

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Acinetobacter baumannii İZOLATLARININ GENOTİPLERİNİN SAPTANMASI
VE BİYOFİLM OLUŞUMU İLE KARŞILAŞTIRILMASI

DR. FATMA ZEHRA DUYMAZ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

2019

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Acinetobacter baumannii İZOLATLARININ GENOTİPLERİNİN SAPTANMASI
VE BİYOFİLM OLUŞUMU İLE KARŞILAŞTIRILMASI

DR. FATMA ZEHRA DUYMAZ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FATMA BUDAK

ETİK KURUL ONAY TARİHİ VE SIRA SAYISI:26.04.2017-2017/127

2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	IV
Kısaltmalar dizelgesi.....	V
Çizelgeler dizelgesi.....	IX
Çizimler dizelgesi.....	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
2.1.1. Genel tanımlama ve sınıflandırma.....	3
2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri ve Tür Tanımlaması.....	3
2.1.3. Virülans faktörleri ve patogenez.....	5
2.1.3.1. Hücre yüzeyi ile ilgili virülans faktörleri.....	5
2.1.3.2. Demir kazanım mekanizmaları.....	6
2.1.3.3. Biyofilm.....	6
2.1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> enfeksiyonları.....	7
2.1.4.1. Pnömoniler.....	8
2.1.4.2. Bakteriyemi ve sepsis.....	8
2.1.4.3. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları.....	9
2.1.4.4. Menenjit.....	9
2.1.4.5. İdrar yolu enfeksiyonları.....	10
2.1.4.6. Diğer enfeksiyonlar.....	10
2.1.5. Epidemiyoloji.....	10
2.1.6. <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de antibiyotik direnci.....	11
2.1.6.1. β -Laktam Antibiyotiklere direnç.....	13
2.1.6.2. Aminoglikozid direnci.....	15
2.1.6.3. Florokinolon direnci.....	15
2.1.6.4. Tetrasiklin ve tigesiklin direnci.....	15
2.1.6.5. Kolistin direnci.....	15
2.2. Biyofilm.....	16
2.2.1. Biyofilm oluşumu.....	16

2.2.2.	<i>A.baumannii</i> 'de biyofilm oluşumunun düzenlenmesi.....	17
2.3.	Moleküler tiplendirme yöntemleri.....	18
2.3.1.	REP-PZR.....	19
2.3.2.	MLST	20
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1.	Besiyerleri ve ayraçların hazırlanması	22
3.1.1.	Luria Bertani buyyon	22
3.1.2.	MacConkey agar	22
3.1.3.	Mueller – Hinton agar (MHA)	22
3.1.4.	Mueller – Hinton Buyyon (MHB).....	22
3.1.5.	Triptik soy agar (TSA)	22
3.1.6.	Glukoz (%1) içeren Triptik soy buyyon (TSB).....	23
3.1.7.	Gliserol (%15) içeren triptik soy buyyon	23
3.1.8.	Üç şekerli besiyeri.....	23
3.1.9.	Sülfid – indol – hareket besiyeri	23
3.1.10.	Oksidaz Ayracı.....	23
3.2.	Tampon çözeltiler ve kimyasalların hazırlanması	24
3.2.1.	Steril fosfat tamponu	24
3.2.2.	XTT	24
3.2.3.	Menadion.....	24
3.2.4.	0,5 McFarland Standardı	24
3.2.5.	EDTA (pH 8.0).....	24
3.2.6.	Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE).....	24
3.3.	Kalite kontrol suşları	25
3.4.	Çalışmada kullanılacak izolatların seçilmesi ve saklanması	25
3.5.	Saklamadan çıkarılan izolatların tanımlanması	25
3.5.1.	Üç şekerli besiyerinde fermentasyon testi.....	25
3.5.2.	İndol ve Hareket testi	25
3.5.3.	Oksidaz testi	26
3.5.4.	Katalaz testi	26
3.6.	Antibiyotik duyarlılık testleri	26
3.6.1.	Disk difüzyon testi	27
3.6.2.	Sıvı mikrodilüsyon testi	27

3.6.3. Agar dilüsyon testi	28
3.7. Biyofilm aktivitesinin saptanması	30
3.7.1. Mikroplakta biyofilm oluşturulması.....	30
3.7.2. Biyofilm aktivitesinin ölçülmesi	30
3.8. Deoksiribonükleik Asit İzolasyonu	31
3.9. Genotiplerin REP-PZR ile belirlenmesi	31
3.10. Biyofilm ile ilişkili genlerin PZR yöntemi ile araştırılması.....	34
3.11. Sekans tiplerinin MLST ile belirlenmesi	36
3.12. İstatistiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. İzolatların genel özellikleri.....	39
4.2. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.....	40
4.3. REP-PZR ile belirlenen genotipler	41
4.4. Biyofilm aktivitesi sonuçları	45
4.5. PZR ile saptanan biyofilm ile ilişkili genler ve sıklığı	49
4.6. MLST ile belirlenen sekans tipleri	52
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
7. ÖZET	71
8. ABSTRACT.....	73
9. KAYNAKLAR	75

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın en başından bu yana deneyimleriyle bana yol gösteren, tezimin hazırlanması sürecinde ilgi, hoşgörü ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Fatma BUDAK'a,

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, saygıdeğer hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI'ya

Uzmanlık eğitimim süresince karşılaştığım her türlü zorlukta bana destek olan, engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Sema KEÇELİ, Prof. Dr. Zeki YUMUK, Prof. Dr. Devrim DÜNDAR, Prof. Dr. Gülден SÖNMEZ TAMER ve Dr. Öğr. Üyesi Erdener BALIKÇI'ya,

İstatistiksel analizlerin yapılması esnasında desteklerinden dolayı Doç. Dr. Canan BAYDEMİR'e,

Anlayış, yardım ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Hüseyin UZUNER, Arş. Gör. Doğanhan ER, Dr. Agim OSMANİ, Uzm Dr.Serpil GENÇ, Arş. Gör. Eda ÖZÇELİK, Dr. Melike KURT, Dr. Melike DEMİR, Dr. Elif OKUMUŞ, Dr. Ufuk AKBAYIRLI, Dr. Merve YILDIZ ve laboratuvar teknisyeni arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, sevgilerini ve özverilerini hiç esirgemeyen, her anımda yanımda olan annem Aynur DERE ve babam Hilmi DERE, kız kardeşlerim Betül DERE ve Sena DERE'ye,

Zorlu tez çalışması sürecinde maddi, manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen kayınvalidem Hatice DUYMAZ ve kayınpederim Hilmi DUYMAZ'a,

Sevgisini ve desteğini her daim hissettiğim hayat arkadaşım Dr. Kenan DUYMAZ ve motivasyon kaynağım canım oğlum Akın Kerem DUYMAZ'a çok teşekkür ederim.

Dr. Fatma Zehra DUYMAZ

Kısaltmalar dizelgesi

ABC	: <i>Acinetobacter calcoaseticus-baumannii complex</i>
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADC	: <i>Acinetobacter</i> Derived Cephalosporinases
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AHL	: Açıl-homoserin lakton
ARDRA	: Amplified ribosomal DNA restriction analysis
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
Bap	: Biyofilm-ilişkili protein
bç	: Baz çifti
BJ	: Bouvet ve Jeanjean
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
°C	: Santigrat
CAESAR	: Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance
CC	: Uluslararası Klonal Kompleks
CTX	: Sefotaksim
ÇİD	: Çoklu İlaç Dirençli
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EARS-Net	: The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EDTA	: Etilendiamintetrasetik Asit
EMB Agar	: Eozin Metilen Blue Agar

EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	: Food and Drug Administration
GLASS	: Global Antimicrobial Resistance Surveillance System
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
IMP	: İmipenem mediated Metallo Protein
Kb	: Kilobaz
KVC	: Kardiyovasküler Cerrahi
LB	: Luria-Bertani
LPS	: Lipopolisakkarit
MALDI TOF-MS	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
MATE	: Multidrug and Toxic Compound Extrusion
MBL	: Metallo-beta-laktamaz
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Buyyon
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	: Mililitre
MLST	: Multilocus Sequence Typing
mm	: Milimetre
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NDM	: New Delhi Metallo-beta-lactamase
OD	: Optik Dansite
OMP	: Dış Membran Proteini

OmpA	: Outer Membrane Protein A
OXA	: Oxacillinases
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PCR-ESI-MS	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu-elektrosprey iyonizasyon kütte spektrometrisi
PDR	: Mevcut tüm antibiyotiklere dirençli
PFGE	: Pulse Field Gel Elektroforezi
PNAG	: Poli- β -1,6-Nasetilglukozamin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
REP-PZR	: Repetitive Extragenic Palindromic - Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RND	: Resistance-Nodulation-Division
SER	: Servis
SENTRY	: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program
SIM	: Sulfide – Indol – Motility
ST	: Sekans Tipi
SXT	: Trimetoprim/ Sülfametaksazol
TAE	: Tris- Asetik asit- Etilendiamintetraasetik Asit
TLR4	: Toll-benzeri reseptör 4
Tm	: Erime sıcaklığı
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Buyyon
TSI	: Triple Sugar Iron - Üç Şekerli Demirli Besiyeri

TU	: Tjenberg ve Ursing
TZP	: Piperasilin/ Tazobaktam
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method With Mathematical Averaging
VEB	: Vietnam Extended Spectrum Beta Lactamases
VIM	: Verona Integron-encoded Metallo–beta-lactamase
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
YİD	: Yaygın İlaça Dirençli
QS	: Quorum Sensing
XTT	: 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt
WGS	: Whole-genome sequencing
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar

Çizelgeler dizelgesi

1. Çizelge. <i>A. baumannii</i> tanımlamasında kullanılan çeşitli testler.....	26
2. Çizelge. <i>Acinetobacter spp.</i> disk difüzyon sınır değerleri.....	27
3. Çizelge. Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması.	29
4. Çizelge. <i>Acinetobacter spp</i> antibiyotik MİK sınır değerleri	30
5. Çizelge. REP-PZR' de kullanılan primer dizileri ve erime sıcaklığı (T _m) değerleri.	31
6. Çizelge. Genotiplerin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.	32
7. Çizelge. REP-PZR döngü koşulları.....	33
8. Çizelge. Biyofilm ile ilişkili genler PZR primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.....	34
9. Çizelge. Biyofilm ile ilişkili genler PZR karışımı.....	34
10. Çizelge. Çoklu (<i>bap</i> , <i>abaI</i> , <i>ompA</i> , <i>bfmR</i>) PZR döngü şartları.....	35
11. Çizelge. Tekli (<i>CsuE</i>) PZR döngü şartları.	35
12. Çizelge. Housekeeping genlerin PZR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.	36
13. Çizelge. Housekeeping genler için PZR karışımı.	37
14. Çizelge. Housekeeping genler için PZR döngü şartları.	37
15. Çizelge. İzolatların örnek türüne göre dağılımı.	39
16. Çizelge. Çoğul dirençli izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları.	40
17. Çizelge. ÇİD olmayan izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları.	41
18. Çizelge. Genotiplerin görülme sıklığı yüzdeleri.	43
19. Çizelge. Gruplara göre biyofilm aktivitesi sonuçları.	46
20. Çizelge. Örnek türüne göre biyofilm aktivitesi sonuçları.	47
21. Çizelge. Endemik ve sporatik genotiplerin biyofilm aktivitesi sonuçları.	48
22. Çizelge. Antibiyotik duyarlılıklarına göre biyofilm OD değerleri.....	48
23. Çizelge. Gruplara göre biyofilm ilişkili genlerin dağılımı.	50
24. Çizelge. Biyofilm ilişkili genleri pozitif olan izolatlarda biyofilm aktiviteleri.....	51
25. Çizelge. Endemik ve sporatik izolatlarda biyofilm ilişkili genleri saptanma sayıları.....	51
26. Çizelge. İzolatların ST, CC ve allellik profilleri.	52
27. Çizelge. İzolasyon tarihlerine göre ÇİD izolatların REP-PZR genotipleri, izole edildikleri örnek türü, klinikler ve biyofilm aktiviteleri.	53

Çizimler dizelgesi

1. Çizim. Biyofilm oluşum basamakları.....	17
2. Çizim. REP-PZR ve bilgisayar destekli analize genel bakış.....	19
3. Çizim. MLST yöntemi.	21
4. Çizim. İzolatların REP-PZR analizi ile elde edilen dendrogramı.	42
5. Çizim. Endemik genotip ve bazı sporadik genotiplere ait REP-PZR bant profilleri.	44
6. Çizim. Örnek türlerine göre endemik ve sporadik izolatların dağılımı.....	45
7. Çizim. XTT ile boyama sonrası negatif kontrol, pozitif kontrol, güçlü biyofilm, orta güçlü biyofilm ve zayıf biyofilm aktivitesine sahip izolatların görüntüleri.....	46
8. Çizim. İzolatların biyofilm OD değeri dağılımları.....	47
9. Çizim. <i>Bap</i> , <i>abaI</i> , <i>ompA</i> , <i>bfnR</i> genlerine ait jel görüntüsü.....	49
10. Çizim. <i>CsuE</i> genine ait jel görüntüsü.....	50

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Acinetobacter baumannii, tüm dünyada yaygın görülen ciddi bir nozokomiyal enfeksiyon etkenidir. Birçok antibiyotiğe karşı kendiliğinden dirençli olmakla birlikte yeni direnç mekanizmaları kazanma ile ilgili olağanüstü bir yeteneğe sahiptir.¹ Hızla ilaç direnci geliştirmesi ve uzun süre hastane ortamında hayatta kalabilmesi, yayılma kabiliyetini güçlendirmektedir.² Özellikle hastaların mekanik ventilasyona bağlı olduğu yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yüksek ölüm oranlarıyla ilişkili salgınlara neden olmaktadır.^{1,3}

Acinetobacter cinsi bakteriler, 1970'lerin başlarına kadar çoğu antibiyotiğe duyarlı iken 1980'lerde pek çok antibiyotik grubuna direnç geliştirmiş ve 1990'lı yıllarda da imipenem dirençli *A. baumannii* izolatları ortaya çıkmıştır.^{4,5} Karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları sıklıkla florokinolon ve aminoglikozidlere karşı da dirençli olmaktadır. Çoğu izolat kolistine duyarlıdır fakat yaygın kullanımına bağlı kolistin dirençli izolatlar da bildirilmiştir.⁵ Giderek dirençli hale gelen *A. baumannii* izolatları için tedavi seçenekleri oldukça kısıtlı hale gelmiştir.⁶ Bu durum çoklu ilaç dirençli (ÇİD) izolatların yaygınlaşmasını azaltmada enfeksiyon kontrol müdahalelerinin önemini açıkça göstermektedir. Hastane içi salgınları önleme ve kontrol etme sürecinde, antimikrobiyal yönetim, temas izolasyonunun optimizasyonu, el hijyeni ve çevre temizliği eğitim programları ve sürveyans çalışmaları yer almaktadır.²

ÇİD *A. baumannii* gibi önemli nozokomiyal patojenlerin, sürveyans programının bir parçası olarak, rutin ya da periyodik olarak tiplendirilmesi tavsiye edilmektedir. Son yıllarda, bakteriyel tiplendirme, fenotipik yöntemlerden moleküler yöntemlere ve hatta daha yakın zamanda genomik yöntemlere doğru kaymıştır. Amplifikasyon temelli yöntemlerden REP-PZR (repetitive extragenic palindromic - PZR) ve dizileme yöntemlerinden MLST, en yaygın olarak kullanılan genotiplendirme yöntemleridir.⁷

A. baumannii, abiyotik ve biyotik yüzeylerde biyofilmler oluşturabilmekte ve bu sayede kuruluk, besinsizlik gibi olumsuz koşullara rağmen hastane ortamlarında hayatta kalmaktadır.⁸ Bakteri yapısal bileşenleri (Csu pilus), bakteriyel yüzey bileşenleri (OmpA, Bap), makromoleküler sekresyonlar (polisakkaritler, nükleik asitler vb.) ve çevreyi algılama sistemi (QS), biyofilm oluşumunda rol almaktadır. Ayrıca bu süreçte bir dizi moleküler olay gerçekleşmektedir.⁹ İki bileşenli düzenleyici sistemler (BfmRS),

CsuA/BABCDE pilus şaperon sistemi, *pgaABCD* operonu, *Bap*, *OmpA*, *abaI* genleri, *A. baumannii* biyofilminin genetik olarak düzenlenmesi sürecine katılmaktadır.

Hastanede baskın olan endemik *A. baumannii* izolatlarında ve sporadik izolatlarda, biyofilm oluşumu gibi virülans faktörlerinin hem fenotipik hem de genotipik değerlendirildiği az sayıda çalışma mevcuttur.¹⁰ Epidemik *A. baumannii* izolatları, yaygın virülans genlerine sahip olmasına rağmen, virülans ile ilişkili fenotiplerin ortaya çıkmasında farklılıklar gösterebilmektedir.¹¹

Bu çalışmanın amacı; Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkisinin ortaya konması, epidemik ve sporadik ÇİD izolatların sekans tiplerinin belirlenmesi, hastane ortamında yayılma ve kalıcılığa yardımcı olabilecek biyofilm aktivitesinin ve biyofilm ile ilgili genlerinin varlığının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Acinetobacter baumannii*

2.1.1. Genel tanımlama ve sınıflandırma

Acinetobacter cinsi bakteriler, hareketsiz, oksidaz negatif, katalaz pozitif, zorunlu aerob, nonfermentatif gram negatif kokobasillerdir.^{12, 13}

Acinetobacter cinsi, *Moraxellaceae* ailesinden olup, 1986 yılında Bouvet ve Grimont tarafından DNA-DNA hibridizasyon yöntemi kullanılarak, 12 farklı genomik türe ayrılmıştır. *A.baumannii* (genomik tür 2), *Acinetobacter calcoaceticus* (genomik tür 1), *Acinetobacter haemolyticus* (genomik tür 4), *Acinetobacter johnsonii* (genomik tür 7), *Acinetobacter junii* (genomik tür 5) ve *Acinetobacter lwoffii* (genomik tür 8/9) bunlardan bazılarıdır. Ardından 1989'da Tjenberg ve Ursing üç genomik tür (*Acinetobacter* genomik tür 13TU, 14TU,15TU); Bouvet ve Jeanjean da beş genomik tür (*Acinetobacter* genomik tür 13BJ,14BJ,15BJ,16 ve 17) tanımlamışlardır.^{2, 13} Günümüzde ise, çoğu patojen olmamakla birlikte 50'den fazla tür tanımlanmıştır.^{8, 14}

Gerner-Smidt ve ark.¹⁵, birbirine çok benzeyen, fenotipik testlerle ayrımı zor olan dört genomik türe (*Acinetobacter* genomik tür 1,2,3 ve 13TU), '*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex' (ABC) adını önermişlerdir. *A. calcoaceticus*, sıklıkla çevresel örneklerden izole edilirken, *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU, toplum kaynaklı ve nosokomial enfeksiyonların önemli etkenlerindedir.² Klinik olarak giderek artan önemi nedeniyle ve laboratuvar ortamında tanımlarını kolaylaştırmak için *Acinetobacter* genomik tür 3'e *A. pittii*, *Acinetobacter* genomik tür 13TU'ya ise *A. nosocomialis* tür adı verilmiştir.¹⁶ ABC ile ilgili moleküler çalışmalar sırasında genomik tür 13TU'ya çok benzer bir izolat tespit edilmiş, yıllar sonra ileri moleküler yöntemler sayesinde bu izolatın ABC üyelerine çok benzer fakat, *Acinetobacter seifertii* tür adı önerisiyle, farklı bir tür olduğu saptanmıştır.¹⁷ Böylelikle, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* ve *A. seifertii* bu komplekste yer alan türler olmuştur.¹³

2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri ve Tür Tanımlaması

A.baumannii, hareketsiz, oksidaz negatif, katalaz pozitif, zorunlu aerob, nonfermentatif gram negatif kokobasildir. Boyutları 1-1,5 ile 1,5-2,5 µm ölçülerinde olup, özellikle klinik

örneklerde gram negatif diplokoklar halinde görülmektedir. Bu özelliği, diğer nonfermentatif bakterilerden ayırımında önemli bir ipucudur.^{12, 13} *A.baumannii* hücre duvarı, gram negatif bakterilere benzer, fakat kapsüllü olanların kristal viyoleyi tutma eğilimi nedeniyle mikroskopta gram pozitif kok olarak görülebilmektedir.¹⁸

A. baumannii nazlı bakterilerden değildir ve laboratuarda rutin kullanımda olan standart besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilmektedirler.^{1, 18} ABC kolonileri, 1,5 ila 3 mm koloni çapı ile *Enterobacteriaceae* kolonilerine benzer olup, diğer *Acinetobacter* türlerinin çoğunda ise daha küçük ve daha şeffaf koloniler oluşturmaktadır.² Koyun kanlı agarda, düzgün opak kolonilere sahip olup, *A. haemolyticus* ve birkaç genomik tür dışında hemoliz oluşturmamaktadırlar. ABC üyeleri, MacConkey agarda saydam veya hafif pembe renkli koloniler oluşturmaktadır.^{2, 13} İndol negatiftir, glukozu fermente etmezler. DNA G+C içeriği % 39-47 arasındadır.¹

A.baumannii'nin tür düzeyinde tanımlanması etkili antibiyotik tedavisi için önem taşımaktadır. Tür düzeyinde tanımlamak için ilk olarak Bouvet ve Grimont tarafından 1986 yılında DNA-DNA hibridizasyon testi ve 28 fenotipik testten oluşan bir şema önerilmiştir. Fenotipik şema, glikozdan asit üretimi, 37°C, 41°C ve 44°C'de üreme, jelatin hidrolizi gibi testler eklenerek 1987 yılında revize edilmiştir. Şemanın bu haliyle insan deri örneklerinden izole edilen 136 *Acinetobacter* türünden % 95,6'sı doğru olarak tanımlanmıştır.² *A. calcoaceticus* ve *Acinetobacter* genomik tür 3 farklı sıcaklıklarda büyüme özelliklerine göre ayrılmış iken klinik örneklerde en sık karşılaşılan *A. baumannii* ve *A. nosocomialis* türleri ayırt edilememiştir.¹⁵ Amplifiye edilmiş fragman uzunluğundaki polimorfizmi (AFLP), 16S rRNA gen restriksiyon analizi (ARDRA), ribotiplendirme, spesifik gen (*gyrB*, OXA-51) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), PZR-elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi (PCR-ESI-MS) ve sekans analizleri gibi moleküler yöntemler sayesinde bu iki türün de ayırt edilmesi başarılmıştır. Fakat rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvar ortamında uygulanması zordur. API 20NE, Vitek 2, Phoenix ve MicroScan WalkAway sistemleri gibi rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan manuel ve yarı otomatize tanımlama sistemlerinde, türlerin tanımlanması problemlidir. Kısıtlı veri tabanı içeriği, *Acinetobacter* tür tanımlaması için özel substratların kullanılmaması nedeniyle ABC türleri tam olarak ayırtılamamaktadır. Bu anlamda, matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi –

(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI TOF-MS), pahalı ekipman ve iyi bir değerlendirme gerektirmesine rağmen bir saatten kısa sürede sonuç vermesi ile ümit verici görünmektedir.²

2.1.3. Virülans faktörleri ve patogenezi

A. baumannii, diğer gram-negatif bakterilere kıyasla daha az sayıda olmakla birlikte, son zamanlardaki genomik ve fenotipik analizler sayesinde, bazı önemli virülans faktörleri tanımlanmıştır.¹⁹

2.1.3.1. Hücre yüzeyi ile ilgili virülans faktörleri

Porinler, hücresel geçirgenliği düzenleyen dış membran proteinleridir. Dış zarın en bol porinlerinden biri olan OmpA, birçok farklı biyolojik aktiviteye sahiptir.¹⁹ Konak hücrelerde apoptozisi indüklemeye, epitel hücrelerine tutunma ve invazyon, biyofilm oluşumu, yüzey hareketliliği bunlardan bazılarıdır.²⁰ Ayrıca OmpA, klinik izolatlar arasında yüksek oranda korunmaktadır ve insan proteomuna en az benzerlik göstermektedir. Fare modeli çalışmalarda yüksek anti-OmpA antikor titreleri üretimi sağlanmış, bu immünojen özelliğinden dolayı da aşı çalışmalarının hedefi olmuştur.²¹

Gram negatif bakterilerdeki lipopolisakkarit (LPS) tabaka, Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) aracılı makrofaj uyarımında oldukça önemli olan immünoreaktif bir moleküldür. Bununla birlikte lipit A biyosentezinde aktif olan genlerin inhibisyonu ile fare modellerinde *A. baumannii*'nin LPS aracılı TLR4 aktivasyonu bastırılmış ve *A. baumannii* fagositozunu arttırarak farenin ölümcül enfeksiyondan kurtarıldığı görülmüştür.²²

Kapsüler polisakkarit, klinik *A. baumannii* izolatlarının çoğu tarafından eksprese edilen ve konakçı serumun öldürülmesine karşı koruma sağladığı bilinen önemli bir virülans faktörüdür. *A. baumannii* genomunda, kapsüler polisakkaritlerin üretimini belirleyebilen K lokus adı verilen korunmuş bir gen kümesi bulunmaktadır.¹⁹ Bu bölgedeki kapsül polimerizasyonu ile ilgili genleri mutasyona uğramış bakterilerde, serum direncinin ve yumuşak doku enfeksiyonu bölgelerinde canlılığının azaldığı görülmüştür.²³ Ayrıca K locus polisakkaritlerinin, bazı subinhibitör konsantrasyonlardaki antibiyotiklere yanıt olarak kapsül üretimini arttırdığı ve çoklu antibiyotiklere karşı direnci kolaylaştırdığı tespit edilmiştir.²⁴ K lokus genlerinin ekspresyonu da, BfmRS iki bileşenli düzenleyici sistem

tarafından düzenlenmektedir. *BfmS* geni ayrıca ökaryotik hücelere tutunma ve biyofilm oluşumunda da rol oynamaktadır.²⁴

Gram negatif bakterilerde, periplazmik proteinler, enzimler, LPS, DNA ve RNA gibi moleküllerden oluşan dış membran vezikülleri bulunmaktadır.¹⁹ Birçok *A. baumannii* izolatu da özellikle OmpA, proteazlar, fosfolipazlar dahil çeşitli virülans faktörlerini içeren dış membran vezikülleri salgılamaktadır. Bakterilerin bu veziküller sayesinde doku yıkıcı enzimleri içeren molekülleri konak hücelere ileterek hem konak immün yanıtından korunduğu hem de konak hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu görülmüştür.²⁵ Bunların yanında, *A. baumannii* dış membran vezikülleri, yatay gen transferleri ve antibiyotik direncinin yayılması ile ilişkilendirilmiştir. Karbapenem dirençli olmayan *A. baumannii* ATCC 17978 suşu, dirençli klinik izolatlara ile aynı ortamda inkübasyona bırakıldığında, karbapenem direnci kazanmış ve OXA-24 geni barındıran orijinal plazmidlerin varlığı tespit edilmiştir.¹⁹

