

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ACİNETOBACTER BAUMANNİİ* İZOLATLARINDA  
BİYOFİLM ÜRETİMİ VE KOLİSTİN  
DUYARLILIKLARININ BİYOFİLM FORMASYONUNDA  
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ  
Dr. FİKRİYE MİLLETLİ SEZGİN

SAMSUN 2012





T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARINDA  
BİYOFİLM ÜRETİMİ VE KOLİSTİN  
DUYARLILIKLARININ BİYOFİLM FORMASYONUNDA  
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. FİKRİYE MİLLETLİ SEZGİN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. AHMET YILMAZ ÇOBAN

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından  
PYO.TIP.1904.10.017 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN 2012

## TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar olan süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan tez danışman hocam Doç. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban'a çok teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, destekleyici ve verimli ortam için başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Murat Günaydın'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Belma Durupınar, Prof. Dr. Asuman Birinci, Prof. Dr. Cafer Eroğlu, Prof. Dr. Murat Hökelek, Yrd. Doç. Dr. Çağatay Acuner, Yrd. Doç. Dr. Adil Karadağ, Yrd. Doç. Dr. Kerametdin Yanık'a çok teşekkür ederim.

Çalışma ortamındaki uyum, özveri ve saygıları yanı sıra en kötü günlerimde yardımlarını ve sevgilerini hiç esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Zeynep Cingör Bayram ve Dr. Hacer Özlem Kalaycı'ya; kendileriyle çalışmaktan mutlu olduğum tüm asistan ve teknisyen arkadaşlarıma her şey için çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her zaman destek ve sevgilerini hep yanımda hissettiğim, büyük özverilerle beni yetiştiren, bu günümü borçlu olduğum saygıdeğer anneme ve babama tüm kalbimle teşekkür ederim.

En zor anlarımda varlığından güç aldığım, hep yanımda ve destek olan değerli eşim Dr. Hicabi Sezgin'e, hayatıma anlam katan biricik oğlum Emir Yiğit'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VIII
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Acinetobacter Cinsi Bakteriler	3
2.1.1 Taksonomi ve Tarihçe	3
2.1.2 Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler	4
2.1.3 Patogenez ve Virülans Faktörleri	5
2.1.4 Epidemiyoloji	7
2.1.5 <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonları	7
2.1.6 <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi	8
2.1.7 Acinetobacter Enfeksiyonlarında Kullanılan Antibiyotikler	9
2.1.7.1 Beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine antibiyotikler	9
2.1.7.2 Antipsödomonal penisilinler	11
2.1.7.3 Sefalosporinler	11
2.1.7.4 Karbapenemler	12
2.1.7.5 Kinolonlar	13
2.1.7.6 Aminoglikozidler	14
2.1.7.7 Tigesiklin	15
2.1.7.8 Polimiksinler	15
2.1.8 Acinetobacter Türlerinde Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	16
2.2. BİYOFİLM	20
2.2.1 Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi	20
2.2.2 Biyofilmin Yapısı	21

2.2.3 Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri	23
2.2.4 Biyofilm Oluşum Aşamaları	24
2.2.5 Biyofilm Hastalık İlişkisi	26
2.2.6 “QUORUM SENSING” (Çoğunluğu Algılama)	27
2.2.7 Biyofilmde Antimikrobiyal Direnç	29
2.2.8 <i>Acinetobacter baumannii</i> ve Biyofilm	30
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>33</b>
3.1 Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	33
3.2 Kolistin Duyarlılığının Standart Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Belirlenmesi	33
3.3 Biyofilm Oluşumunun Araştırılması	34
3.3.1 Tüp Yöntemi	34
3.3.2 Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi	34
3.4 Kolistinin Oluşmuş Biyofilm Tabakasına Etkisinin Araştırılması	35
3.4.1 Biyofilm tabakası üzerine kolistinin etkisinin optik dansite (OD) ölçülerek belirlenmesi	35
3.4.2 Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonun (BİK) Belirlenmesi	35
3.5 İstatistiksel Yöntem	36
<b>4. BULGULAR</b>	<b>37</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>52</b>
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>65</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>67</b>

## TABLO LİSTESİ

		<b>Sayfa</b>
Tablo I	: <i>A. baumannii</i> 'nin sahip olduğu antibiyotik direnç mekanizmaları	19
Tablo II	:Gönderilen Materyallerin Servislere Göre Dağılımı	38
Tablo III	: <i>A. baumannii</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları	40
Tablo IV	:PDR, XDR, MDR ve duyarlı izolatların oranları	40
Tablo V	: <i>Acinetobacter spp.</i> 'de antimikrobiyal kategoriler ve ajanların MDR, XDR ve PDR belirlenmesindeki kullanımları	41
Tablo VI	: <i>Acinetobacter</i> izolatlarında Phoenix Sistemi ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Elde Edilen Kolistin Duyarlılık Sonuçları	42
Tablo VII	:Biyofilm üretiminin belirlenmesinde tüp yöntemi ile mikrotitrasyon plağı yönteminin karşılaştırılması.	47
Tablo VIII	:Kolistinin OD üzerine etkisi	48
Tablo IX	:İzolatların MİK ve BİK değerleri	50

## ŞEKİL LİSTESİ

		<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1 a)</b>	: EPS yapısı	22
<b>Şekil 1 b)</b>	: EPS içinde basiller	22
<b>Şekil 2</b>	: Planktonik hücreden biyofilm gelişme aşamaları	25
<b>Şekil 3</b>	: Bakteriler arası iletişim	29
<b>Şekil 4</b>	: Biyofilmde Antibakteriyellere karşı gelişen direnç	30
<b>Şekil 5</b>	: Hastalardan gönderilen materyallerin dağılımı	37
<b>Şekil 6</b>	: Gönderilen materyallerin servislere göre dağılımı	39
<b>Şekil 7</b>	: Biyofilm üretiminin tüp yöntemi ile değerlendirilmesi	45
<b>Şekil 8</b>	: Biyofilm üretiminin mikrotitrasyon plağı ile değerlendirilmesi	46

## KISALTMALAR

<i>A. baumannii</i>	: <i>Acinetobacter baumannii</i>
ADCs	: Acinetobacter-Derived Cephalosporinases
AHL	: Aşıl Homoserin Lakton
AIP	: Autoinducer
BHI	: Brain Heart Infüzyon
BİK	: Biyofilm İnhibitör Konsantrasyon
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CFU	: Koloni Oluşturan Ünite
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
ÇİD	: Çok İlaça Dirençli
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDP	: Energy-Depent Phase
EMB	: Eozin Metilen Blue agar
EPS	: Ekstrasellüler polisakkaritler
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
KAMHB	: Katyon Ayarlı Mueller-Hinton-Buyyon
LPS	: lipopolisakkaridler
µg	: mikrogram
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MDR	: Multidrug-resistant
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	: mililitre
MRSA	: Metisilin Rezistans <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	: Optik Dansite
OmpA	: Outer membrane protein A
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PDR	: Pandrug-resistant
QS	: Quorum Sensing
RNA	: Ribonükleik asit



TSB	: Triptikaz Soy Buyyon
TSI	: Triptik Sugar Iron
XDR	: Extensively drug-resistant
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi



## ÖZET

### ***ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARINDA BİYOFİLM ÜRETİMİ VE KOLİSTİN DUYARLILIKLARININ BİYOFİLM FORMASYONUNDA ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* izolatlarının biyofilm oluşturma oranları, biyofilm üretimi tespitinde kullanılan yöntemler ve kolistin biyofilm üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

Çalışma kapsamına çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 152 *A. baumannii* izolatı dahil edildi. Çalışmada biyofilm üretiminin tespitinde tüp yöntemi ve mikrotitrasyon plak yöntemi karşılaştırılmıştır. Tüp yüzeyinde bir film tabakasının oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edildi ve kalitatif olarak değerlendirmeler sonrası 152 *A. baumannii* suşunun 83'ünde (%54.6) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 69'unda (%45.4) biyofilm oluşumu pozitif bulundu. Mikrotitrasyon yöntemiyle kristal viyole kullanılarak yapılan absorban ölçümlerine dayanan kantitatif değerlendirme sonucunda 75'inde (%49,3) biyofilm negatif, 68'inde (%44,7) orta derece biyofilm üretimi ve 9'unda (%5,9) güçlü biyofilm üretimi belirlendi. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile tüp yöntemi biyofilm üretimi tespit etme yönünden karşılaştırıldığında uyumlu bulundu ( $p < 0.001$ ). Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm üretimi pozitif tespit edilen 77 izolatla çalışmaya devam edildi. Kolistin biyofilm oluşturmuş *A. baumannii* izolatlarına etkileri 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağı kullanılarak belirlendi. Bir gece önceden oluşturulmuş biyofilme farklı konsantrasyonlarda antibiyotik eklenerek ELISA reader'da optik dansiteleri (OD) ölçüldü. İstatiksel olarak antibiyotik öncesi ölçülen OD ile antibiyotik sonrası ölçülen OD arasında anlamlı fark bulunmadı ( $P > 0,05$ ). Ancak biyofilm üretimi pozitif 77 klinik izolatın 33'ünde, kolistin yüksek konsantrasyonlarında (64µg/ml) OD'de azalma saptandı. Kolistin biyofilm inhibitör konsantrasyonları (BİK) mikrotitrasyon plağında boncuklar kullanılarak araştırıldı. Çalışılan izolatların BİK<sub>90</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri karşılaştırıldı. BİK<sub>90</sub> değeri, MİK<sub>90</sub> değerinin 512 katı olarak bulundu. Sonuç olarak

oluşan biyofilm antibiyotik tedavisine, aynı genetik materyale sahip serbest yaşayan bakterilere oranla 100-1000 kat tolerans veya direnç gösterebilmektedir. *A. baumannii* suşlarında biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler bir suşun farklı koşullarda farklı biyofilm oluşturma eğilimi gösterebileceğini göstermektedir ve biyofilm oluşumu antibiyotiklere direnç gelişiminde önemli rol oynamaktadır.

**Anahtar Sözcükler:**

*Acinetobacter baumannii*, Kolistin, Biyofilm, BİK, OD

## Abstract

### INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION IN *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLATES AND THEIR COLISTIN SUSCEPTIBILITIES IN BIOFILM FORMATION

In this study, the ratio of biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from various clinics, methods that are used for the detection of biofilm formation and efficacy of colistin on biofilm were investigated.

One hundred fifty-two *A. baumannii* isolates recovered from various clinical samples were included in the study. Tube method and microtitration plate method for the detection of biofilm formation were compared in the study. Formation of a film layer on the tube surface was considered as positive reaction. Of the 152 *A. baumannii* isolates, biofilm formation was found negative for 83 (54,6%) and positive for 69 (45,4%), following the qualitative evaluations. As a result of the quantitative evaluation based on absorbance measurements performed by microtitration method using crystal violet, for 75 (49,3%) biofilm was found negative and moderate biofilm formation and strong biofilm formation were detected in 68 (44,7 %) and 9 (5.9%), respectively. Correlation was found in the comparison of microtitration plate method and tube method for the detection of biofilm formation ( $p < 0.001$ ). The study was continued with 77 isolates that were positive for biofilm formation by microtitration plate. Efficacy of colistin on biofilm forming *A. baumannii* isolates was determined by using 96-well microtitration plate. Biofilms formed the night before were added with antibiotics with different concentrations and then their optical densities (O.D.) were measured by ELISA reader. No statistically significant difference was found between optical densities measured before and after the antibiotic ( $P > 0,05$ ). However, in 33 of 77 clinical isolates that were positive for biofilm formation, decrease in O.D. was detected in the high concentrations of colistin (64 $\mu$ g/ml). Biofilm inhibitory concentration (BIC) values of colistin were investigated by using glass beads. BIC<sub>90</sub> and MIC<sub>90</sub> values of the tested isolates were compared. BIC<sub>90</sub> value was 512-fold higher than MIC<sub>90</sub> value. As a result, biofilm can exhibit 100-1000 fold tolerance and resistance to antibiotic treatment

compared to free-living bacteria that contains same genetic material. The factors that affect biofilm formation in *A. baumannii* strains show that a strain can exhibit a tendency to form different biofilm under different conditions and biofilm formation plays an important role in the development of resistance to antibiotics.

**Key Words:**

*Acinetobacter baumannii*, Colistin, Biofilm, BIC, O.D.



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Nonfermentatif, gram negatif kokobasil görünümünde zorunlu aerob olan *Acinetobacter* türleri doğada ve hastane ortamında yaygın olarak bulunmaktadır. Bakteri, sağlıklı erişkinlerin deri, boğaz ve diğer vücut bölgelerinde normal flora üyesi olarak izole edilebilmektedir. İnsanlardan en sık izole edilen tür, *Acinetobacter baumannii*'dir (Schreckenberger ve ark., 2007).

*A. baumannii*, hastane kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu olan türdür ve antimikrobiyal çoğul direnç kazanma yeteneği, dış ortamda birçok yüzeyde canlı kalma kapasitesi hastane enfeksiyonları açısından önemini artırmaktadır (Schreckenberger ve ark., 2007). Ancak çok ilaca dirençli suşlar nedeniyle enfeksiyonların tedavisi güçleşmektedir. *A. baumannii* kaynaklı hastane enfeksiyonlarında %34 olarak bilinen mortalite oranı, yoğun bakım hastalarında %43'lere çıkmaktadır (Karageorgopoulos ve Falagas, 2008; Can ve ark. 2008).

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı *Acinetobacter* türlerini antimikrobik ajanlara karşı dirençli hale getirmiştir (Schreckenberger ve ark., 2007). Mikroorganizmalarda görülen direnç oranının artması nedeniyle, farklı tedavi protokolleri geliştirmeye çalışılmaktadır. Kombinasyon tedavileri ve/veya kolistin gibi eski antibiyotiklerin yeniden gündeme gelmesine neden olmuştur. Kolistin günümüzde bu tip enfeksiyonlara yakalanan hastaların tedavisinde son tedavi seçeneği olarak göz önüne alınmaktadır (Saltoğlu, 2007).

Biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri ekstrasellüler polisakkaritler (EPS), proteinler, çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır. Biyofilmin temel birimi mikrokolonilerdir. Mikrokoloniler bir veya daha fazla türde bakteri hücresinden oluşabilir. Biyofilm, cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları müköz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan, "mikroplar şehri" olarak tanımlanmıştır (Watnick ve Kolter, 2000).

Biyofilm oluşumu, bakterilerin hastane ortamında canlılığını uzun süre koruması ve enfeksiyonlarda antimikrobiyal tedaviye direnç oluşturması nedeniyle önemli bir virülans faktörüdür (Tomaras ve ark. 2003). *A. baumannii*'de yüzeylere tutunma özelliklerini ve biyofilm oluşumuna neden olan etkenleri açıklayan az sayıda çalışma

vardır. Ayrıca biyofilm formasyonu içindeki bakteriye antimikrobiklerin etkinliklerinin değerlendirildiği çalışma sayısı da oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada 6 aylık periyotta hastanemizde yatmakta olan hastalardan soyutlanan *A. baumannii* izolatlarının virulansında önemli rolü olan biyofilmin oluşum oranını belirlemek ve çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarında tedavi seçeneğinin sınırlı olması nedeniyle tedavide tek duyarlı görünen kolistinin (Polimiksin E) biyofilm üretimi üzerine ve biyofilm içindeki bakterilere etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Acinetobacter Cinsi Bakteriler

#### 2.1.1 Taksonomi ve Tarihçe

*Acinetobacter* türleri ilk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calco-aceticus* olarak isimlendirilmiş, 1939 yılında DeBord'un gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesiyle tanımlanmıştır (Munoz-Price ve Weinstein, 2008; Schreckenberger ve ark., 2007; Bahar ve Esen, 2008). Günümüze kadar 15'in üzerinde farklı jenerik isimle adlandırılmışlardır. Bunlardan bazıları *Bacterium anitratum*, *Herellea Vaginicola/Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, *B5W*, *Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii*'dir. Taksonomik çalışmalar sonucu *Acinetobacter* cinsi günümüzde *Moraxella*, *Psychrobacter* ve ilgili diğer cinslerle birlikte *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır (Berezin ve Towner, 1996).

Deoksiribonükleik asit (DNA) benzerlikleri temel alınarak yapılan çalışmalarda *Acinetobacter calcoaceticus*, *A.baumannii*, *A.haemolyticus*, *A.junii*, *A.johnsonii*, *A.lwoffii*, *A.radiorezistens*, *A.schindleri*, *A.ursingii* ile birlikte 19'dan fazla tür belirlenmiştir. Bu yedi türden dördü birbirlerine çok yakın olduklarından *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi olarakta kabul edilmektedirler. Klinik laboratuarda DNA gruplarını fenotipik testlerle ayırt etmek güç olduğundan, *Acinetobacter* türleri sakkarolitik ve asakkarolitik olarak incelenmiştir. Glikozu okside eden, hemolitik olmayan suşların bir çoğu *A. baumannii*, glikoz negatif hemolitik olmayanlar *A. lwoffii*, hemolitik olanlar ise *A. haemolyticus* olarak tanımlanmıştır (Schreckenberger ve ark., 2007; Bahar ve Esen, 2008) *A.baumannii*, *A.calcoaceticus* ve *A.lwoffii*, klinik literatürde sık rapor edilen *Acinetobacter* türleridir (Munoz-Price ve Weinstein, 2008). Tüm bu türler içerisinde en sık ve önemli klinik tablolara yol açan tür *A. baumannii*'dir (Bergogone-Berezin ve Towner, 1996).



