management 2010;17(8):363-369.
26. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles European communicable disease bulletin 2008;13(47):1-11.

27. Turner P, Greenhalgh J. The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. *Clin Microbiol Infect* 2003;9(6):563-567.
28. Turner PJ. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60(2):185-192.
29. Gür D, Hascelik G, Aydın N, et al. Antimicrobial resistance in Gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. *J Chemother* 2009;21(4):383-389.
30. Gür D, Gülay Z, Akan ÖA, et al. Türkiye'de Hastane İzolatı Gram-Negatif Bakterilerde Yeni Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç ve GSBL Tipleri: Çok Merkezli Hitit Sürveyansının Sonuçları. *Mikrobiyol Bul* 2008;42(4):537-544.
31. Joly Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(11):868-873.
32. Schaechter M, Medoff G, Schlessinger D. Mechanisms of microbial disease, Ed: Satterfeld TS. *Pathophysiology of Infectious disease*. pp.675-695 Williams & Wilkins Baltimore, USA, 1993.
33. Salyers AA, Whitt DD. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. pp.3-15 ASM press Washington, DC, USA, 1994.
34. Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respir care* 2005;50(6):725-739.
35. Van Faassen H, KuoLee R, Harris G, et al. Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infect Immun* 2007;75(12):5597-5608.
36. Knapp S, Wieland CW, Florquin S et al. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;173(1):122-129.

37. McQueary CN. Variations in Biofilm Formation and Motility Displayed by Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Miami University, Dissertation in Microbiology, 2010, Ohio.
38. Gospodarek E, Grzanka A, Dudziak Z, et al. Electron-microscopic observation of adherence of *Acinetobacter baumannii* to red blood cells. *Acta Microbiol Pol* 1998; 47(2):213-217.
39. Sepulveda M, Ruiz M, Bello H, et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* to rat bladder tissue. *Microbios* 1998;95(380):45-53.
40. Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(8): 839-844.
41. King LB, Swiatlo E, Swiatlo A, et al. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009;55(3):414-421.
42. Ysakowska M, Sienkiewicz M, Denys A. *Acinetobacter* pneumonia and immune response to this infection. *Int. Rev. Allergol. Clin Immunol* 2010;16 (1):48-53.
43. Choi CH, Lee JS, Lee YC, et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC microbiology* 2008; 8(1):216-227.
44. Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, et al. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *Journal of bacteriology* 2003;185(12):3613-3623.
45. Park SY, Kim KM, Lee JH, et al. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun* 2007;75(4):1861-1869.
46. Hancock LE, Perego M. Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* 2004;186(23):7951-7958.

47. Mohamed JA, Murray BE. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. J Clin Microbiol 2005;43(10):5405-5407.
48. Stehling EG, Silveira WD, Leite DS. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. Braz J Infect Dis 2008;12(1): 86-88.
49. Cevahir N, Demir M, Kaleli I, et al. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. J Microbiol Immunol Infect 2008;41(6):513-518.
50. Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Med Sci Monit 2004;10(6):180-184.
51. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, et al. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. PLoS Pathog 2010; 6(4):1520-1541.
52. Poh C, Loh G. Enzymatic profile of clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*. Med Microbiol Immunol. 1985; 174(1): 29-33.
53. Raymond KN, Dertz EA. Biochemical and physical properties of siderophores. Ed: Crosa JH, Mey AR, Payne SM, Iron transport in bacteria. pp.3-18 ASM Press Washington DC, 2004.
54. Relman DA, Falkow S. Microbial Pathogenesis. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. pp. 1673-1691 6th Edition, Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2005.
55. Echenique J, Arienti H, Tolmasky ME et al. Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol 1992;174(23): 7670-7679.
56. Yamamoto S, Okujo N, Sakakibara Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin., a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. Archives of microbiology 1994;162(4):249-254.