2.1.3.2. Demir kazanım mekanizmaları

Demir mikrobiyal yaşamın temel besinlerinden biridir. Fakat, ferrik demir aerobik koşullar altında zayıf çözünür olduğundan ve laktoferrin, transferin, hem gibi proteinler tarafından şelatlandırılması nedeniyle bakteriler için pek ulaşılabilir değildir. Bu yüzden çoğu bakteri ferrik demir için yüksek afiniteye sahip olan demir şelatörleri sideroforları üretir. Bakterilerde, metabolizma için demir biriktirme ve taşıma için farklı genler tarafından kontrol edilen çok çeşitli sideroforlar mevcuttur.²⁶ Asinetobaktin (acinetobactin), *A. baumannii* tarafından üretilen iyi tanımlanmış (treoninden türetilmiş bir oksazolin halkasına sahip) karışık tipte bir siderofordur.²⁰ Asinetobaktin biyosentezi ve transport fonksiyonlarının inaktivasyonu ile, *A. baumannii* ATCC 19606 suşunun hücre içi üreme yeteneği ve sitotoksosite etkisinin önemli oranda azaldığı gösterilmiştir.²⁷

2.1.3.3. Biyofilm

Biyofilm, biyotik veya abiyotik yüzey ile ilişkili, ekstrasellüler matriks ile kaplanmış ve birbiri ile yakın temasta olan bakteri topluluğudur. Biyofilm sayesinde, bakteriler, besin açlığı, kuruluk ve antimikrobiyal tedaviler gibi olumsuz koşullara rağmen hastane ortamlarında hayatta kalmaktadırlar. *A. baumannii*, polistiren ve cam gibi abiyotik

yüzeyler ile birlikte epitel hücreleri ve mantar filamanları gibi biyotik yüzeyler üzerinde de biyofilmler oluşturabilmektedir. Bu biyofilmlerin oluşumu ve gelişiminin düzenlenmesinde, bakterinin üzerinde durduğu yüzeyler dışında, bir dizi moleküler ve yapısal hücresel bileşen rol oynamaktadır.^{8,9} Bugüne kadar, *A. baumannii*'nin biyofilm ile ilişkili birkaç virülans faktörü tanımlanmıştır. Bunlar; iki bileşenli bir sistem (BfmRS) tarafından düzenlenen *CsuA/BABCDE* pilus şaperon sistemi, kapsüller polisakaritler, dış zar proteinlerinden OmpA ve biyofilm-ilişkili protein (Bap), çevreyi algılama sisteminin (Quorum sensing, QS) bir parçası ve oto-indüktör sentaz *abaI*, ve poli- β -1,6-Nasetilglukozamin (PNAG) üretimi için sorumlu *pgaABCD* operonu olarak özetlenebilir. Bu yapılar *A. baumannii* biyofilm oluşumu ve korunmasına büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır.²⁸

Endotrakeal tüp, kateter gibi tıbbi aletler, biyofilm oluşturan *A. baumannii* izolatları için ideal ortamlardır. Mekanik ventilasyon sırasında doğal konak savunmasını aşarak, akciğer alveollerine ulaşan bakteriler, pnömoniye yol açabilmektedir.¹⁴ *A. baumannii* cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında da hem yara hem de tıkaçıcı pansumanlarda dayanıklı biyofilmler oluşturabilmektedir.⁸ Biyofilmler, hem bakteri ve konak hücre etkileşimini sağlayıp hem de, immün yanıt ve antimikrobialardan kaçışı kolaylaştırmaktadır.⁹

2.1.4. *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları

A. baumannii, insana ait klinik örneklerden en çok izole edilen ve en iyi tanımlanmış genomik türdür.⁸ Daha nadir olarak, *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* gibi diğer türler de enfeksiyolara neden olmaktadır. Klinik veri analizleri ve hayvan modeli çalışmalarda *A. baumannii* enfeksiyonlarının diğer *Acinetobacter* cinsi bakteri enfeksiyonlarına göre daha ölümcül seyrettiği tespit edilmiştir.^{13, 14}

A. baumannii tarafından oluşturulan enfeksiyonların çoğu, solunum sistemi ve üriner sistem gibi kalıcı tıbbi araçlara maruz kalan ve sıvı içeriği fazla olan organlarda meydana gelmektedir.¹ Enfeksiyonlar haricinde cildi, yaraları, solunum ve gastrointestinal sistemi kolonize edebilmektedir. Kolonizasyon ortamında da birçok enfeksiyon meydana geldiğinden, kolonizasyon ve gerçek enfeksiyon arasında ayırım yapmak oldukça zor olabilmektedir.³

A. baumannii enfeksiyonu risk faktörleri; YBÜ ve uzun süreli bakım merkezlerinde tedavi alma, son zamanlarda büyük cerrahi operasyon geçirme, malignite, yanık, immünsüpresif tedavi, yaşlılık, santral vasküler kateterizasyon, trakeostomi, mekanik ventilasyon, enteral beslemeler ve uzun süreli üçüncü kuşak sefalosporin, fluorokinolon veya karbapenem antibiyotik tedavisi alma olarak sıralanabilir.³

A. baumannii tarafından oluşturulan en yaygın iki enfeksiyon tablosu nozokomiyal pnömoni ve bakteriyemilerdir.¹⁴

2.1.4.1. Pnömoniler

Nozokomiyal pnömoniler, sıklıkla YBÜ’de endotrakeal tüp veya trakeostomi üzerinde biyofilm oluşturmuş bakterilerin aspire edilmesi ile meydana gelmektedir.¹⁴ Son çalışmalarda, Asya ülkeleri başta olmak üzere ventilatör ilişkili pnömonilerde % 5,6-38,7 izole edilme oranları ile *A. baumannii* etken olarak ilk sıralara yerleşmektedir.²⁹⁻³¹ Avrupa'daki dokuz ülkede toplam 27 YBÜ’den nozokomiyal pnömoni olgularının derlendiği çalışmada, Yunanistan ve Türkiye’de en yaygın izolat olarak *A. baumannii* bildirilmiştir.³²

A. baumannii kaynaklı nozokomiyal pnömonilerin mortalitesi %35-70 arasında değişmekle birlikte çoğu zaman eş zamanlı yaşamı tehdit eden farklı patolojiler de bulunduğundan gerçek mortalite oranını saptanması güç olmaktadır. Fakat ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonu olan hastalarda, ÇİD olmayan izolatlarla enfekte olan veya hiç enfekte olmamış hastalara göre daha yüksek mortalite oranları saptamıştır.³

Sıcak ve nemli tropikal bölgelerde, özellikle de Çin, Tayvan ve Tayland ve Avustralya’da toplum kaynaklı pnömoniler görülmektedir. Bu kişilerde çoğunlukla, diyabet, böbrek hastalığı, kanser ya da kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi altta yatan ek hastalıklar bulunmaktadır. Ani başlayıp septik şoka ilerleyen fulminan seyirli pnömonilerde artmış mortalite oranları, uygun olmayan başlangıç antimikrobisidleri ile ilişkilendirilmiştir.¹⁴

2.1.4.2. Bakteriyemi ve sepsis

A. baumannii'ye bağı kan dolaşımı enfeksiyonları sıklıkla damar içi kateter varlığında veya pnömoniye sekonder oluşmaktadır.¹⁴ Daha az sıklıkla da yaralar ve idrar yolu enfeksiyonları kaynak oluşturmaktadır. Nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının % 1,5-8,4'ünü *A. baumannii* oluşturmaktadır. Bakteriyemi tespit edilen hastaların yaklaşık üçte birinde septik şok geliştiği ve mortalite oranının % 20-60 arasında olduğu bildirilmiştir.^{3, 14, 33}

Dünya Sağlık Örgütü'nin 2015 yılında başlattığı GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System) çalışmalarında, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarından elde edilen bilgilere göre, pozitif kabul edilen kan kültürü şişelerinin % 6,5'unu, etken kabul edilen bakterilerin ise % 8,9'unu *A. baumannii* oluşturmuştur. Toplum kökenli bakteriyemilerde % 2,8, hastane kökenli bakteriyemilerde ise % 15,3 oranında *A. baumannii* izole edilmiştir.³³

2.1.4.3. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

Doğal afetlerde ve aktif savaş bölgelerinde travmaya maruz kalma veya cerrahi müdahaleler, *A. baumannii* kaynaklı deri ve yumuşak doku enfeksiyonları için altta yatan en önemli sebeplerdendir.¹⁴ Açık yaraları kontamine ederek, osteomyelite kadar ilerleyebilen ciddi yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açabilmektedir. Cerrahi yara enfeksiyonları sıklıkla prostetik materyalin varlığında meydana gelmekte ve genellikle yoğun debridman gerektirebilmektedir.³ Irak ve Afganistan'daki savaşlarda, açık tibia kırıkları olan askerlerden çok izole edilen organizma (% 32,5) *A. baumannii* olmuştur.¹ Son zamanlarda HIV, hepatik siroz, solid organ transplantasyonu ve diabetes mellitus gibi immünsüpresif durumu olan hastalarda *A. baumannii* veya *A. calcoaceticus*'un neden olduğu nekrotizan fasit olguları bildirilmiştir. ölümcül enfeksiyonların ve antibiyotik direncinin bir araya gelmesi endişe verici olarak yorumlanmıştır.¹⁴

2.1.4.4. Menenjit

A. baumannii'nin neden olduğu beyin cerrahisi ameliyatlarından sonra meydana gelen menenjitler, artan oranlar nedeniyle giderek artan bir önem taşımaktadır.¹ Beyin cerrahisi prosedürleri, beyin omurilik sıvısı (BOS) kaçağı, uzun süreli antibiyotik tedavisi, intrakraniyal kanamalar ve şantlar ileri gelen risk faktörleridir.³ Ülkemizde yapılan

çalışmalarda postoperatif menenjitlerde *A. baumannii* % 30,7 ve %34,8 oranlarıyla en sık etken olarak tespit edilmiştir.^{34,35} Akut bakteriyel menenjitler arasında ise Katar'da %13 oranında ve Tayvan'da %7,6 oranında etken kabul edilmiştir.^{36,37}

Acinetobacter ile deri kontaminasyonu, yanlışlıkla enfeksiyon olarak yorumlanmakta veya gerçek menenjit etkeninin tespit edilmesini gizleyebilmektedir.³ BOS kültüründe *Acinetobacter* üretilen 54 hastanın retrospektif olarak analiz edildiği bir çalışmada, 34 (% 63) hastada *Acinetobacter* klinik olarak etken kabul edilmemiştir.³⁸ *A. baumannii*'nin ardarda BOS örneklerinden izole edilmesi ve bakteriyel menenjitin tipik klinik ve laboratuvar bulgularının bulunması kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımında yardımcı olacaktır.³

2.1.4.5. İdrar yolu enfeksiyonları

A. baumannii'ye bağlı idrar yolu enfeksiyonu insidansı oldukça dūřüktür. YBÜ'de nozokomiyal idrar yolu enfeksiyonlarının % 1,6'sında etken olarak üretilmiştir. Özellikle de kalıcı idrar sondası kateterlerinde kolaylıkla kolonize olduğundan, kateter ilişkili enfeksiyon ve kolonizasyon ayırımını yapmak gerekmektedir.^{1,3}

2.1.4.6. Diğer enfeksiyonlar

A. baumannii, protez kalp kapakçığı olan kişilerde nadiren enfektif endokardit etkeni olabilmektedir.¹ Nozokomiyal bakteriyemiden kaynaklanan protez kalp kapağı endokarditi tanısı alan 171 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, iki olguda *Acinetobacter* etken olarak kabul edilmiştir. Kontakt lens kullananlarda kolonizasyon; göze penetran travma veya oküler cerrahi girişim sonrası korneal ülserler, endoftalmit ve periorbital selülit meydana gelebilmektedir. Periton diyalizine giren hastalarda peritonit olguları bildirilmiştir.³

2.1.5. Epidemiyoloji

Acinetobacter cinsi bakteriler, toprak, su, gıdalar, hayvanlar ve insanlar olmak üzere çeşitli, habitatlarda yaygın olarak bulunabilen heterojen mikroorganizma grubudur. Hem kuru hem de nemli ortamlarda uzun süre canlı kalabilme yeteneğine sahiptirler. *A. baumannii*, ventilatör boruları, arteriyel basınç izleme cihazları gibi yeniden kullanılabilir tıbbi ekipmanlardan ve çeşitli yüzeyel çevresel örneklerden sıklıkla izole edilmektedir. Böylece doğal ve tıbbi ortamlarda süreklilik sağlayarak sağlık bakımı ile ilişkili

enfeksiyonlarda nonfermentatif bakteriler arasında *P. aeruginosa*'dan sonra ikinci sıklıkla karşımıza çıkmaktadır.^{1, 12}

Acinetobacter enfeksiyonları; tropikal çevre, savaş ve doğal afetlerde enfeksiyonlar ile birlikte ılıman iklimde hastane salgınları olmak üzere geniş bir epidemiyolojiye sahiptir. Hastane ortamında sağkalımı ve hızlı antibiyotik direnci geliştirmesi sayesinde, 1970'lerden bu yana giderek yaygın görülen ciddi bir nozokomiyal sorun haline gelmiştir. Özellikle hastaların mekanik ventilasyona bağlı olduğu YBÜ ve yanık ünitelerinde sıklıkla salgınlara neden olmaktadır.³ Sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonlarda en sık görülen antimikrobiyal dirençli patojenlerin gözden geçirildiği Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı tarafından yayınlanan 2016 raporuna göre; en yaygın gram-negatif izolatlar arasında, ventilatör ilişkili pnömonilerde %12,8, kan dolaşımı enfeksiyonlarında %8,8, kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonu ve cerrahi alan enfeksiyonlarında ise %1,5 oranında *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir.³⁹

Acinetobacter izolatları hastaneye girdikten sonra, herhangi bir zamanda baskın olan tek bir izolat olmak üzere bir seri salgın meydana gelebilmekte ve hastanede birden fazla izolatın endemisitesi kurulmaktadır. *Acinetobacter* salgınları çoğunlukla, kolonize veya enfekte hastalara bakım veren sağlık çalışanlarının ellerinden çapraz bulaş ya da ortak kaynaklı bir kontaminasyon (kontamine solunum ve ventilatör ekipmanı) yoluyla meydana gelmektedir. Ortak kaynak ya da çapraz bulaşın doğrulanması gerektiğinde ve salgına yol açan *Acinetobacter* izolatlarını tiplendirmek amacıyla PFGE ya da PZR temelli genotiplendirme testleri göz önünde bulundurulmalıdır.⁴⁰

Hastane salgınlarının yanı sıra, özellikle tropikal bölgelerde toplum kökenli *A. baumannii* enfeksiyonlarına da rastlanılmaktadır. Nadir olarak görülmesine rağmen yüksek ateş, şiddetli solunum semptomları ve çok organlı disfonksiyon ile karakterize fulminan seyirli pnömoniler bildirilmiştir.⁴¹

2.1.6. *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik direnci

Acinetobacter cinsi bakteriler, 1970'lerin başlarına kadar ampisilin, gentamisin, minosiklin, nalidiksik asit gibi antibiyotiklerin çoğuna karşı duyarlı bulunmuştur. Nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonları başarılı bir şekilde tedavi edilirken, 1971 ve 1974 yılları arasında bu ajanlara karşı direnç oranlarında artış fark edilmeye başlanmıştır.

Aslında, birçok *Acinetobacter*, aminopenisilin, ureidopenisilin, dar spektrumlu sefalosporinler (sefalotin), sefoksitin, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi antibakteriyel ilaçların klinik olarak erişilebilir seviyelerine direnç göstermektedir. Fakat geniş spektrumlu sefalosporinler (sefotaksim, seftazidim), imipenem, amikasin, tobramisin ve siprofloksasin gibi antibiyotikler için, duyarlılık bir süredaha devam etmiştir.⁴ Zamanla, bu antibiyotiklerin de MİK değerlerinde artış meydana gelmiş, 1980'lerde pek çok antibiyotik grubuna direnç gelişmiştir ve 1990'ların başlarına kadar imipeneme dirençli izolatlar ortaya çıkmıştır. İmipenem direnci, *Acinetobacter* enfeksiyonlarında en güvenilir tedavi seçeneğini ortadan kaldırdığı için endişe verici olarak yorumlanmıştır. Karbapenemlere dirençli *A. baumannii* izolatlarının sıklıkla aminoglikozid ve florokinolonlara karşı da dirençli olmuştur. Çoğu izolat kolistine duyarlı kalmıştır, fakat karbapenem dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında yaygın kullanımı nedeniyle kolistine dirençli izolatlar giderek artmaktadır.⁵

Giderek dirençli hale gelen *Acinetobacter spp.* için antimikrobiyal direncin derecesini tanımlamak üzere; çoklu ilaca dirençli (ÇİD), yaygın ilaca dirençli (YİD) ve tüm-ilaçlara dirençli (PDR) gibi çeşitli tanımlamalar kullanılmıştır. ÇİD *Acinetobacter spp.* en az üç antimikrobiyal ilaç sınıfına karşı dirençli olanlar için kullanılmıştır, örn. tüm penisilinler ve sefalosporinler, fluorokinolonlar ve aminoglikozitler. ÇİD'in bir başka tanımı ise, beş ilaç sınıfının (ampisilin-sülbaktam, anti-psödomonal sefalosporinler (seftazidim veya sefepim), anti-psödomonal karbapenemler (imipenem veya meropenem), florokinolonlar (siprofloksasin veya levofloksasin) ve aminoglikozidler (gentamisin, tobramisin veya amikasin)) en az üçüne direnç olmasıdır. Karbapenem direnci ile birlikte sadece bir veya iki antibiyotiğe (kolistin/tigesiklin) duyarlı olan izolatlar YİD *Acinetobacter spp.* olarak tanımlanmıştır. Son olarak, PDR *Acinetobacter spp.* mevcut tüm antibiyotiklere dirençli *Acinetobacter* izolatlarını belirtmek için kullanılmıştır.¹

A. baumannii, birçok antibiyotiğe karşı kendiliğinden dirençli olmakla birlikte yeni direnç mekanizmaları için özellikle de antibiyotik direnç genlerinin kazanılması ile ilgili olağanüstü bir yeteneğe sahiptir. Plazmid, transpozon ve integronların bu direnç genlerinin taşınmasında önemli katkısı bulunan faktörler olduğu gösterilmiştir.¹ Fransa'da epidemik ÇİD *A. baumannii* AYE suşunun genomunda, 52 direnç geninden 45'ini içeren, bugüne kadar bilinen en büyük (86-kb) direnç geni adası (AbaR1) tanımlanmıştır.⁴² Çoklu ilaç dışı

atım pompalarının büyük bir kısmı, ÇİD *A. baumannii* izolatlarının genomunda kodlanmaktadır.¹ ÇİD *A. baumannii*'de en çok ilişkilendirilen dışa atım pompa sistemi, AdeABC, AdeFGH ve AdeIJK olmak üzere üç farklı üyesi bilinen *Resistance-Nodulation-Division* (RND) ailesine ait pompalar olmuştur.⁴³ RND tipi pompalar, aminoglikozidler, kinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol, eritromisin ve trimetoprimdahil birçok antibiyotiğe direnç gelişiminden sorumlu tutulurken, son zamanlarda yeni tanımlanan çoklu ilaç dışa atım pompası AdeM'nin substrat profili, fluorokinolonlarla sınırlı gibi görünmektedir.¹

A. baumannii'de antibiyotik direnci temel olarak; antimikrobiyal inaktive edici enzimler, dışa atım pompaları, OMP ve penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklikler ile meydana gelmektedir.

2.1.6.1. β -Laktam Antibiyotiklere direnç

A. baumannii'nin beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin ana mekanizması kromozom ya da plazmid tarafından kodlanan beta-laktamaz üretimi olarak bildirilmiştir.⁴⁴ Beta laktamazlar; Ambler sınıf A, Ambler sınıf B (metallo- β -laktamaz), Sınıf C β -laktamazlar ve Ambler sınıf D (oksasilinazlar) olmak üzere dört grupta toplanmıştır.¹ Ambler sınıf A'da yer alan β -laktamazların, ampisilin, karboksipenisilinler ve üreidopenisilinlere direnç gelişimi ile ilişkili fakat geniş spektrumlu sefalosporinler ve karbapenemlere karşı aktif olmadığı belirtilmiştir.⁴⁴ İtalya ve Hollanda'dan TEM-92 ve 116, Çin ve Hollanda'dan SHV-12, Japonya ve Bolivya'dan CTX-M-2 ve CTX-M-43, Fransa'dan VEB-1, Belçika ve Arjantin'den (VEB-1a), Fransa, Türkiye, Belçika, Romanya ve Kore'den PER-1, Amerika Birleşik Devletleri ve Arjantin'den PER-2 β -laktamaz bildirimleri olmuştur.¹

Günümüzde *A. baumannii* klinik izolatlarının çoğu, üçüncü kuşak (sefotaksim, seftazidim) ve dördüncü kuşak (sefepim) dahil olmak üzere, sefalosporinlere karşı dirençli bulunmaktadır.⁵ *A. baumannii*, Ambler sınıf C'de yer alan ve 'Acinetobacter derived cephalosporinases' (ADCs) olarak da bilinen AmpC β -laktamazları doğal olarak üretmektedir. Diğer gram-negatif organizmaların aksine *A. baumannii* AmpC β -laktamazı, indüklenebilir değildir.^{2,5} Bu enzimlerin, aminopenisilinler ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize ettiği vebazal seviyede eksprese edildiğinde geniş spektrumlu

sefalosporinlerin etkinliğini azaltmadığı görülmüştür. AmpC geninin üst kısmında, ISAbal olarak bilinen insersiyon sekansının varlığı, geniş spektrumlu sefalosporin (sefotaksim ve seftazidim) direncine yol açan yüksek düzeylerde beta laktamaz üretimi ile sonuçlanmaktadır.¹ Karbapenemler ve sefepim bu enzimden etkilenmemektedir.²

A. baumannii karbapenem direncinin en önemli mekanizması, kromozomal veya kazanılmış karbapenemaz üretimi olarak bildirilmiştir.⁵ Karbapenemaz aktivitesine sahip olan beta laktamazlar, serin oksasilinazlar (Ambler sınıfı D OXA tipi) ve Ambler sınıfı B'de yer alan metallo- β -laktamazlardır(MBL).² MBL, aktif bölgesinde katalizlemeye yardımcı metal iyonu (genellikle çinko) taşıyan ve aztreonam dışındaki tüm β -laktam antibiyotikleri hidrolize eden enzim grubudur. VIM, IMP ve NDM gibi enzimleri içeren MBL, genellikle bakteriler arasında kolaylıkla aktarılan mobil genetik elemanlar üzerinde yer aldıklarından, önemli bir tehdit oluşturdukları düşünülmektedir.¹ Son yıllarda en çok ilgililenen MBL, NDM-1 olup NDM-1 üreten karbapenem dirençli *A. baumannii*, 2011'den beri ülkemiz dahil birçok ülkede tanımlanmıştır.^{5, 45}

Ambler sınıfı D'de yer alan OXA tipi β -laktamazlar, karbapenem direncine yol açan diğer enzimlerdir. OXA-51 grubu (OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80, ve -82) karbapenemazlar, *A. baumannii* doğal olarak üretilmektedir. Düşük seviyede eksprese edilmesine rağmen AmpC'de olduğu gibi ISAbal insersiyon sekansının eklenmesi ile karbapenem direncine yol açabilmektedir.⁵ *A. baumannii*'de ilk izole edilen OXA tipi enzim, (başlangıçta ARI-1 olarak adlandırılan) OXA-23'tür. Ardından farklı oksasilinazlar saptanmış ve birbirine genetik olarak benzeyenler ile grup oluşturulmuştur.² Dünya çapında Clone 2 izolatlarının ürettiği en yaygın grup olan OXA-23, ve OXA -40, -58, -143 ve -235 grupları dahil olmak üzere *A. baumannii*'de beş büyük OXA grubu karbapenemaz bildirilmiştir.⁵

β -laktam direncine neden olan diğer mekanizmalar; dış zar proteinlerindeki (OMP) değişiklikler, penisilin bağlayan proteinlerin afinitesindeki veya ekspresyonundaki değişiklikler ve çoklu ilaç dışa atım pompaları yer almaktadır.² Dış zarda 29 kDa'lık bir protein olan CarO'nun kaybının imipenem ve meropenem direnci ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır.¹ Penisilin bağlayıcı protein-2(PBP2)'nin azaltılmış ekspresyonu, *A. baumannii* karşı intrinsik aktiviteye sahip olan sülbaktam için direnç gelişimine neden olmaktadır.⁵

2.1.6.2. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozid direnci, çoğunlukla çeşitli aminoglikozid modifiye edici enzimler ile meydana gelmektedir. ÇİD *A. baumannii* izolatlarında, asetiltransferazlar, nükleotidiltransferazlar ve fosfotransferazlar dahil olmak üzere birçok ana enzim sınıfları saptanmıştır.^{1,2} Son zamanlarda dünya çapında Klon2 izolatları arasında yaygın olarak görülen diğer bir aminoglikozit direnç mekanizması, 16S ribozomal RNA metiltransferaz (özellikle ArmA) üretimi bildirilmiştir. ArmA, aminoglikozidlerin hedef bölgeye bağlanmasını engelleyerek, gentamisin, tobramisin ve amikasin direncine neden olmaktadır.^{2,5} Aynı zamanda aminoglikozidlerin (gentamisin ve kanamisin), çoğul ilaç direncinde rol alan MATE ailesine ait AbeM pompasının substratları olduğu bildirilmiştir.²

2.1.6.3. Florokinolon direnci

Florokinolon direncinin temel nedeni, *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlar yoluyla DNA giraz veya topoizomeraz IV yapısındaki değişimlerdir. Bununla birlikte, kinolonlar da, AdeABC ve AdeM pompaları dahil olmak üzere çoklu ilaç dışa atım pompaları için substrat olma özelliği taşımaktadır.^{1,2}