### 2.1.2 Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler

*Acinetobacter* cinsi bakteriler; nonfermentatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, indol negatif, hareketsiz, nitratları redükte etmeyen, 35-37°C'de üremeyi seven, kesin aerop üreyen gram negatif mikroorganizmalardır (Bahar ve Esen, 2008). Flajellaları yoktur, fimbriaları vardır. Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar (Bergogone-Berezin ve Towner, 1996; Bartual, 2005; Towner, 1998). Her biri 1-1,5 x 1,5-2,5 µm ölçülerinde, bazen zor dekolorize olup sıklıkla çiftler halinde yerleşim gösterirler. *Acinetobacter* türleri özellikle kan kültür şişelerinden hazırlanan direkt yaymalarda gram-pozitif kok görünümünde olabilirler. Seçici olmayan agarda, sabit üreme fazında kokobasil formu predominans gösterirken, sıvı besiyerinde erken üreme döneminde veya hücre duvarında aktif antimikrobiyal ajanları içeren plaklarda sıklıkla basil formunda izlenirler.

*Acinetobacter* kolonileri düzgün, opak ve *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerine göre daha küçük kolonilerdir. Bir çok suş MacConkey agarda renksiz veya hafif pembe renkte koloniler oluşturur. Bazı suşlar daha zor ürer ve kanlı garda ortası delik koloniler meydana gelir. Bu koloniler sıvı besiyerinde üreyemezler (Schreckenberger ve ark., 2007).

Enterobakterilerden anaerobik şartlarda ürememesi ve nitratları redükte etmemesi ile kolayca ayrılabilir.

Klinik örneklerden izole etmek için seçici-ayırıcı besiyerleri geliştirilmiştir. Safra tuzları, şeker ve bromkrezol moru içeren Herelea agar, Holton's agar, Leeds *Acinetobacter* Medium bu amaçla kullanılabilir. Bakterileri, dışkı gibi kontamine örneklerden izole etmek için tek bir karbon ve enerji kaynağı, nitrojen kaynağı olarak amonyum veya nitrat tuzları içeren pH 5.5- 6.0 olan sıvı mineral besiyerine inoküle ederek izole etmek mümkündür (Berezin ve Towner, 1996; Jawad, 1994).

Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) sınıflamasına göre *Acinetobacter* türleri nonfermentatif gram negatif basiller içerisinde CDC Grup EO -5, CDC Grup NO -1 ve *Bordetella* türleri ile birlikte oksidaz negatif grup içerisinde yer alırlar (Schreckenberger ve ark., 2007).

Tür düzeyinde ayırmda glukoz oksidatif etki, hemoliz ve 44°C'de üreyebilme genelde yeterli olmaktadır. *A.baumannii* hemoliz yapmayarak, glukozu oksitleyerek ve 44°C'de üreyebilme yeteneği ile kolayca diğerlerinden ayırılabilir. Glukoz negatif



kökenlerden hemoliz yapmayan *A.lwoffii*, hemoliz yapan *A.haemolyticus* olarak adlandırılır. *A.johnsonii* diğer türlerden 37°C’de üreyememesi nedeni ile ayırt edilebilir (Bahar ve Esen, 2008; Bergogone-Berezin ve Towner, 1996; Weaver ve Actis, 1994).

Klasik yöntemlerin dışında otomatize sistemlerde *Acinetobacter*’lerde tür ayrımı yapılabilmektedir. Fakat moleküler yöntemler en duyarlı metotlardır. Bakteriyosin ve faj tiplendirme, protein profili, serotiplendirme, multilokus enzim elektroforez ile tiplendirme, PZR, ribotiplendirme, Pulsed Field Gel Electrophoresis yöntemleri de kullanılabilir ( Berezin ve Towner, 1996).

### 2.1.3 Patogenez ve Virülans Faktörleri

Son yıllarda yapılan çalışmalar, *A. baumannii*’nin daha dirençli ve virülan hale gelerek hastane enfeksiyonları için tehdit oluşturduğunu göstermektedir. Bakterinin hastane ortamında uzun süre yaşayabilme ve yaygın antibiyotik direnci geliştirebilme yeteneğinden dolayı enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi zorlaşmaktadır. *A.baumannii*’nin insan sağlığı için önemi ortadır ve bakteri tarafından eksprese edilen virülans mekanizmalarının doğasının anlaşılması gerekmektedir. Potansiyel virülans etmenleri arasında;

a-Hücre Yüzey Özellikleri; *Acinetobacter* cinsindeki lipopolisakkarid O antijeni, yapısındaki tekrarlayan deoksiamino şekerler ve bu polimerlerin çoğundaki yapısal dallanmalar nedeniyle hidrofobik özellik göstermektedir. Bakterinin hücrelere hidrofobik yüzey bileşenleri aracılığıyla tutunduğu gösterilmiştir. Bu tutunmada ince fimbria ve polisakkarid kapsül benzeri yapılarda rol almaktadır. Yeni yapılan çalışmalarda K1 kapsül yapısının önemli bir virülans faktörü olduğu vurgulanmaktadır (Aşık, 2011).

b-Litik/Toksik Bileşik Üretimi; Çoğu *A.baumannii* izolatu, yapısı ve antijenik özellikleri iyi bilinen çeşitli lipopolisakkaridler (LPS) üretmektedir. Bu yapıların, serum direnci, konağın endotoksine karşı immün yanıtı ve klinik semptomlar ile ilişkili virülans faktörleri olabileceği düşünülmektedir. Diğer bir virülans özelliğide ekstraselüler enzim üretebilme yeteneğidir. Bu enzimler lipid yıkımına neden olurlar. Ayrıca bir çalışmada da, *A.baumannii* tarafından salgılanan dış membran veziküllerinin, konak hücre üzerinde sitotoksik aktivite gösteren bir protein (outer membrane protein

A; OmpA) içerdiği saptanmış ve bu proteininin önemli bir virülans faktörü olduğu ifade edilmiştir (Aşık, 2011).

c-Dokulara Yapışma ve Hasar Oluşturma; Bakterinin intraselüler alanında lokalize olmuş, uzun, ince ve mannoza dirençli polisakkarid fimbrialar aracılığıyla dokulara yapışma gerçekleşmektedir. *A.baumannii* OmpA (AbOmpA), 38 kDa moleküler ağırlığına sahip bir yüzey proteini olup küçük maddelerin geçişinde rol almaktadır. Daha önceden Omp38 olarak adlandırılan bu protein, *A.baumannii*'nin epitelyal hücrelere yapışmasından ve invazyonundan sorumludur (Aşık, 2011).

d-Biyofilm Oluşumu; *A. baumannii*'nin biyofilm oluşturması, hastane ortamında ve aygıtların yüzeyinde uzun süre canlı kalabilmesi nedeniyle, özellikle kateter kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir virülans faktörüdür. Biyofilm oluşturma özelliği hastane ortamında uzun süre canlı kalmasını sağlamasının yanısıra, bakteriyi bazı antimikrobiyal ajanlara karşı da korumaktadır. Diğer bakterilerde tutunma özelliğini inceleyen çalışmalarda, bakteri ve yüzey arasında gelişen bağlantılardan bakteride oluşan ekzopolimerik yapıların oluşturulması, pili ve flajella gibi uzantıların sorumlu olduğu gösterilmiştir (Can ve ark. 2006).

e-Demir Kazanım Mekanizmaları; Konakta varlığını sürdürmek için mikroorganizmalar, öncü demir moleküllerini kullanma yeteneklerini ortaya koyar ve bunu da, yüksek afiniteli demir kazanım sistemlerini eksprese ederek sağlar. *A.baumannii* izolatları, farklı demir kaynaklarını kullanabilme yeteneğine ve konağa kolonize olmayı sağlayan bağımsız demir kazanım sistemine sahiptir. Bu bakteriler, demir kazanım kapasitelerindeki farklılığa göre siderofor aracılı ve/veya hemin kazanım fonksiyonlarını eksprese etmektedir (Aşık, 2011).

f- "Quorum Sensing" (QS); Bir bakterinin patogenezi için gerekli olan şartlardan biri, yeni çevreye uyum sağlamak ve çevreden gelen uyarınları algılayarak yanıt geliştirmektir. "Minimum popülasyon birimini algılama" olarak ifade edilen QS mekanizması, bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan bir sistem olup, bakteri bu bilgiyi birçok genin regülasyonunu kontrol etmekte kullanır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir, aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir, enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konağın immün yanıtından kaçabilir (Aşık, 2011).



#### 2.1.4 Epidemiyoloji

Bir bakteriyel patojenin, sınırlı besin koşullarında ve kuru yüzeylerde yaşayabilme yeteneği, doğal ve tıbbi çevrelerde canlı kalarak yayılmasına yardımcı olmaktadır. Bu durum bakterinin, hastane cihaz ve ekipmanlarındaki kolonizasyonun uzun süreli olmasına yol açmakta ve salgınların ortaya çıkışı ile sonuçlanabilmektedir. Diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında *Acinetobacter* türleri kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH derecelerinde yaşayabilme özellikleri ile cansız yüzeylerde günlerce canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler (Berezin ve Towner, 1996). *Acinetobacter* türleri insan derisinin doğal konakçısı olarak benimsenmekte ve özellikle salgınlar sırasında hastanede yatan hastalarda %25'e varan yüksek oranlarda taşıyıcılık saptanmaktadır. Bu durum en çok hastane personeline derideki kalıcı taşıyıcılığa bağlanmaktadır (Bahar ve Esen, 2008; Mandell, Douglas, ve Bennett's, 2005). *A.baumannii*, tıbbi cihazlar, yatak/şilte ve yastıklar, eldivenler, elektrikli ekipmanlar ve tıbbi giysiler gibi abiyotik yüzeylerde günlerce hatta haftalarca yaşama yeteneğine sahiptir (Towner, 2009).

Yoğun bakım ünitelerinde özellikle ventilasyon uygulanan hastalarda, solunum sisteminde taşıyıcılığın yüksek oranda arttığı ve salgınlara yol açtığı gösterilmiştir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların dışkılarında çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter* türleri izole edilmiş ve trakeostomili hastaların %45'inde kolonizasyon saptanmıştır (Bahar ve Esen, 2008; Schreckenberger ve ark., 2007). Özellikle YBÜ'de değişik risk faktörleri bu duruma etkili olmaktadır. Antibiyotik tedavisi, cerrahi girişim, yabancı cisim uygulamaları, mekanik ventilasyon, uzun süre YBÜ'de yatış ile birlikte kolonize olan bakteriler risk faktörlerinden bazılarıdır (Schreckenberger ve ark., 2007). Son yirmi yılda *Acinetobacter* enfeksiyonları ılıman iklimlerde giderek yaygınlaşan ortak bir nozokomiyal sorun haline gelmiştir (Munoz-Price ve Weinstein, 2008)

#### 2.1.5 *Acinetobacter* Enfeksiyonları

*Acinetobacter* türleri genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar. Toplumdan kazanılmış enfeksiyonlarına nadir rastlanır. *Acinetobacter* türleri arasında en sık ve en ciddi klinik tablolara neden olan etken *A. baumannii*'dir. Özellikle

yoğun bakım ünitelerinde pnömoni, sepsis, menenjit, bakteriyemi, üriner sistem ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olurlar (Mandell, Douglas ve Bennett's, 2000).

*Acinetobacter* enfeksiyonları arasında en önemlisi olan bakteremide en sık kaynak intravasküler ve solunum yolu kateterleridir. Primer bakteremi, tanımlanamamış vasküler kateter enfeksiyonlarına sekonder olabilir ya da bakteriyel translokasyondan dolayı intestinal kaynaklı olabilir. Genelde bakteremi yüksek mortalite ile birlikte ve *A. baumannii*'ye bağlı bakteremilerde prognoz daha ağır seyreder.

*Acinetobacter* enfeksiyonlarının ikinci önemli nedeni olan pnömoniler de ciddi seyirli olup, mortalite oranında ve hastanede kalış süresinde artışa neden olmaktadır (Saltoğlu, 2007).

### **2.1.6 *Acinetobacter* Enfeksiyonlarının Tedavisi**

*A. baumannii* antimikrobiyal direncin hızla geliştiği bir bakteridir. Bu direnç tedavide ciddi sonuçlara yol açan bir problemdir. Özellikle hasta sirkülasyonu ve antimikrobiyal kullanımı yüksek olan YBÜ'lerinde daha önemli sorundur (Saltoğlu, 2007).

*Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle karbapenemler, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler,  $\beta$ -laktam- $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonları, kombinasyonla veya tek başına aminoglikozitler, kinolonlar, kloramfenikol, rifampisin, trimetoprim-sülfametoksazol, doksisiklin ve kolistin kullanılan etkili antimikrobiyal ajanlardır (Berezin ve Towner, 1996; ASM Pres: 2007). Ancak *Acinetobacter* enfeksiyonlarında direnç nedeniyle tedavi seçenekleri sınırlıdır. Karbapenemler, sulbaktam, kolistin ve tigesiklin en etkili antibiyotiklerdir. Direnç sorunu nedeniyle kolistine olan ilgi artmıştır. Kolistin kullanımı ile ilgili başarılı sonuçlar bildirilmekle birlikte bu ilaçla klinik deneyim sınırlıdır. Kolistin dahil tüm ilaçlara dirençli suşlar panrezistan olarak adlandırılmıştır (Saltoğlu, 2007).

Bakterinin tedavi esnasında hızla direnç geliştirebilme olasılığı ve tedavide yeterince başarı sağlanamaması nedeniyle kombinasyon tedavileri önerilmektedir. En sık tercih edilen kombinasyon, düşük direnç oranları ve in vitro sinerji göstermesinden dolayı imipenem+aminoglikozid, seftazidim+aminoglikozid veya florokinolon, imipenem+siprofloksasin, sefoperozon+sulbaktam kombinasyonlarıdır (Marques ve ark. 1997).



Çoğul ilaç dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için yapılan *in vitro* çalışmalarda polmiksin B veya kolistin+imipenem veya rifampin veya azitromisin; polmiksin veya kolistin+imipenem+rifampin; rifampin+azitromisin; sulbaktam+rifampin veya azitromisin veya kinolon kombinasyonlarının kullanımı tek başına kullanıma göre etkiyi değiştirdiği gösterilmiştir (Rahal, 2006; Appleman ve ark. 2000).

Tigesiklin bazı çoğul ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarına karşı *in vitro* ve klinik olarak aktif olan yeni glisiklin antibiyotiktir, fakat son zamanlarda tigesikline karşı da direnç rapor edilmiştir (Munoz-Price ve Weinstein, 2008).

### **2.1.7 Acinetobacter Enfeksiyonlarında Kullanılan Antibiyotikler**

#### **2.1.7.1 Beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine antibiyotikler:**

Beta-laktamazlar yapısal olarak PBP'lere benzerler ve beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek etkisiz kılarlar. Pratikte beta-laktamaz inhibitörleri olarak klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam kullanılır. Bunlar antibakteriyel etkileri zayıf beta-laktam molekülleridir. Bu üç molekülde beta-laktamaz inhibisyonunda benzer yolları kullanır ve irreversible inhibitör olarak davranır. Yalnız bu inhibitörler *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarında bulunan kromozomal beta-laktamazları inhibe edemez, plazmid kökenli enzimleri inhibe eder. Sulbaktam diğerlerinden farklı olarak, *Acinetobacter* türleri üzerinde antibakteriyel etki gösterir ve sulbaktam kombinasyonlarına bu bakterilerin duyarlılıkları yüksek bulunur. Bu bileşiklerle (sulbaktam-ampisilin ve sulbaktam-sefoperazon) çoklu dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde yüksek başarı bildirilmektedir (Vahaboğlu, 2008).

a) Ampisilin-sulbaktam: Ampisilin ile beta-laktamaz inhibitörü olan sulbaktamın kombinasyonudur ve 2:1 oranında ampisilin ve sulbaktam içerir. Yapısal olarak bakterilerin hücre duvar sentezinde rol alan disakkarid peptidlerin karboksi terminali ile benzerlik gösterir. Bu benzerlik nedeniyle penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak hücre duvar sentezi inhibisyonu yaparak, bakterisidal etki gösterir. Ampisiline sulbaktam eklenmesi, dar spektrumlu ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapan ve ampisiline dirençli olan gram-negatif, gram-pozitif ve anaerob bakterilere karşı etkinliğini artırır (Leblebicioğlu, 2004).