57. Nucleo E, Stefannoni L, Fugazza G, et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol 2009;9(1):270-284.
58. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002;15(2):167-193.
59. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: The "house of biofilm cells". J Bacteriol 2007;189(22):7945-7947.
60. Pace JL. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. 2005: CRC.
61. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. Curr Opin Biotechnol 2002;13(3):228-233.
62. Merritt J, Kadouri DE, O'Toole G. Growing and analyzing static biofilms. Curr Protoc Microbiol 2005; 1B.1.1-1B.1.17
63. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. J Clin Microbiol 1998;36(7):1938-1941.
64. Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. Microbios 1996;86(346): 49-58.
65. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. Clin Microbiol Infect 2008;14(3):276-278.
66. Wroblewska M.M, Sawicka-Grzelak A, Marchel H, et al. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. FEMS Immunology & Medical Microbiology 2008; 53(1):140-144.
67. De Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, et al. Do Biofilm Formation and Interactions with Human Cells Explain the Clinical Success of *Acinetobacter baumannii*? PLoS ONE 2010; 5(5): 896-903.
68. Towner, K., *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect., 2009; 73(4): 355-363.
69. Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10(8): 684-

704.

70. Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, et al. Clinical importance of extended-spectrum β -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol* 2001; 50(7): 642-645.
71. Lee HW, Koh YM, Kim J, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 49-54.
72. Durmaz R. Dirençli bakteri Suşları Arasındaki Klonal İlişkinin Belirlenmesi. *ANKEM Derg* 2007;21(Ek 2): 178-183.
73. Durmaz R. Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. Ed: Durmaz R. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, s.139-147 2. basım Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2001.
74. Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H, et al. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *J Microbiol Methods* 2001; 47(1): 11-16.
75. O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, et al. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* 1999; 310: 91-109.
76. Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, et al. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* *J Med Microbiol* 2004;53:841-853.
77. Reboli AC, Houston ED, Monteforte JS, et al. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11): 2635-2640.
78. Vila J, Marcos M, Jimenez de Anta M. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* 1996; 44(6): 482-489.
79. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al. 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(12): 635-643.
80. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) M2-A9-Antimikrobik Disk Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onaylanmış Standart-Dokuzuncu Baskı, B.T.Y., Ankara, 2007.
 81. Eveillard M, Soltner C, Kempf M, et al. The virulence variability of different *Acinetobacter baumannii* strains in experimental pneumonia. J Infect 2010;60(2):154-161.
 82. Dunne Jr, WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev 2002; 15(2): 155-166.
 83. Can F, Kurt AÖ, Demirbilek M, et al. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Biyofilm Oluşumu. İnfeksiyon Dergisi 2006; 20(3): 159-163.
 84. Deligianni E, Pattison S, Berrar D, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. BMC Microbiol 2010; 8(10):38-51.
 85. Lee B, Haagensen JA, Ciofu O, et al. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2005; 43(10): 5247-5255.
 86. Litwin CM, Calderwood S. Role of iron in regulation of virulence genes. Clin Microbiol Rev 1993;6(2): 137-149.
 87. Dorsey CW, Beglin MS, Actis LA. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Clin Microbiol 2003. 41(9): 4188-4193.
 88. Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99: 839-844.
 89. Actis LA, Tolmasky ME, Crosa LM, et al. Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 1993; 31(10):2812-2815.

90. Rubin LG, Moxon ER. Pathogenesis of bloodstream invasion with *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 1983. 41(1): 280.
91. Blot S , Depuydt P, Vandewoude K, et al. Bacteraemic Ventilator-associated Pneumonia. *European infectious disease* 2007; Bacterial infections: 107-109.
92. Magret M, Lisboa T, Martin-Loeches I, et al. Bacteremia is an independent risk factor for mortality in nosocomial pneumonia: a prospective and observational multicentre study. *J Crit Care* 2011; 15(1): R62.
93. Wendt C, Grunwald WJ. Polyclonal bacteremia due to gram-negative rods. *Clin Infect Dis* 2001; 33(4): 460-465.
94. Martin-Lozano D, Cisneros J.M, Becerril B, et al. Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2002; **40**(12):4571.
95. Landman D, Quale JM, Mayorga D, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med* 2002; 162(13): 1515-1520.
96. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6): 1519-1525.
97. Reddy T, Chopra T, Marchaim D, et al. Trends in Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Metropolitan Detroit Health System. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(5): 2235-2238.
98. Quadri LEN, Strategic paradigm shifts in the antimicrobial drug discovery process of the 21st century. *Infect Disord Drug Targets* 2007;7(3):230-237.