2.1.6.4. Tetrasiklin ve tigesiklin direnci

Ribozomu tetrasiklin etkisinden koruyan *tetM* geni tarafından kodlanan ribozomal koruma proteini ile birlikte transpozon aracılı dışa atım pompaları TetA ve TetB, tetrasiklin direncinde rol almaktadır. Tetrasikline özgü dışa atım pompalarından ayrı olarak, AdeABC pompası da hem tetrasiklin hem de tigesiklini substrat olarak kullanmaktadır.¹

² AdeABC dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu, tigesiklin duyarlılığının azalması ile ilişkilendirilmiş ve AdeB geninin inaktivasyonu ile, tigesiklin MİK değerlerinde belirgin bir düşüş olduğu (4 g/l'den 0,5 g/ml) gösterilmiştir.⁴⁶

2.1.6.5. Kolistin direnci

A. baumannii'de kolistin direncinin iki ana mekanizması, LPS tabakaya katyonik grup eklenmesi ve LPS üretiminin tamamen kaybedilmesi olarak bildirilmiştir.⁴⁷ LPS tabakada değişiklik için; *pmrB*'de en az bir aminoasit değişimi ve *pmrA* ve *pmrB* genlerinin artmış ekspresyonu gerekmektedir. LPS tabakanın tamamen kaybı, lipit A biyosentezinde görevli

lpxA, *lpxC* ve *lpxD* genlerinin inaktivasyonu ile meydana gelmektedir. *LpxA* ya da *lpxC* gen bölgesindeki insersiyon sekansı *ISAbal1*, LPS kaybı ve yüksek seviyede kolistin direnci ile ilişkili bulunmuştur.⁴⁸

2.2. Biyofilm

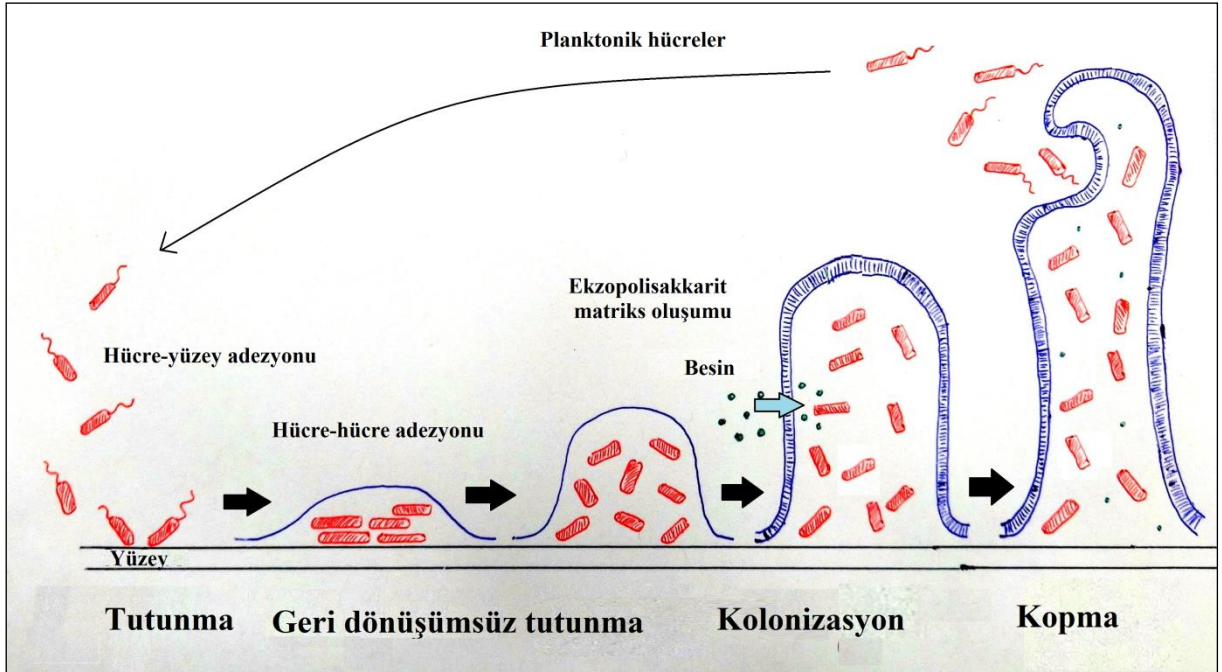
Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışmış ve polisakkarit, protein, nükleik asitleri içeren polimerik matriks ile kaplı birbiri ile yakın temasta olan mikroorganizmaların oluşturduğu bir topluluktur.^{9, 18} Biyofilmler, matriks içindeki kanallar vasıtasıyla sıvıları ve besinleri pompalayan ilkel bir dolaşım sistemini kullanarak dokulara benzer bir şekilde işlev görmektedir. Mikroorganizmalar biyofilmler sayesinde konak immün yanıtından ve antimikrobialların saldırısından korunmuş olur.¹⁸

2.2.1. Biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu birkaç basamakta (1. Çizim) meydana gelmektedir:

1. Mikroorganizmanın yüzeye tutunması: Mikroorganizmalar, yüzeyde organik ve/veya inorganik madde varlığında yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunur. Bu evrede bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler ve bakterinin hareketi rol oynamaktadır.
2. Geri dönüşümsüz tutunma: Mikroorganizmanın hücre zarındaki proteinlerin uyarımı ile yüzeye tutunan bakteriler ekzopolisakkarid yapıda madde sentezlemeye başlamaktadır. Bu sayede bakteriler birbirine ve yüzeye iyice tutunmuş olmaktadır.
3. Kolonizasyon: Yüzeye tutunan bakteriler, bölünüp çoğalarak mikrokoloniler oluşturmaktadır. Bu mikrokolonilerin üzerine de ortamdaki planktonik bakteriler yapışarak kolonizasyon sağlanmaktadır.
4. Kopma: Biyofilm oluştuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrası hareketi sağlayacak olan flajellalar sentezlenmekte ve üst tabakadan kopmalar gerçekleşmektedir. Kopan planktonik bakteriler yeni biyofilm odaklarını oluşturmaktadır. Bu süreç bir döngü halinde devam etmektedir.⁴⁹

1. Çizim. Biyofilm oluşum basamakları.⁵⁰



2.2.2. *A.baumannii*'de biyofilm oluşumunun düzenlenmesi

Bakteriyel biyofilm başlangıcı ve gelişimi için, bakteriyel hücrelerin bir yüzeye tutunması haricinde hücrelerin sıkı bir düzenlemeye tabi tutulduğu oldukça düzenli bir dizi moleküler olay gerçekleşmektedir. Bakteri yapısal bileşenleri (pili ve flagella), bakteriyel yüzey bileşenleri (adezinler, dış membran proteinleri), makromoleküler sekresyonlar (polisakkaritler, nükleik asitler vb.) ve çevreyi algılama sistemi (QS), biyofilm oluşumunu etkileyebilecek en yaygın faktörlerdir. Bunlara ek olarak, iki bileşenli düzenleyici sistemler ve bazı transkripsiyon düzenleyici ağların, çeşitli biyofilm ile ilişkili gen ürünlerinin ekspresyonundan sorumlu oldukları bilinmektedir.⁹

Biyofilmin genetik düzenlenmesi üzerinde ilk çalışmalar, *CsuA/BABCDE* şaperon sistemi ile ilgilidir. Bu şaperon sisteminin aracılık ettiği *Csu* pilus üretiminin, *A. baumannii* ATCC 19606T suşu için abiyotik yüzeylere bağlanma ve mikrokolonilerin oluşumunu başlatarak biyofilmin tam gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir.²⁰ Adezinleri kodlayan *csuE* geninin inaktivasyonu, biyofilm oluşumunun yanı sıra pili üretiminin de ortadan kalkmasına neden olmuştur.⁹ *CsuA/BABCDE* operonunun ekspresyonu, *bfmS* tarafından kodlanan sensör kinaz ve *bfmR* tarafından kodlanan yanıt düzenleyiciden oluşan iki bileşenli sistem tarafından düzenlendiği bulunmuştur.²⁸ *BfmR*'nin inaktivasyonu,

CsuA/BABCDE operonunun ekspresyon kaybına ve plastik üzerinde pili üretiminin ve biyofilm oluşumunun ortadan kalkmasına neden olmuştur. *BfmS* sensör kinaz geninin inaktivasyonu ile biyofilm oluşumu ortadan kaldırılamamış fakat azalması sağlanmıştır.⁵¹

Birçok farklı protein, hücre-yüzey ve hücre-hücre adezyonunu destekleyerek hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Bunlardan biri de 38 kDa ağırlığında trimerik bir porin olan dış membran proteini OmpA'dır. OmpA, *A.baumannii*'nin plastik yüzeylere tutunma aşamasında ve hem insan epitel hücreleri hem de *Candida albicans* filamentleri ile etkileşiminde rol oynamaktadır.²⁸ *A. baumannii* *bap* geni, *Staphylococcus aureus*'ta tanımlanmış Bap proteini ile benzer büyük bir yüzey proteinini kodlamaktadır.⁵² Bap'ın mutasyonel olarak kaybedildiği suşlarda, cam üzerinde oluşan biyofilmlerin hacim ve kalınlığının azaldığı görülmüştür.²⁰ Biyofilmin elektron mikroskobu analizleri, polipropilen, polistiren ve titanyum dahil olmak üzere tıbbi cihaz yüzeylerinde üç boyutlu biyofilm yapısı ve içerisindeki kanal formasyonu için Bap'ın gerekli olduğunu göstermiştir.⁵² Benzer çalışmalarda Bap'ın, mikroorganizmanın hücre yüzey hidrofobikliğini artırarak, insan bronşiyal epitelyal hücreleri ve insan neonatal keratinositlerine olan adezyonunu arttırdığı da gösterilmiştir.²⁸

A. baumannii klinik izolatlarında biyofilm gelişimi ve olgunlaşması için PNAG salgılamaya kapasitesi de önemlidir. PNAG, dört gen kümesi tarafından (*pgaABCD*) kodlanır ve biyofilm ekzopolisakkarid matrisinin ana bileşenidir.²⁸

A. baumannii'nin biyofilm oluşumunu etkileyen bir diğer mekanizma ise çevreyi algılama sistemidir (QS). QS sayesinde hücre dışı sinyalleri algılayıp biyofilm oluşumunu yönlendirmektedir. *A. baumannii* M2 suşu, *abaI* otoindükleyici sentez geninin bir ürünü olan açil-homoserin lakton (AHL) molekülü üretmektedir. *AbaI* geni inaktive edilmiş mutant suşlarda, biyofilm % 30-40 oranında azalmıştır. Ortama saflaştırılmış M2 AHL'nin ekzojen olarak eklenmesi ile, mutant suşlar biyofilm olgunlaşmasını geri kazanmıştır. Bu araştırma ile *AbaI* gen ürünlerinin biyofilm oluşumunun son aşamalarında rol oynadığı gösterilmiştir. Hücre yoğunluğuna göre bakteriyel hücreler arasındaki iletişim, *A. baumannii* biyofilminin olgunlaşmasının bir parçası olduğu görülmektedir.⁹

2.3. Moleküler tiplendirme yöntemleri

Mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi, hastane enfeksiyon kontrol programlarının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Epidemiyoloji ve klinik mikrobiyoloji

laboratuvarı işbirliği ile, belirli bir patojenin meydana getirdiği enfeksiyon kümesi tanımlanmış olmaktadır. İzolatlar arası klonal ilişki, uygun tiplendirme yöntemleri kullanarak ortaya konmaktadır.⁵³

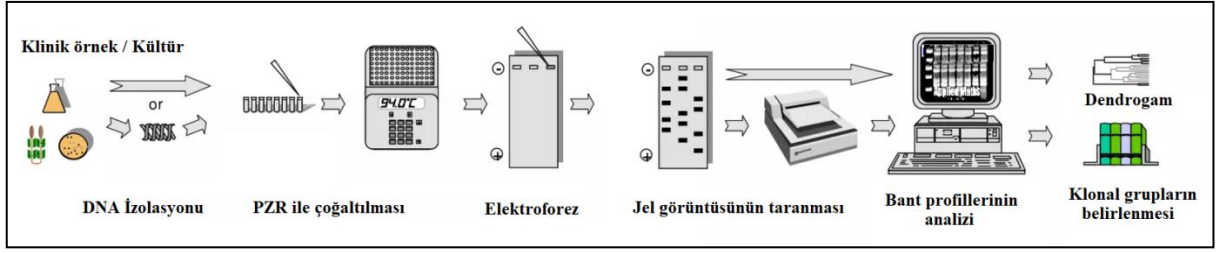
Uygun tiplendirme yönteminin belirlenmesinde, performans ve uygunluk etkili faktörler olmaktadır. Yöntemin performansı; ayırım gücü, stabilite, epidemiyolojik uyum ve tekrarlanabilirliktir. Uygunluk kriterleri arasında da hızlilik, kullanım kolaylığı, maliyet, esneklik, erişilebilirlik ve bilgisayarlı analizlere ve elektronik veritabanlarına yatkınlık bulunmaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemleri; amplifikasyon tabanlı (REP-RZR,RAPD), fragman (parça) tabanlı (PFGE), dizileme tabanlı (MLST) ve genomik tabanlı yöntemler (WGS) olarak dört geniş kategoriye ayrılabilir.⁷

Son yıllarda, bakteriyel tiplendirme, fenotipik yöntemlerden moleküler yöntemlere ve daha yakın zamanda genomik yöntemlere kaymıştır. Dizilemeye dayalı tiplendirme yöntemlerinden multilokus sekans tiplendirme (MLST) ve tüm genom dizileme (Whole-genome sequencing, WGS), farklı coğrafyalardan elde edilen izolatların da karşılaştırılmasına fırsat sağladığından referans yöntemler olarak kullanılmaktadır. WGS kullanımı, zahmetli, zaman alıcı, maliyetli olmasından ve uzman eksikliğinden dolayısırlıdır. Sonuç olarak, PFGE, REP-PZR ve MLST, en yaygın olarak kullanılan genotiplendirme yöntemleridir.⁷

2.3.1. REP-PZR

REP-PZR, tekrarlayan dizilerin bakteriyel genomdaki dağılımını kullanan PZR tabanlı bir tiplendirme yöntemidir. Bu tekrarlayan diziler arasında yer alan DNA fragmanları, tekrar eden bölgelere komplementer primerler ile çoğaltılmaktadır.⁵⁴ İzolatlar arasında tekrarlayan bölgelerin sayısı ve konumu farklı olduğundan PZR sonrasıtipe özgü bant profilioluşmaktadır.⁵³ PZR sonrası bantların görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır ancak daha yüksek hassasiyet için poliakrilamid jeller veya kapiller elektroforez de kullanılabilir. Az sayıda izolat analiz edildiğinde ve bant profilleri karmaşık olmadığında, göz ile değerlendirme yapılabilmektedir. Birden fazla jelin analiz edilmesi ve karşılaştırılması gerektiğinde, bilgisayar destekli analiz programları gerekmektedir.⁵⁵

2. Çizim. REP-PZR ve bilgisayar destekli analize genel bakış.⁵⁵

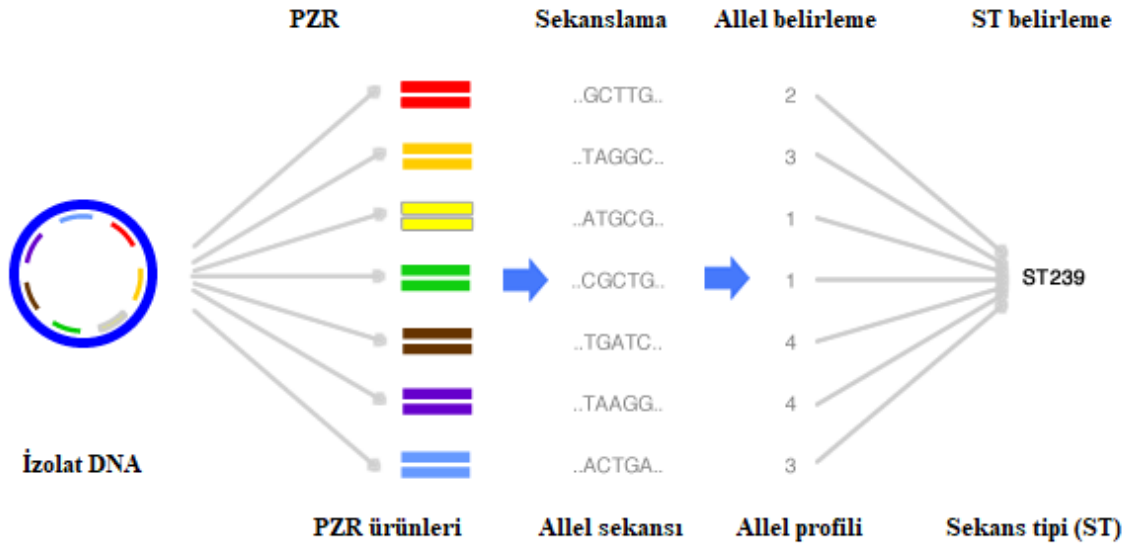


REP-PZR, en yaygın kullanılan ve teknik açıdan en iyi doğrulanmış amplifikasyon temeli tiplendirme yöntemidir.⁷ Kullanım kolaylığı, hızlı oluşu, yüksek ayırım gücü ve çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi nedeniyle sık kullanılan tiplendirme yöntemlerinden birisidir.⁵³ REP-PZR'in dezavantajlarından biri, agaroz jel elektroforezinin kullanılmasıdır. Farklı elektroforez sistemlerinin farklı zamanlarda kullanımına bağlı olarak, bant profillerinde yorumlama problemleri olabilmektedir. Bu da laboratuvarlar arası REP-PZR uygulamasının tekrarlanabilirliği sınırlanmaktadır.^{54, 56}

2.3.2. MLST

1998 yılında tanımlanan MLST, klonal ilişki ve popülasyon yapısını incelemek için kullanılan en kabul gören tiplendirme yöntemlerinden biridir. Temel metabolik süreçte görevli yedi adet (housekeeping) geni hedeflemektedir. Her bir genin iç kısımlarının (internal fragmanları) PZR ile çoğaltılması ardından dizi analizi yapılmaktadır. Uluslararası veri tabanında, bir genin her farklı dizilemesi, farklı bir allel tipine işaret etmektedir. Yedi genin allel tipi kombinasyonu, izolatın sekans tipini belirlemektedir.^{53, 54.}
⁵⁶ Aşağıda MLST yöntemini anlatan 3. Çizim yer almaktadır.

3. Çizim. MLST yöntemi.⁵⁷



A. baumannii için; iki MLST planı geliştirilmiştir. Bunlardan ilki Oxford MLST (*gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, *rpoD*, ikinci şema Pasteur MLST (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, *rpoB*) olup her ikisinin de veri tabanı MLST Pasteur/Oxford web sitesinde mevcuttur. İki şema da kullanılmakta olup, birçok çalışma Oxford şemasındaki *gyrB* ve *gpi* lokusunun filogenetik ağaçlarda gözlenen uyumsuzluklar nedeniyle gereksizliğini vurgulamaktadır.⁵⁴

Ayrım gücü yüksek olması, dizi analiz verilerinin açık olması ve elektronik olarak saklanabilmesi MLST yöntemini avantajlı kılmaktadır. Aynı zamanda farklı coğrafyalarda ve farklı laboratuvarlarda elde edilen izolatların karşılaştırılmasına imkan sağlamaktadır. Çoğunlukla uzun vadeli küresel epidemiyoloji ve sürveyans çalışmalarında kullanılmakla birlikte kısa süreli epidemilerde de faydalı olmaktadır. Fakat dizileme gerektirdiğinden izolat sayısı fazla olan çalışmalarda maliyetli olması dezavantajlarındanır.^{53, 54}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Besiyeleri ve ayraçların hazırlanması

3.1.1. Luria Bertani buyyon

Ticari olarak satılan toz besiyeri, Difco LB (Luria-Bertani) Broth, Miller (BD, Fransa), üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri, eritildikten sonra cam tüplere üç ml hacimde dağıtılıp, ağızları pamuk ile kapatılmıştır. Otoklavda 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiş, kullanım zamanına kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.1.2. MacConkey agar

Ticari olarak satılan toz besiyeri, MacConkey Agar (Merck, Almanya), üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri, 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Sıcaklığı 45–50°C'ye düştüğünde, aseptik şartlarda 20'şer ml besiyeri, petri kaplarına dökülmüştür. Katılaştıktan sonra kullanım zamanına kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3. Mueller – Hinton agar (MHA)

Ticari olarak satılan toz besiyeri, Mueller – Hinton agar (Merck, Almanya), üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri, 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Sıcaklığı 45–50°C'ye düştüğünde, aseptik şartlarda derinliği yaklaşık 4 mm (milimetre) olacak şekilde 22 ml hacimde besiyeri, petri kaplarına dökülmüştür. Katılaştıktan sonra kullanım zamanına kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.1.4. Mueller – Hinton Buyyon (MHB)

Ticari olarak satılan toz besiyeri, Mueller – Hinton Broth (Merck, Almanya), üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri, 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiş, kullanım zamanına kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.1.5. Triptik soy agar (TSA)

Ticari olarak satılan toz besiyeri, Tryptic Soy Agar (Merck, Almanya), üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri, 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Sıcaklığı 45–50°C'ye düştüğünde, aseptik şartlarda 20'şer ml besiyeri,

petri kaplarına dökülmüştür. Katılaştıktan sonra kullanım zamanına kadar +4°C’de saklanmıştır.

3.1.6. Glukoz (%1) içeren Triptik soy buyyon (TSB)

Ticari olarak satılan Tryptic Soy Broth (Merck, Almanya) toz besiyeri, üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyerinin üzerine, hacimde ağırlıkça % 1 oranında glukoz eklenmiştir. 121°C’de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiş, kullanım zamanına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.1.7. Gliserol (%15) içeren triptik soy buyyon

Ticari olarak satılan Tryptic Soy Broth (Merck, Almanya) toz besiyeri, üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri toplam hacminin %15’i kadar gliserol (Merck, Almanya), eklenmiştir, toplam su hacminden düşürülmüştür. Besiyeri, 121°C’de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiş, ardından steril 1.5 ml’lik ependorf tüplerine bir ml hacimde besiyeri paylaştırılmıştır. Kullanım zamanına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.1.8. Üç şekerli besiyeri

Ticari olarak satılan toz besiyeri, Triple Sugar Iron (TSI) Agar (Merck, Almanya), üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri, eritildikten sonra, cam tüplere 10 ml hacimde dağıtılıp, ağızları pamuk ile kapatılmıştır. 121°C’de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edildikten sonra, üçte biri dipte, kalan kısmı yatık olacak şekilde katılaşmaya bırakılmıştır. Kullanım zamanına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.1.9. Sülfite – indol – hareket besiyeri

Ticari olarak satılan toz besiyeri, Sulfide – Indol – Motility (SIM) Medium (Merck, Almanya), üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri, eritildikten sonra, cam tüplere 5 ml hacimde dağıtılıp, ağızları pamuk ile kapatılmıştır. 121°C’de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edildikten sonra, dik olacak şekilde katılaşmaya bırakılmıştır. Kullanım zamanına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.1.10. Oksidaz Ayracı

Tetrametil parafenilen diamin hidrokloridin saf suda % 0.5 oranında çözülerek oksidaz ayracı hazırlanmıştır. Işıkla teması kesilerek -20°C’de saklanmıştır.

3.2. Tampon çözeltiler ve kimyasalların hazırlanması

3.2.1. Steril fosfat tamponu

Steril fosfat tamponu hazırlamak için, ticari olarak satın alınan Phosphate Buffered Saline tabletleri (MP Biomedicals, ABD) kullanılmıştır. Her tablet 100 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

3.2.2. XTT

Ticari olarak temin edilen XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt) (Biomatik, Türkiye), 1 mg/ml konsantrasyonunda steril fosfat tamponu içerisinde çözülmüştür. Vorteks yardımı ile iyice karışması sağlanmıştır. 0,2 nm’lik filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Işık görmeyecek şekilde -80°C’de saklanmıştır.^{58, 59}

3.2.3. Menadion

Ticari olarak temin edilen toz menadion, (Sigma, Almanya) (1 mM) aseton içerisinde çözülmüştür. 0,2 nm’lik filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Kullanım zamanına kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.2.4. 0,5 McFarland Standardı

Baryum klorür çözeltisinden (0.048 mol/l’lik), 0,5 ml ve sülfürik asit çözeltisinden (0,18 mol/l’lik) 99,5 ml alınarak karıştırılmıştır.

3.2.5. EDTA (pH 8.0)

Beş yüz mililitre 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlamak için; 73.06 g EDTA tartılıp 450 ml distile su içerisinde, manyetik ısıtıcıda 65°C’de sodyum hidroksit (NaOH) eklenerek çözülmüştür. pH 8.0 olduğunda NaOH eklenmesi durdurup, son hacim 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanarak steril edilmiştir.

3.2.6. Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE)

Bir litre 50X TAE tamponu hazırlamak için; 242 g Tris Base tartılarak, 750 ml distile suda çözülmüştür. Üzerine 0,5 M EDTA’dan 100 ml ve glacial asetik asitten 57,1 ml eklenip bir litreye tamamlanmıştır. Kullanmadan önce 1/50 (1X) oranında seyreltilmiştir.

3.3. Kalite kontrol suşları

Kalite kontrol amacıyla, biyokimyasal testler ve antibiyotik duyarlılık testlerinde *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, PZR reaksiyonlarında ise *A.baumannii* ATCC 17978 suşu kullanılmıştır.

3.4. Çalışmada kullanılacak izolatların seçilmesi ve saklanması

Ekim 2016 ile Aralık 2017 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi'ne gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilip, MALDI-TOF MS (BioMérieux, Fransa) ile tür tanımlaması ve Vitek-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış olan *A. baumannii* izolatları taranmıştır. İzolatların büyük bir kısmı ÇİD olduğundan, antibiyotik duyarlılıklarına göre karşılaştırma yapabilmek için; ÇİD izolatlar iki grupta (YBÜ izolatları ve servis izolatları), ÇİD olmayan izolatlar da ayrı bir grupta toplanmıştır. Her gruptan 30 olmak üzere toplamda 90 *A. baumannii* izolatu çalışmaya alınmıştır. Her hastadan tek izolat çalışmaya alınmıştır. İzolatlar çalışma zamanına kadar %15 gliserol içeren TSB içerisinde -80°C'de saklanmıştır.

Hastalara ait klinik bilgiler retrospektif olarak hastane bilgi yönetim sistemi üzerinden araştırılmıştır.