Sulbaktam, 1-1 didioksi penisilanik asit-sülfondur. Yapısal ve farmakokinetik özellikleriyle ampisiline benzer; serum yarı ömrü 1.1-1.3 saattir (Vahaboğlu, 2003). Sulbaktam, gram negatif bakterilerde PBP2'ye bağlanarak inhibisyona yol açar. Bu özellik tek başına antibakteriyel etkinliğe yol açmamakla birlikte penisilin veya sefalosporinlerle kombine edildiğinde antibakteriyel etkinliğin güçlenmesine neden olmaktadır (Williams, 1997).

Ampisilin aminopenisilinler grubunda yer alan beta-laktam bir antibiyotiktir. Yapısal olarak bakterilerin hücre duvar sentezinde rol alan disakkarid peptidlerin karboksi terminali ile benzerlik gösterir. Bu benzerlik nedeniyle PBP'lere bağlanarak hücre duvar sentezini durdurur. Oral kullanımda biyoyararlanımı düşüktür, oral alımı takiben %30-55'i emilir. Ampisilin vücut sıvılarında dağılımı oldukça iyidir. Yarılanma ömrü 1-2 saat, plazma proteinlerine bağlanma oranı %20'dir. İntravenöz uygulamadan 1 saat sonra serum konsantrasyonu 12-29 mg/lt'ye ulaşır; erişkin dozu 6 saatte bir uygulanır. Beta-laktamaz salgılayan gram negatif bakterilere karşı etkinliği yoktur. Bu nedenle bir beta-laktamaz inhibitörüyle kombine edilmiş ticari formu bu tip infeksiyonlarda kullanılır (Dökmetaş, 2003).

b) Sefaperazon-sulbaktam: Sefoperazon bir üçüncü kuşak sefalosporindir. Diğerlerinden farklı olarak antipsödomonal etki gösterir. Beta-laktamaz sentezlemeyen enterik gram-negatifler ve *P.aeruginosa*'ya karşı yüksek etkinlik gösterir. Özellikle enterik gram-negatif mikroorganizmaların ve *P.aeruginosa*'nın beta-laktamaz üretimiyle sefoperazonun etkinliğini belirgin derecede azaltmasının önüne geçmek için, sefoperazon sulbaktam ile kombine edilerek kullanıma sunulmuştur. Ülkemizde sefoperazon ve sulbaktam kombinasyonu, içinde her iki etken maddenin de 1'er gramını içeren 1:1 kombinasyonu şeklinde bulunmaktadır. Sefoperazon, sulbaktam ile kombine edildikten sonra beta-laktamaz üreten pek çok mikroorganizmaya karşı yeniden etkin hale geçer (Akova, 2006).

*Acinetobacter* türlerine karşı sulbaktamla sefaperazonun 1:1 oranında kombine formu oldukça etkilidir (Williams, 1997). Türk Antibiyotik Direnç Grubu tarafından 9 merkezin katılımı ile gerçekleşen bir çalışmada 716 bakteri kullanılmış ve E-test yöntemi ile in vitro sefaperazon-sulbaktam duyarlılıkları tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Acinetobacter* izolatlarına en etkili antibiyotiklerin sefaperazon-sulbaktam ve imipenem



olduğu saptanmıştır (Pfaller ve ark. 1999). Aygün ve ark. (Aygün ve ark. 2002) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi yoğun bakım ünitesinden hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 50 *A. baumannii* izolatının disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarını saptamışlardır. Sefoperazon-sulbaktam (%80) netilmisinden sonra ikinci en etkili antibiyotik olarak saptanmıştır.

Sefoperazon-sulbaktam sadece parenteral yolla kullanılır. Bu iki ajanın kombinasyon biçiminde kullanımının tek tek kullanımlarından farklı farmakokinetik özelliklere sahip olmadığı saptanmıştır. Sefoperazon-sulbaktamın dokulara dağılımı oldukça iyidir. Sefoperazon çoğunlukla safra yoluyla atıldığı için safra kesesi içinde ve kese duvarında yüksek yoğunluklarda bulunur. Sefoperazon-sulbaktam inflamasyon varlığında bile beyin omurilik sıvısına tedavi edici yoğunluklarda geçmez. Günlük doz normalde 12 saat arayla verilen 2 g sefoperazona karşılık gelecek biçimdedir. Ciddi enfeksiyonlarda bu miktar 4 grama kadar çıkarılabilir (Akova, 2006).

#### **2.1.7.2 Antipsödomonal penisilinler:**

Karboksi penisilinler (karbenisilin ve tikarsilin) ve üreidopenisilinler (azlosilin, mezlosilin ve piperasilin) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Aminopenisilinlerle karşılaştırıldığında etkinlikleri gram negatif basiller üzerine daha fazladır. Bakteri hücre duvar sentezinin son basamağını inhibe ederek etki ederler. Bunlar içerisinde piperasilin ve tikarsilinin beta-laktam inhibitörlü kombinasyonları *Acinetobacter* izolatlarına karşı etkinlik göstermektedir.

Piperasilin ile bir beta-laktamaz inhibitörü olan tazobaktam 8/1 oranında kombine edilerek kullanılır. Tikarsilin etkinliği ise klavulonik asitle artar. Tikarsilin/klavulonik asit 15/1 oranında kombine edilerek kullanılır (Çakır, 2004). Tikarsilin ile karbenisilinin etkisi benzerdir, fakat tikarsilinin etkin dozu daha düşüktür (Dökmeci, 1992).

#### **2.1.7.3 Sefalosporinler**

Penisilinlerden beş üyeli tiazolidon halkası yerine, sefem çekirdeği adı verilen altı üyeli dihidrotiazin halkasının olmasıyla ayrılırlar. Dihidrotiazin halkası sefalosporinlerin beta-laktamlara karşı daha stabil olmasını sağlar. Sefem çekirdeğinin yedinci pozisyonundaki değişiklikler antibakteriyel etkiden, üçüncü pozisyonundaki değişiklikler ise farmakokinetik ve metabolik özelliklerden sorumludur (Leblebicioğlu, 2008).

Penisilinler gibi PBP'lere bağlanarak hücre duvar sentezini önler ve bakterisidal etki gösterirler. Sefalosporinler yapılarına ve antimikrobiyal etkinliklerine göre birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Kuşak sayısı arttıkça gram-pozitif etkinlik azalırken, gram negatif etkinlik artmaktadır. Dördüncü kuşak sefalosporinlerde aynı zamanda gram pozitif etkinlik olup, ikinci kuşak sefalosporinler kadar etkinlik gösterirler (Leblebicioğlu, 2008).

Özellikle üçüncü kuşak sefalosporinlerden sefaperazonun sulbaktamli kombinasyonu, seftazidim ve dördüncü kuşak sefalosporinlerden sefepim *Acinetobacter* enfeksiyonlarında etkilidirler (Çakır, 2004).

Seftazidim; aminotiazolil grubu yarı sentetik bir üçüncü kuşak sefalosporindir. Tüm vücut sıvılarında dağılımı oldukça iyidir. Antipsödomonal etkinliği ön plandadır. Duyarlı *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kullanılabilir. Ancak son zamanlarda yüksek direnç oranları bildirilmiştir (Çakır, 2004; Aygün, 2002).

Sefepim; dördüncü kuşak yarı sentetik bir sefalosporindir. Parantral kullanıma uygun çift iyonik karakterde aminotiazolil sefalosporindir. Aminotiazolil grubunun varlığı gram negatif etkinliği ve beta-laktamazlara direnci sağlayan bir özelliktir. *Pseudomonas* izolatları da dahil tüm gram negatif çomaklara, gram pozitif koklara ve anaeroplara karşı etkilidir. Gram pozitif koklara karşı etkisi üçüncü kuşak sefalosporinlerden fazla, ikinci kuşak sefalosporinlerden azdır. Tip 1 kromozomal betalaktamazlardan daha az etkilenmesi nedeni ile gram negatif enterik basillere üçüncü kuşak sefalosporinlerden daha etkilidir. Diğer sefalosporinlere benzer şekilde enterokoklar ve MRSA izolatlarına karşı etkisizdir. Bu nedenle özellikle gram negatif mikroorganizmaların neden olduğu polimikrobiyal nozokomiyal enfeksiyonlarda kullanılır (Çakır, 2004). Beyin omurilik sıvısı dahil tüm vücut sıvı ve dokularına geçişi iyidir. Plazma yarı ömrü 2-2,3 saattir ve idrar yoluyla atılır (Leblebicioğlu, 2008).

#### **2.1.7.4 Karbapenemler:**

Karbapenemler en geniş spektruma sahip beta-laktam grubu antibiyotikler olup hem enterik hem de nonenterik gram negatif çomak ve koklar, gram pozitif koklar, anaerop bakteriler üzerine etkindirler. Ortak bir karbapenem molekülü içeren yarı sentetik beta laktam türevi antibiyotiklerdir. Penisilinlerden farklı olarak C1 atomuna bir kükürt atomu buna da bir tiazolidin halkası bağlanmıştır. C2 ve C3 atomlarında



doymamış bağlar vardır. 6-transhidroksimetil grubunun varlığı birçok beta-laktamaz türüne karşı molekülün direncini sağlar. Karbapenemler başta PBP2 olmak üzere, PBP1A, PBP1B, PBP3, PBP4 ve PBP5'e bağlanarak hücre duvar sentezini engellerler (Çakır, 2008).

Geniş spektrumları ile birlikte AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerine karşı dirençli olmaları ve indüklenmiş bakteri topluluklarında AmpC mutantların seçimine meydan vermemesi karbapenemlere üstünlük sağlamaktadır. İmipenem ve meropenemden sonra üç yeni üye daha ruhsatlandırılarak klinik kullanıma verilmiştir. Bunlar; ertapenem, doripenem ve faropenemdir.

İmipenemin plazma yarılanma ömrü yaklaşık 1 saattir. Serum proteinlerine bağlanma oranı %10-20 arasındadır, vücut sıvılarına dağılımı iyidir. Klinik kullanımda imipenem/silastatin intravenöz infüzyon şeklinde 6 saatte bir 500 mg olarak uygulanır. Plazmada dolaşan imipenemin %50-70'i vücutta moleküler değişikliğe uğramadan böbrek yolu ile atılır. Bu nedenle böbrek yetmezliğinde doz ayarı gerekmektedir (Usluer ve Ünal, 2004).

Meropenem genellikle sekiz saat arayla 1 gr şeklinde uygulanır. Meropenem de imipenem gibi böbrekler yoluyla ve genellikle değişmeden atılır. Bu nedenle böbrek yetmezliklerinde doz ayarlanmasına gerek vardır.

Karbapenemler birçok plazmid kökenli beta-laktamaza dirençlidir. Kromozomal beta-laktamazların kuvvetli indükleyicisidirler. Çinko metalloenzimlere duyarlıdır. Karbapenemler, TEM ve SVH-tip beta-laktamazlardan (Richmond Sykes Tip 3) ve Richmond Sykes Tip 1 enzimlerden klinik düzeyde etkilenmezler (Çakır, 2008).

#### **2.1.7.5 Kinolonlar**

Kinolonlar, konsantrasyona bağımlı bakterisidal etkiye sahip antibiyotiklerdir. Bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan iki topoizomerez (DNA giraz ve topoizomerez IV) ile etkileşime girerek DNA sentezini durdurmaktadırlar. DNA giraz, iki GyrA ve iki GyrB alt birimlerinden oluşan tetramerik bir enzim olup *gyrA* ve *gyrB* genlerinden kodlanır. Topoizomerez IV de, ParC ve ParE alt birimlerinden oluşmaktadır. Florokinolonların gram pozitif ve gram negatif bakterilerdeki enzim hedefleri farklıdır. Gram negatif bakterilerde birincil hedef DNA giraz, gram pozitif bakterilerde ise topoizomerez IV'tür (Hooper, 2000).

Kinolonlar kimyasal yapı-aktivite ilişkisine göre dört kuşakta incelenir. Gruptaki ajanların tümü *Enterobacteriaceae* ailesine çok iyi etkinlik gösterir. *P.aeruginosa*'ya karşı en iyi etkinlik siprofloksasindedir. Ancak hiçbirisi diğer *Pseudomonas* türlerine etkin değildir. Moksifloksasin ek olarak anaeroplara karşı yüksek etkinlik gösterir (Arda ve Ulusoy, 2008).

Ofloksasin ve siprofloksasin, enterik bakterilerin yanı sıra *Acinetobacter* spp. türlerine de etkilidir. Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kombine tedavide siprofloksasin sıklıkla kullanılan bir ajandır. *Acinetobacter* türlerine karşı, 1988'lere kadar florokinolonlar oldukça etkiliyken günümüzde dirençli kökenler ön plandadır (Gür, 2008; Ruiz, 2003).

#### **2.1.7.6 Aminoglikozidler**

Aminoglikozidler, *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi mantarlardan elde edilen doğal yada yarı sentetik bakterisidal etkili antibiyotiklerdir. Etkilerini mRNA'daki kodonların okunuşunu azaltarak ve tRNA antikodonlarındaki bilginin ribozomlarda yanlış okunması ile proteinlerin yanlış kodlanmasına yol açarak gösterirler. Bunun sonucunda bakteri protein sentezi sonlanır. Bu etkinin gerçekleşebilmesi için streptomisin ribozomal 30S alt birimine bağlanırken diğer aminoglikozidler hem 30S hem de 50S alt birimlerine bağlanırlar. Aminoglikozidler bakterilerin dış membranlarındaki porin kanallarından periplazmik aralığa difüzyonla girer, ancak bakteri sitoplazmik membranını geçebilmeleri enerji ve oksijene bağımlı aktif transport mekanizması ile olmaktadır. Bu işlem Energy-Depent Phase 1 (EDP) ve EDP 2 olmak üzere iki fazda gerçekleşir. Diğer protein sentezini inhibe eden antibiyotikler bakteriyostatik etki gösterirken aminoglikozidlerin bakterisid etki göstermesinin transport esnasında hücre membranında delikler oluşmasına ve sonuçta hücre duvar geçirgenliğinin bozulmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Aminoglikozidler *P. aeruginosa* başta olmak üzere gram negatif aerop bakterilere etkilidir. Gram pozitif bakterilere etkinlikleri ise kısıtlıdır. Metisiline duyarlı stafilokoklara etki ederken; piyogen streptokoklar aminoglikozidlere nadiren duyarlıdır. *Listeria* türlerine ve diğer gram pozitif basillere ise etkisizdirler. Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında kombine tedavide etkilidirler (Willke, 2008).



### 2.1.7.7 Tigesiklin

Tigesiklin (GAR 936) tetrasiklin grubundan minosiklinin semisentetik olarak türetilmesi ile oluşan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Glisiklin grubunun ilk üyesidir. Tetrasiklinlerin temel çekirdeğindeki 9 pozisyonunda yapılan N-alkil-glisilamido modifikasyonu bu yeni moleküle çok geniş bir antibakteriyel spektrum ve tetrasikline direnç mekanizmalarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Esen, 2008).

Tigesiklin de tetrasiklinler gibi bakteri ribozomlarının 30S alt ünitlerine bağlanarak protein sentezini elongasyon basamağında inhibe ederler. Bağlanma noktası tetrasiklinlerden farklı olduğu için Tet(M) proteininden etkilenmez ve tetrasiklinlere göre beş kat daha güçlü olarak bağlanır (Pankey, 2005; Çalık ve Akova, 2007).

Tigesiklin aerobik gram-pozitif, gram-negatif ve anaerop patojenlere karşı etkinlik gösterir. Aynı zamanda *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.* ve *Morganella spp.* hariç tetrasiklinlere efluks veya ribozomal bağlanma ünitesinde değişiklik yoluyla direnç geliştirmiş tüm mikroorganizmalara etkilidir. Ayrıca tigesiklin karbapenemaz üreten *Acinetobacter* izolatlarına karşı etkili bulunmuştur (Çalık ve Akova, 2007).

### 2.1.7.8 Polimiksinler

Polimiksinler kimyasal olarak 5 farklı bileşiği içeren (polimiksin A-E) polipeptid antibiyotiklerdir. Klinik pratikte sadece polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmıştır (Akalin, 2007).

Polimiksin B'nin kolistinden bir aminoasit farklılığı mevcuttur. Polimiksin B'nin Gram pozitif bakterilere karşı etkinliği yoktur, ama Gram negatif bakterilere karşı farklı düzeylerde etkilidir. Polimiksin B'nin etki spektrumu kolistine benzerdir. Diğer tüm antibiyotik gruplara dirençli olan MDR *P. aeruginosa* ve MDR *Acinetobacter* izolatları polimiksin B'ye intrinsek olarak duyarlıdır (Zavascki ve ark, 2007).

Kolistin; *Bacilluspolymyxa subspecies colistinus* Koyama tarafından ribozom dışı sentezlenir. 1940'lı yıllarda tanımlanan bu ilaç ciddi toksisitesi nedeniyle kullanım dışı kalmıştır. 1993'te sadece kolistine duyarlı gram negatif suşlar bildirilmesi tekrar bu ilaca ilgiyi arttırmıştır (Saltoğlu, 2007).

Ticari olarak kolistinin 2 formu mevcuttur. Bu formlar kolistin sülfat ve kolistimetat sodyum'dur. Kolistimetat sodyum kolistin sülfata göre daha az etkili ve daha az toksiktir. Kolistin sülfat barsak dekontaminasyonu için, oral ve bakteriyel cilt enfeksiyonları için topikal olarak kullanılır (Akalin, 2007).

Kolistinin hedefi bakteri hücre membranıdır. Katyonik bir peptid olan kolistin ile gram-negatif bakterilerin dış membranındaki anyonik LPS molekülleri elektrostatik ilişkiye girerler ve hücre membranında düzensizliğe yol açarlar. Kolistin, LPS moleküllerini stabil halde tutan magnezyum ve kalsiyumun yerini değiştirerek dış membranda bozulmaya ve oluşan permeabilite bozukluğu bakterinin ölümüne neden olur. Ek olarak kolistin güçlü endotoksin aktivitesiyle direkt antibakteriyel etki de gösterir.

Kolistin ciddi yan etkileri, nefrotoksisite, nörotoksisite ve nöromuskuler blokaj nedeni ile kullanımı sorunlu bir antimikrobiyaldir. İlk olarak dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında yara yerine topikal olarak kullanılmıştır. Dirençli enfeksiyonlarda 2.55 milyon ünite/kg/gün i.v yolla, maksimum 300 mg'a kadar, iki ya da 3 doza bölünerek kullanımı önerilir. Renal yetersizlikte doz azaltılmasına gerek vardır. Hastaların %58'inde iyi klinik sonuç alınmıştır. Diğer tedavi seçeneklerinin kalmadığı durumlarda kolistin hastayı yakın izleme koşulu ile önerilebilmektedir. Kolistin dahil tüm ilaçlara dirençli suşlar panrezistan olarak adlandırılmıştır (Saltoğlu, 2007).

Kolistin, *Acinetobacter* türleri, *P.aeruginosa*, *Klebsiella* türleri, *Enterobacter* türleri, *Escherichia coli*, *Salmonella* türleri, *Shigella* türleri, *Citrobacter* türleri, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Morganella morganii* ve *Haemophilus influenzae*'ya karşı bakterisidal etki gösterir. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarına da etkili olduğu gösterilmiştir. Gram negatif bakterilerde mutasyon ya da adaptasyon yolu ile bu antibiyotiğe karşı direnç gelişebilmektedir (Falagas, 2005).

Son yıllarda çok ilaca dirençli *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında yeniden gündeme gelmiştir ve tedavide kullanılmıştır. Çok ilaca dirençli *P.aeruginosa* veya *A.baumannii*'nin neden olduğu nozokomiyal pnömonilerde kolistine klinik yanıt oranları % 25-73.3 arasında değişmektedir (Akalin, 2007).

### **2.1.8 *Acinetobacter* Türlerinde Antibiyotik Direnç Mekanizmaları**

*A.baumannii* izolatlarına bağlı enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı giderek artan direnç tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Demirtürk ve Demirdal, 2004). Aminoglikozidler, üreidopenisilinler, florokinolonlar, üçüncü kuşak sefalosporinler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı *Acinetobacter* türlerini



antibiyotiklere dirençli hale getirmiştir. Üçüncü kuşak sefalosporinlerin yaygın kullanımının, karbapeneme dirençli suşların ortaya çıkmasıyla anlamlı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (Manikal, 2000). Özellikle *A. baumannii* diğer türlere göre daha dirençlidir ve yoğun bakım ünitelerindeki mortalitenin %19-25'inden sorumludur (Tatman, 2003).

Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarının direnç mekanizmaları sıklıkla beta laktamaz üretimi, eflüks pompası ve hücre duvar kanallarındaki (porinler) değişikliklerdir (Ardıç, 2004). *A. baumannii* izolatlarının antibiyotik direnç mekanizmaları tablo 1'de özetlenmiştir.

*A. baumannii* izolatlarında beta laktam direnci daha sıktır. Beta laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç beta laktamaz enzimleriyle antibiyotiğin parçalanması, beta laktam antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi ve PBP'de değişikliklerin oluşması ile gelişebilmektedir (Schreckenberger ve ark., 2007; Livermore, 1995).

*Acinetobacter* izolatlarında beta laktam direncinin en önemli sebebi  $\beta$ -laktamaz enzimleriyle antibiyotiğin parçalanmasıdır. Plazmid, kromozom veya transpozon kontrolünde sentezlenirler (Livermore, 1995).

Gram negatif bakterilerin çoğu, tür özelliği olarak, değişik sınıflamalara göre AmpC veya Bush-Jacoby-Mederios Grup 1 olarak adlandırılan kromozomal beta laktamazlar üretir. *Acinetobacter* türlerinde bulunan kromozomal enzimlerin büyük çoğunluğu Ambler sınıf C içerisinde yer almakta ve sefalosporinaz aktivitesi göstermektedir. Yapılan çalışmalarda *A. baumannii* izolatlarının %98'inde sefalosporinaz aktivitesi saptanmıştır (Thomson, 2005; Livermore, 1995).

ACE-1, ACE-2, ACE-3, ACE-4 enzimler, Ambler sınıf C'de yer alan sefalosporinazlardır. ACE-1 sefuroksime karşı zayıf etkili, klavulonik aside dirençli en geniş spektrumlu enzimdir (Speller, 1998; Livermore, 1995).

Yeni tanımlanan sınıf C enzimler günümüzde *Acinetobacter* kökenli sefalosporinazlar olarak adlandırılırlar (*Acinetobacter*-Derived Cephalosporinases (ADCs)) ve yeni yapılan çalışmalarda yedi adet ADC AmpC geni tanımlanmıştır (Hujer, 2005). AmpC beta laktamazların karbapenemler üzerine etkileri son derece az olmasına karşın, bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir

diğer mekanizma ile birleştiklerinde karbapenem direncine yol açabilmektedir (Thomson, 2005).

İmipeneme dirençli *A. baumannii* izolatlarında kromozomal OXA-24 enzimi gösterilmiştir. Bu enzim, Ambler sınıf D'de yer almakta ve karbapenemleri hidrolize etmektedir (Hujer ve ark. 2005).

Plazmidlerce kodlanan enzimler sınıf A, B ve D beta-laktamazlar içerisinde yer almaktadırlar. Bunlar içerisinde Ambler sınıf A'da yer alan TEM-1 ve TEM-2 beta-laktamazların varlığı *Acinetobacter* türlerindeki beta-laktam direncinden büyük ölçüde sorumlu tutulmaktadır (Jeong, 2005; Vahaboglu, 1997).

Ambler sınıf A'da yer alan PER-1 enzimi ilk kez 1996 yılında Türkiye'de saptanmış ve PER-1 enzimi taşıyan kökenlerle gelişen enfeksiyonlarda prognozun daha kötü olduğu bildirilmiştir. Bu enzim bir genişlemiş spektrumlu beta-laktamazdır (GSBL). Geniş spektrumlu sefalosporin ve gentamisin direncinden yüksek düzeyde, amikasin direncinden düşük düzeyde sorumlu tutulmaktadır, karbapenemlere etkisiz veya orta derecede etki göstermektedir (Vahaboglu, 1997).

Karbapenemler çoğu beta-laktamazlar tarafından hidrolize edilmezler. *Acinetobacter* türlerinde karbapenem ve yeni kuşak sefalosporinleri hidrolize eden metallo-beta-laktamazlar tanımlanmıştır (IMP, VIM). Bu enzimler plazmidlerce kodlanan sınıf B beta-laktamazlardır (Lee ve ark, 2003; Walsh ve ark, 2005).

*A. baumannii*'nin porin kanalları iyi karakterize edilmediği halde, bakteriyel porin proteinlerinin sentezinin azalması veya mutasyonları, beta-laktam antibiyotiklerinin periplazmik alana geçişini engelleyip, antibiyotik direncine yol açabilir (Munoz-Price ve Weinstein, 2008).

Bakteriyel eflüks pompalarının aşırı çalışması, periplazmik alanda beta-laktam antibiyotiklerinin konsantrasyonunu azaltabilir. *Acinetobacter*'de klinik direnç oluşturmak için eflüks pompaları genelde AmpC beta-laktamazlarının veya karbapenemazların aşırı ekspresyonuyla bağlantılı olarak etki eder. Eflüks pompaları, beta-laktam antibiyotiklerini uzaklaştırmanın yanı sıra kinolonları, tetrasiklinleri, kloramfenikölü, dezenfektanları ve tigesiklini etkin biçimde dışarı atar (Peleg ve ark, 2007).

*A. baumannii*'nin lipopolisakkaritindeki modifikasyon kolistin direncindeki olası mekanizmadır (Perez, 2007; Looveren, 2004). Gram negatif bakteriler adaptasyon ve

mutasyon mekanizmaları aracılığıyla kolistine direnç geliştirir. Mutasyon kalıtsal, düşük düzeyli ve antibiyotiğin sürekli varlığına bağlıyken adaptasyon bunun tam tersidir. Kolistin ve polimiksin arasında çapraz direnç vardır (Falagas, 2005).

Tablo 1: *A. baumannii*'nin sahip olduğu antibiyotik direnç mekanizmaları (Çiftçi ve Aşık, 2011)

Antibiyotik/Direnç mekanizması	Grup/Gen	Antibiyotik/Direnç mekanizması	Grup/Gen
<b>Beta-laktamlar için</b>		<b>Aminoglikozidler için</b>	
Beta-laktamaz		Enzimatik yıkım	
Doğal		Asetiltransferaz	AAC-2, -3,-6 SAT-2
Sınıf A/sık görülen	<i>ampC</i> (ADC1-7) VEB-1,-2 PER-1,-2 TEM-92,-116 SHV-5,-12 CTX-M-2-3	Nükleotidiltransferaz Fosfotransferaz	ANT-2,-3 APH(3')-I, -II,-III,-IV APH(3'')-I adeABC adeM
Sınıf A/nadir görülen	SCO-1	Eflüks pompası	
Karbapenemaz		16s rDNA metiltransferaz	armA
Sınıf D oksasilinaz	OXA-51 benzeri OXA-23 OXA-24 OXA-27 OXA-37 OXA-40 OXA-58 benzeri	<b>Kinolonlar için</b>	
Metallo-beta-laktamaz	VIM IMP SIM	DNA giraz/topoizomeraz Eflüks pompası	gyrA/parC adeABC adeM abeS
Sınıf A karbapenemaz	GES-11	<b>Kloramfenikol için</b>	
Dış membran proteinleri	carO HMP-AB 33-36 kDa protein 43 kDa protein	Eflüks pompası	adeABC adeIJK cmlA craA abeS
Eflüks pompası	adeABC PBP2 değişimi	<b>Trimetoprim/sulfametoksazol için</b>	
<b>Tetrasiklinler için</b>		Eflüks pompası	adeABC adeIJK sul-I,-II folA
	tetA, tetB	<b>Makrolitler için</b>	
Eflüks pompası	adeABC	Eflüks pompası	adeM
Ribozomal hedef değişimi	tetM	<b>Glisilsiklin için</b>	
		Eflüks pompası	adeABC
		<b>Polimiksin için</b>	pmrAB
		<b>Rifampisin için</b>	arr-2



## 2.2. BİYOFİLM

### 2.2.1 Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi

Biyofilm günümüze kadar bir çok bilim adamı tarafından çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. İlk olarak 17. yüzyılda Leewenhoek kendi dışından aldığı örnekte plaklar içinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmiştir. Biyofilmler ile ilgili çalışmalar 1970'lerin sonlarından itibaren yapılmaya başlanmıştır. 1976 yılında Marshall, biyofilmin çok ince bir ekstraselüler polimer fibril olduğunu ve bakterinin yüzeye tutunmasında önemli olduğunu bildirmiştir (Marshall, 1976). Costerton ve ark., bakteri tarafından üretilen ve bakterinin cansız ve canlı yüzeylere yapışmasını sağlayan "glikokaliks" olarak da adlandırılan polimerik matriks olarak tanımlamışlardır (Costerton ve ark, 1999). Carpentier ve Cerf ise basit olarak, bakterilerin gömülü olarak bulunduğu ve yüzeye yapışmış olan organik polimer matriks olarak tanımlamıştır (Carpentier ve Cerf, 1993). Biyofilmin günümüzde en yeni tanımı ise mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks şeklindedir (Donlan, 2002).

Biyofilm, mikrobiyal hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskobik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 mm yükseklikte koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi çok zor olan yapıdadır. Matriks içinde kan pıhtısı, kristaller, toprak, metal korozyon artıkları bulunabilir bu nedenle biyofilmin rengi bulunduğu yere göre değişir (Assanta, 2000; Donlan, 2002).

Yapılan mikroskobik gözlemlerde bakterilerin doğadaki sıvısal ekosistemlerde farklı yüzeylere yapışarak çoğalmasının %99.9 oranında biyofilm aracılığı ile olduğu gösterilmiştir. Günümüzde derin yer altı suları ve okyanusların derinlikleri hariç biyofilmin tüm doğal ekosistemde oluşabildiği kabul edilmektedir (Costerton ve ark, 1995).

Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar, buldukları yüzeylerde planktonik hücre



davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlarda biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen direnç ve irreversibl yapışma gibi özellikler bulunmamaktadır. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakterilerin de zamanla matriksten koparak ayrıldıkları, dolaşıma geçtikleri ve planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm direnç özelliklerini taşıdığı bildirilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002).

### **2.2.2 Biyofilmin Yapısı**

Biyofilm, bakterinin yüzeyinde düzensiz bir şekilde dağılmış polisakkarid bir matriktir. Matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil aynı zamanda mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir. Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere, esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan “su kanallarına” sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler (Bothwell ve ark, 2003). Tüm biyofilmlerin büyük bölümü (%73-98) hidrate şekildedir.

Biyofilimde fiziksel ve biyolojik yapı çoklu intrinsik ve ekstrinsik faktörlerin etkileşimi ile düzenlendiği, fiziksel yapının ekzopolisakkaridler (EPS) ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. EPS'nin jel ya da viskoelastik davranış sergileyebileceği, bu fazlara geçişinde protein,  $Ca^{+2}$  iyonları, polisakkaritler ile yapının daha sağlamlaştığı bildirilmiştir (Hussain ve ark, 1993; Leriche ve ark, 2000; Sutherland, 2001). Tabakalı yapının alttaki hücreleri stabilize ettiği, biyofilimde antibakteriyel direnç ve oksijen kullanımını açısından değişkenlik gösteren tabakalar oluştuğu vurgulanmıştır (Leriche ve ark. 2000; Jenkinson ve Lappin-Scott, 2000)



Şekil 1 a): EPS yapısı (Sutherland, 2001)



Şekil 1 b): EPS içinde basiller (Sutherland, 2001).

Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaridler biyofilmin ana ekstrasellüler komponentini oluşturur. Mikrobiyal hücrelerden salgılanan ekzopolisakkaridler hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar gösterir. Polisakkaridler uzun, ince moleküler zincirlerdir ve  $0,5-2,0 \times 10^6$  Da'luk bir moleküler yapıya sahiptirler. Biyofilm preparatlarında polisakkaridler bakteriyel hücre yüzeyine tutunmuş olan ince şeritler halinde ve hücrenin etrafında kompleks bir ağ oluşturmuş şekilde izlenir (Bothwell ve ark, 2003; Sutherland, 2001).

Konakçı ve çevreden kaynaklanan partiküllerin biyofilm mimarisine katıldığı bildirilmiştir. Canlı sistemlerde zaman içerisinde eritrosit ve fibrin katılımı ile besince daha zengin ve daha stabil bir biyofilm oluşumu görülmüştür. Su sistemlerindeki biyofilm ise paslanmaz çelik borulardaki demiri indirgeyip korozyon yaparak borularda yeni tutunma yüzeyleri oluşturmaktadır (Costerton ve ark. 1999).

Biyofilmin gelişmesi, ortam pH'ı, oksijen perfüzyonu, karbon kaynağı, osmolarite, yakın çevredeki besinlerin hücre içine alınıp kullanımı ve atıkların uzaklaştırılması ile yakın ilişkide olup, bunların dışında besin kısıtlanması sonucu sunulan "quorum sensing" moleküllerinin salınımında biyofilm gelişmesinde oldukça etkilidir (Carpentier ve Cerf, 1993; Allison ve ark. 1998).

Son zamanlarda bazı hücrelerden salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak, bakterinin gen sunumunu düzenleyen moleküller (acylated homoserine lactonase vs.) aracılığı ile biyofilm yapımının düzenlenebileceğinin gösterilmesi biyofilmin çevreye adaptasyonunda "quorum sensing" in önemini arttırmıştır (Dong ve Zhang, 2005).