3.5. Saklamadan çıkarılan izolatların tanımlanması

İzolatlar, -80°C'deki saklama besiyerlerinden MacConkey agara tek koloni düşürme yöntemi ile ekilmiştir. 35-37°C'de bir gece inkübe edilmiş, tek düşen kolonilerden tekrar TSA'ya pasajlanmıştır. Ertesi gün üreyen bakterilerin tanımlama testleri yapılmıştır.

3.5.1. Üç şekerli besiyerinde fermentasyon testi

TSA'da üreyen kolonilerden biri iğne öze yardımıyla agarın dip kısma batırma, yüzey kısmına çizgi ekim yapılmıştır. Tüpler 35-37°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüpler, gaz oluşumu, şeker fermentasyonu ve hidrojen sülfür (H₂S) oluşumu yönünden değerlendirilmiştir.

3.5.2. İndol ve Hareket testi

TSA'da üreyen kolonilerden, iğne öze yardımıyla SIM besiyerinin ilk 4 mm'lik kısmına batırma ekimi yapıp 35-37°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra tüpler, önce hareket testi, ardından indol reaksiyonu için değerlendirilmiştir. Hareket testi için, ilk okuma 4-6 saat sonra (hareketli nonfermentatif basiller için) ve ikinci okuma 24 saat sonra yapılmıştır. Yalnızca ekim çizgisinde meydana gelen üreme negatif, çizgiden dışa yayılıp bulanıklık oluşturan üreme pozitif olarak değerlendirilmiştir. İndol testi için, tüpün kenarından 4-5 damla Kovac's Ayracı damlatılarak tabaka oluşturulmuştur. Birkaç saniye içinde besiyerinin yüzeyi ile ayraç arasında kırmızı rengin oluşması indol pozitif, renk değişikliği oluşmaması ise indol negatif olarak değerlendirilmiştir.¹³

3.5.3. Oksidaz testi

Birkaç damla oksidaz ayracı damlatılmış kurutma kağıdı üzerine tahta çubuk yardımı ile bakteri kolonilerinden sürülmüştür. Koyu mavi renk oluşmaması negatif, on saniye içinde koyu mavi rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.¹³

3.5.4. Katalaz testi

Ticari olarak satılan %3 hidrojen peroksit (Aqua Med, Türkiye) kullanılmıştır. Lamda koloniler üzerine birkaç damla %3 hidrojen peroksit damlatılmıştır. Hızlı köpürme pozitif, köpürme olmaması negatif olarak değerlendirilmiştir.¹³

1.Çizelge. *A. baumannii* tanımlamasında kullanılan çeşitli testler.

	Üç Şekerli Besiyeri			Oksidaz	Katalaz	MacConkey'de üreme	42°C'de üreme	İndol	Hareket
	Şeker fermentasyonu	Gaz	H ₂ S						
<i>A.baumannii</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

3.6. Antibiyotik duyarlılık testleri

İzolatların, kolistin duyarlılık testi için sıvı mikrodilüsyon, trimetoprim sülfametoksazol (SXT) duyarlılık testi için disk düfüzyon, diğer antibiyotik duyarlılık testleri için ise agar dilüsyon yöntemleri kullanılmıştır.

3.6.1. Disk difüzyon testi

Bakterinin MHA besiyerinde hazırlanan taze pasajlarından birkaç koloni steril serum fizyolojik içine koyularak 0,5 McFarland Standardı bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonu, MHA yüzeyine eşit dağılacak şekilde üç yönde steril pamuklu eküvyon çubuk ile yayılmıştır. Trimethoprim-sulphamethoxazole (Oxoid 1.25/23.75 µg) ve piperasilin tazobaktam (Oxoid 100/10 µg) diski, steril penset yardımı ile agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Plaklar 35±1°C’de 16-20 saat inkübe edildikten sonra zon çapları mm cinsinden ölçülerek 2.Çizelge’de belirtilen sınır değerlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirilmiştir. Kalite kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.⁶⁰⁻⁶²

2. Çizelge. *Acinetobacter spp.* disk difüzyon sınır değerleri.

Antibiyotik	Disk İçeriği (µg)	Duyarlı ≥	Orta Duyarlı	Dirençli<
Trimetoprim/ Sulfametoksazol	1.25/ 23.75	14	11 - 13	11
Piperasilin/ Tazobaktam	100/10	21	18-20	18

3.6.2. Sıvı mikrodilüsyon testi

Sıvı mikrodilüsyon testi için Colistin sulfatesalt (Sigma C4461- 100 mg, potens ≥ 15.000 U) temin edilmiştir. Kolistin potensi,“*CLSI*”önerileri doğrultusunda 30,000 U, %100 potens kabul edilerek hesaplandığından, % 50 olarak kabul edilmiştir.⁶⁰

Tartılacak antibiyotik miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

Ağırlık (mg): Hacim (ml) X Konsantrasyon (µg/ml) / Potens.⁶²

Stok kolistin çözeltisi (640 µg/ml) hazırlamak için; 12,8 mg kolistin toz etken madde tartılarak 10 ml steril distile su ile çözülmüştür. Test edilecek konsantrasyon, “*EUCAST*” 2018 *Acinetobacter spp.* duyarlılık sınır değerinin 3 dilüsyon altı ve direnç sınır değerinin 3 dilüsyon üstüne çıkacak şekilde hesaplanmıştır.

Steril U tabanlı mikropklara 100'er µl MHB dağıtılmıştır. İlk kuyucukta olması gereken kolistin konsantrasyonunun iki kat üst konsantrasyonundan 100 µl alınarak MHB içeren ilk kuyucuğa koyulmuştur. Ardından antibiyotiğin seri dilüsyonu yapılarak son kuyucuktan 100 µl alınarak atılmıştır. Steril serum fizyolojik içerisinde 0,5 McFarland Standardı bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu 1/10 oranında dilüe edilmiş ve bakterinin son konsantrasyonu 5×10^5 olacak şekilde bakteri süspansiyonundan her kuyucuğa (sterilite kuyucuğu hariç) 5 µl olarak ekilmiştir. Her plakta bir sterilite kontrolü ve her bakteri için bir üreme kontrolü çalışılmıştır. Kalite kontrol suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Mikropklar 35°C de 16-20 saat inkübe edildikten sonra MİK (minimal inhibitör konsantrasyon) değerleri okunmuş ve EUCAST 2018 sınır değerlerine göre $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ duyarlı ve $< 2 \mu\text{g/ml}$ dirençli olarak değerlendirilmiştir.^{61, 62}

3.6.3. Agar dilüsyon testi

Amikasin, gentamisin, siprofloksasin, levofloksasin, meropenem, imipenem ve tigesiklin duyarlılık testleri için agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Antibiyotik stok çözeltileri, 3. Çizelge'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. İçerdiği yardımcı maddelerden dolayı, imipenem potensi 0,5 ve meropenem potensi 0,69 alınarak hesaplanmıştır.

3. Çizelge. Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması.

Antibiyotik adı	Stok konsantrasyonu	Hazırlanışı
Amikasin	1280 µg/ml	51 µl Amikasin (Amikozit 500 mg/2 ml, Zentiva) çözeltisi alınarak steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.
Gentamisin	640 µg/ml	800 µl gentamisin (Genta 160 mg/2 ml, İbrahim Ethem Ulugay) çözeltisi alınarak steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.
Levofloksasin	640 µg/ml	1,28 ml levofloksasin (Lefox 500 mg/100 ml, VEM) çözeltisi alınarak steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.
Siprofloksasin	640 µg/ml	3,2 ml siprofloksasin (Flotic 200 mg/100 ml, VEM) çözeltisi alınarak steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.
Meropenem	640 µg/ml	9,26 mg meropenem (Meronem 1 g, Astrazeneca) toz madde tartılarak 10 ml distile su ile çözülmüştür.
İmipenem	640 µg/ml	12, 8 mg imipenem (Tienam 500 mg, MSD) toz madde tartılarak 10 ml steril distile su ile çözülmüştür.
Tigesiklin (TG)	640 µg/ml	640 µl tigesiklin (Tygacil 50 mg/5 ml, Pfizer) çözeltisi alınarak steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Antibiyotik stok çözeltilerinden, steril distile su ile çift kat seri dilüsyon yapılarak konsantrasyonlar elde edilmiştir. Sıcaklığı 45-50°C'ye getirilmiş, erimiş durumdaki MHA besiyerlerine (18 ml), uygun dilüsyonlar (2 ml) eklenmiştir. Agar ve antibiyotik çözeltilerinin iyice karışması sağlanmış ve besiyerleri katılaşmaya bırakılmıştır. Steril serum fizyolojik içerisinde 0,5 McFarland Standardı bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları 1/10 oranında dilüe edilmiş ve U tabanlı mikropklara dağıtılmıştır. Mikropklarda yer alan bakteri süspansiyonları, replikatör yardımı ile en düşük konsantrasyonda antibiyotik içeren agardan başlayarak antibiyotikli MHA besiyerlerine inoküle edilmiştir. Kalite kontrol suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

kullanılmıştır. Mikroplaklar 35°C de 16-20 saat inkübe edildikten sonra MİK değerleri kaydedilmiştir.^{61, 62}

4.Çizelge. *Acinetobacter spp* antibiyotik MİK sınır değerleri.^{61, 63}

Antibiyotik	MİK sınır değeri (µg/ml)		
	Duyarlı (S) ≤	Orta Duyarlı (I)	Dirençli (R) >
Amikasin	8	16	16
Gentamisin	4	-	4
Siprofloksasin	1	-	1
Levofloksasin	0,5	1	1
Meropenem	2	4	8
İmipenem	2	4	8
Kolistin	2	-	2
Tigesiklin*	2	4	8

*FDA kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

3.7. Biyofilm aktivitesinin saptanması

İzolatların biyofilm aktivitesi, XTT redüksiyon analizi kullanılarak belirlenmiştir.

3.7.1. Mikroplakta biyofilm oluşturulması

İzolatların 24 saatlik taze pasajlarından alınan koloniler, 25 ml %2'lik TSB'de bir gece (16-24 saat) çalkalamalı etüvde (170 rpm, 37°C) inkübe edilmiştir. Ertesi gün üremeli besiyeri santrifüj edilmiş (3000 rpm, 4°C, 5 dk), 25 ml steril fosfat tamponu ile üç kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra %2'lik TSB içerisinde 0,5 McFarland standardı bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonlarından 100'er µl alınarak mikroplaklara koyulmuştur. Plaklar, 24 saat inkübasyondan sonra 100 µl steril fosfat tamponu ile üç kez yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. XTT çözeltisinden 50 ml ve menadion çözeltisinden 4 ml alınarak ayrı bir falkonda karıştırılmıştır. Bu karışımdan her kuyucuğa 100'er µl koyulmuştur. Mikroplaklar, karanlık ortamda 37°C'de 3 saat inkübe edilmişlerdir.⁵⁹

3.7.2. Biyofilm aktivitesinin ölçülmesi

Mikroplak okuyucuda 450 nm'de okunan optik dansite değerlerine göre biyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak *A. baumannii* ATCC 17978 suşu, negatif kontrol olarak steril TSB kullanılmıştır. *A. baumannii* ATCC 17978 suşunun absorbans

değeri % 100 olarak kabul edilmiş, diğer izolatlar pozitif kontrole göre karşılaştırmalı olarak zayıf (% 50'nin altı), orta (% 50-100) ve güçlü (% 100'ün üstü) olarak yorumlanmıştır.

3.8. Deoksiribonükleik Asit İzolasyonu

Genotiplerin belirlenmesi ve biyofilm ilişkili genlerin araştırılması amacı ile gerçekleştirilecek PZR için DNA izolasyonu, kaynatma metodu ile gerçekleştirilmiştir. Bakteriler saklamadan çıkarılırken ilk olarak tek koloni düşürme yöntemi ile EMB agara ekilmiştir. Bu kültürden bir koloni, LB buyyona pasajlanarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri süspansiyonundan 500 µl mikrosantrifüj tüpüne alınmış 14000 rpm'de beş dakika santrifüjlenmiştir. Dipteki pelete dokunmadan üstteki besiyeri çekilip 500 µl steril fosfat tamponu koyularak iki kez yıkama işlemi yapılmıştır. Son yıkamadan sonra steril fosfat tamponu iyice çekilip peletin üzerine 200 µl steril saf su ilave edilmiştir. Bakteri süspansiyonu, vorteks yardımı ile çözüldükten sonra kuru ısıtıcı bloğunda (Eppendorf, ThermoStat Plus, Almanya) 95°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda mikrosantrifüj tüpleri buz üzerine alınıp 1 dakika bekletildikten sonra, 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. DNA içeren üst kısım steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Elde edilen DNA, kullanım zamanına kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.9. Genotiplerin REP-PZR ile belirlenmesi

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması ve hastanemizdeki genotiplerin belirlenmesi amacıyla REP-PZR yöntemi kullanılmıştır. Primerler için, Bou ve ark.⁶⁴'nın çalışması referans alınmıştır. Primer dizileri ve erime sıcaklığı (Tm) değerleri 5. Çizelge'de gösterilmiştir.

5. Çizelge. REP-PZR' de kullanılan primer dizileri ve erime sıcaklığı (Tm) değerleri.

Primer Çifti	Primer Dizisi	Erime sıcaklığı (Tm) °C
REP -1	5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3'	47 °C
REP-2	5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3'	43 °C

Liyofilize halde gelen her bir primer dizileri, firmanın önerileri doğrultusunda steril saf su ile sulandırılarak 100 µM'lık stok primer çözeltileri elde edilmiş, kullanım zamanına kadar -20°C'de saklanmıştır.

REP-PZR karışımı, Luo ve ark.¹⁰ çalışmasından optimize edilmiştir. Ticari olarak satın alınan Hot Start Green Master Mix (Promega M5122 GoTaq®, ABD) kullanılmıştır. REP-PZR karışımı içerisinde, G2 Hot Start Master karışımı, primer çifti, kalıp DNA ve steril distile su (dH2O) bulunmaktadır. PZR karışımında her bir örnek için kullanılan miktarlar 6. Çizelge'de gösterilmiştir.

6. Çizelge. Genotiplerin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.

Reaktifler	Bir örnek için
Hot Start Green Master karışımı	12,5 µl
DMSO	2,5 µl
Primer (1 çift)	2 µl (her birinden 1 µl)
Steril Saf Su	4 µl
Kalıp DNA	2 µl
Toplam	25 µl

PZR için hazırlanan karışım, dondurulup çözülme sayısını azaltmak ve kontaminasyon riskini en aza indirmek için 21 örneklilik karışımlar halinde hazırlanmıştır. Kalıp DNA'lar eklenmeden hazırlanan toplam 483 µl karışım, 200 µl'lik mikrosantrifüj tüplerine 23'er µl paylaştırılmıştır. Son olarak karışımın üzerine izolatlara ait 2 µl kalıp DNA eklenmiştir.

Reaksiyon döngüleri Bou ve ark.⁶⁴'nün çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PZR, 7.Çizelge'de belirtilen koşullarda iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler'da gerçekleştirilmiştir.

7. Çizelge. REP-PZR döngü koşulları.

Aktivasyon	94 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	40 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	2 dk	
Son uzama	72 °C	5 dk	
Sınırsız bekleme	4 °C	∞	

PZR ürünlerinin görüntülenmesi için yatay jel elektroforezi kullanılmıştır. Elektroforez için, Tris–Asetik asit–EDTA (TAE) tamponu içerisinde % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Temiz bir erlen içerisinde 30 ml 1X TAE tamponu içerisine 0,4 g agaroz (Peqlab, Almanya) koyulup total hacim 1X TAE tamponu ile 40 ml'ye tamamlanmıştır. Mikrodalga fırında agaroz eriyinceye kadar ısıtılmış, jel sıcaklığı yaklaşık 50–55°C'ye düştüğünde, içerisine son konsantrasyon 1 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik stok etidyum bromür solüsyonu eklenmiştir. Taraklar elektroforez yatağına yerleştirilip, içerisine jel dökülmüş ve yaklaşık 20-30 dakika katılaşması beklenmiştir.

Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarılarak, elektroforez yatağı ile birlikte tanka (Thermo Scientific, ABD) yerleştirilmiştir. Jelin üzeri kapanacak şekilde 1X TAE tamponu eklenmiştir. Jeller arasında karşılaştırma yapabilmek için ilk kuyucuğa 5 µl GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD), diğer kuyucuklara ise 20 µl örnekler ait PZR ürünleri yüklenmiştir. Elektroforez tankında 80 V'da 90 dakika yürütülen örnekler, GeneLine ImageSCI (Spectronics Corp., ABD) jel görüntüleme sisteminde değerlendirilmiştir. Görüntüler tif formatında kaydedilmiştir.

REP-PZR profillerinin analizi için, Phoretix 1D Pro (TotalLab Ltd) programı kullanılmıştır. Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) metodu ve Dice benzerlik katsayısı işaretlenerek REP-PZR profillerinin dendrogramı oluşturulmuş ve klonal gruplar belirlenmiştir.

3.10. Biyofilm ile ilişkili genlerin PZR yöntemi ile araştırılması

A.baumannii izolatlarında, daha önceki çalışmalarda biyofilm ile ilişkilendirilmiş beş gen (*bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmR*, *csuE*) bölgesinin araştırılması için PZR yöntemi kullanılmıştır. Genlerin belirlenmesi için yapılan PZR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri ve moleküler ağırlıkları, 8. Çizelge’de gösterildiği gibidir.

8. Çizelge. Biyofilm ile ilişkili genler PZR primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.^{51, 65-68}

Primer Çifti	Primer Dizisi	Moleküler Ağırlık (baz çifti)
<i>Bap</i> – F	TGCTGACAGTGACGTAGAACCACA	190 bç
<i>Bap</i> – R	TGCAACTAGTGGGAATAGCAGCCCA	
<i>OmpA</i> – F	GTAAAGGCGACGTAGACG	578 bç
<i>OmpA</i> –R	CCAGTGTTATCTGTGTGACC	
<i>AbaI</i> – F	GGTTGGGAGTTGAACTGTCC	370 bç
<i>AbaI</i> – R	AAACG TTCTACTCCAAGAGG	
<i>BfmR</i> - F	CACCATGAGCCAAGAAGAAAAG	750 bç
<i>BfmR</i> – R	GACCAACCTTATAGGAAG	
<i>CsuE</i> - F	CGTAAAGCTACTCATGTC	810 bç
<i>CsuE</i> – R	AAGTGCCTGATGTTCTGG	

Biyofilm ile ilişkilendirilmiş dört farklı gen (*bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmR*) bölgesinin araştırılması için çoklu PZR, *csuE* geninin araştırılması için tekli PZR kurulmuştur. Her bir reaksiyon için hazırlanan karışımlar 9. Çizelge’de gösterildiği gibidir.

9. Çizelge. Biyofilm ile ilişkili genler PZR karışımı.

Reaktifler	Çoklu PZR (Bir örnek için)	Tekli PZR (Bir örnek için)
Hot Start Green Master karışımı	12,5 µl	12,5 µl
Primer	8 µl (her birinden 1 µl)	2 µl (her birinden 1 µl)
Steril Saf Su	2,5 µl	8,5 µl
Kalıp DNA	2 µl	2 µl
Toplam	25 µl	25 µl

Reaksiyon döngüleri, primerlerin Tm değerlerine göre optimize edilmiştir. PZR, iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler’da 10. ve 11. Çizelge’de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

10. Çizelge. Çoklu (*bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmR*) PZR döngü şartları.

Aktivasyon	94 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	52 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	2 dk	
Son uzama	72 °C	5 dk	
Sınırsız bekleme	4 °C	∞	

11. Çizelge. *CsuE* PZR döngü şartları.

Aktivasyon	94 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	52 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	2 dk	
Son uzama	72 °C	5 dk	
Sınırsız bekleme	4 °C	∞	

PZR ürünlerinin görüntülenmesi için yatay jel elektroforezi kullanılmıştır. Elektroforez için, daha önce tarif edildiği gibi TAE tamponu içerisinde % 1,5’lik agaroz jel hazırlanmıştır. Jelin ilk kuyucuğuna 5 µl GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD), diğer kuyucuklara da aynı miktarda örnekler ait PZR ürünleri yüklenmiştir. Elektroforez tankında 90 V’da 45 dakika yürütülen örnekler, GeneLine ImageSCI (Spectronics Corp., ABD) jel görüntüleme sisteminde değerlendirilmiştir.

3.11. Sekans tiplerinin MLST ile belirlenmesi

REP-PZR analizi yapıldıktan sonra, MLST için; birisi kolistin dirençli endemik genotipe ait üç izolat ve ÇİD olup farklı genotiplerde yer alan dört izolat olmak üzere yedi izolat seçilmiştir. Pasteur Enstitüsü tarafından geliştirilmiş MLST şeması kullanılmıştır.⁶⁹ İzolatların housekeeping genleri (*fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *cpn60*, *rpoB* ve *rplB*) Pubmlst veritabanında belirtilen primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. Kullanılan primerler ve housekeeping gen uzunlukları 12. Çizelge’de yer almaktadır.

12. Çizelge. Housekeeping genlerin PZR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.

Primer Çifti	Primer Dizisi	Moleküler Ağırlık (baz çifti)
<i>cpn60</i> - F	ACTGTACTTGCTCAAGC	405bç
<i>cpn60</i> - R	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	
<i>fusA</i> - F	ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT	633bç
<i>fusA</i> -R	CCAACATAACKYTGWACACCTTTGTT	
<i>gltA</i> - F	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	483bç
<i>gltA</i> - R	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	
<i>pyrG</i> - F	GGTGTGTTTCATCACTAGGWAAAGG	297 bç
<i>pyrG</i> - R	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA	
<i>recA</i> - F	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	372 bç
<i>recA</i> - R	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	
<i>rplB</i> - F	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC	330 bç
<i>rplB</i> -R	CACCACCACRTGYGGGTGATC	
<i>rpoB</i> - F	GCGGAAATGGCDGARAACCAC	456 bç
<i>rpoB</i> - R	GARTCYTCGAAGTTGTAACC	

Yedi gen bölgesinin PZR reaksiyonu için hazırlanan karışımlar 13. Çizelge’de gösterildiği gibidir.

13. Çizelge. Housekeeping genler için PZR karışımı.

Reaktifler	Bir örnek için
Hot Start Green Master karışımı	25 µl
Primer	2 µl (her birinden 1 µl)
Steril Saf Su	21µl
Kalıp DNA	2 µl
Toplam	50 µl

Reaksiyon döngüleri, primerlerin Tm değerlerine göre optimize edilmiştir. PZR, iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler'da 14. Çizelge'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

14. Çizelge. Housekeeping genler için PZR döngü şartları.

Aktivasyon	94 °C	2 dk	
Denatürasyon	94 °C	30 sn	} 35 döngü
Primer bağlanması	50 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	30 sn	
Son uzama	72 °C	5 dk	
Sınırsız bekletme	4 °C	∞	

PZR ürünlerinin DNA dizi analizi için Sanotech firmasından hizmet alımı yapılmış, dizileme çalışması Applied Biosystems 3730XL DNA analyzer ile gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonuçları SnapGene 4.2.6. programı üzerinden görüntülenmiş ve Pubmlst veritabanında belirtilen allel dizilerine göre yedi genin allel numaraları tanımlanmış ve sekans tipi saptanmıştır.

3.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile yapılmıştır. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile

değerlendirmiştir. Nümerik değişkenler Ortalama \pm standart sapma ve medyan (25.- 75. persentil) ve frekans (yüzdeler) olarak verilmiştir.

Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için Mann Whitney U Testi, Kruskal Wallis Tek yönlü varyans analizi ve Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

Gruplar arası farklılıkları değerlendirmek amacı ile kategorik değişkenlerde Fisher's Exact kare testi, Yates' kare testi ve Monte Carlo kare testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ iki yönlü testlerde istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. İzolatların genel özellikleri

Bu çalışmaya, Ekim 2016 ile Aralık 2017 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarına gelen hasta örneklerinden izole edilen 90 *A. baumannii* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların, 47'si erkek, 43'ü kadın hastalardan izole edilmiştir. Hastaların en küçüğü bir, en büyüğü ise 83 yaşında olup yaş ortalaması $52,02 \pm 23,06$ 'dır.

Çoğul dirençli izolatlar, YBÜ ve servislerden eşit sayıda olacak şekilde toplam 60 yatan hastaya ait çeşitli örneklerden izole edilmiştir. ÇİD olmayan izolatların 25 tanesi çeşitli servislerde, ikisi YBÜ'de yatan hastalardan ve üçü de poliklinik hastalarından gönderilen örneklerden izole edilmiştir. Örneklerin 27'sini trakeal aspirat, 18'ini yara, 14'ünü idrar, 11'ini kan, yedisini balgam, altısını kateter, dördünü BOS, birini BAL, birini derin doku ve birini periton sıvısı örnekleri oluşturmaktadır. İzolatların örnek türüne göre dağılımı 15. Çizelge'de gösterilmiştir.

15.Çizelge. İzolatların örnek türüne göre dağılımı.

	Trakeal					İdrar	BOS	Yara	Toplam
	Kan	Kateter	BAL	Balgam	aspirat				
YBÜ	3	2	-	-	20	1	3	3	32
Dahili Servisler	6	3	1	7	6	9		8	40
Cerrahi Servisler	1	1	-	-	1	2	1	9	15
Poliklinik	1	-	-	-	-	2	-	-	3
Toplam	11	6	1	7	27	14	4	20	90

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi, BAL: Bronko Alveolar Lavaj, BOS: Beyin Omurilik Sıvısı.

Hastalara ait veriler tarandığında, dokuz izolat kolonizasyon, 81 izolat ise enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilmiştir. Kolonizasyon oranı, ÇİD olmayan izolatlarda (% 23,3), çoğul dirençli olan izolatlara göre (% 3,3) anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p=0,006$).

İzolatların 21 (%23,3)'inde *A. baumannii*'ye ek olarak farklı mikroorganizma üremeleri görülmüştür. Bunlardan en sık *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis*, ardından sırasıyla *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Streptococcus mitis/oralis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* ve *Escherichia coli* üretilmiştir.

4.2. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Çalışmaya alınan çoğul dirençli 60 izolatta, piperasilin tazobaktam, siprofloksasin, imipenem ve meropenem direnci % 100 oranındadır. Levofloksasin direnci % 90, amikasin direnci % 60, gentamisin direnci % 83,3, SXT direnci % 51,7, tigesiklin direnci % 23,3, kolistin direnci % 1,6 olarak bulunmuştur. Çoğul dirençli izolatların 6 (%10) tanesi YİD, 54 (%90) tanesi ise ÇİD olduğu saptanmıştır. ÇİD olmayan izolatlar siprofloksasin, levofloksasin ve SXT dışında tüm antibiyotiklere % 100 duyarlı bulunmuştur. Bir izolatta siprofloksasin ve levofloksasin direnci, iki izolatta ise SXT direnci tespit edilmiştir. ÇİD Antibiyotik duyarlılık ve MİK sonuçları ÇİD izolatların 16. Çizelge’de, ÇİD olmayan izolatların ise 17. Çizelge’de gösterilmiştir.