### **2.2.3 Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri**

Bakterilerin biyofilm oluşturan formları ile serbest yaşayan formları arasında ciddi farklılıklar görülmüştür. Bakterinin biyofilm oluşturmaya sebep olan bazı nedenler şu başlıklar altında açıklanabilir.

Savunma; biyofilmin kan akımı, tükrüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Serbest yaşayan hücrelere göre, besin yoksunluğu,



pH değişikliği, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz, ve antibiyotiklere karşı biyofilm içindeki bakteriler daha dirençlidir (Öztürk ve ark, 2008).

Adezyon ve kolonizasyon; Vücudun belli bir bölgesinde bakterilerin sabit kalabilmesi için konakçının ekstraselüler matriks proteinlerine yapışır ve adherans sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliklerine göre biyofilm yapımına başlar (Whiteley ve ark, 2001).

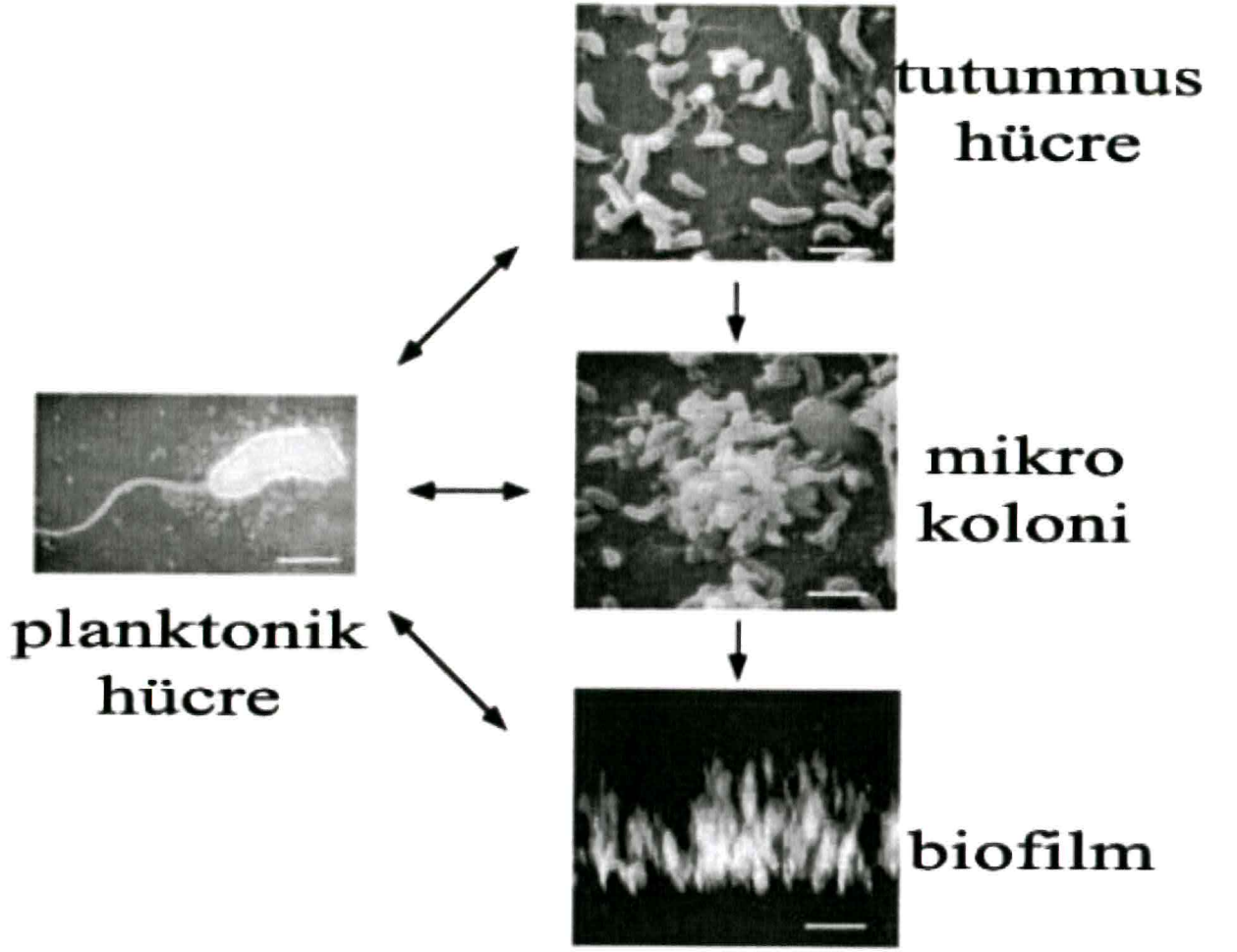
Yaşanabilir çevre geliştirmek; karbon katabolitlerinin, konakta yapışmış bakterinin gen düzenlenmesini uyararak biyofilm oluşumunda önemli rol oynaması, bakterinin konakta uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmayı açıklayabilmektedir (O'Toole ve ark, 2000).

Topluluk oluşturmak; bakterilerin ortama adaptasyonundaki birlikteliği biyofilm oluşturmada sıklıkla gözlenmektedir. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri toplu halde yaşamalarının en önemli göstergesidir (Öztürk ve ark, 2008).

#### **2.2.4 Biyofilm Oluşum Aşamaları**

Yapılan çalışmalar sonucu yapısal olarak planktonik hücreden köken alan biyofilmin oluşumunun beş aşamada gerçekleştiği bildirilmiştir.

1. Tutunma
2. Yapışma
3. Müköz yapı (*slime*) oluşumu
4. Olgun biyofilm
5. Kopma ve ayrılma



Şekil 2: Planktonik hücreden biyofilm gelişme aşamaları (Watnick ve Kolter, 2000)

Katı – sıvı etkileşim yüzeyi ve sıvı besi ortamın bakterilerin tutunması için ideal ortamı hazırladığı bildirilmiştir. Tutunma olgusunu açıkça ortaya koyabilmek için yüzey, yüzeyde hazırlayıcı film oluşumu, sıvı besi ortamının hidrodinamiği, sıvı ortamın özellikleri ve hücre yüzeyinin çeşitli özellikleri etkilidir (Bullitt ve Makowski, 1995).

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir olaydır. Tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için, kendilerinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları gereklidir. Bakteriler bu çevresel uyarıları fenotipik değişiklere çevirebilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak

yönünde farklılaşma işleminin başlaması, “quorum sensing” sistemi denilen başka bir haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar (Çitçi, 2005).

Hücre yüzeyinin biyokimyasal yapısının da tutunmada etkili olduğu ortaya konmuştur (Fletcher ve ark, 1991). Beech ve Gaylarde, lesitinlerin tutunmayı inhibe etmelerine rağmen önleyemediklerini, glukozidaz ve N-asetil glukozaminidazın ise tutunmayı azalttığını bildirmişler, ancak mekanizmasını net olarak ortaya koyamamışlardır (Beech ve Gaylarde, 1989).

Biyofilm oluşumunda ikinci basamak bakterilerin yüzeye kuvvetli bir şekilde tutunma, yapışma işlemidir. Üçüncü evrede ise bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler. Dördüncü evrede mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler (Çitçi, 2005).

Biyofilm gelişiminin beşinci evresi ise kopma veya ayrılma evresidir. Bu evrede tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle veya biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucudur (Çitçi, 2005).

### **2.2.5 Biyofilm Hastalık İlişkisi**

Biyofilm yıllardır endüstriyel bir sorun olarak bilinirken, artık tıptaki önemi sadece dişteki plaklardan ibaret olmayıp özellikle yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere birçok kronik enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Sakarya, 2005).

Oluşan biyofilmin antibiyotik tedavisine aynı genetik materyale sahip planktonik bakterilere oranla 100–1000 kat tolerans veya direnç geliştirmesi, fagositoza karşı oluşan direnç ve tedavi sonrası tekrar oranının yüksek olması biyofilm oluşturan bakterilerin yaşayan organizmadan uzaklaştırılmasının ne kadar güç olduğunun en önemli göstergesidir (Lewis, 2001).



Biyofilm oluşturan bakteriler ile doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit gibi doğal seyirli hastalıklar ve bunun dışında, protez kapak, santral venöz katater, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim enfeksiyonları arasındaki epidemiyolojik bağ artık kanıtlanmıştır (Donlan ve Costerton, 2002). Bu ilişkide önemli bazı mekanizmalar tespit edilmiştir.

#### *1- Hücrelerin ayrılması veya hücre agregatları*

Hücrelerin büyümesi ve aynı zamanda çevreden gelen streslerin artması bazen biyofilm içindeki bakteriyi kopartabilmektedir. Ayrıca biyofilmin düzenleyicisi olarak bilinen açıl homoserin lakton molekülü biyofilmin oluşumunu sağladığı gibi kopmaya neden olarak, dolaşım sisteminde enfeksiyona neden olabilir (Sakarya, 2005).

#### *2- Endotoksin üretimi*

Biyofilm üreten Gram negatif bakteriler endotoksin üretimini arttırarak hastada daha fazla immün yanıtı da neden olmaktadır. Oluşan inflamatuvar yanıtın büyüklüğü enfeksiyonun şiddetini de etkilemektedir (Sakarya, 2005).

#### *3- Konağın immün yanıtına direnç*

Biyofilm oluşturan bakterilere karşı makrofaj fagositik aktivitesinin veya yapılan opsonik antikorların yetersiz olduğu gösterilmiştir (Sakarya, 2005).

#### *4- Bakterilere direnç aktarımı*

Bakteride bulunan direnç genlerinin, plazmidlerin biyofilmlere konjugasyonu ile türler arasında aktarılabildiği gösterilmiştir (Sakarya, 2005).

### **2.2.6 “QUORUM SENSING” (Çoğunluğu Algılama)**

Biyofilm oluşumunun genetik analizi sonucu ekstrasellüler sinyaller ve QS düzenleme sistemlerinin biyofilmin varlığı için önemli olduğu bildirilmiştir (Kjelleberg ve Molin, 2002).

QS, bakteriyel hücrelerin kendi nüfus yoğunluklarını dolaylı yolla izledikleri ve yoğunluk değiştiğinde, çok hücreyi etkileyecek tarzda davranışlarını düzenledikleri, bir hücreden hücreye iletişim olgusudur (Baskın, 2005).

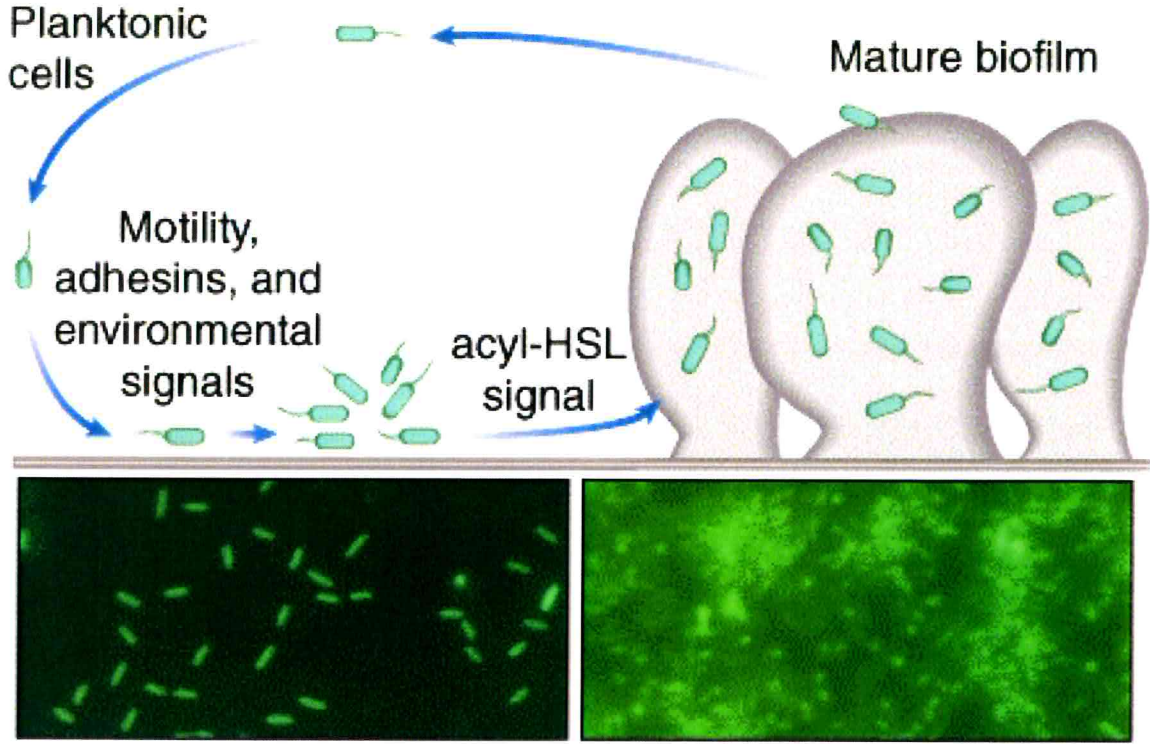
Bu tür bir hücreden – hücreye iletişim dizgesinin (QS), bakteri topluluklarında gen sunumunun uyumu ve işlevsel yönetiminde temel roller oynadığı bilinmektedir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak QS bakteriler küçük işaret moleküllerinin birikimine

yanıt verirler, ortamı tararlar, salınımda bulunurlar. Bu tür etkileşimlerin sonucunda da bir gurup hedef genin düzenlenmesini sağlarlar (Dong ve Zhang, 2005).

QS sistemi içinde en önemli rolü sinyal molekülleri üstlenir. Bu moleküllere aynı zamanda “autoinducer” da denilmektedir. Bakterilerdeki sinyal molekülleri gram negatif bakterilerde aşıl homoserin lakton (AHL), siklik dipeptidler, gram-pozitif bakterilerde küçük peptidler, hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde “autoinducer-2”dir (Redfield, 2002).

Özellikle Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen ve "autoinducer" peptidler (AIP) olarak ifade edilen QS moleküllerinin birçoğu translasyon sonrası değişikliğe uğrayan büyük peptidlerden üretilir. AIP, gram negatif bakterilerin aksine hücre içinden dışarıya difüzyonla değil genellikle hücre zarında bulunan “ATP-binding cassette” (ABC transporter) sistemince aktif olarak salgılanır. Hücre dışı QS molekülleri, ya membrana bağlı sensör kinazlara bağlanır ve hücre içinde bir veya daha fazla sayıda genin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyicilerin fosforilasyonu yoluyla hücrede transkripsiyonel değişikliklere neden olur, ya da bazı bakterilerde olduğu gibi oligopeptid permeazlar aracılığı ile doğrudan hücre içine girerek hücre içi reseptörler ile kendileri etkileşime geçer (Raffa ve ark, 2005; Saraçlı, 2006).

QS sisteminin bakteriye getirdiği pek çok avantaj vardır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir. Aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir. En önemlisi, enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıtı kaçabilir.



Şekil 3: Bakteriler arası iletişim (<http://www.erc.montana.edu>)

### 2.2.7 Biyofilmde Antimikrobiyal Direnç

Bakterilerin biyofilm yapısında buldukları zaman çeşitli antimikrobiyellere, antiseptik ve endüstriyel biositlere, biyofilm bakterilerinin planktonik hallerine göre, 100-1000 kat daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Douglas, 2003). Biyofilmlerin bu dirence multipl mekanizmalar aracılığıyla sahip oldukları düşünülmektedir (Costerton ve ark, 1999).

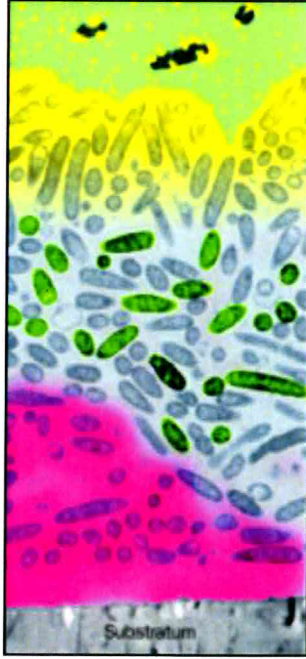
1. Moleküler filtre; antimikrobiyal ajanın biyofilmin tüm tabakaları boyunca penetrasyon gösterememesidir. Biyofilm matriksi içerisindeki polimerik maddelerin antibiyotik difüzyonunu güçleştirdiği bilinmektedir. Bu durum yeterli antibiyotik konsantrasyonuna ulaşamaması anlamına gelmektedir. Siprofloksasinin *P. aeruginosa*'ya penetrasyonu normalde 40 saniye iken aynı genetik yapıya sahip biyofilm oluşturmuş forma penetrasyonunun 21 dk. olması gibi çalışmalar biyofilmin bariyer fonksiyonunu destekleyen en önemli bulgulardandır (Suci ve ark, 1994).

2. Çoğalma oranlarının değiştirilmesi; bakterilerin büyüme oranlarındaki değişiklikler antibiyotik cevaplarını da değiştirmektedir. Biyofilimli bakterilerin büyüme hızları planktonik bakterilerden belirgin bir şekilde düşük olduğu tesbit edilmiştir.



Biyofilm içerisindeki hücrelerden en azından bir kısmı besin yetersizliği yaşamakta ve bu nedenle yavaş büyüme fazına girmek zorunda kalmaktadırlar. Yavaş büyüyen veya büyüme göstermeyen hücreler bir çok antimikrobiyal maddeye karşı duyarlı değildirler ve bir çoğu hayatta kalabilmektedirler (Öztürk ve ark. 2008).

3. Mikroçevrenin antibiyotik aktivitesine etkisi: biyofilm oluşumu için gerekli pH, pCO<sub>2</sub>, divalen katyonik konsantrasyonun hidrasyon seviyesi, primidin konsantrasyonu gibi mikroçevre değişkenleri biyofilm oluşumu üzerine çok etkilidir. Biyofilm oluşumunu kolaylaştıran bu mikroçevre değişkenleri özellikle aminoglikozit, tetrasiklin ve makrolidlerin antibakteriyel etkisini negatif yönde etkileyerek antibiyotik direnci oluşturmaktadır (Dunne ve Bucmire, 1985). Ayrıca biyofilm içerisindeki bakteriler arasında direnç genlerin aktarımı söz konusudur.



#### **Yavaş Penetrasyon**

Sarı İle Gösterilen Antibiyotik Alt Tabakalara İlerleyemez

#### **Dayanıklı Fenotip**

Yeşille Gösterilen Bakteriler Antibiyotiğe Dirençlidir

#### **Değişken Ortam**

Pembe İle Gösterilen Metabolitler Antibiyotiklerin Etkisini Azaltır

Şekil 4: Biyofilmde antibakteriyellere karşı gelişen direnç (Stewart ve Costerton, 2001).

### **2.2.8 A. baumannii ve Biyofilm**

Birçok bakteride sık olarak karşımıza çıkan biyofilm üretimi, patojenlerin antimikrobiyal ajanlardan ve konağın immün yanıtından kaçmasına olanak sağlamasıyla enfeksiyonların patogeneze katkıda bulunmaktadır (Gaddy, 2009). *A. baumannii* için önceleri üzerinde fazla durulmayan bu konu, zaman ilerledikçe ve enfeksiyonların ciddiyeti ve insidansı artmaya başladıkça önem kazanmış, bakterinin biyofilm

oluşturma yeteneği ve mekanizmalarıyla ilgili bilgiler 2003 yılında açıklık kazanmıştır. (Aşık, 2011; Tomaras, 2008; Towner, 2009).

*A. baumannii* polistren ve cam gibi abiyotik yüzeylerde olduğu gibi epitel hücreler ve fungal filamentler gibi biyotik yüzeylerde de biyofilm oluşturur. Pilus ve Bap yüzey adezyon proteininin üretimi, abiyotik yüzeye ilk yapışmayı takiben biyofilm oluşumu ve olgunlaşmasında rol oynar (Gaddy, 2009). Bununla birlikte bazı klinik izolatların adezyonu ve biyofilm fenotipi, geniş spektrumlu antibiyotik direnci varlığı ile ilişkili gibi görünmektedir. Çok ilaca dirençli (ÇİD) izolatların belirgin bir şekilde fazla biyofilm oluşturduğu ve bunun diğer membran proteinlerinin birikimi ile korele olduğu görülmüştür (Gordon ve Wareham, 2010; Lee ve ark, 2008). ÇİD *A. baumannii* izolatlarında oluşan biyofilm miktarı ile epitel hücreye yapışmasının doğru orantılı olduğu, PER-1 beta-laktamaz geni taşıyan *A. baumannii* izolatlarının biyofilm oluşturma ve epitel hücrelere yapışma kapasitesinin bu geni içermeyen izolatlara göre daha fazla olduğu belirtilmektedir (Lee ve ark, 2008). Ayrıca, önceden aminoglikozid kullanımının biyofilm üreten *A. baumannii* ile kolonizasyon ve enfeksiyon riskini artırdığı gösterilmiştir (Rodríguez-Baño ve ark, 2008).

Biyofilm oluşumu ve olgunlaşmasının düzenlenmesi, bu bakterinin yüzeyindeki ve hücresel komponentlerindeki çeşitlilik nedeniyle çok basamaklı süreç şeklinde yürütülmektedir. Biyofilm oluşumunu düzenleyici süreç, bakteriyel hücre yoğunluğunun algılanması, bakteri için gerekli olan serbest katyonların konsantrasyonu ve farklı besinlerin varlığını içermektedir (Gaddy, 2009). Bu ekstraselüler sinyallerin bazıları BfmRS gibi iki komponenti olan düzenleyici sistemler tarafından algılanır. Bu transkripsiyonel düzenleyici sistem, hücreye yapışma ve polistren yüzeyde biyofilm oluşumu için gerekli olan pilusların üretiminden sorumlu şaperon çeviri sisteminin ekspresyonunu aktifleştirmektedir (Gaddy, 2009).

*A. baumannii*'nin abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturmada temel bileşenin, bakterinin hücresel bir komponenti olan ve hücrenin çevresine yayılmış uzun filamanlar olduğu gösterilmiştir. Bakterinin hareketli olmaması, bu filamanların, yüzeylere sıkıca yapışabilen tip-1 pililer olma olasılığını güçlendirmiştir (Tomaras, 2008).

Ayrıca, farklı *A. baumannii* izolatları tarafından eksprese edilen farklı biyofilm fenotiplerinin, kommensal ve patojenik *Escherichia coli* izolatları ile benzerlik gösterdiği ifade edilmiştir (Reisner ve ark, 2006). Bugün için *Acinetobacter* türlerinde

biyofilm üretimi ile ilgili en önemli hücresel komponentlerin pili oluşum sistemleri ve ekstraselüler salgılanan OmpA proteini olduğu düşünülmektedir (Tomaras ve Dorsey, 2003; Gaddy, 2009; Tomaras, 2008).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kasım 2009- Nisan 2010 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Altdisiplin Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 152 *A.baumannii* izolatu çalışmaya dahil edildi. Kontrol suş olarak biyofilm oluşturmeyen *E.coli* ATCC 25922 ve güçlü biyofilm oluşturan *A. baumannii* ATCC 19606 kullanıldı. Antibiyotik çalışmaları için kontrol suş olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanıldı.

#### 3.1 Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örnekler %5 koyun kanlı agar ve Eozin Metilen Blue agar (EMB) besiyerlerine ekildi. 18- 24 saat inkübasyonun ardından besiyerinde saf koloni şeklinde üreyen, Gram negatif, aerob, hareketsiz, diplokok veya kokobasil morfolojisinde, katalaz pozitif, oksidaz negatif, glukoz ve laktoz fermentasyonu yapmayan bakteriler *Acinetobacter* şüphesiyle ileri identifikasyon testlerine alındı. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığı Phoenix-100 (BD Diagnostic Systems, ABD) ve VITEK2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemler kullanılarak belirlendi. Bakteriler çalışma zamanına kadar - 80°C'de %10'luk gliserinli buyyon besiyeri içerisinde saklandı.

#### 3.2 Kolistin Duyarlılığının Standart Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan Kolistin sülfat Sigma'dan (Sigma Aldrich, ABD) satın alınmıştır. Kolistin sülfat distile su ile çözdürülerek 4096'lık stok konsantrasyonu hazırlanıp -80°C'de saklandı.

Testte CLSI'nın önerileri doğrultusunda katyon ayarlı Mueller-Hinton-Buyyon (KAMHB) ve U tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı. İlk olarak 4096'lık hazırladığımız antibiyotik stok solüsyonu MHB ile 1/32 dilüe edilerek konsantrasyon 128'e düşürüldü. Steril U tabanlı MIK plağının tüm kuyucuklarına KAMHB besiyerinden 100 µl dağıtıldı. Daha sonra 2 numaralı sütündeki kuyucuklara 128 µg/ml antibiyotik içeren besiyerinden 100 µl konulup seri dilüsyon yapıldı. 1 numaralı sütündeki kuyucuklara antibiyotik konulmayıp bakteri üreme kontrolü (pozitif kontrol)

olarak kullanıldı. Seri dilüsyonda 11. kuyucuğa kadar gelindi. 12 numaralı sütündeki kuyucuklar negatif kontrol olarak belirlendiği için dilüsyon yapılmadı.

CLSI önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültüründeki kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanıp, 1/100 oranında dilüe edildi. Her yatay sıraya ayrı bir bakteri süspansiyonundan 100'er µl 11. kuyucuğa kadar eklendi. Plakların ilk 2 yatay sırasına kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922'den hazırlanan süspansiyondan 100'er µl konuldu. Mikroplaklar 35 ±2°C'de 24 saat inkübe edildi ve gözle üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonları MİK olarak saptandı. Sonuçlar CLSI M100-S21'e göre değerlendirildi.

Kolistin için;  $\geq 4$  µg/ml dirençli,  $\leq 2$  µg/ml duyarlı olarak kabul edilmiştir. Standart suşun kolistin için CLSI'nın önerdiği MİK değeri 0.5-2 µg/ml'dir ve çalışma süresince bu değerler arasında kalmıştır.

### **3.3 Biyofilm Oluşumunun Araştırılması**

Biyofilm üretimi, Christensen ve ark.'nın tanımladığı tüp metodu ve mikrotitrasyon plağı yöntemiyle araştırıldı (Christensen ve ark., 1985).

#### **3.3.1 Tüp Yöntemi**

%0,25 glukoz içeren triptikaz soy buyyon (TSB) besiyeri hazırlandı. 5 ml TSB içerisine  $1 \times 10^5$  bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonra ve 37°C'de 18-20 saat bekletildi. Tüp içeriği boşaltılıp 1'er ml %25'lik safranin eklendi ve tüp içeriği uzaklaştırıldıktan sonra kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip bekletildi. Tüp yüzeyinde bir film tabakasının oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Hava ile temas eden kısımda halka şeklinde tabaka oluşması negatif sonuç olarak belirlendi.

#### **3.3.2 Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi**

Kanlı agara pasajlanmış *A.baumannii* izolatlarının taze kültürlerinden %0,25 glukoz içeren TSB içeren tüplere alınarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Kültürler 1/20 dilüe edilerek 200 µl'si 96 kuyucuklu düz tabanlı polistren mikrotitrasyon plağı içerisinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvı besiyeri dökülüp kuyucuklar distile su ile 3 kez nazikçe yıkandı ve kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara %1'lik kristal viyole solüsyonundan 100 µl dağıtıldı ve 15



dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar 3 kez distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara 200 µl etanol/aseton (80:20) ilave edilerek 10 dakika bekletilip boya çözdürüldü. Plaklar dalga boyu 540 nm olan filtre ile optik ELISA okuyucuda (ELISA reader, Organon Teknika 530, version 1.21) okutuldu. Aynı izolat 3 farklı kuyucukta çalışılarak okutuldu. Sonuçlar biyofilm oluşturmeyen *E.coli* ATCC 25922 ve biyofilm oluşturan *A.baumannii* ATCC 19606'dan elde edilen absorbans değerleriyle karşılaştırılarak yorumlandı.

### **3.4 Kolistinin Oluşmuş Biyofilm Tabakasına Etkisinin Araştırılması**

*A. baumannii* ATCC 19606'nın oluşturduğu biofilm miktarı esas alınarak, toplam 77 *A. baumannii* suşu bu amaçla test edildi.

#### **3.4.1 Biyofilm tabakası üzerine kolistinin etkisinin optik dansite (OD) ölçülerek belirlenmesi**

Taze kanlı agarda 24 saat 37°C'de inkübasyondan sonra üretilen bakteriler TSB içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında ayarlandı ve 1/100 dilüe edilip, 200'er µl alınarak 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağına aktarıldı ve bir gece önceden kuyucuklarda biyofilm tabakası oluşturuldu. Ertesi gün kuyucuklar 2 kez distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Kuyucukların üzerine kolistinin farklı konstrasyonları (64-0,125 µg/ml) TSB içerisinde sulandırılarak 200 µl kuyucuklara eklendi. 37°C de 18-20 saat bekletilip, plaklar yıkandı, boyandı ve ELISA reader da OD'si okutuldu. Her izolat 3'er kez çalışıldı.

#### **3.4.2 Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonun (BİK) Belirlenmesi**

Tüm izolatlar 1 gece 37°C'de %0,25 glukozlu TSB besiyerinde biyofilm oluşturmaları için bekletildi. Ertesi gün %0,25 glukozlu TSB besiyeri ile 1/20 sulandırılarak 200'er µl 96 kuyucuklu mikropklara dağıtıldı. Plaklardaki her bir kuyucuğun içine steril cam boncuk yerleştirildi ve 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Başka bir mikropklakta taze hazırlanan MHB içinde kolistin 4096'lık konsantrasyondan başlatılarak seri dilüsyonu yapıldı. Biyofilm oluşturulan boncuklar antibiyotik dilüsyonu yapılan mikropklakların her kuyucuğuna yerleştirdikten sonra 1 gece 37°C'de inkübe



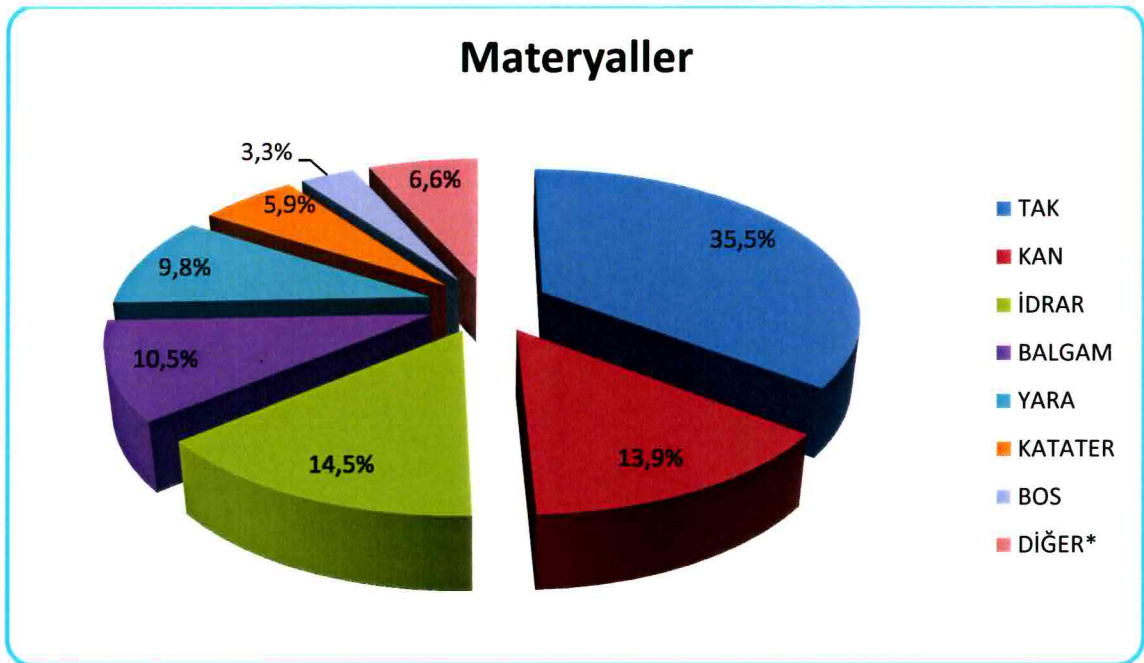
edildi. Ertesi gün kuyucuklardaki boncuklar 200 µl MHB içeren ependorf tüplerine transfer edildi ve hızlı devirde 5 dk vortekslendi. Bu işlemden sonra tüplerden 100 µl alınıp yeni bir plakta içinde 100'er µl MHB bulunan kuyucuklara aktarılıp 37°C'de 1 gece inkübasyondan sonra üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon BİK olarak değerlendirildi. Kontrol olarak ekim yapılmamış TSB içeren kuyucuk kullanıldı (Tre-Hardy ve ark, 2008).

### **3.5 İstatistiksel Yöntem**

İstatistiksel analizde biyofilm üretiminin saptanmasında kullanılan yöntemler arasındaki uyum için Kappa testi, kolistin uygulanmadan önce belirlenen OD ile kıyaslandığında uygulandıktan sonra belirlenen OD'de anlamlı azalma olup olmadığının belirlenmesinde Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı.

#### 4. BULGULAR

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 152 *A. baumannii* izolatu kullanıldı. Bu izolatların 54 tanesi trakeal aspirat örneklerinden (%35,5), 21 tanesi kan (%13,9), 22 tanesi idrar (%14,5), 16 tanesi balgam (%10,5), 15 tanesi yara (%9,8), 9 tanesi kateter (%5,9), 5 tanesi BOS (%3,3) ve diğer 10'u da çeşitli klinik örneklerden (akıntı, ameliyat materyali, diyalizat gibi) izole edildi. Laboratuvarımıza gönderilen materyallerden izole ettiğimiz *A. baumannii* izolatlarının materyal dağılımı şekil 5'de görülmektedir.