16. Çizelge. Çoğul dirençli izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları.

Antibiyotik	Duyarlı (S)	Orta duyarlı (I)	Dirençli (R)	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı
SXT	% 48,3	% 1,6	% 50,1	-	-	-
TZP	% 0	% 0	% 100	-	-	-
Amikasin	% 40	% -	% 60	>64	>64	≤1->32
Gentamisin	% 16,7	% -	% 83,3	>32	>32	2->32
Siprofloksasin	% -	% -	% 100	>16	>16	4->16
Levofloksasin	% 10	% -	% 90	16	>16	0,5->16
İmipenem	% 0	% 1,6	% 98,4	>32	>32	8->32
Meropenem	% -	% -	% 100	>32	>32	16->32
Tigesiklin	% 76,7	% 18,3	% 5	2	4	0,25-8
Kolistin	% 98,4	% -	% 1,6	0,25	0,5	0.12->16

SXT: Trimetoprim sülfametaksazol, TZP: Piperasilin tazobaktam.

17. Çizelge. ÇİD olmayan izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları.

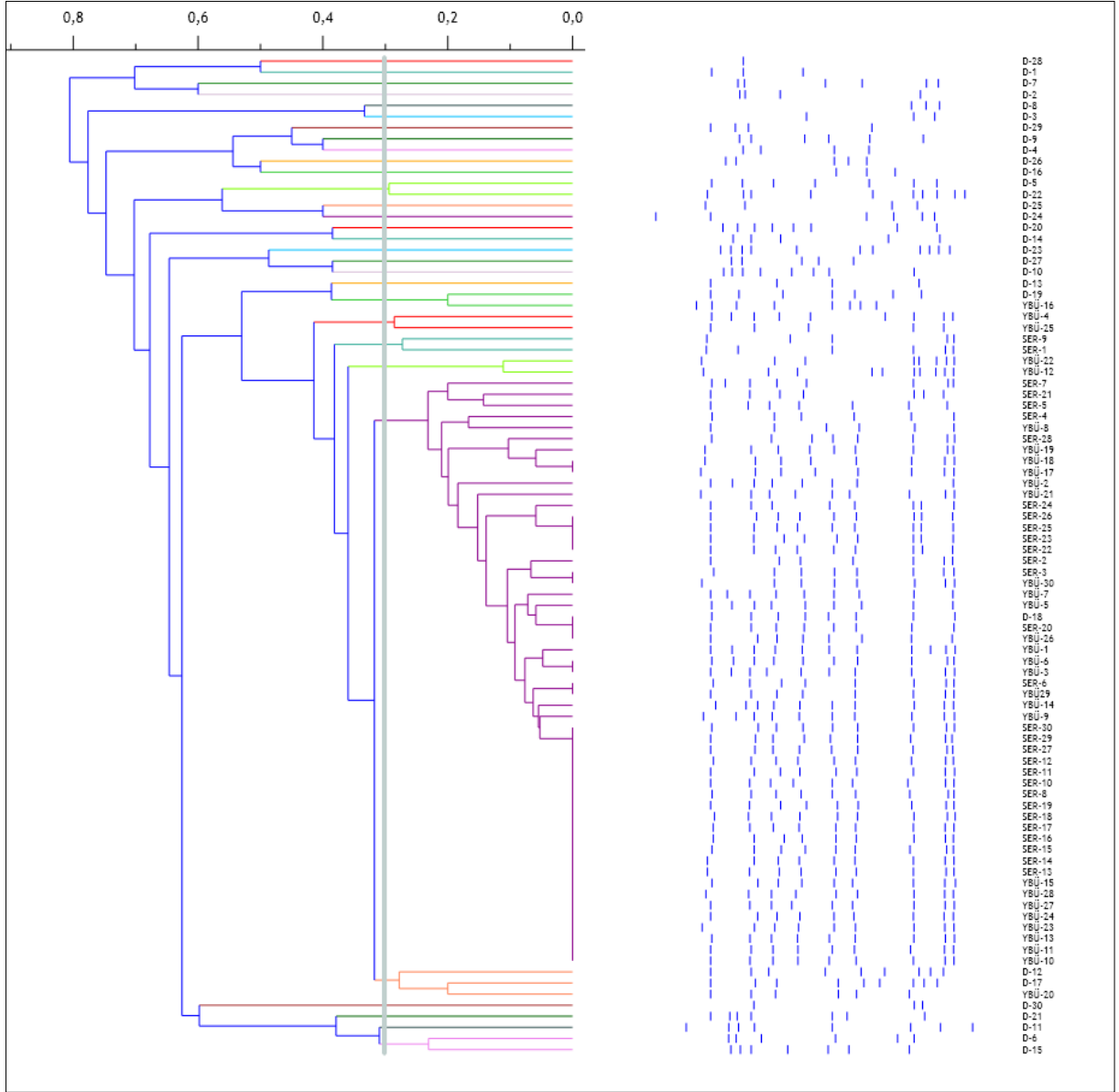
Antibiyotik	Duyarlı (S)	Orta duyarlı (I)	Dirençli (R)	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı
SXT	% 6,6	% -	% 93,4	-	-	-
TZP	% 100	% -	% -	-	-	-
Amikasin	% 100	% -	% -	2	4	≤1-4
Gentamisin	% 100	% -	% -	≤0,5	1	≤0,5-2
Siprofloksasin	% 3,3	% -	% 96,7	0.12	0,5	≤0.12-4
Levofloksasin	% 3,3	% -	% 96,7	≤0.12	0,25	≤0.12-8
İmipenem	% 100	% -	% -	0,25	0,25	≤0,25-0,25
Meropenem	% 100	% -	% -	0,25	1	≤0,25-1
Tigesiklin	% 100	% -	% -	0,25	0,5	≤0,25-0,5
Kolistin	% 100	% -	% -	0,25	0,5	0.12-0,5

SXT: Trimetoprim sülfametaksazol, TZP: Piperasilin tazobaktam.

4.3. REP-PZR ile belirlenen genotipler

İzolatların REP-PZR ile analizinde 29 genotip saptanmıştır. İzolatların 53'ünde (% 59) Genotip A saptanmış ve hastanemizin endemik genotipi olarak belirlenmiştir. Diğer genotipler sayıca az görüldüğünden sporadik olarak değerlendirilmiştir. İzolatların REP-PZR paternleri ve klonal ilişkilerinin dendrogramı 4.Çizim'de gösterilmiştir.

4. Çizim. İzolatların REP-PZR analizi ile elde edilen dendrogramı.



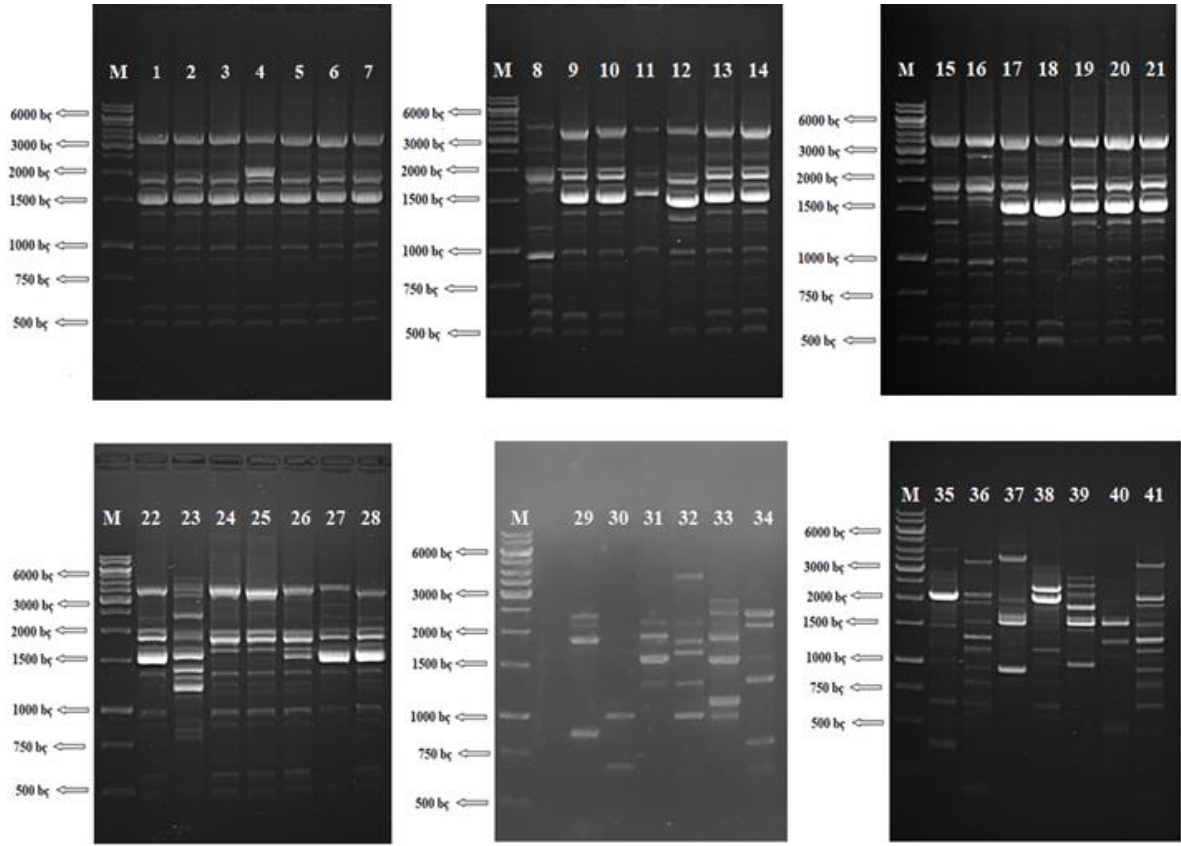
YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi, SER: Servis grubu, D: ÇİD olmayan izolatlar

Sporadik genotiplerin kendi içinde dağılımına bakıldığında; YBÜ-12 ve YBÜ-22 izolatları Genotip B; YBÜ-4 ve YBÜ-25 izolatları Genotip C; SER-1 ve SER-9 izolatları Genotip D; YBÜ-16 ve D-9 izolatları Genotip E; D-5 ve D-22 izolatları Genotip F; YBÜ-20, D-12 ve D-17 izolatları Genotip G; D-6 ve D-15 izolatların da Genotip H'yi oluşturmaktadır. Diğer izolatlar tek olarak farklı genotipler içerisinde yer almaktadır. Endemik genotip ve birden fazla izolat içeren sporadik genotiplerin görülme sıklığı 18. Çizelge'de belirtilmiştir. Endemik genotip ve bazı sporadik genotiplere ait REP-PZR bant profilleri 5. Çizim'de gösterilmiştir.

18. Çizelge. Genotiplerin görülme sıklığı yüzdeleri.

Genotipler	İzolat Sayısı	%
Genotip A	53	59
Genotip B	2	2,2
Genotip C	2	2,2
Genotip D	2	2,2
Genotip E	2	2,2
Genotip F	2	2,2
Genotip G	3	3,3
Genotip H	2	2,2
Diğer genotipler	22	24,5

5. Çizim. Endemik genotip ve bazı sporadik genotiplere ait REP-PZR bant profilleri.



M: Moleküler ağırlık standardı (1 kb);

1-7,9,10,12-17, 19-22,24-28nolu kuyucuklar endemik genotip, **Genotip A**;

8 nolu kuyucuk **Genotip B**;

11 nolu kuyucuk **Genotip C**;

18 nolu kuyucuk **Genotip D**;

23nolu kuyucuk **Genotip E**;

32nolu kuyucuk **Genotip F**;

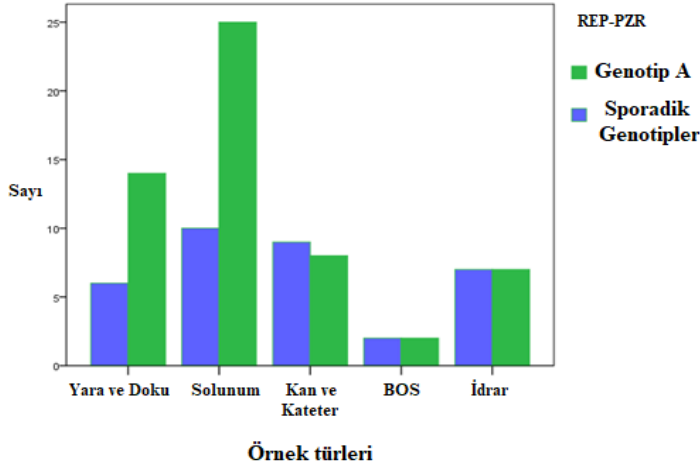
33 nolu kuyucuk **Genotip H**;

36 ve **41** nolu kuyucuklar **Genotip G**

29-31, 34,35, 37-40 nolu kuyucuklar farklı sporadik genotiplereait izolatların bant profilleri.

Örnek türüne göre endemik ve sporadik izolatların dağılımına (6.Çizim) bakıldığında, yara-doku ve solunum yolu örneklerinde endemik tipin daha sık, diğer örneklerde ise sporadik tiplerin daha sık olduğu görülmüştür. Aradaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p=0,351$).

6. Çizim. Örnek türlerine göre endemik ve sporadik izolatların dağılımı.



Hastanemiz endemik genotipi, YİD izolatların hepsinde (%100), ÇİD izolatların 48 (% 88,9)'inde ve ÇİD olmayan izolatların ikisinde (% 6,7) mevcuttur. Genotip A, ÇİD izolatlarda, ÇİD olmayan izolatlara göre arasında anlamlı derecede fazla saptanmıştır (p=0,000).

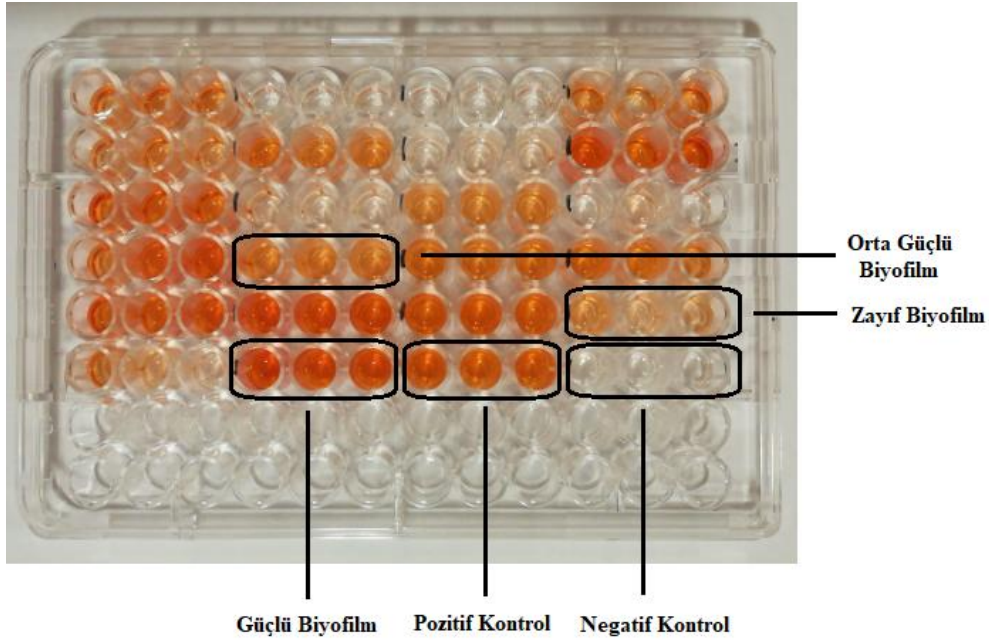
Sporadik genotiplere ait izolatlarda yüksek kolonizasyon oranı (% 23,5) saptanmıştır. Endemik genotipte ise sadece bir izolat kolonize olarak değerlendirilmiştir. Endemik genotipe ait izolatların sporadiklere göre, etken olma ihtimali daha yüksektir, aradaki fark anlamlı bulunmuştur (p=0,002).

Genotip A'nın antibiyotiklere direnç oranları; kolistin % 1,8, tigesiklin % 23, SXT % 48, amikasin % 59, gentamisin % 82, levofloksasin % 91, imipenem ve meropenem %96 olarak tespit edilmiştir.

4.4. Biyofilm aktivitesi sonuçları

İzolatların biyofilm aktivitesi, XTT redüksiyon analizi kullanılarak belirlenmiştir. İzolatların 2 tanesinin (% 2,2) biyofilm oluşturmadığı, 7 tanesinin (% 7,8) zayıf biyofilm, 30 tanesinin (%33,3) orta güçlü biyofilm, 51 tanesinin de (%56,7) güçlü biyofilm oluştuğu saptanmıştır. Negatif kontrol, pozitif kontrol, güçlü biyofilm, orta güçlü biyofilm ve zayıf biyofilm aktivitesine sahip izolatların XTT ile boyandıktan sonraki görüntüsü 7. Çizim'de gösterilmiştir.

7. Çizim. XTT ile boyama sonrası negatif kontrol, pozitif kontrol, güçlü biyofilm, orta güçlü biyofilm ve zayıf biyofilm aktivitesine sahip izolatların görüntüleri.



YBÜ ve servislerdeki çoğul dirençli izolatların biyofilm OD değerleri 0,10-1,75 arasında dağılım gösterirken, ÇİD olmayan izolatların biyofilm OD değerleri 0,33-2,46 arasında geniş bir dağılıma sahiptir. İzolatların biyofilm OD değeri dağılımları 8.Çizim’de gösterilmiştir.

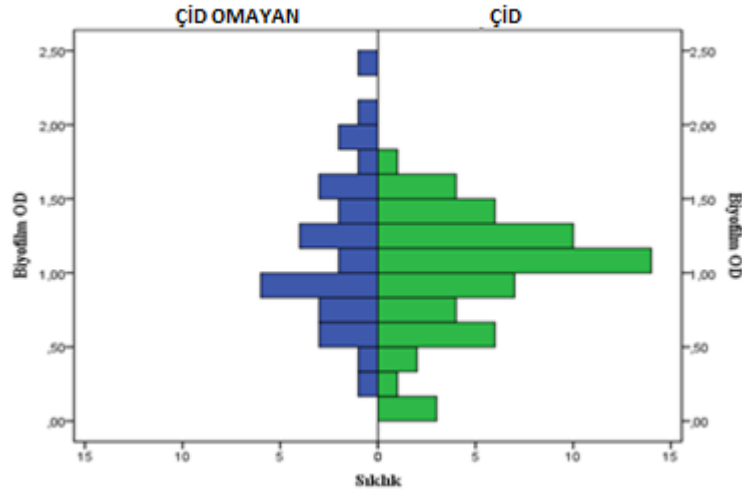
ÇİD olan ve olmayan izolatlar arasında biyofilm aktivitesi bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,213$).

19. Çizelge. Gruplara göre biyofilm aktivitesi sonuçları.

	Biyofilm OD Ortanca (25p-75p)	Negatif	Zayıf biyofilm	Orta güçlü biyofilm	Güçlü biyofilm
YBÜ izolatları	1,04 (0,78-1,36)	-	2	10	18
Servis izolatları	1,02 (0,58-1,22)	2	3	8	17
ÇİD olmayan izolatlar	1,14 (0,50-1,14)	0	2	12	16
Toplam	1,04 (0,72-1,33)	2	7	30	51

OD: Optik Dansite, YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

8. Çizim. İzolatların biyofilm OD değeri dağılımları.



Örnek türüne göre biyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde, idrar örneklerinin % 86'sında, BOS örneklerinin % 75'inde, solunum yolu örneklerinin % 72'sinde, yara ve doku örneklerinin % 55'inde, kan ve kateter örneklerinin ise % 44'ünde güçlü biyofilm aktivitesi tespit edilmiştir. 20. Çizelge'de örnek türüne göre biyofilm aktiviteleri gösterilmiştir. BOS, kan ve derin doku gibi invazif örneklerin % 44'ünde; balgam, idrar ve yüzeysel yara gibi invazif olmayan örneklerin ise % 62'sinde güçlü biyofilm aktivitesi saptanmıştır. İnvazif olan ve invazif olmayan örnek türlerinde biyofilm aktivitesi bakımından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0,403$).

20. Çizelge. Örnek türüne göre biyofilm aktivitesi sonuçları.

	Negatif	Zayıf biyofilm	Orta güçlü biyofilm	Güçlü biyofilm
Yara ve doku	0	1	8	11
Solunum yolu örnekleri	1	5	11	18
Kan ve Kateter	1	0	9	7
BOS	0	0	1	3
İdrar	0	1	1	12
Toplam	2	7	30	51

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

Biyofilm oluşturmayan iki izolatın biri Genotip A içerisinde yer alırken, diğeri ise sporadik genotiplerden birine aittir. Endemik genotip içerisinde yer alan izolatların biyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde, % 61'inin güçlü, % 27'sinin orta güçlü, % 10'unun zayıf biyofilm oluşturduğu görülmüştür. 21. Çizelgede endemik ve sporadik genotiplerin biyofilm aktivitesinin dağılımı gösterilmiştir. Endemik ve sporadik genotipler arasında biyofilm aktivitesi bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,609).

21. Çizelge. Endemik ve sporatik genotiplerin biyofilm aktivitesi sonuçları.

	Biyofilm OD Ortanca (25p-75p)	Negatif	Zayıf biyofilm	Orta güçlü biyofilm	Güçlü biyofilm
Endemik genotip (Genotip A)	1,04 (0,75-1,29)	1	6	15	34
Sporadik genotipler	1,00 (0,71-1,46)	1	1	15	17
Toplam	1,04 (0,72-1,33)	2	7	30	51

OD: Optik Dansite

Biyofilm aktivitesi ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki (22. Çizelge) incelendiğinde; SXT duyarlı olanlarda SXT dirençli olanlara göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu saptanmıştır (p=0,016). Diğer antibiyotiklere duyarlılık ve biyofilm aktivitesi bakımından anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

22. Çizelge. Antibiyotik duyarlılıklarına göre biyofilm OD değerleri.

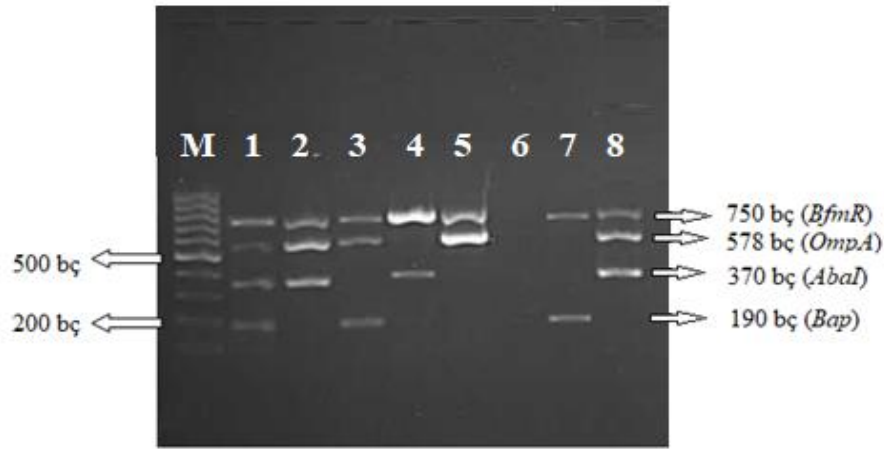
	Biyofilm OD		p değeri
	Dirençli Ortanca (25p-75p)	Duyarlı Ortanca (25p-75p)	
SXT	1,00 (0,60-1,19)	1,14(0,90-1,40)	0,016
TZP	1,04 (0,68-1,26)	1,14 (0,76-1,54)	0,153
Amikasin	1,04 (0,62-1,19)	1,05 (0,76-1,38)	0,286
Gentamisin	1,04 (0,87-1,25)	1,06 (0,60-1,41)	0,874
Siprofloksasin	1,04 (0,69-1,25)	1,14 (0,75-1,56)	0,111
Levofloksasin	1,04 (0,68-1,23)	1,14 (0,78-1,25)	0,089
İmipenem	1,04 (0,68-1,26)	1,14 (0,76-1,54)	0,153
Meropenem	1,04 (0,68-1,26)	1,14 (0,76-1,54)	0,153
Tigesiklin	1,09 (0,50-1,21)	1,03 (0,75-1,33)	0,518
Kolistin	1,093	1,04 (0,70-1,33)	-

SXT: Trimetoprim sülfametaksazol, TZP: Piperasilin tazobaktam.

4.5. PZR ile saptanan biyofilm ile ilişkili genler ve sıklığı

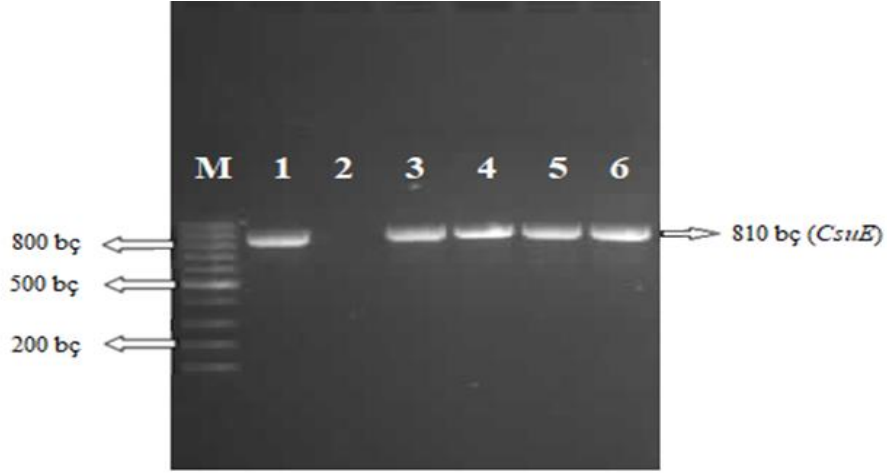
Biyofilm ile ilişkili beş gen (*bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmR*, *csuE*) bölgesi PZR ile araştırıldığında, izolatların hepsinde bir veya birden fazla biyofilm ile ilişkili gen saptanmıştır. PZR ürünlerinin jel elektroforezi ile yürütülmesi sonucu; *bap* geni için 190 bç, *abaI* geni için 370 bç, *ompA* geni için 578 bç, *bfmR* geni için 750 bç, *csuE* geni için 810 bç hizasında bant elde edilmesi pozitif olarak kabul edilmiştir.