**Şekil 5:** Hastalardan gönderilen materyallerin dağılımı

\*: 1 aspirasyon, 1 protected brush, 1 diyalizat, 1 parasentez, 1 plevral mayi, 1 ponksiyon sıvısı, 2 akıntı, 2 ameliyat materyali.

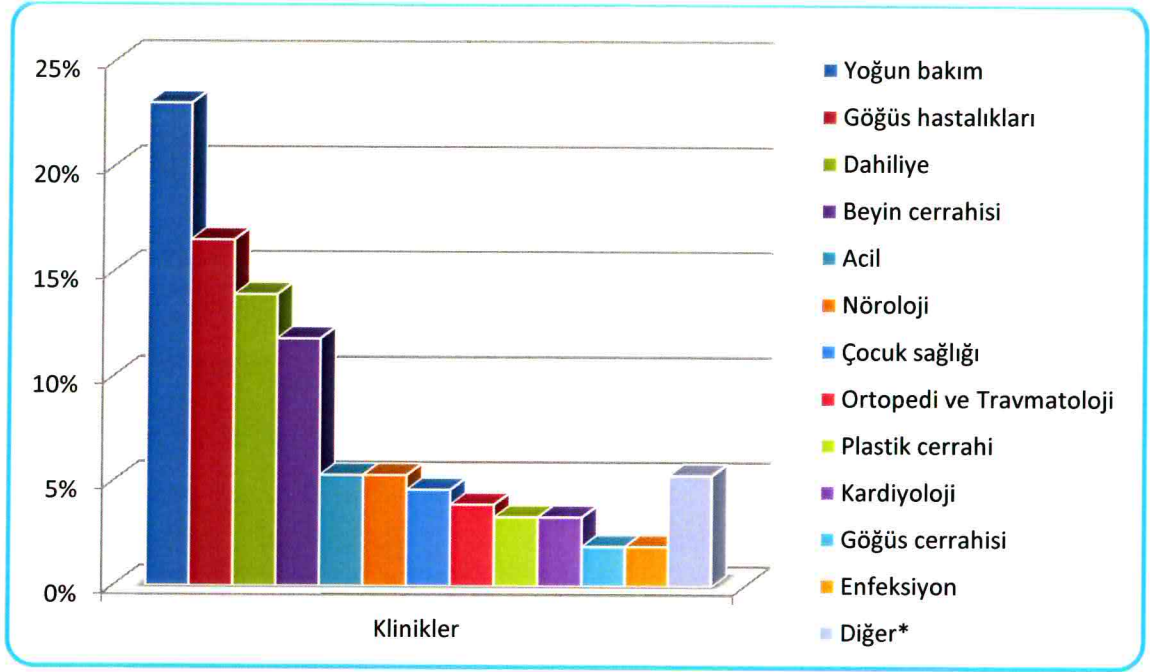
Laboratuvarımıza gelen materyallerin kliniklere göre dağılımı Tablo 2'de sunulmuştur. Laboratuvarımıza materyallerin en büyük bölümü yoğun bakım ünitesinden gönderilmiştir. Bunu göğüs hastalıkları ve dahiliye servisleri izlemiştir. Gönderilen materyallerin servislere göre dağılım grafiği Şekil 6'da görülmektedir.

**Tablo II;** Gönderilen Materyallerin Servislere Göre Dağılımı

<b>KLİNİK</b>	<b>SAYI</b>	<b>%</b>
Yoğun bakım ünitesi	35	23
Göğüs hastalıkları	25	16,5
Dahiliye	21	13,9
Beyin cerrahisi	18	11,8
Acil servis	8	5,3
Nöroloji	8	5,3
Çocuk sağlığı	7	4,6
Ortopedi ve Travmatoloji	6	3,9
Plastik cerrahi	5	3,3
Kardiyoloji	5	3,3
Göğüs cerrahisi	3	1,9
Enfeksiyon	3	1,9
Diğer *	8	5,3

\*: Genel cerrahi 2, Kulak Burun Boğaz 2, Üroloji 2, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon 1, Kalp Damar cerrahisi 1.





**Şekil 6:** Gönderilen materyallerin servislere göre dağılımı

*A. baumannii* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları; çalışmaya alınan *A. baumannii* izolatlarının Phoenix sistemi (BD Diagnostic Systems, ABD) ile yapılan antibiyogram sonuçlarına göre en yüksek direnç piperasilin (%91,5) ve meropenem (%83,8)'e karşı görülmüştür. Çalışmamızda tüm izolatlar kolistine duyarlı bulunmuştur. Kolistinin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerleri; 0,125-1 µg/ml aralığındadır. Otomatize bir sistem olan Phoenix'in verdiği MİK değerleri ise ≤0,5-1 aralığındadır.

**Tablo III:** *A. baumannii* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Duyarlı	Ara duyarlı	Dirençli
amikasin	%32,2	%1,3	%66,5
sefepim	%14,50	%1,9	%83,6
seftazidim	%14,50	%2,6	%82,9
siprofloksasin	%17,70	%0,6	%81,7
kolistin	%100	–	–
gentamisin	%22,30	%0,6	%77,1
levofloksasin	%17,10	%0,6	%82,3
imipenem	%21	–	%79
meropenem	%22,30	%3,9	%83,8
piperasilin	%8,50	–	%91,5
piperasilin-tazobaktam	%15,70	%0,6	%83,7
tetrasiklin	%17,10	%2,6	%80,3
trimetoprim-sulfametoksazol	%24,30	–	%75,7

İzolatlarımızın pandrug-resistant (PDR), extensively drug-resistant (XDR) ve multidrug-resistant (MDR) tanımlamaları referans kaynaktan alınan tabloya göre belirlendi. Buna göre izolatlarımızın hiç biri PDR değildi ve 103 (%67,8) tanesi XDR, 22 (%14,5) tanesi MDR, 27 (%17,7) tanesi duyarlı olarak belirlendi. Biyofilm üreten 77 izolatın ise 52 (%67,5) tanesi XDR, 10 (%13) tanesi MDR ve 15 (%19,5) tanesi duyarlı olarak tespit edildi.

**Tablo IV:** PDR, XDR, MDR ve duyarlı izolatların oranları

	Biyofilm (+)	Biyofilm (-)
PDR	-	-
XDR	52 (%50,48)	51 (%49,51)
MDR	10 (%45,45)	12 (%54,54)
DUYARLI	15 (%55,5)	12 (%44,5)
Toplam	77	75

**Tablo V:** *Acinetobacter spp.*'de antimikrobiyal kategoriler ve ajanların MDR, XDR ve PDR belirlenmesindeki kullanımları (Magiorakos ve ark, 2011).

<b>Antimikrobiyal kategori</b>	<b>Antimikrobiyal ajan</b>	<b>Antimikrobiyal duyarlılık testinde sonuçlar duyarlı ya da dirençli</b>
<b>Aminoglikozidler</b>	Gentamisin Tobramisin Amikasin Netilmisin	
<b>Antipseudomonal karbapenemler</b>	İmipenem Meropenem Doripenem	
<b>Antipseudomonal florokinolonlar</b>	Siprofloksasin Levofloksasin	
<b>Antipseudomonal penisilinler+β-laktamaz inh.</b>	Piperasilin tazobaktam Tikarsilin klavulanik asit	
<b>Extended spektrumlu sefalosporinler</b>	Sefotaksim Sefepim Seftazidim Seftriakson	
<b>Folat yolu inh.</b>	Trimetoprim-sülfometaksazol	
<b>penisilinler+β-laktamaz inh.</b>	Ampisilin sulbaktam	
<b>Polimiksinler</b>	Kolistin Polimiksin B	
<b>Tetrasiklinler</b>	Tetrasiklin Doksisiklin Minosiklin	
<b><i>Acinetobacter spp.</i>'lerde MDR, XDR ve PDR belirlemenin kriterleri</b>		
<b>MDR: 3 veya üzeri daha fazla kategoride 1 veya daha fazla ajana duyarlı olmama durumu</b>		
<b>XDR: 2 veya daha az kategori hariç tüm kategorilerde 1 veya daha fazla ajana duyarlı olmama durumu</b>		
<b>PDR: Yukarıda listelenen tüm antimikrobiyal ajanlara duyarlı olmama durumu</b>		



**Tablo VI;** *A. baumannii* izolatlarında Phoenix Sistemi ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Elde Edilen Kolistin Duyarlılık Sonuçları

<b>İzolat Numarası</b>	<b>Phoenix Sistemi</b>	<b>Sıvı Mikrodilüsyon</b>	<b>İzolat Numarası</b>	<b>Phoenix Sistemi</b>	<b>Sıvı Mikrodilüsyon</b>
<b>1</b>	≤0,5	0,5	<b>15</b>	≤0,5	0,125
<b>2</b>	≤0,5	1	<b>16</b>	≤0,5	0,125
<b>3</b>	≤0,5	1	<b>17</b>	≤0,5	0,25
<b>4</b>	-	0,5	<b>18</b>	≤0,5	0,125
<b>5</b>	-	0,5	<b>19</b>	≤0,5	0,5
<b>6</b>	≤0,5	1	<b>20</b>	1	1
<b>7</b>	≤0,5	1	<b>21</b>	1	1
<b>8</b>	≤0,5	1	<b>22</b>	≤0,5	0,125
<b>9</b>	≤0,5	0,25	<b>23</b>	≤0,5	1
<b>10</b>	≤0,5	0,125	<b>24</b>	≤0,5	1
<b>11</b>	≤0,5	1	<b>25</b>	1	0,5
<b>12</b>	≤0,5	0,5	<b>26</b>	-	0,5
<b>13</b>	≤0,5	1	<b>27</b>	≤0,5	1
<b>14</b>	≤0,5	1	<b>28</b>	1	0,5
<b>29</b>	≤0,5	0,5	<b>43</b>	≤0,5	0,25
<b>30</b>	-	0,25	<b>44</b>	≤0,5	0,125
<b>31</b>	≤0,5	1	<b>45</b>	≤0,5	0,125
<b>32</b>	1	0,5	<b>46</b>	≤0,5	0,125
<b>33</b>	≤0,5	0,25	<b>47</b>	1	0,125
<b>34</b>	≤0,5	0,125	<b>48</b>	≤0,5	0,125
<b>35</b>	≤0,5	0,125	<b>49</b>	≤0,5	0,125
<b>36</b>	≤0,5	0,5	<b>50</b>	≤0,5	0,125
<b>37</b>	-	0,125	<b>51</b>	-	0,5
<b>38</b>	≤0,5	0,25	<b>52</b>	≤0,5	0,125
<b>39</b>	≤0,5	0,125	<b>53</b>	1	0,25
<b>40</b>	1	0,5	<b>54</b>	1	0,125

İzolat Numarası	Phoenix Sistemi	Sıvı Mikrodilüsyon	İzolat Numarası	Phoenix Sistemi	Sıvı Mikrodilüsyon
41	≤0,5	1	55	≤0,5	0,125
42	≤0,5	0,125	56	≤0,5	0,125
57	1	0,25	71	≤0,5	0,25
58	≤0,5	0,25	72	≤0,5	0,125
59	≤0,5	0,125	73	-	0,25
60	≤0,5	0,5	74	1	1
61	≤0,5	0,5	75	-	1
62	-	0,5	76	-	1
63	≤0,5	1	77	1	1
64	≤0,5	0,5	78	-	1
65	≤0,5	0,25	79	1	0,5
66	1	0,5	80	1	0,5
67	1	0,5	81	1	0,125
68	≤0,5	1	82	1	0,25
69	-	1	83	≤0,5	0,5
70	-	1	84	1	0,5
85	≤0,5	≤0,125	99	≤0,5	0,25
86	≤0,5	0,25	100	≤0,5	0,125
87	≤0,5	0,125	101	≤0,5	0,125
88	≤0,5	0,25	102	-	0,125
89	≤0,5	0,25	103	≤0,5	0,125
90	≤0,5	0,25	104	≤0,5	0,5
91	≤0,5	0,25	105	1	0,25
92	≤0,5	0,25	106	≤0,5	0,25
93	≤0,5	0,125	107	≤0,5	0,125
94	≤0,5	0,125	108	≤0,5	0,125
95	≤0,5	0,5	109	1	0,25
96	1	0,125	110	1	0,125
97	≤0,5	0,5	111	-	0,125
98	1	0,25	112	1	0,125

İzolat Numarası	Phoenix Sistemi	Sıvı Mikrodilüsyon	İzolat Numarası	Phoenix Sistemi	Sıvı Mikrodilüsyon
113	-*	0,125	127	-	0,125
114	-*	0,125	128	1	1
115	-*	0,125	129	1	0,25
116	-*	0,5	130	1	0,125
117	1	0,125	131	1	0,125
118	1	1	132	≤0,5	0,125
119	1	-	133	-	0,5
120	1	1	154	≤0,5	0,125
121	-*	1	135	≤0,5	1
122	1	0,5	136	≤0,5	1
123	1	1	137	-	0,5
124	≤0,5	1	138	-	1
125	1	1	139	≤0,5	1
126	≤0,5	0,125	140	≤0,5	1
141	-	0,5	148	1	1
142	≤0,5	0,125	149	≤0,5	1
144	-	0,5	150	≤0,5	0,125
145	≤0,5	0,125	151	≤0,5	0,25
146	-	0,125	152	-	0,25
147	1	0,125	153	≤0,5	0,125

- ; Örnek türü idrar olduğu için Phoenix-100 UNMIC/ID-62 kartı ile çalışılmıştır. Bu panelde kolistin antibiyotiği yoktur.

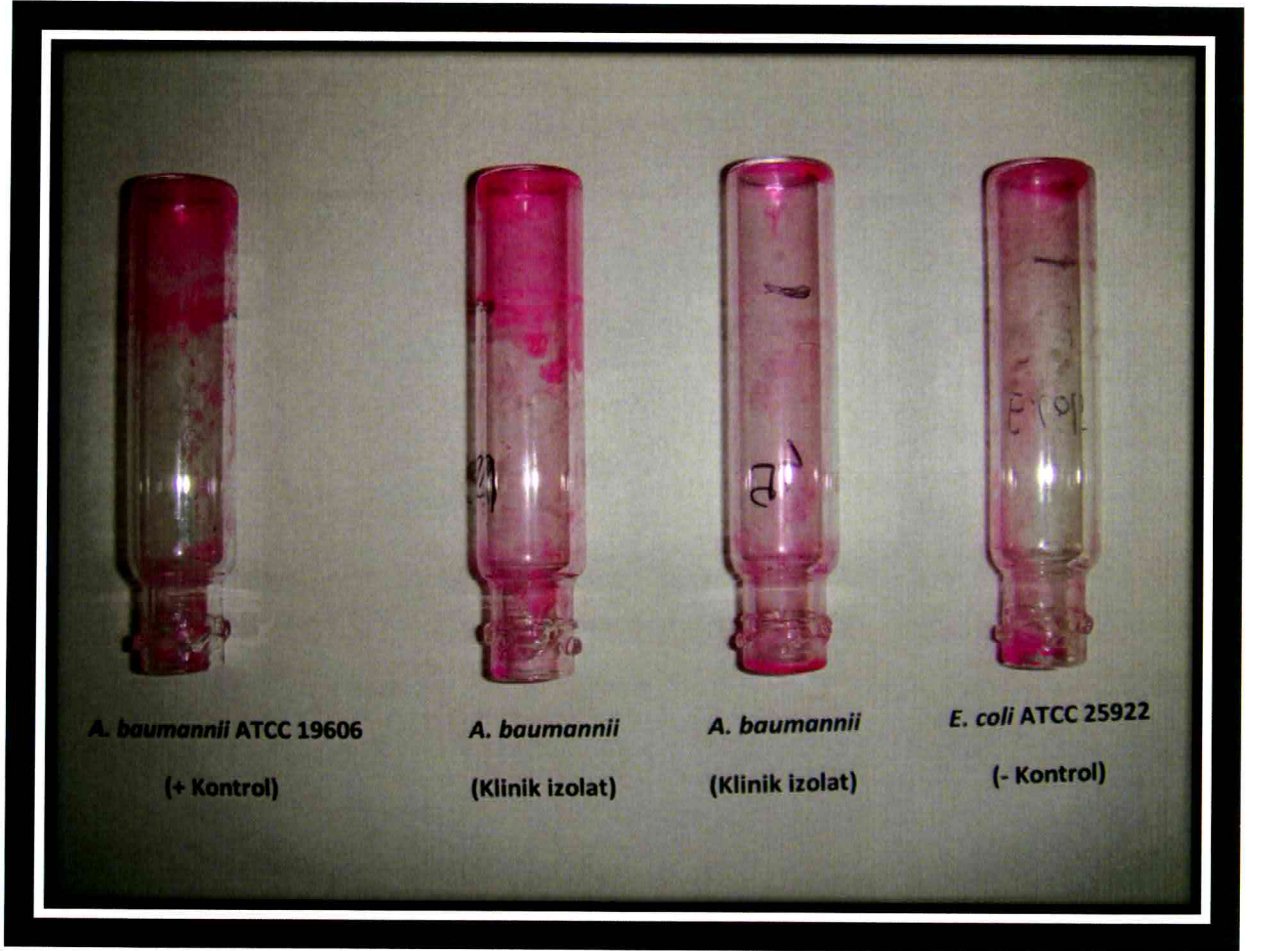
-\* ; VITEK-2 otomatize sistem ile gram negatif panelinde çalışılmıştır. Bu panelde kolistin antibiyotiği yoktur.