9. Çizim. *Bap*, *AbaI*, *OmpA*, *BfmR* genlerine ait jel görüntüsü.



- M:** Moleküler ağırlık standardı (100 bç),
1 nolu kuyucuk *Bap*, *AbaI*, *OmpA*, *BfmR* Pozitif kontrol,
2 nolu kuyucuk *AbaI*, *OmpA*, *BfmR* (+),
3 nolu kuyucuk *Bap*, *OmpA*, *BfmR* (+),
4 nolu kuyucuk *AbaI*, *BfmR* (+),
5 nolu kuyucuk *OmpA*, *BfmR* (+),
6 nolu kuyucuk negatif kontrol,
7 nolu kuyucuk *Bap*, *BfmR* (+),
8 nolu kuyucuk *Bap*, *AbaI*, *OmpA* (+).

10. Çizim. *CsuE* genine ait jel görüntüsü.



M: Moleküler ağırlık standardı (100 bç),
1 nolu kuyucuk *CsuE* Pozitif kontrol,
2nolu kuyucuk negatif kontrol,
3-6 nolu kuyucuklar *CsuE*(+).

Pozitif saptanan biyofilm ilişkili genlerin görüme sıklığı; *bfmR* 89 (% 99), *ompA* 84 (% 93), *bap* 83(% 92), *csuE* 77 (% 85), *abaI* 74 (% 82) olarak belirlenmiştir. Çoğul dirençli YBÜ-servis izolatları ve ÇİD olmayan izolatlarda tespit edilen genler 23. Çizelge’de gösterilmiştir. Çoğul dirençli izolatlarda ÇİD olmayanlara göre *ompA* ve *csuE* gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (p=0,003,p=0,001).

23. Çizelge. Gruplara göre biyofilm ilişkili genlerin dağılımı.

Pozitif saptanan genler	YBÜ izolatları	Servis izolatları	ÇİD olmayan izolatlar	p değeri
<i>bfmR</i>	30	30	29	1,00
<i>ompA</i>	30	30	24	0,003*
<i>bap</i>	30	27	26	0,203
<i>csuE</i>	30	27	20	0,001*
<i>abaI</i>	26	27	21	0,111

Güçlü ve orta güçlü biyofilm aktivitesine sahip izolatların 80 tanesinde (% 99) *bfmR* geni, 76 tanesinde (% 94) *ompA* geni, 67 tanesinde (% 83) *abaI*geni, 75 tanesinde (% 92) *bap* geni, 72 tanesinde (% 89) *csuE* geni pozitif olarak saptanmıştır. *CsuE* geni pozitif

olanların, negatif olanlara göre anlamlı olarak daha güçlü biyofilm aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (p=0,009). Zayıf biyofilm, orta güçlü biyofilm ve güçlü biyofilm aktivitesine sahip izolatlar arasında *bap*, *abal*, *ompA*, ve *bfmR* genlerinin varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05). Biyofilm ilişkili genler pozitifliklerinin, biyofilm aktivitesine göre dağılımı 24. Çizelge’de gösterilmiştir.

24. Çizelge. Biyofilm ilişkili genleri pozitif olan izolatlarda biyofilm aktiviteleri.

Pozitif saptanan genler	Biyofilm Negatif	Zayıf Biyofilm	Orta Güçlü Biyofilm	Güçlü Biyofilm	p değeri
<i>bfmR</i>	2	7	30	50	0,576
<i>ompA</i>	2	6	28	48	0,425
<i>bap</i>	1	7	28	47	0,349
<i>csuE</i>	-	5	26	46	0,009*
<i>abal</i>	2	5	23	44	0,261
Toplam	2	7	30	51	-

Biyofilm ilişkili genlerin endemik ve sporadik genotiplere göre saptanma oranlarına bakıldığında her iki genotipe ait izolatlarda bir veya birden fazla gen pozitif bulunmuştur. Endemik genotipe ait izolatlarda saptanan genler sıklığına göre sırasıyla *bfmR*, *ompA*, *bap*, *csuE* ve *abal* iken sporadik genotiplerde sırasıyla, *bfmR*, *bap*, *ompA*, *abal* ve *csuE* olmuştur. Endemik genotipe ait izolatlarda sporadiklere göre *ompA* ve *csuE* gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (p=0,002, p=0,000). Endemik ve sporadik genotiplere göre biyofilm ilişkili gen pozitiflikleri 25. Çizelge’de gösterilmiştir.

25. Çizelge. Endemik ve sporadik izolatlarda biyofilm ilişkili genleri saptanma sayıları.

Pozitif saptanan genler	Endemik Genotip A	Sporadik genotipler	p değeri
<i>bfmR</i>	56	33	0,378
<i>ompA</i>	56	28	0,002*
<i>bap</i>	54	29	0,99
<i>csuE</i>	54	23	0,000*
<i>abal</i>	46	28	0,408

4.6. MLST ile belirlenen sekans tipleri

Genotip A içerisinde yer alan üç izolatın MLST ile sekans tipi belirlenmiştir. İki (YBÜ-27 ve Servis-20) ST-2, kolistin dirençli olan üçüncü izolat (Servis-15) ise ST-604 klonuna ait olduğu saptanmıştır. REP-PZR ile farklı genotiplere ait YBÜ kaynaklı üç izolattan ikisi (YBÜ-12, YBÜ-25) yine ST-2, dış merkez YBÜ'den hastanemiz YBÜ'ye nakil edilen diğer izolat ise (YBÜ-16) ST-695 olarak saptanmıştır. Servis izolatlarından Genotip D'ye ait izolat ise ST-604 olarak tespit edilmiştir. ST-695 ve ST-604 için henüz CC bildirilmemiştir. Yedi housekeeping gene ait allellik profilleri, ST ve CC 26.Çizelge'de yer almaktadır.

26. Çizelge. İzolatların ST, CC ve allellik profilleri.

İzolatlar	REP-PZR	Pasteur MLST								ST
		CC	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>	
YBÜ-27	Genotip A	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Servis-15	Genotip A	-	2	2	2	55	2	2	2	604
Servis-20	Genotip A	2	2	2	2	2	2	2	2	2
YBÜ-12	Genotip B	2	2	2	2	2	2	2	2	2
YBÜ-25	Genotip C	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Servis-9	Genotip D	157	1	3	2	1	4	24	2	157
YBÜ-16	Genotip E	-	1	3	2	2	3	4	2	695
YBÜ-20	Genotip G	2	2	2	2	2	2	2	2	2

CC:Klonal Kompleks

27. Çizelge. İzolasyon tarihlerine göre ÇİD izolatların REP-PZR genotipleri, izole edildikleri örnek türü, klinikler ve biyofilm aktiviteleri.

REP-PZR Genotipi	ST	İzolat no	Klinik	İzolasyon Tarihi	Örnek Türü	Biyofilm Aktivitesi
A		YBÜ-7		19.10.2016	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-7	Enfeksiyon Servis	25.10.2016	Derin yara	Orta
		SER-10	KVC servis	26.10.2016	Yara	Orta
		YBÜ-18	YBÜ	26.10.2016	Trakeal aspirat	Orta
		YBÜ-19	YBÜ	26.10.2016	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-6	Enfeksiyon Servis	02.12.2016	Derin doku	Güçlü
		SER-2	Hematoloji Servis	25.12.2016	Kan	Güçlü
	ST-2	YBÜ-27	YBÜ	27.12.2016	Kan	Orta
	ST-2	SER-20	Romatoloji S.	01.01.2017	Balgam	Güçlü
	ST-604	SER-15	Enfeksiyon Servis	03.01.2017	İdrar	Güçlü
		YBÜ-3	YBÜ	03.01.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		YBÜ-2	YBÜ	11.01.2017	İdrar	Güçlü
		SER-13	Ortopedi Servis	11.01.2017	Yara	Orta
		SER-18	Gastroenteroloji S.	11.01.2017	Balgam	Zayıf
		SER-24	Pediyatri Servis	16.01.2017	İdrar	Güçlü
		YBÜ-28	YBÜ	16.01.2017	Kan	Güçlü
		YBÜ-1	YBÜ	05.02.2017	Doku	Güçlü
		SER-25	Romatoloji S.	13.02.2017	Yara	Güçlü
		YBÜ-9	YBÜ	14.02.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-23	KVC	15.02.2017	Yara	Güçlü
		SER-4	Enfeksiyon Servis	15.02.2017	Balgam	Güçlü
		YBÜ-8	YBÜ	22.02.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-26	Göğüs Hast. S.	27.12.2017	İdrar	Güçlü
		SER-14	Ortopedi Servis	28.02.2017	Yara	Orta
		SER-19	Genel Cerrahi S.	01.03.2017	Yara	Güçlü
		YBÜ-6	KVC-YBÜ	03.03.2017	Kateter	Güçlü
		SER-16	Onkoloji S.	06.03.2017	Balgam	Güçlü
		SER-21	Göğüs Hast. S.	08.03.2017	Balgam	Zayıf
		YBÜ-5	YBÜ	09.03.2017	Dren	Güçlü
		YBÜ-26	YBÜ	11.03.2017	BOS	Güçlü
		YBÜ-17	YBÜ	18.03.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-28	Göğüs Hast. Ser.	21.03.2017	BAL	Zayıf
		SER-3	Enfeksiyon Servis	22.03.2017	Kan	Güçlü
		YBÜ-15	YBÜ	13.04.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-5	Nefroloji S.	17.04.2017	Kan	Negatif
		YBÜ-14	YBÜ	18.04.2017	Trakeal aspirat	Zayıf
		YBÜ-30	Pediyatri YBÜ	20.04.2017	Kateter	Orta
		SER-27	Genel Cerrahi S.	25.04.2017	Yara	Orta
		SER-30	Hematoloji S.	25.04.2017	Balgam	Güçlü
		YBÜ-13	YBÜ	26.04.2017	BOS	Güçlü
		SER-29	Göğüs Hast. Ser	02.05.2017	Balgam	Orta
		YBÜ-29	Koroner YBÜ	05.05.2017	Trakeal aspirat	Orta
		YBÜ-11	YBÜ	10.05.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-17	Pediyatri Servis	15.05.2017	Trakeal aspirat	Orta
		YBÜ-10	YBÜ	22.05.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-11	KVC	23.05.2017	Yara	Güçlü
		SER-12	Genel Cerrahi S.	27.05.2017	İdrar	Güçlü
		YBÜ-21	Cerrahi YBÜ	29.05.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		YBÜ-24	Cerrahi YBÜ	06.06.2017	Trakeal aspirat	Güçlü
		SER-8	Kadın Doğum S.	07.06.2017	Yara	Güçlü
		YBÜ-23	Cerrahi YBÜ	08.06.2017	Trakeal aspirat	Zayıf
		D-18	Nefroloji poliklinik	06.07.2017	İdrar	Orta
		SER-22	Hematoloji S.	29.07.2017	Kan	Güçlü

B	ST-2	YBÜ-22	Cerrahi YBÜ	06.12.2017	BOS	Güçlü
		YBÜ-12	Cerrahi YBÜ	11.12.2017	Trakeal aspirat	Orta
C		YBÜ-4	YBÜ	16.03.2017	Dren	Güçlü
	ST-2	YBÜ-25	Koroner YBÜ	08.06.2017	Kan	Orta
D	ST-157	SER-9	Enfeksiyon Servis	04.11.2016	Balgam	Negatif
		SER-1	Hematoloji S.	30.01.2017	Kan	Orta
E	ST-695	YBÜ-16	YBÜ	22.03.2016	Trakeal aspirat	Orta
G	ST-2	YBÜ-20	YBÜ	20.10.2016	Trakeal aspirat	Güçlü



5. TARTIŞMA

Acinetobacter cinsi bakteriler, hızla antibiyotik direnci geliştirmesi ve hastane ortamında uzun süre sağkalımı sayesinde, 1970'lerden bu yana giderek yaygın görülen ciddi bir nozokomiyal sorun haline gelmiştir.³ Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı 2009-2010 verilerine bakıldığında *Acinetobacter spp.* tüm sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların % 1.8'ine neden olmuştur. Asya ülkelerinde ise bu oran daha da artmaktadır.¹⁴

A.baumannii enfeksiyonlarının çoğu, YBÜ'de yatan ve ek hastalığı olan hastalarda ortaya çıkmaktadır. Tipik olarak cihazla ilişkili enfeksiyonlarda (ventilatör ilişkili pnömoni, santral venöz kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları vs.) ilk akla gelenlerdir. Ocak 2009-Aralık 2011 tarihleri arası SENTRY çalışmasında da Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da YBÜ enfeksiyonlarının % 7'sinde ABC'nin rol oynadığı bildirilmiştir.⁷⁰ Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda, *A. baumannii*'nin, YBÜ enfeksiyonlarında etken olarak bildirilme oranı % 7,2-34,7 arasında değişmektedir.⁷¹⁻⁷⁵ Hastanemizde de Ekim 2005 ile Ekim 2006 tarihleri arasında YBÜ'de OXA-23 genine sahip ÇİD *A. baumannii* salgını tespit edilmiştir. Salgın izolatu toplam 47 hastadan izole edilmiş, 37'sinin klinik verilerine ulaşılmıştır. Epidemik izolata maruz kalan hastalarda ölüm oranı % 35 olarak bulunmuştur. Salgın izolatlarının PFGE ile klonal ilişkileri ortaya konmuştur.⁷⁶

A. baumannii enfeksiyonları, 1970'li yıllarda çoğu antibiyotik ile başarılı bir şekilde tedavi edilirken zamanla bakteri antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir.⁴ Birçok antibiyotiğe karşı kendiliğinden dirençli olmakla birlikte yeni direnç mekanizmaları için özellikle de antibiyotik direnç genlerinin elde edilmesi ile ilgili olağanüstü bir yeteneğe sahiptir. Antibiyotik direnci temel olarak; antimikrobiyal inaktive edici enzimler ve dışa atım pompaları ile meydana gelmektedir.¹

Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı (EARS-Net)'nin 2017 raporunda 30 Avrupa ülkesine ait invaziv izolatların antimikrobiyal direnç verileri bildirilmiştir. İzolatların % 45'i tüm antibiyotiklere duyarlı, % 4,3'ü tek antibiyotik grubuna dirençli, % 7,5'i iki antibiyotik grubuna dirençli, % 43,2'si üç antibiyotik grubuna da dirençli olarak bulunmuştur. İsveç, Norveç, İzlanda, Finlandia ve Malta'dan gönderilen izolatlar tüm

antibiyotiklere duyarlı iken, Hırvatistan, Bulgaristan, Yunanistan ve Romanya en dirençli izolatların gönderildiği ülkelerdir.⁷⁷

Kan ve BOS örneklerinden izole edilen, halk sağlığı açısından önemli bakteriyel patojenlerin antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirildiği, ülkemizde yer aldığı Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (CAESAR) 2018 raporu yakın tarihte yayınlanmıştır. Ülkemizde ÇİD *A. baumannii* oranı % 78 olup, antibiyotik direnç oranları; imipenem ve meropenem % 92, gentamisin ve tobramisin % 78, amikasin % 71, siprofloksasin % 93 olarak bildirilmiştir.⁷⁸

Çelik ve ark.'nın çalışmasında 2014-2016 yılları arasında YBÜ'de yatan hastaların örneklerinden izole edilen *A. baumannii* izolatlarının antibiyotik direnç oranları, levofloksasin % 100, TZP ve meropenem % 98, siprofloksasin % 99, imipenem % 96,5, amikasin % 79, tigesiklin % 2, kolistin % 1,5 olarak bildirilmiştir.⁷⁹ YBÜ'de yatan hastaların kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmaların araştırıldığı çalışmada, *A. baumannii* antibiyotik direnç oranları; TZP % 97, siprofloksasin % 95, imipenem ve meropenem % 90, gentamisin % 73, tigesiklin % 72, amikasin % 63,5 olarak saptanmıştır.⁸⁰

Bizim çalışmaya aldığımız 60 ÇİD izolatta antibiyotik direnç oranları, TZP, siprofloksasin, imipenem ve meropenem % 100, levofloksasin % 90, amikasin % 60, gentamisin % 83,3, SXT % 51,7, tigesiklin % 23,3, kolistin % 1,6 olarak bulunmuştur. Çoğul dirençli izolatların 6 (%10) tanesinin YİD, 54 (%90) tanesinin ise ÇİD olduğu saptanmıştır.

A. baumannii tarafından oluşturulan en yaygın iki enfeksiyon tablosu nozokomiyal pnömoni ve bakteriyemilerdir. Pnömoniler, sıklıkla YBÜ'lerde endotrakeal tüp veya trakeostomilerdeki biyofilmlerden kopan bakterilerin aspire edilmesi ile meydana gelmektedir.¹⁴ Biyofilm oluşturması ve ÇİD *A. baumannii*'nin hastane ortamında hayatta kalmasını sağlayan ana faktörlerdir.⁸¹

Giderek artan çoğul dirençli *A. baumannii* izolatları, biyofilm oluşumu gibi virülans faktörü ile ilgili çalışmaların hedefi olmuştur. Bizim çalışmamızda, hastanemiz merkez laboratuvarına gönderilen örneklerinden izole edilen ÇİD/YİD *A. baumannii* izolatları ve ÇİD olmayan *A. baumannii* izolatlarında biyofilm aktivitesi ve antibiyotik direnci ile ilişki araştırılmıştır.

Biyofilm oluşumunu saptamada; tüp yöntemleri (standart cam tüp, modifiye Christensen, polistren tüp), mikrotitrasyon plak yöntemleri ve Calgary biyofilm cihazı, sık kullanılan metodlardır. Mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm oluşumu saptanması, kuyucuğun dip kısmında bir halka şeklinde oluşan biyofilm kütesinin veya metabolik olarak biyofilm aktivitesinin optik yoğunluğun ölçülmesi ile gerçekleştirilir. Biyofilm kütesinin boyanması için sıklıkla kristal viyole kullanılmaktadır. Yöntemin kolaylığı, çabukluğu ve tekrarlanabilirliği avantaj sağlamaktadır. Fakat kristal viyole, ölü ve canlı hücrelerin eşit olarak boyadığından, biyokütle ve biyofilm canlılığı arasında bir ilişkiyi ortaya koymak zor olmaktadır.⁸²

XTT testi, bir tetrazolyum tuzunun, sitoplazmatik membranda yer alan solunum zinciri enzimleri tarafından metabolize edilmesine dayanmaktadır.⁸³ XTT, metabolik olarak aktif hücreler tarafından, renkli bir suda çözünebilir formazan türevine indirgenmektedir. Ölçülen OD, metabolik olarak aktif bakteri hücrelerin sayısıyla orantılı olmaktadır.^{59, 83}

Peeters ve ark.⁸³'nin çalışmasında, mikrotitrasyon plakalarda üretilen mikrobiyal biyofilmlerin ölçümünde, XTT ve kristal viyole boyamalarını da içeren altı farklı yöntem karşılaştırılmıştır. Biyofilmlerde bulunan tahmini koloni oluşturan birim sayıları, farklı analizler arasında sınırlı varyasyonlar göstermekle birlikte genel olarak yöntemlerin uygulanabilirlik ve tekrarlanabilirliği yüksek bulunmuştur. *P. aeruginosa* biyofilm kantifikasyonu için kristal viyole yöntemi pek uygun görülmemiştir. Diğer bakterilere göre *P. aeruginosa* biyofilmi için ölçülen absorbans değeri düşük bulunmuştur. Bu düşüklüğün, *P. aeruginosa*'nın fazla miktarlarda su içeren biyofilminin yetersiz fiksasyonundan kaynaklandığı düşünülmüştür. XTT, hücre kantifikasyonu ile korele bulunmuştur fakat pahalı ve zaman alıcı olması dezavantaj olarak değerlendirilmiştir.⁸³

Tiyokinon maddesinin bakteriyal biyofilm oluşumunu üzerine inhibitör etkisinin araştırıldığı çalışmada, biyofilm ölçümü için eş zamanlı olarak XTT ve kristal viyole boyası kullanılmıştır. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu değerlendirildiğinde, XTT ve kristal viyole sonuçları birbiri ile ilişkili bulunmamıştır. Bunun, biyokütle ve metabolik aktivite farkından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.⁵⁹

Hendiani ve ark.⁸⁴'nin çalışmasında 75 klinik *A. baumannii* izolatu ile mikrotitrasyon plağında ve polipropilen falkon tüpte hem XTT hem kristal viyole boyası kullanılarak

biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir. Tüp yöntemi ile 57, mikrotitrasyon plağında 50 izolat biyofilm oluşturmuştur. Her iki boya kullanıldığında da sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Kristal viyole ucuz ve hızlı bir yöntemdir, XTT pahalı olmasına rağmen tekrarlanabilirliği ve güvenilirliğinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Kristal viyole metodu ile XTT'den farklı olarak, hem aktif hücreler hem de hücre dışı matrisi boyanabildiğinden çalışmamızda metabolik aktiviteyi gösteren XTT boyası tercih edilmiştir.

Ülkemizde *A. baumannii*'de biyofilm aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla XTT boyasının kullanıldığı bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Sadece, bazı biyokimyasal maddelerin *A. baumannii* biyofilmi üzerine etkilerinin araştırıldığı Çelik ve ark.'nın çalışmasında yer almaktadır.⁸⁵ Ülkemizdeki çalışmalarda çoğunlukla biyofilmin gösterilmesinde boya olarak kristal viyole kullanılmıştır. Can ve ark.⁸⁶'nın çalışmasında kan kültürlerinden izole edilen 17 *A. baumannii*'de kristal viyole boyası kullanılarak polistren plaklarda biyofilm oluşumu araştırılmış ve ardından biyofilm oluşturan bakterilerin hücre duvarı transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. İzolatların dokuzunda (%52,9) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Biyofilm oluşturan bakterilerin çevresinde ekzopolisakkarit materyal birikimi görülmüş, fakat flajella veya pili gözlenmemiştir. Biyofilm oluşumundan hücre çevresindeki ekzopolisakkaritlerin sorumlu olduğunu düşünülmüştür.⁸⁶ ÇİD *A. baumannii* izolatlarında virülans faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada da, 16 izolattan 12'sinin güçlü, üçünün orta derecede biyofilm ürettiği saptanmıştır. Bu verinin ÇİD *A. baumannii* ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi desteklediği belirtilmiştir.⁸⁷

Hindistan'da yapılan bir çalışmada 72 klinik *A. baumannii* izolatının 45'i (% 62,5) biyofilm oluşturmuştur. İzolatların % 36,1'i imipeneme, % 66,6'sı seftazidime, % 72,2'si siprofloksasine, % 80,5'i amikasine ve % 84,7'si piperasiline dirençli bulunmuştur. İzolatların 65'i (% 90.3) ÇİD olup, biyofilm oluşumu ve çoğul ilaç direnci arasında pozitif bir korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır (p=0.0004). Fakat biyofilm oluşturmayan izolatlarda, biyofilm oluşturanlara göre imipenem ve piperasilin direnci, daha yüksek bulunmuştur.⁸⁸ Meksika'da 2007-2012 yılları arasında izole edilmiş toplam 152 *A. baumannii* ile yapılan bir çalışmada ise, biyofilm üretimi imipenem direnci ile ilişkili bulunmuştur (p = 0.002). Çin'de yapılan bir çalışmada da, 2010-2013 yılları arasında

birçok hastaneden toplanan 272 izolatta biyofilm aktivitesi ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki araştırılmıştır. İzolatların 31'i ÇİD ve 166'sı YİD olarak saptanmıştır. Güçlü biyofilm oluşturan 63 izolatın %20,6'sı ÇİD/YİD iken, zayıf biyofilm oluşturanların %87,6'sı ÇİD/YİD bulunmuştur. Daha yüksek direnç seviyesine sahip olan izolatların, daha zayıf biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Biyofilmin, antibiyotiklere direnç oranı yeterince yüksek olmayan izolatlarda, koruyucu bir mekanizma olarak işlev görebileceği düşünülmüştür.⁸⁹

Cepas ve ark.⁹⁰'nin çalışmasında gram negatif bakterilerin bazı türlerinde, biyofilm oluşturma yeteneği ve antimikrobiyal direnç arasında ilişki bulunmuştur fakat çoğul ilaç direncive biyofilm oluşumu arasında bir ilişki gözlenmemiştir.

Bizim çalışmamızda, biyofilm aktivitesi ve antibiyotik direncinin istatistiksel olarak karşılaştırılması için 60 ÇİD/YİD ve 30 ÇİD olmayan izolat seçilmiştir. Toplamda 90 izolatın, 2 tanesinin (% 2,2) biyofilm oluşturmadığı, 7 tanesinin (% 7,8) zayıf biyofilm, 30 tanesinin (%33,3) orta güçte biyofilm, 51 tanesinin de (%56,7) güçlü biyofilm olduğu saptanmıştır. ÇİD/YİD (YBÜ ve servis izolatları) ve ÇİD olmayan izolatlar arasında biyofilm aktivitesi bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,213). Her antibiyotik için ayrı ayrı direnç ve biyofilm aktivitesi ilişkisi incelendiğinde; SXT duyarlı izolatların SXT dirençli olanlara göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu saptanmıştır (p=0,016).

Biyofilm oluşumu ve antibiyotik direncinin araştırıldığı çalışmalarda farklı bildirimler mevcuttur. Bu farklılıklar, direnç oranlarının ve virülansın coğrafyalara göre değişmesine veya istatistiksel olarak karşılaştırma yapılması için yeterli izolat sayısının elde edilmemiş olmasına bağlı olabilir. Biyofilm ve antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin henüz belirsiz olduğunu ve daha fazla ve genetik verileri de içeren daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Bakteriyel biyofilm başlangıcı ve gelişimi için, bakteriyel hücrelerin bir yüzeye tutunması haricinde, hücre içerisinde oldukça düzenli bir dizi moleküler olay gerçekleşmektedir. İki bileşenli düzenleyici sistemlerde bazı transkripsiyon düzenleyici ağların, çeşitli biyofilm ile ilişkili gen ürünlerinin ekspresyonundan sorumlu oldukları bilinmektedir.⁹ Bugüne kadar, *A. baumannii*'nin biyofilm ile ilişkili birkaç virülans faktörü tanımlanmıştır. Bunlar; iki bileşenli bir sistem (BfmS/BfmR) tarafından düzenlenen

CsuA/BABCDE pilus şaperon sistemi, dış zar proteinlerinden *OmpA* ve *Bap*, çevreyi algılama sisteminin (QS) bir parçası ve oto-indüktör sentaz *AbaI*, ve PNAG üretimi için sorumlu *pgaABCD* operonu olarak özetlenebilir.²⁸ Bu genlerin var olup olmadığı ve transkripsiyon düzeylerinin analizi, biyofilm oluşumu ve gelişimi hakkında kapsamlı bilgi sağlayabileceği bildirilmiştir.⁹

Ülkemizde, biyofilm ilişkili genlerin araştırıldığı çalışma sayısı çok az olup, sadece iki tez çalışmasına ulaşılmıştır. Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen ÇİD 156 *A. baumannii* kan izolatının yer aldığı bir tez çalışmasında, kantitatif mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumu belirlenmiş ve *csaA*, *csuE*, *fimH*, *ompA* virülans genlerinin varlığı PZR ile araştırılmıştır. İzolatların 17 tanesi zayıf, 33 tanesi orta ve 44 tanesi kuvvetli biyofilm olmak üzere toplam 94 (% 60,25) izolatın biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşturan izolatların % 41,48'inde *csaA*, % 20,2'sinde *csuE*, % 24,46'sında *ompA* ve %5,31'inde *fimH* varlığı tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan ÇİD *A. baumannii* izolatlarında virülans genlerinin varlığı, virülans ve biyofilm yapımının ilişkili olduğunu gösterebileceği ancak bu ilişkinin kanıtlanabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir.⁹¹

Malezya'da yatan hastalardan izole edilen 17 ÇİD *A. baumannii* izolatlarında, XTT ile biyofilm aktivitesi, PZR ile *csuE*, *ompA*, *bauA* ve *pgaA* virülans genleri araştırılmıştır. İzolatların dördü güçlü biyofilm olmak üzere 12 tanesi biyofilm oluşturmuştur. *OmpA* tüm izolatlarda, *csuE* ve *pgaA* biyofilm oluşturanlarda, *bauA* ise sadece güçlü biyofilm oluşturan izolatlarda pozitif bulunmuştur. Asinetobaktin aracılı demir alım proteinini kodlayan *bauA* geni, bakterilerin daha çok virülan ve daha ısrarcı olmasına neden olabileceği yorumu yapılmıştır.⁹²

Tayland'daki üç hastaneden toplanan 225 *A. baumannii* klinik izolatında biyofilm oluşumunda rol oynayan *epsA*, *bap*, *ompA*, *bfmS* ve *blaPER-1* virülans genlerinin varlığı araştırılmıştır. İzolatların % 76,9 'u biyofilm oluşturmuştur. En yaygın virülans genleri, *ompA* (% 84,4) ve *bfmS* (% 84) olarak tespit edilmiştir. *EpsA*, *bfmS* ve *blaPER-1*'in varlığı veya yokluğu, biyofilm biyokütlesi ile ilişkili bulunmamış fakat *bap* veya *ompA* genleri bulunmayan izolatlar, bulunan izolatlara göre daha güçlü biyofilm oluşturmuşlardır ($p<0.05$). Biyofilm oluşumu, *bap* veya *ompA* geni varlığı ile ters korelasyon göstermiştir.⁹³

Pakharukova ve ark.⁹⁴'nin çalışmasında, *csuE*'nin pilusun ucunda üç hidrofobik parmak benzeri halka ortaya çıkardığı ve hidrofobik plastikler üzerinde *A. baumannii* biyofilm oluşumundan sorumlu olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, *Csu* pili'nin *A. baumannii*'nin tıbbi alet ve cihazlar da kolonize olmasında büyük bir rol üstlendiğini vurgulamaktadır.

Bizim çalışmamızın sonuçları da Pakharukova'yı destekler şekilde, biyofilm ile ilişkili *bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmR* ve *csuE* genleri araştırılmıştır. Biyofilm ilişkili genlerin biyofilm aktivite derecesine katkısı istatistiksel olarak analiz edilmiştir. İzolatların 89'unda (% 99) *bfmR*, 84'ünde (% 93) *ompA*, 83'ünde (% 92) *bap*, 77'sinde (% 85) *csuE*, 74'ünde (% 82) *abaI* pozitif olarak bulunmuştur. Güçlü ve orta güçte biyofilm aktivitesine sahip izolatların 80 tanesinde (% 99) *bfmR* geni, 76 tanesinde (% 94) *ompA* geni, 67 tanesinde (% 83) *abaI* geni, 75 tanesinde (% 92) *bap* geni, 72 tanesinde (% 89) *csuE* geni pozitif olarak saptanmıştır. Biyofilm oluşturmayan iki izolatta *abaI*, *ompA*, *bfmR* genleri pozitif saptanırken, *CsuE* geni saptanmamıştır. *CsuE* geni pozitif olanların, negatif olanlara göre anlamlı olarak daha güçlü biyofilm aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,009$). Biyofilm oluşturmayan iki izolatta *abaI*, *ompA*, *bfmR* genleri pozitif saptanmışken, *csuE* geni saptanmamıştır. *CsuE* geninin, Biyofilm aktivitesinin derecesi ile ilgili bir belirteç olarak kullanılabilceğini düşünmekteyiz.

Çalışmalarda, *csuE*, *bap*, *ompA*, *bfmR* dahil olmak üzere biyofilm ile ilişkili bazı genlerin *A. baumannii* izolatlarında biyofilm oluşumu üzerine olumlu veya olumsuz etkileri gösterilmiştir. Fakat, bazı yayınlarda, izolat seçiminin, izolatların özelliklerinin ve kullanılan tekniklerin tam olarak tanımlanmadığı görülmüştür. Bakterilerin biyotik veya abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma fenotipleri, izolat türüne veya tekniğe bağlı farklılıklardan dolayı değişebilmektedir.⁹³ Bunun yanı sıra biyofilm oluşumunda genetik faktörler dışı çevresel etkileşimler olabileceği de unutulmamalıdır.

A. baumannii, biyofilmi sayesinde tıbbi ortamlarda uzun süre bulunma, hızlı direnç gelişimi ve salgınlara yol açma yeteneğinin bir araya getirilmesiyle karakterize edilmektedir.⁶ YBÜ ortamına girikten sonra çoğunlukla ÇİD izolatların neden olduğu salgınlar meydana gelmektedir. Bu durum, herhangi bir zaman diliminde baskın olan tek bir endemik izolatın ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.⁹⁵ Bazen de, belirli bir endemik bazal oranın üzerinde farklı genotiplerden küçük salgınlar görülebilmektedir. Sürveyans programının bir parçası olarak, *A. baumannii* gibi önemli nozokomiyal patojenlerin, rutin

ya da periyodik olarak tiplendirilmesi tavsiye edilmektedir. Böylece salgınlar sırasında yeni genotip girişlerinin erken saptanması sağlanacaktır.⁷

Çalışmamızda 2016-2017 yılları arasında hasta örneklerinden izole edilmiş *A. baumannii* izolatları arasında klonal ilişkinin araştırılması ve hastanemizdeki genotiplerin belirlenmesi amacıyla REP-PZR ve MLST genotiplendirme yöntemleri kullanılmıştır.

Ülkemizde REP-PZR ile tiplendirme yapılan çalışmalar irdelendiğinde Ankara, Bolu, Rize ve Mersin’de benzer çalışmalara rastlanmıştır. Sarı ve ark.⁹⁶ çalışmalarında 62 ÇİD *A.baumannii* izolatından %77,4’ünün, %95’in üzerinde benzerlik göstererek tek bir tipe kümelendikleri görülmüştür. Mersin’de yapılan bir çalışmada ise iki ana genotip olmak üzere sekiz farklı genotip tespit edilmiştir. Ana genotiplerin YBÜ’de yaygın olduğu ve YBÜ-servis hasta transferinin, yayılmayı kolaylaştırdığı düşünülmüştür.⁹⁷ Ankara’daki çeşitli hastanelerden toplanan 99 *A.baumannii* izolatı ile yapılan çalışmada, üçünün bant profilleri birbirine benzeyen toplam dört genotip saptanmıştır. Her genotipte de farklı hastanelerden izolat bulunmuş, bu durumun hastaneler arası hasta transferinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir.⁹⁸ Rizede 101 *A. baumannii* izolatı ile yapılan çalışmada, ikisi baskın olmak üzere toplam 12 genotip saptanmıştır.⁹⁹

Ülkemizde *A. baumannii* izolatlarında ST belirlenmesi ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bunlarda biri, Erciyes Üniversitesi Hastanesi’nde kan örneklerinden izole edilen 98’i *A. baumannii* olan 100 *Acinetobacter spp.* izolatının, AFLP ve MLST ile tiplendirildiği çalışmadır. İzolatlar, AFLP ile % 80 benzerlik gözetilerek sekiz küme halinde ve üç tek izolattan oluşan 11 genotipe ayrılmıştır. En büyük kümelenme olan H genotipi (41 izolat) ST-84 tipi ve CC15; ikinci büyük kümelenme J Genotipi (18) CC1 ve diğer büyük genotipler CC2’ye tanımlanmıştır. İzolatların % 77’si YİD olup toplamda % 99’unun ÇİD olduğu tespit edilmiştir. Hastane içerisinde ÇİD *A. baumannii* izolatları yaygın olup ve bunların hem izolat hem de klon seviyesindeki çeşitliliği farklı suşların ve klonların endemik olduğunu düşündürmüştür. Bu çeşitliliğin ne derecede diğer hastanelerden gelen kolonize hastaların başvurularından kaynaklanmış olabileceğinin de araştırılması gerektiği belirtilmiştir.¹⁰⁰

Yunanistan, İtalya, Lübnan ve Türkiye’den 1999-2009 yıllarına ait 28 salgını temsil eden 35 ÇİD *A. baumannii* izolatının MLST analiz edildiği çalışmada, Ülkemizden

Kocaeli, İzmir, İstanbul, Kayseri ve Trabzon'dan gönderilen izolatlar yer almıştır. Kocaeli'nden 2005 yılında gönderilen 47 izolat ST-25, İzmir ve İstanbul'dan 2003 yılında gönderilen izolatlar ST-15 ve ST-84, Kayseri'den 2003 yılında gönderilen iki izolat ST-83, Trabzon'dan 2003 yılında gönderilen izolat ST-84 olarak tespit edilmiştir. Dört Akdeniz ülkesinin verilerine bakıldığında; en sık saptanan ST-2 ve daha az orandasılarıyla ST-1, ST-25 ve ST-78, ST-20, ST-3, ST-84, ST-15, ST-82 ve ST-83 varlığı görülmektedir.¹⁰¹

İran'ın iki kentindeki (Tahran ve Tebriz) iki hastaneden toplanan 71 *A.baumannii* klinik izolatının REP-PZR ve MLST ile moleküler epidemiyolojisi incelenmiştir. ÇİD *A.baumannii* oranı %94,4 olarak tespit edilmiştir. REP-PZR ile 11 tek üyeli, 11 küme halinde toplam 22 genotip saptanmıştır. ST-323 ve ST-328 dahil altı yeni ST ve önceden bilinen ST-2, ST-25, ST-85, ST-94, ST-136 ve ST-307 olmak üzere toplam 12 ST tanımlanmıştır. ST-2 haricinde, her bir ST, farklı bir REP-PZR genotipine karşılık gelmiştir. CC II, en yaygın klonal grup olarak bulunmuştur. Karbapenem dirençli izolatların %67'sinin epidemik CC'lere ait olması, karbapenem direncinin, bu klonların dünya çapındaki yayılımı ile kuvvetli bir ilişkisi olduğunu göstermektedir.¹⁰²

Çin'de yapılan bir çalışmada 2014-2016 yılları arasında üçüncü basamak bir hastanede, 101 *A. baumannii* izolatının 78'i (%77,2) karbapeneme dirençli bulunmuş ve çoğu YBÜ'deki hasta örneklerinden kültürlenmiştir. Karbapenem dirençli izolatların 45'inde OXA-72 ve 33'ünde ise OXA-23 pozitif bulunmuştur. İzolatların REP-PZR analizinde; karbapenem dirençli olanlar dokuz, karbapenem duyarlı olanlar ise 22 genotip olmak üzere toplamda 31 genotip saptanmıştır. Her genotipten bir temsilci izolatın MLST ile sekans tipi belirlenmiş ve dokuz genotipin de ST-2'ye ait olduğu gösterilmiştir. OXA-72 üreten ve OXA-23 üreten *A. baumannii* izolatlarının genetik olarak ilişkili olduğu ve aynı klona ait oldukları belirtilmiştir. ST-2, Çin hastanelerindeki en yaygın karbapenem dirençli *A. baumannii* klonunu temsil etmektedir. Görünüşe göre, OXA-72 ve OXA-23 üreten *A. baumannii*, 2014 yılından beri YBÜ'de endemik bir hal almıştır. YBÜ'lerde yüksek riskli klon ST-2'nin yaygınlaşmasını azaltmak için, antimikrobiyal yönetim, el hijyeni ve çevre temizliği eğitim programları gibi gelişmiş enfeksiyon kontrol önlemleri uygulanması gerektiği bildirilmiştir.¹⁰³

Bizim çalışmamızda, REP-PZR ile 29 genotip saptanmıştır. İzolatların 53'ünde (%59) Genotip A saptanmış ve hastanemizin endemik genotipi olarak belirlenmiştir. Diğer

genotipler sayıca az görüldüğünden sporadik olarak değerlendirilmiştir. Hastanemiz endemik genotipi, YİD izolatların hepsinde (%100), ÇİD izolatların 48 (% 88,9)'inde ve ÇİD olmayan izolatların ikisinde (% 6,7) mevcuttur. Genotip A, ÇİD izolatlarda, ÇİD olmayan izolatlara göre anlamlı derecede fazla sayıda saptanmıştır (p=0,000). Genotip A'nın antibiyotiklere direnç oranları; kolistin % 1,8, tigesiklin % 23, SXT % 48, amikasin % 59, gentamisin % 82, levofloksasin % 91, imipenem ve meropenem %96 olarak tespit edilmiştir. Kolistin ve tigesiklinin, hastanemizde *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek ajanlar olduğu görülmektedir.

Sporadik genotiplerin kendi içinde dağılımına bakıldığında; YBÜ-12 ve YBÜ-22 izolatları Genotip B; YBÜ-4 ve YBÜ-25 izolatları Genotip C; SER-1 ve SER-9 izolatları Genotip D; YBÜ-16 ve D-9 izolatları Genotip E; D-5 ve D-22 izolatları Genotip F; YBÜ-20, D-12 ve D-17 izolatları Genotip G; D-6 ve D-15 izolatların da Genotip H'yi oluşturmaktadır. Diğer izolatlar tek olarak farklı genotipler içerisinde yer almaktadır.

Klinik izolatlar arasındaki biyofilm oluşumundaki kantitatif farklılıklar, izolatların epidemisi ilişkisi ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur.¹⁰⁴ Çalışmamızda izolatların REP-PZR genotiplere göre, biyofilm aktivitesi ve biyofilm ilişkili genlerin varlığı karşılaştırılıp istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Endemik genotip içerisinde yer alan izolatların biyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde; % 61'inin güçlü, % 27'sinin orta güçlü, % 10'unun zayıf biyofilm aktivitesine sahip olduğu ve bir izolatın biyofilm oluşturmadığı görülmüştür. Endemik ve sporadik genotipler arasında biyofilm aktivitesi bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,609). Endemik genotipe ait izolatlarda sporadiklere göre, *ompA* ve *csuE* gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (p=0,002, p=0,000).

Bizim çalışmamıza benzer olarak, Amerika'da sağlık hizmeti sunan merkezlerde endemik ve sporadik *A.baumannii* izolatları arasında antibiyotik direnci ve biyofilm oluşturma yeteneği açısından fark olup olmadığı araştırılmıştır. Yedi ayrı hastaneden toplam 290 *A. baumannii* izolatı çalışmaya alınmış ve REP-PZR ile tiplendirilmiştir. İzolatların 169'u, beş endemik genotip arasında dağılmıştır. Endemik genotiplerde, sporadik genotiplere göre hem *bap* hem de OXA-23 pozitifliği 5,1 kat fazla bulunmuştur. Ayrıca, endemik izolatlarda üç antibiyotik grubuna (β-laktam, aminoglikozid ve

florokinolon) daha fazla direnç tespit edilmiştir. Beş endemik genotipin dördünün, sporadik izolatlardan daha yoğun biyofilm oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Bu verilere bakılarak, endemik *A.baumannii* izolatlarının, sporadik izolatlara göre hastane ortamında hayatta kalmayı arttıran virülans faktörlerine sahip olma olasılığının daha yüksek olduğu düşünülmüştür.¹⁰

Hastanemizde YBÜ ve çeşitli servislerden izole edilen *A.baumannii* izolatlarının çoğunun aynı REP-PZR genotipine ait olması, tek klondan yayılım olduğunu göstermektedir. Genotip A, hastanemizin baskın ana klonunu yansıtmaktadır. Çalışmamızda, Genotip A'ya ait iki izolatın (YBÜ-27 ve SER-20) MLST ile ST-2 klonuna ait olduğu saptanmıştır. Genotip B'de (YBÜ-12, YBÜ-22), ve Genotip G'de (YBÜ-20) yer alan izolatların REP-PZR bant profilleri Genotip A'ya çok benzer olup, dendrogramda da en yakın olan genotiplerdir. Bu iki genotipe ait YBÜ-12 ve YBÜ-20 izolatları da, ST-2 olarak tespit edilmiştir. Genotip C'de yer alan YBÜ-25 izolatı Koroner YBÜ'de yatan bir hastadan izole edilmiştir. REP-PZR bant profili Genotip A ile bazı farklılıklara göstermesine rağmen o da ST-2 klonu içerisinde yer almaktadır.

Avrupa'da *A. baumannii* salgınları başlıca üç klonda toplanmış ve Avrupa Klonları (European clones) I,II, III olarak gruplanmıştır. Fakat günümüzde bu klonlar dünya çapında kabul görmüş uluslararası klonal kompleksleri (CCs) terimi ile sırasıyla CC1, CC2 ve CC3'e karşılık gelmektedir. ST-2 klonu CC2'de yer almaktadır.¹⁰⁵ ST-2, Avrupa ülkelerinde en sık izole edilen klon olarak bilinmektedir. Çoğunlukla YBÜ kaynaklı olup, diğer klonlara göre daha yüksek oranda karbapenem direnci görülmektedir.¹⁰⁶ Biyofilm oluşturma yeteneği ve A549 pnömositlere bağlanma, diğer ST'lere kıyasla, ST-2, ST-25 ve ST-78 klonuna ait *A. baumannii* izolatlarında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.¹¹ Farklı ST'lere ait *A.baumannii* izolatları ile oluşan kan dolaşımı enfeksiyonlarındaki klinik verilerinin araştırıldığı çalışmada, ST-2, antimikrobiyal tedavi uyumsuzluğu, enfeksiyonun ciddiyeti ve mortalite ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur.¹⁰⁷

Çin'de yapılan bir çalışmada da, *A. baumannii*'nin epidemik yayılımı için biyofilmin gerekli olmayabileceği bildirilmiştir. 114 klinik *A. baumannii*, ve 32 *A. baumannii* dışı *Acinetobacter* izolatının biyofilm oluşumu, izolatlar arasındaki klonal ilişkiler, PFGE ve MLST yöntemi ile belirlenmiştir. PFGE ile, büyük bir salgın klonu ve beş farklı epidemik klon tanımlanmıştır. Epidemik ve salgın izolatları dahil olmak üzere toplam 89 izolat

(%78), ST-2 klonuna ait bulunmuştur. Sporadik izolatlarda, salgın ve epidemik *A. baumannii* izolatlarına göre daha güçlü biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Fakat sporadik *A. baumannii* ve *A.baumannii* dışı *Acinetobacter* izolatları arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bu da *A. baumannii*'nin yayılması için, biyofilmin önemli olmadığını düşündürmüştür.¹⁰⁸

A. baumannii'de biyofilm ve biyofilm ilişkili genlerin epidemik yayılıma etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.⁸⁹ Biyofilmin epidemik ve endemik izolatların patogenezi ve epidemiyolojisi üzerine etkilerini anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

ST-2 dahil endemik ve epidemik izolatlar çoğunlukla çoğul dirençli olduğundan neredeyse tedavide kullanılacak tek antimikrobiyal ajan olarak kolistin kalmıştır.¹⁰⁶ Çalışmamızda yer alan kolistin dirençli tek izolat (SER-15), Genotip A'ya ait olmasına rağmen MLST ile ST-604 klonuna ait olduğu belirlenmiştir. ST-604 ile ilgili literatürde tek çalışma bulunmaktadır. İlk olarak 2015 yılında, karbepenem ve aminoglikozid dirençli *A. baumannii* izolatları üzerine çalışma yapan Mısır'lı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Filogenetik olarak ST-2'ye çok yakın olan ST-604, ortak olarak yüksek düzey aminoglikozid direncinden sorumlu *armA* geni bulunduran dört klinik izolatta tespit edilmiştir.¹⁰⁹ Bizim çalışmamızda ST-604 izolatının, amikasin ve gentamisin direnci yanında kolistin direnci de mevcuttur. Güçlü biyofilm aktivitesine sahip olmakla birlikte biyofilm ilişkili beş geni de pozitif olarak saptanmıştır. Çoğul antibiyotik direnci ve güçlü biyofilm aktivitesi nedeniyle yayılım açısından dikkat edilmesi gereken bir izolat olduğu göze çarpmaktadır. Yaptığımız literatür taramasına dayanarak, çalışmamızın, ülkemizde ST-604 izolatının ilk bildirimini olduğunu düşünmekteyiz.

Genotip D'ye ait iki ÇİD *A. baumannii* izolatından biri (SER-9), ST-157 olarak tespit edilmiştir. SER-9 izolatı, Aralık 2016'da enfeksiyon hastalıkları sevisinden yatan, SER-1 ise Ocak 2017'de hematoloji servisinde yatan hastadan izole edilmiştir. Hastaların klinik verileri incelendiğinde iki hastanın da hematolojik malignite nedeniyle hematoloji servisinde kemoterapi aldığı ve santral venöz kateterleri olduğu göze çarpmıştır.

ST-157 ilk olarak ülkemiz izolatlarında Castanheira ve ark.¹¹⁰ tarafından 2014 yılında bildirilmiştir. Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde 2009-2010 yıllarına ait karbepenem dirençli

ABC izolatlarının tiplendirildiği bu çalışmada, ülkemizden gönderilen 188 izolat yer almıştır. Ankara'dan gönderilen 20 izolatta ve İstanbul'dan gönderilen 7 izolatta, ST-157 tespit edilmiştir. Ülkemiz izolatlarında, en sık ST-2 olmak üzere ST-15, ST-97, ST-84, ST-158 ve ST-157'nin tek lokus varyantı ST-10 diğer saptanan sekans tipleri olmuştur.

İlk olarak 2013 ve daha sonra 2015 yıllarında Hindistan'da Rynga ve ark.^{111, 112} tarafından yeni bir sekans tipi olarak bildirilen ST-391'in, ST-157'nin Oxford MLST şemasındaki karşılığı olabileceği tespit edilmiştir.^{112, 113}

ST-391 (ST-157), Mısır'da Kasr Al-Aini Hastanesi'nde sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyon etkeni olan 50 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları arasında en baskın klon olarak saptanmıştır. Hastaların yaşı, cinsiyeti, antibiyotik alımı, YBÜ'de bulunması, yatış süresi ve mortalitesi, diğer ST'lere göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir.¹¹⁴

Vuotto ve ark.¹¹⁵'nin çalışmasında da, ST-391 (ST-157) bildiri yapılmıştır. Beş farklı Avrupa ülkesi hastanesinden, üriner kateter ve idrar örneklerinden izole edilen 128 *A. baumannii* klinik izolatının adherans, biyofilm oluşturma yeteneği ve klonal ilişkileri analiz edilmiştir. Almanya'da 2012 yılında üriner kateter örneğinden izole edilen ST-391 izolatının düşük adherans ve düşük biyofilm aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da balgam örneğinden izole edilen ST-157 (SER-9) izolatının biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiş ve *abaI*, *ompA* ve *bfmR* geni pozitif olduğu halde *csuE* ve *bap* geni negatif bulunmuştur. Biyofilm oluşturmamasına rağmen ÇİD olması ve immünsüpresif hastadan izole edilmiş olması dikkat edilmesi gereken bir izolat olduğunu göstermektedir.

Sporadik genotipler arasında Genotip E'de yer alan ÇİD YBÜ-16 izolatının, ST-695 klonuna ait olduğu saptanmıştır. Araştırmalarımız sonucu, İspanya'lı araştırmacılar tarafından 2005 yılında PubMLST veritabanına eklenen ST-695 ile ilgili bir yayına rastlanmamıştır. Ülkemizde klinik *A. baumannii* örneklerinden ilk kez bildirildiğini düşünmekteyiz. Tigesiklin ve kolistin haricinde diğer çalıştığımız antibiyotiklere dirençli bulunmuştur. Orta güçlü biyofilm aktivitesine sahip, *ompA*, *bfmR*, *csuE* ve *bap* genleri pozitif bulunmuştur. Bu izolatın dış merkezde YBÜ'de tedavi görmekte iken hastanemiz YBÜ'ye nakledilen bir hastadan izole edilmesi ve sporadik genotipe ait olması nedeniyle,

hastanemize farklı bir hastaneden aktarıldığını düşünmekteyiz. Hastaneler arası hasta transferi, farklı klondan ÇİD izolatların aktarımında önemli olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda; klonal ilişkili izolatlar REP-PZR ile gösterilmiş, biyofilm ve biyofilm ilişkili genler araştırılmış ve MLST ile bazı önemli izolatlar tiplendirilmiştir. REP-PZR, ani bir salgın durumunda, hastanemiz gibi düşük oranda bazal endemisitesi olan birimlerde, hızlı bir yöntem olduğundan uygun önleyici müdahaleyi uygulamak için kullanılabilir. Fakat uzun süreli klonal ilişki araştırmalarında ayırım gücü daha yüksek olan MLST, REP-PZR'dan daha yararlı görünmektedir.

Hastanemizdeki *A. baumannii* izolatlarının çoğunun ÇİD, biyofilm ilişkili genleri bulunduran ve bununla uyumlu olarak güçlü biyofilm aktivitesine sahip olduğunu görmekteyiz. ST-2 klonunun hastanemizin baskın genotipi olduğu tespit edilmiştir. Onunla birlikte ST-157, ST-604 ve ST-695 izolatları da saptanmıştır. ST-604 ve ST-695'in ülkemizden ilk bildirim olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamız, hastanemizde endemik *A. baumannii* izolatlarının sekans tipleri, antibiyotik direnç profilleri ve biyofilm aktiviteleri konusunda geniş bir veri sağlamıştır. Epidemik izolatlar çoğunlukla ÇİD veya YİD olduğundan, birçok çalışmada, antimikrobiyal direncin genetik temeli araştırılmıştır. Fakat, *A. baumannii*'nin virülans özellikleri ve epidemik yayılıma etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.^{11, 89} Virülans ve genetik ile ilgili daha ileri araştırmalar bu süreçleri anlamamızı geliştirecek ve *A. baumannii* biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlara karşı tedavi ve önleme konusunda yeni bilgiler sunacaktır.⁸⁹

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Hastanemizde YBÜ ve çeşitli servislerden izole edilen *A.baumannii* izolatlarının çoğunun aynı genotip paternine sahip olması, tek klondan yayılım olduğunu göstermektedir. Genotip A, hastanemizin baskın ana klonunu yansıtmaktadır.
2. Hastanemiz endemik genotipi (Genotip A), YİD izolatların hepsinde (%100), ÇİD izolatların 48 (% 88,9)'inde ve ÇİD olmayan izolatların ikisinde (% 6,7) mevcuttur. Genotip A, ÇİD izolatlarda, ÇİD olmayan izolatlara göre anlamlı derecede fazla saptanmıştır (p=0,000).
3. Genotip A'ya ait iki izolatın (YBÜ-27 ve SER-20), Genotip B (YBÜ-22), Genotip C (YBÜ-25) ve Genotip G'den (YBÜ-20) birer izolatın ST-2 klonuna ait olduğu tespit edilmiştir.
4. Kolistin dirençli tek izolat (SER-15), Genotip A'ya ait olmasına rağmen filogenetik olarak ST-2'ye çok yakın olan ST-604 klonuna ait olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız literatür taramasına dayanarak, çalışmamızın, ülkemizde ST-604 izolatının ilk bildirimini olduğunu düşünmekteyiz.
5. Sporadik genotipler arasında Genotip E'de yer alan ÇİD YBÜ-16 izolatının, ST-695 klonuna ait olduğu saptanmıştır. Ülkemizde klinik *A. baumannii* örneklerinden ilk kez bildirildiğini düşünmekteyiz. Bu izolatın dış merkezde YBÜ'de tedavi görmekte iken hastanemiz YBÜ'ye nakledilen bir hastadan izole edilmesi ve sporadik genotipe ait olması nedeniyle, hastanemize farklı bir hastaneden aktarıldığını düşünmekteyiz. Hastaneler arası hasta transferi, farklı klondan ÇİD izolatların aktarımında önemli olduğu görülmektedir.
6. REP-PZR, ani bir salgın durumunda, hastanemiz gibi düşük oranda bazal endemisitesi olan birimlerde, hızlı bir yöntem olduğundan uygun önleyici müdahaleyi uygulamak için kullanılabilir. Fakat uzun süreli klonal ilişki araştırmalarında ayırım gücü daha yüksek olan MLST, REP-PZR'dan daha yararlı görünmektedir.
7. Hastanemizdeki *A. baumannii* izolatlarının çoğunun ÇİD, biyofilm ilişkili genleri bulduran ve bununla uyumlu olarak güçlü biyofilm aktivitesine sahip olduğunu görmekteyiz.
8. Endemik ve sporadik genotipler arasında biyofilm aktivitesi bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,609).

9. ÇİD olan ve olmayan izolatlar arasında biyofilm aktivitesi bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,213$). Biyofilm aktivitesi ve her bir antibiyotik direnci arasındaki ilişki incelendiğinde; SXT duyarlı olanlarda SXT dirençli olanlara göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu saptanmıştır ($p=0,016$).
10. Biyofilm ilişkili genler araştırıldığında, ÇİD izolatlarda ÇİD olmayanlara göre *ompA* ve *csuE* gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p=0,003, p=0,001$). Endemik genotipe ait izolatlarda sporadiklere göre *ompA* ve *csuE* gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p=0,002, p=0,000$).
11. *CsuE* geni pozitif olanların, negatif olanlara göre anlamlı olarak daha güçlü biyofilm aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,009$).
12. Çalışmamız, hastanemizde endemik *A. baumannii* izolatlarının sekans tipleri, antibiyotik direnç profilleri ve biyofilm aktiviteleri konusunda geniş bir veri sağlamıştır. ÇİD ve güçlü biyofilm aktivitesine sahip izolatların tanımlanması, virülansı ve epidemisi ile ilgili çalışmalar yapılması, hastanelerde uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması adına önemlidir.
13. Virülans ve genetik ile ilgili daha ileri araştırmalar bu süreçleri anlamamızı geliştirecek ve *A. baumannii* biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlara karşı tedavi ve önleme konusunda yeni bilgiler sunacaktır.

7. ÖZET

***Acinetobacter baumannii* izolatlarının genotiplerinin saptanması ve biyofilm oluşumu ile karşılaştırılması**

Giriş ve amaç

ÇİD *Acinetobacter baumannii*, tüm dünyada yaygın görülen ciddi bir nozokomiyal enfeksiyon etkenidir. Bu çalışmada; Ekim 2016 ile Aralık 2017 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilmiş *A.baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkisinin ortaya konması, epidemik ve sporadik ÇİD izolatların sekans tipinin belirlenmesi, biyofilm aktivitesinin ve biyofilm ile ilgili genlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem

YBÜ ve servis hastalarının örneklerinden izole edilen 60 ÇİD izolat ve 30 ÇİD olmayan *A. baumannii* izolatı çalışmaya alınmıştır. İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin ve hastanemizdeki genotiplerin belirlenmesi amacıyla REP-PZR yöntemi kullanılmıştır. XTT redüksiyon analizi kullanılarak izolatların biyofilm aktivitesi belirlenmiş ve biyofilm ile ilişkili *bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmR*, *csuE* gen bölgeleri PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Endemik genotip ve diğer ÇİD izolatların olduğu sporadik genotiplerden temsilci izolatların MLST ile sekans tipi belirlenmiştir.

Bulgular

İzolatların % 59'unda, hastanemiz endemik genotipi (Genotip A) saptanmış olup, bu genotipi temsilen iki izolatın MLST ile ST-2 klonuna ait olduğu bulunmuştur. Ayrıca kolistin dirençli bir izolat ST-604, sporadik genotiplerden ST-695 ve ST-157 klonları tespit edilmiştir. Hastanemizdeki *A. baumannii* izolatlarının çoğunun biyofilm ilişkili genleri taşıdığı ve bununla uyumlu olarak güçlü biyofilm aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. ÇİD izolatlarda, ÇİD olmayanlara göre *ompA* ve *csuE* gen pozitifliği anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p=0,003$, $p=0,001$). *CsuE* geni pozitif olanların, negatif olanlara göre anlamlı olarak daha güçlü biyofilm aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,009$).

Sonuç

Hastanemiz YBÜ ve çeşitli servislerinde, ST-2 klonuna ait güçlü biyofilm aktivitesine sahip ÇİD *A. baumannii* izolatları endemik olarak bulunmaktadır. Bunun yanı sıra ST-604, ST-695 ve ST-157 klonları da zaman zaman tespit edilmiştir. İzolatlar arasındaki klonal ilişkilerin belirlenmesi ve biyofilmin fenotipik ve genotipik olarak araştırılması; *A. baumannii* enfeksiyonlarının önlenmesi, kontrolü ve tedavisinde yardımcı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: *A. baumannii*, Biyofilm, REP-PZR, MLST.



8. ABSTRACT

Determination of Genotypes of *Acinetobacter baumannii* Isolates and Comparison with Biofilm Formation

Introduction and purpose

MDR *A. baumannii* is serious nosocomial infection agent seen common in all of the world. The aim of this study is to investigate biofilm activity and the presence of biofilm related genes, to determine the clonal relationship between *A.baumannii* isolates and to investigate the sequence type in epidemic and sporadic MDR isolates. Strains isolated from clinical samples sent to the Microbiology Laboratory of Kocaeli University Medical Faculty Hospital between October 2016 and December 2017.

Materials and methods

It was included 60 MDR and 30 non-MDR *A. baumannii* strains isolated from ICU and service patients' samples. In order to determine clonal relationship between isolates and genotypes in our hospital, REP-PZR method was used. The strains' biofilm activity was determined using XTT reduction analysis and biofilm related *bap*, *abaI*, *ompA*, *bfmR*, *csuE* gene regions were investigated by PCR method. MLST was used to determine sequence type of representative isolates from endemic genotype and other MDR isolates of sporadic genotypes.

Results

The endemic genotype (Genotype A) was determined in 59% of the isolates and two isolates representing this genotype were belong to ST-2 clones. Also ST-604 clone in a colistin-resistant isolate, ST-695 and ST-157 clones from sporadic genotypes were determined. Most of the *A. baumannii* isolates in our hospital have biofilm-related genes and have strong biofilm activity. In MDR isolates, *ompA* and *csuE* gene positivity were significantly higher than those non-MDR isolates ($p=0,003$, $p=0,001$). *CsuE* gene positive isolates were found to have significantly stronger biofilm activity than negative ones ($p=0,009$).

Conclusion

MDR *A. baumannii* isolates with strong biofilm activity are belong to ST-2 clone and endemic in ICU and various services of our hospital. In addition, ST-604, ST-695 and ST-157 clones were also detected. To determine of clonal relationship between isolates and investigate of phenotypic and genotypic biofilm will help prevention, control and treatment of *A. baumannii* infections.

Key Words: *A. baumannii*, Biofilm, REP-PCR, MLST.



9. KAYNAKLAR

1. Almasaudi SB. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features, Saudi J Biol Sci, 2018;25:586-596.
2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen, Clin Microbiol Rev, 2008;21:538-82.
3. <https://www.uptodate.com>. Acinetobacter infection: Epidemiology, microbiology, pathogenesis, clinical features, and diagnosis. Kanafani Za KS.
4. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features, Clin Microbiol Rev, 1996;9:148-65.
5. Doi Y, Murray GL, Peleg AY. Acinetobacter baumannii: evolution of antimicrobial resistance-treatment options, Semin Respir Crit Care Med, 2015;36:85-98.
6. Falagas ME, Vardakas KZ, Kapaskelis A, Triarides NA, Roussos NS. Tetracyclines for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections, Int J Antimicrob Agents, 2015;45:455-60.
7. Nutman A, Marchaim D. 'How to do it' - a molecular investigation of a hospital outbreak, Clin Microbiol Infect, 2018;
8. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence, Nat Rev Microbiol, 2018;16:91-102.
9. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation, Future Microbiol, 2009;4:273-8.
10. Luo TL, Rickard AH, Srinivasan U, Kaye KS, Foxman B. Association of blaOXA-23 and bap with the persistence of Acinetobacter baumannii within a major healthcare system, Front Microbiol, 2015;6:182.
11. Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V ve ark. Virulence-related traits of epidemic Acinetobacter baumannii strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78, BMC Infect Dis, 2013;13:282.
12. Paul C. Schreckenberger MID, Dannie G. Hollis, Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacilli, Patrick R. Murray, E. J. B., James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, Michael A. Pfaller, ed. Manual of Clinical Microbiology, 9. basım. Washington: Asm Press, 2009:770-774.

13. Gary W. Procop DLC, Geraldine S. Hall., The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 7. basım. Philadelphia: Wolters Kluwer Press,2017:385-390.
14. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA ve ark. Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges, Clin Microbiol Rev, 2017;30:409-447.
15. Gerner-Smidt P, Tjernberg I,Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of Acinetobacter species, J Clin Microbiol, 1991;29:277-82.
16. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M ve ark. Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 13TU), Res Microbiol, 2011;162:393-404.
17. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M ve ark. Acinetobacter seifertii sp. nov., a member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex isolated from human clinical specimens, Int J Syst Evol Microbiol, 2015;65:934-42.
18. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS,Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of Acinetobacter spp.: an overview, Microbes Environ, 2011;26:101-12.
19. Lee CR, Lee JH, Park M ve ark. Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options, Front Cell Infect Microbiol, 2017;7:55.
20. Mcconnell MJ, Actis L,Pachon J. Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models, FEMS Microbiol Rev, 2013;37:130-55.
21. Hassan A, Naz A, Obaid A ve ark. Pangenome and immuno-proteomics analysis of Acinetobacter baumannii strains revealed the core peptide vaccine targets, BMC Genomics, 2016;17:732.
22. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P ve ark. Inhibition of LpxC protects mice from resistant Acinetobacter baumannii by modulating inflammation and enhancing phagocytosis, MBio, 2012;3:

23. Russo TA, Luke NR, Beanan JM ve ark. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor, *Infect Immun*, 2010;78:3993-4000.
24. Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*, *PLoS Pathog*, 2015;11:e1004691.
25. Jin JS, Kwon SO, Moon DC ve ark. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles, *PLoS One*, 2011;6:e17027.
26. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial siderophores: a mini review, *J Basic Microbiol*, 2013;53:303-17.
27. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ ve ark. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice, *Infect Immun*, 2012;80:1015-24.
28. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*, *New Microbiol*, 2014;37:119-27.
29. Bhadade R, Harde M, Desouza R, More A, Bharmal R. Emerging trends of nosocomial pneumonia in intensive care unit of a tertiary care public teaching hospital in Western India, *Ann Afr Med*, 2017;16:107-113.
30. Chawla R. Epidemiology, etiology, and diagnosis of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in Asian countries, *Am J Infect Control*, 2008;36:S93-100.
31. Walaszek M, Rozanska A, Walaszek MZ, Wojkowska-Mach J, Polish Society of Hospital Infections T. Epidemiology of Ventilator-Associated Pneumonia, microbiological diagnostics and the length of antimicrobial treatment in the Polish Intensive Care Units in the years 2013-2015, *BMC Infect Dis*, 2018;18:308.
32. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017;36:1999-2006.
33. Sirijatuphat R, Sripanidkulchai K, Boonyasiri A ve ark. Implementation of global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) in patients with bacteremia, *PLoS One*, 2018;13:e0190132.

34. Kurtaran B, Kuscu F, Ulu A ve ark. The Causes of Postoperative Meningitis: The Comparison of Gram-Negative and Gram-Positive Pathogens, *Turk Neurosurg*, 2018;28:589-596.
35. Sipahi OR, Nazli Zeka A, Tasbakan M ve ark. Pooled analysis of 899 nosocomial meningitis episodes from Turkey, *Turk J Med Sci*, 2017;47:29-33.
36. Khan FY, Abu-Khattab M, Almaslamani EA ve ark. Acute Bacterial Meningitis in Qatar: A Hospital-Based Study from 2009 to 2013, *Biomed Res Int*, 2017;2017:2975610.
37. Lien CY, Huang CR, Tsai WC ve ark. Epidemiologic trend of adult bacterial meningitis in southern Taiwan (2006-2015), *J Clin Neurosci*, 2017;42:59-65.
38. Chen HP, Lai CH, Chan YJ ve ark. Clinical significance of *Acinetobacter* species isolated from cerebrospinal fluid, *Scand J Infect Dis*, 2005;37:669-75.
39. Weiner LM, Webb AK, Limbago B ve ark. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2016;37:1288-1301.
40. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003;24:284-95.
41. Dexter C, Murray GL, Paulsen IT, Peleg AY. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis, *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015;13:567-73.
42. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V ve ark. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*, *PLoS Genet*, 2006;2:e7.
43. Nowak J, Seifert H, Higgins PG. Prevalence of eight resistance-nodulation-division efflux pump genes in epidemiologically characterized *Acinetobacter baumannii* of worldwide origin, *J Med Microbiol*, 2015;64:630-5.
44. Çiftçi İH. *Acinetobacter baumannii*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları, *ANKEM Derg*, 2011;25:196-207.
45. Karaaslan A, Soysal A, Altinkanat Gelmez G ve ark. Molecular characterization and risk factors for carbapenem-resistant Gram-negative bacilli colonization in children: emergence of NDM-producing *Acinetobacter baumannii* in a newborn intensive care unit in Turkey, *J Hosp Infect*, 2016;92:67-72.

46. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex, *J Antimicrob Chemother*, 2007;59:1001-4.
47. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes, *Clin Microbiol Rev*, 2017;30:557-596.
48. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies, *J Antimicrob Chemother*, 2012;67:1607-15.
49. Uludağ Altun H. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2008;39:82-88.
50. <http://mph.sgu.edu/mphblog/2015/04/27/687/>. *Biofilms Research*. J A. 2015.
51. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology, *Microbiology*, 2008;154:3398-409.
52. Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells, *Infect Immun*, 2012;80:228-33.
53. Durmaz R. Hastane İnfeksiyonu Salgınında Moleküler Biyolojik Yöntemler Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2005;9:196-202.
54. Rafei R, Kempf M, Eveillard M ve ark. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*, *Future Microbiol*, 2014;9:1179-94.
55. Rademaker JW LF, Versalovic J, and De Bruijn FJ, *Molecular Microbial Ecology Manual II, Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004:1-33.
56. Ahmed SS, Alp E. Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains, *J Infect Dev Ctries*, 2015;9:347-54.
57. <http://beta.mlst.net/Instructions/default.html>. Multilocus sequence typing network. Aanensen Dm SB.

58. Orsinger-Jacobsen SJ, Patel SS, Vellozzi EM ve ark. Use of a stainless steel washer platform to study *Acinetobacter baumannii* adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces, *Microbiology*, 2013;159:2594-604.
59. Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation, *BMC Complement Altern Med*, 2011;11:29.
60. 2018. CLSI, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28.th ed, CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
61. 2018. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1.
62. Gür D, Çöplü N, Gülay D, Hasdemir U, Karahan Zc, Karatuna O. Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2016;46:2-25.
63. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence, *J Antimicrob Chemother*, 2008;62:45-55.
64. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Clin Microbiol Infect*, 2000;6:635-43.
65. Sung JY, Koo SH, Kim S, Kwon GC. Persistence of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Harboring blaOXA-23 and bap for 5 Years, *J Microbiol Biotechnol*, 2016;26:1481-9.
66. Azizi O, Shahcheraghi F, Salimizand H ve ark. Molecular Analysis and Expression of bap Gene in Biofilm-Forming Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Rep Biochem Mol Biol*, 2016;5:62-72.
67. Modarresi F, Azizi O, Shakibaie MR ve ark. Effect of iron on expression of efflux pump (adeABC) and quorum sensing (luxI, luxR) genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *APMIS*, 2015;123:959-68.

68. Dorsey CW, Tomaras AP, Actis LA. Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system, *Appl Environ Microbiol*, 2002;68:6353-60.
69. Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool, *PLoS One*, 2010;5:e10034.
70. Lynch JP, Zhanel GG, Clark NM. Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment Options, *Semin Respir Crit Care Med*, 2017;38:311-325.
71. Baykara N, Akalin H, Arslantas MK ve ark. Epidemiology of sepsis in intensive care units in Turkey: a multicenter, point-prevalence study, *Crit Care*, 2018;22:93.
72. Atici S, Soysal A, Kepenekli Kadayıfci E ve ark. Healthcare-associated infections in a newly opened pediatric intensive care unit in Turkey: Results of four-year surveillance, *J Infect Dev Ctries*, 2016;10:254-9.
73. Özer-Balın Ş. Yoğun Bakım Ünitesinde Gelişen Hastane İnfeksiyonlarının Değerlendirilmesi, *Klinik Dergisi*, 2017;30:108-113.
74. Celiloğlu C, Çelik T, Sucu A, Yurtçu E, Çelik Ü. Çocuk Yoğun Bakım Ünitesindeki Hastane Enfeksiyonlarının Değerlendirilmesi, *J Pediatr Inf*, 2017;11:129-134.
75. Şen Taş S. Uzun süreli yoğun bakım ünitesi ve palyatif bakım merkezinde hastane enfeksiyonlarının sürveyansı: Üç yıllık analiz, *J Contemp Med*, 2018;8:55-59.
76. Meric M, Kasap M, Gacar G ve ark. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey, *FEMS Microbiol Lett*, 2008;282:214-8.
77. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017., Stockholm: ECDC.2018.
78. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance-Annual report 2018, Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.2018.
79. Çelik N. ÇO, Aslan H, Savaş G, İba Yılmaz S. Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Tespit Edilen *Acinetobacter Baumannii* Suşlarının Antibiyotik Direnç Oranları, *Sakarya Tıp Dergisi*, 2017;7:229-234.
80. Şirin Mc AN, Yılmaz N, Bayram a, Yılmaz-Hancı S, Şamlıoğlu P, Karaca-Derici Y, Doğan G. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole

- edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları, Turk Hij Den Biyol Derg, 2017;74: 269 - 278.
81. Bardbari AM, Arabestani MR, Karami M ve ark. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates, Microb Pathog, 2017;108:122-128.
82. Macia MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria, Clin Microbiol Infect, 2014;20:981-90.
83. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates, J Microbiol Methods, 2008;72:157-65.
84. Hendiani S. A-aA, Mohammadi P. Comparison of two methods for quantification of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation, Biol J Microorg, 2014;2:51-57.
85. Celik C TU, Karaman İ, Hepokur C, Atas M. Evaluation of the Antibiofilm and Antimicrobial Properties of *Ziziphora tenuior* L. Essential Oil Against Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Int. J. Pharmacol, 2016;28-35.
86. Can F K-aÖ, Demİrbİlek M, Arabay G, Ergİn F, Arslan H. Kan Kİltürlerinden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Bİyofİlm Oluşumu, İnfeksiyon Dergisi 2006;20: 159-163.
87. Eraç B YF, Hoşgör Limoncu M, Öztürk İ, Aydemir Ş. Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Araştırılması, Mikrobiyol Bul, 2014;48:70-81.
88. Badave GK, Kulkarni D. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging challenge, J. Clin. Diagn. Res, 2015;9:
89. Qi L, Li H, Zhang C ve ark. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*, Front Microbiol, 2016;7:483.
90. Cepas V, Lopez Y, Munoz E ve ark. Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria, Microb Drug Resist, 2018;
91. Ö. A. 2018. *Çok İlaça Dirençli İnvaziv Acinetobacter Baumannii İzolatlarında Biyofilm Yapımının Değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

92. Nathan Jj DM, Yong Vc, Navaratnam P,,Palanisamy Np WE. The emergence of *Acinetobacter baumannii* ST-6 multidrug resistant: A resilient biofilm producer, Malaysia, Malays. J. Microbiol., 2016;12:265-269.
93. Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U,Sitthisak S. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, Int Microbiol, 2016;19:121-129.
94. Pakharukova N, Tuittila M, Paavilainen S ve ark. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation, Proc Natl Acad Sci U S A, 2018;115:5558-5563.
95. Karagöz A BI, Aksu N, Acar S, Durmaz R. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Tek Klonlu *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Karakterizasyonu ve Antibiyotik Direnç Profillerinin İncelenmesi, Mikrobiyol Bul, 2014;48:566-576.
96. Sarı B, Baran I, Alaçam S ve ark. Nozokomiyal Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Oksasilinaz Genlerinin Multipleks PCR ile Araştırılması ve Klonal İlişkilerinin Rep-PCR ile Değerlendirilmesi, Mikrobiyol Bul, 2015;49:249-258.
97. Gülbudak H AG, Tezcan S, Ersöz G, Ülger M, Otağ F, Kuyucu N, Emekdaş G. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan *Acinetobacter baumannii* İzolatları Arasındaki Klonal İlişkinin Rep-PCR ile Araştırılması, Mikrobiyol Bul, 2014;48:316-324.
98. Şahin H ÖU, Adiloğlu Ak, Karakoç Ae, Bulut C, Açıkgöz Zc, Erdem Gb, Hasçelik G, Öztürk Coşkun A. Ankara'daki Çeşitli Hastanelerden Elde Edilen *Acinetobacter baumannii* İzolatları Arasındaki Klonal İlişkinin Gösterilmesi ve Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi, Turk Hij Den Biyol Derg, 2016;73:199-210.
99. Cicek AC, Saral A, Iraz M ve ark. OXA- and GES-type beta-lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital, Clin Microbiol Infect, 2014;20:410-5.
100. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B, Reijden T,Dijkshoorn L. Clonal diversity and high prevalence of OXA-58 among *Acinetobacter baumannii* isolates from blood cultures in a tertiary care centre in Turkey, Infect Genet Evol, 2013;14:92-7.
101. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S,Zarrilli R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme, Clin Microbiol Infect, 2011;17:197-201.

102. Hojabri Z, Pajand O, Bonura C ve ark. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Iran: endemic and epidemic spread of multiresistant isolates, *J Antimicrob Chemother*, 2014;69:2383-7.
103. Chen Y, Yang Y, Liu L ve ark. High prevalence and clonal dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital: a cross sectional study, *BMC Infect Dis*, 2018;18:491.
104. Badmasti F, Siadat SD, Bouzari S, Ajdary S, Shahcheraghi F. Molecular detection of genes related to biofilm formation in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical settings, *J Med Microbiol*, 2015;64:559-64.
105. Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Greece: an extended review (2000-2015), *Future Microbiol*, 2017;12:801-815.
106. Garnacho-Montero J, Gutierrez-Pizarra A, Diaz-Martin A ve ark. *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: Molecular epidemiology, clinical features and predictors of mortality, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2016;34:551-558.
107. Chuang YC, Cheng A, Sun HY ve ark. Microbiological and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremia: Implications of sequence type for prognosis, *J Infect*, 2018;
108. Hu Y, He L, Tao X, Meng F, Zhang J. Biofilm may not be Necessary for the Epidemic Spread of *Acinetobacter baumannii*, *Sci Rep*, 2016;6:32066.
109. El-Sayed-Ahmed MA, Amin MA, Tawakol WM ve ark. High prevalence of bla(NDM-1) carbapenemase-encoding gene and 16S rRNA armA methyltransferase gene among *Acinetobacter baumannii* clinical Isolates in Egypt, *Antimicrob Agents Chemother*, 2015;59:3602-5.
110. Castanheira M, Costello SE, Woosley LN ve ark. Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex and Enterobacteriaceae isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel beta-lactamases, GES-22 and VIM-35, *Antimicrob Agents Chemother*, 2014;58:7358-66.
111. Rynga D, Shariff M, Deb M. Multi-locus sequence types of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from India, *J Infect Dev Ctries*, 2013;7:358-60.

112. Rynga D, Shariff M, Deb M. Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from Delhi, India, *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2015;14:40.
113. Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates, *PLoS One*, 2016;11:e0153014.
114. El Bannah AMS, Nawar NN, Hassan RMM, Salem STB. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Care Hospital in Egypt: Clonal Spread of blaOXA-23, *Microb Drug Resist*, 2018;24:269-277.
115. Vuotto C, Grosso F, Longo F et al. Biofilm-Forming Ability and Clonality in *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Urine Samples and Urinary Catheters in Different European Hospitals, *Adv Exp Med Biol*, 2018;1057:73-83.