### **Biyofilm üretimi**

Çalışılan izolatların biyofilm oluşturma durumları, tüp yöntemi ve mikrotitrasyon plağı yöntemi ile araştırıldı. Bakteriler %0.25 glukoz içeren TSB besiyerine inoküle edilip, tüplerin 37°C'de inkübasyonundan sonra tüp yüzeyinde bir



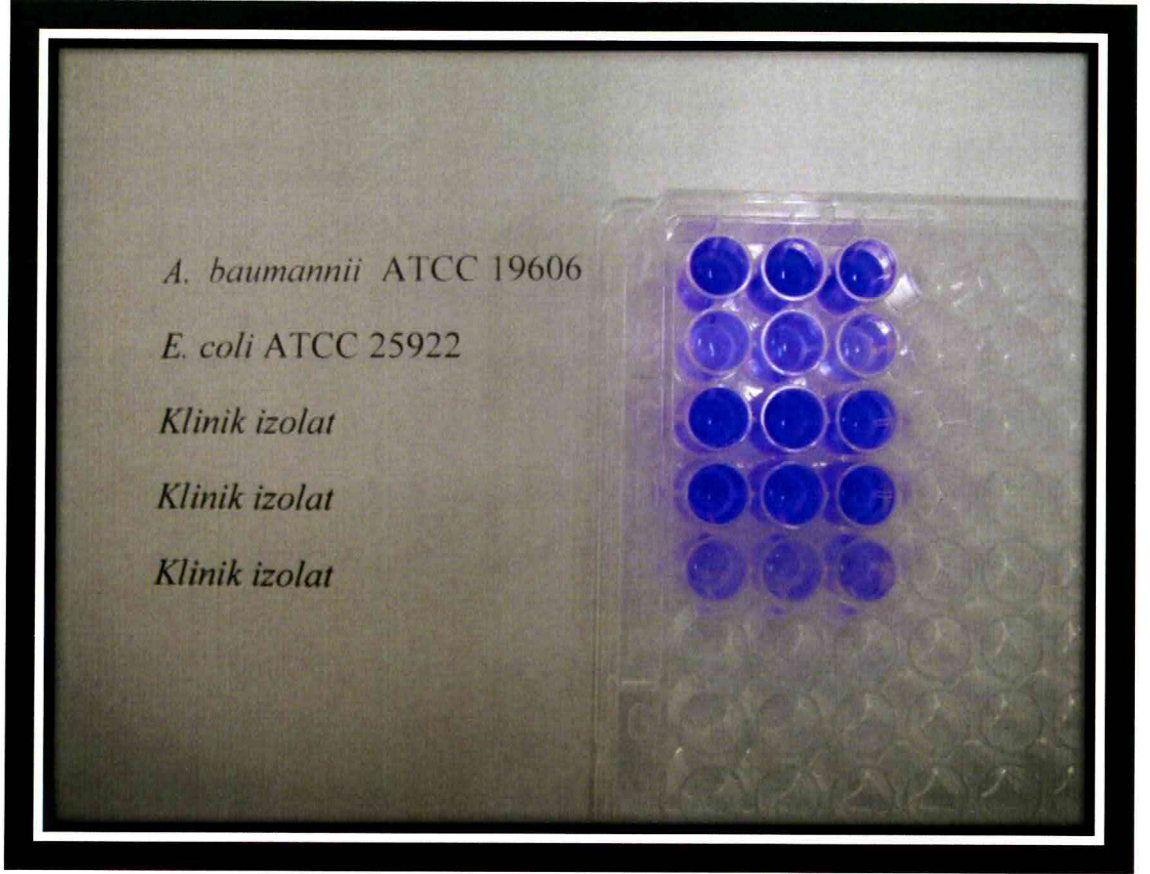
film tabakasının oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Hava ile temas eden kısımda halka şeklinde tabaka oluşması negatif sonuç olarak belirlendi. (Şekil-7)



Şekil 7: Biyofilm üretiminin tüp yöntemi ile değerlendirilmesi.

Yapılan değerlendirmeler sonrasında 152 *A. baumannii* izolatının 83'ünde (%54.6) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 69'unda (%45.4) biyofilm oluşumu pozitif bulundu.

Mikrotitrayon plağı yönteminde; 37°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben kristal viyole ile boyama sonrasında absorbans ölçümü yapılarak tüm izolatların biyofilm üretimi değerlendirildi (şekil 8).



Şekil 8: Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plağı yöntemi ile değerlendirilmesi.

Kontrol suşlar dikkate alınarak; biyofilm oluşturmeyen *E.coli* ATCC 25922'ye eşit ve altında absorbans verenler negatif, güçlü biyofilm oluşturduğu bilinen *A. baumannii* ATCC 19606'ya eşit ve üzerinde absorbans verenler güçlü ve her iki kontrol arasında absorbans verenler orta derece biyofilm üreten izolatlar olarak değerlendirildi.

Kristal viyole kullanılarak yapılan absorbans ölçümlerine göre izolatların 75'inde (%49,3) biyofilm negatif, 68'inde (%44,7) orta derece biyofilm üretimi ve 9'unda (%5,9) güçlü biyofilm üretimi belirlendi.

Tüp yöntemi kullanılarak yapılan değerlendirmede 152 izolatın 83'ünde (%54,6) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, mikrotitrasyon plağı kullanılarak ölçülen absorbanslarına göre izolatların 75'inde (%49,3) biyofilm üretimi negatif olarak tespit edildi. Tüp yönteminde suşların 69'unda (%45,4) biyofilm oluşumu pozitif bulunurken,



kristal viyole kullanılarak yapılan mikrotitrasyon plağı yönteminde izolatların 68'inde (%44,7) orta derece biyofilm üretimi ve 9'unda (%5,9) güçlü biyofilm üretimi belirlendi. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile absorbans ölçümü yapılarak, tüp yönteminde 83 biyofilm negatif izolatın; yalnızca 8'inde biyofilm üretimi pozitif belirlendi. Mikrotitrasyon plağı yönteminde yapılan değerlendirme sonucu güçlü ve orta derece biyofilm üretimi gösteren izolatlar biyofilm pozitif olarak gruplandırıldı.

**Tablo VII:** Biyofilm üretiminin belirlenmesinde tüp yöntemi ile mikrotitrasyon plağı yönteminin karşılaştırılması.

		Mikrotitrasyon plağı yöntemi		
	Biyofilm	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Tüp yöntemi	Pozitif	69	-	69
	Negatif	8	75	83
	TOPLAM	77	75	152

Biyofilm oluşumunun tespitinde kullanılan mikrotitrasyon plağı yöntemi ve tüp yöntemi arasındaki uyum %89.5'dir ve istatistiksel olarak bu uyum anlamlıdır ( $p < 0.001$ ).

Örneklerin izole edildiği yer dikkate alındığında, mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm üretimi tespit edilen *A. baumannii* izolatlarının izole edildiği örneklerin %47'si solunum sistemi örneklerinden oluşmaktadır. İdrar örnekleri %16.8, kan örnekleri %15.6, yara örnekleri %9 ve diğer çeşitli\* örnekler %11.6 olmak üzere biyofilm pozitif tespit edilen örnekleri oluşturmaktadır.

\*: BOS 3, ameliyat materyali 1, akıntı 1, diyalizat 1, mayi 1, vücut sıvısı 1, parasentez 1.

Biyofilm tabakası üzerine kolistinin etkisi mikrotitrasyon plağında 1gece önceden oluşturulmuş biyofilme farklı konsantrasyonlarda antibiyotik eklenerek ELISA reader'da OD'leri ölçülerek tespit edildi. Verilerin değerlendirilmesinde Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı ve istatistiksel olarak antibiyotik öncesi ölçülen OD ile antibiyotik sonrası ölçülen OD arasında anlamlı fark bulunmadı ( $P > 0,05$ ).



**Tablo VIII:** Kolistinin OD üzerine etkisi

izolat no	ant önc OD	ant son OD 64	ant son OD 32	ant son OD 16	ant son OD 8	ant son OD 4	ant son OD2	ant son OD 1	ant son OD 0,5	ant sonOD 0,25	antsonOD 0,125
1	1,24	0,425	0,467	0,515	0,586	0,65	0,91	1,139	1,188	1,051	1,059
2	0,768	0,247	0,592	0,459	0,491	0,592	0,68	0,754	0,836	0,703	0,8
3	0,973	0,253	0,38	0,379	0,373	0,449	0,532	0,523	0,513	0,569	0,588
9	0,969	0,148	0,145	0,461	0,421	0,453	0,549	0,651	0,716	0,749	0,825
10	0,861	0,265	0,555	0,937	0,65	0,69	0,887	0,802	0,844	0,871	0,929
12	0,534	0,506	0,653	0,523	0,513	0,557	0,421	0,515	0,453	0,553	0,512
13	0,787	0,697	0,701	0,761	0,752	0,736	0,803	0,714	0,72	0,559	0,718
14	0,542	0,357	0,554	0,523	0,437	0,647	0,585	0,63	0,571	0,645	0,648
15	0,868	0,684	0,656	0,716	0,699	0,659	0,696	0,618	0,687	0,68	0,667
16	0,728	0,503	0,231	0,421	0,43	0,5	0,563	0,674	0,634	0,544	0,663
17	0,554	0,441	0,768	0,581	0,74	0,513	0,644	0,445	0,57	0,554	0,403
23	1,125	1,181	1,118	1,119	1,12	1,101	1,15	1,117	1,17	1,109	1,072
26	0,575	0,507	0,76	0,654	0,593	0,542	0,592	0,53	0,413	0,651	0,501
28	0,857	0,794	0,771	0,766	1,159	0,809	0,724	0,908	0,773	0,734	0,894
29	1,266	0,78	0,957	0,983	1,03	0,941	1,222	1,185	1,093	1,084	1,04
30	0,853	0,663	0,769	0,766	0,746	0,684	0,67	0,884	0,734	0,823	0,854
31	0,748	0,292	0,703	0,832	1,003	0,926	0,824	0,888	0,899	0,789	0,8
32	0,691	0,231	0,656	0,711	0,66	0,671	0,678	0,689	0,73	0,672	0,678
34	0,602	0,14	0,173	0,623	0,622	0,742	0,611	0,564	0,741	1,027	0,898
36	1,03	0,797	0,837	1,003	0,915	0,835	0,748	0,838	0,882	1,235	0,894
37	0,857	0,256	0,487	0,823	0,869	0,933	0,904	0,77	0,933	1,009	0,924
39	1,089	0,06	0,532	0,567	0,684	0,523	0,534	0,785	0,627	1	0,858
40	1,058	0,112	0,862	0,917	0,905	0,886	0,88	0,728	0,755	0,717	0,838
41	1,083	0,612	0,93	0,824	0,801	0,838	0,87	0,719	0,956	0,796	0,852
42	0,777	0,749	0,83	0,74	0,745	0,823	0,749	0,825	0,727	0,761	0,855
45	1,217	1,213	1,124	1,104	1,076	1,161	1,186	1,089	1,169	1,071	1,188
47	0,826	0,106	0,811	0,795	0,719	0,7	0,8	0,701	0,822	0,729	0,824
51	1,06	0,938	0,923	0,927	0,889	0,933	0,884	0,905	0,884	0,915	0,931
52	1,219	0,16	0,9	0,951	1,003	1,033	0,937	0,953	1,001	1,032	0,942
54	1,078	0,29	0,97	0,944	0,96	0,974	0,945	0,866	0,903	0,82	0,883
55	1,205	0,951	0,954	0,943	0,97	0,966	0,928	0,934	0,809	0,945	0,953
65	0,93	0,962	0,956	0,93	0,953	0,915	0,864	0,918	0,869	0,961	0,919
62	0,999	0,986	1	0,998	1,014	1,057	1,03	1,06	1,02	1,03	1,02
68	0,943	0,925	0,966	0,927	0,956	0,911	0,95	0,987	0,902	0,97	0,927
70	1,232	1,262	1,269	1,215	1,274	1,271	1,217	1,222	1,205	1,201	1,194
72	1,264	1,251	1,241	1,192	1,246	1,26	1,228	1,253	1,225	1,205	1,144

<b>75</b>	1,184	1,18	1,171	1,177	1,25	1,259	1,256	1,235	1,237	1,239	1,184
<b>76</b>	1,202	1,185	1,153	1,192	1,132	1,112	1,166	1,115	1,186	1,175	1,139
<b>77</b>	1,281	1,202	1,21	1,185	1,257	1,267	1,292	1,313	1,266	1,348	1,209
<b>78</b>	0,915	0,13	1,03	0,942	0,925	0,84	0,83	0,861	0,855	0,855	0,94
<b>79</b>	1,171	0,216	1,185	1,2	1,241	1,144	1,176	1,185	1,089	1,197	1,137
<b>80</b>	0,938	0,121	0,866	0,861	0,87	0,907	0,911	0,902	0,838	0,919	0,903
<b>81</b>	0,803	0,291	0,797	0,86	0,74	0,572	0,804	0,886	0,855	0,766	0,749
<b>82</b>	1,027	0,147	0,197	0,953	0,873	0,91	0,949	0,948	0,975	0,908	0,909
<b>85</b>	1,139	0,217	0,146	1,145	1,02	1,002	1,03	1,03	0,949	0,89	1,05
<b>87</b>	1,137	0,159	1,01	0,999	1,05	0,917	1,186	1,007	0,989	0,891	1,009
<b>89</b>	1,049	0,187	1,01	0,941	1,007	0,911	0,953	0,944	1,02	0,88	1,032
<b>92</b>	1,099	0,087	0,09	1	0,979	0,948	1,002	0,937	0,936	0,929	1,077
<b>96</b>	1,471	1,195	1,281	1,389	1,416	1,389	1,566	1,41	1,242	1,399	1,098
<b>97</b>	1,078	0,153	0,889	0,91	1,017	1,098	1,028	1,124	1,074	1,057	1,083
<b>98</b>	1,105	0,507	0,179	1,11	1,431	1,128	1,295	1,154	1,032	1,117	1,145
<b>100</b>	1,184	0,062	0,579	0,728	0,587	0,495	0,492	0,525	0,579	0,826	0,845
<b>104</b>	1,334	0,655	0,537	0,62	0,59	0,738	0,678	0,671	0,497	0,768	0,839
<b>105</b>	0,99	0,105	0,995	1,188	1,088	0,998	1,027	1,2	1,228	1,095	1,06
<b>106</b>	1,637	0,187	1,153	1,217	1,035	0,985	0,975	1,066	1,189	1,116	1,314
<b>108</b>	2,028	1,801	1,717	2,449	1,861	1,935	2,433	1,674	2,428	2,43	1,971
<b>109</b>	1,096	1,179	1,185	1,233	1,004	1,699	1,35	1,103	1,267	1,046	1,258
<b>110</b>	0,895	0,984	0,963	0,878	1,195	1,03	0,934	1,028	0,975	1,02	1,172
<b>112</b>	1,308	1,282	1,301	1,263	1,272	1,303	1,211	1,273	1,199	1,278	1,276
<b>115</b>	0,98	0,988	0,886	0,913	0,897	0,909	0,93	0,956	0,902	0,921	0,917
<b>116</b>	1,054	0,964	1,015	0,948	0,87	0,912	1,051	1,049	0,952	0,993	1,139
<b>120</b>	1,131	1,143	1,085	1,12	1,092	1,098	1,101	1,059	1,062	1,121	1,131
<b>121</b>	1,96	1,384	1,73	1,868	1,897	1,416	1,756	1,438	1,182	1,248	1,395
<b>123</b>	1,268	1,277	1,221	1,288	1,268	1,27	1,264	1,262	1,264	1,282	1,266
<b>126</b>	1,733	1,194	1,401	1,177	1,836	1,27	1,298	1,57	1,228	1,196	1,235
<b>128</b>	1,34	1,343	1,387	1,322	1,328	1,337	1,319	1,368	1,355	1,313	1,342
<b>129</b>	1,23	1,205	1,235	1,237	1,272	1,265	1,247	1,224	1,249	1,271	1,24
<b>130</b>	0,965	0,99	0,984	0,964	0,993	0,96	1,038	0,996	1,067	0,983	0,986
<b>132</b>	2,071	1,043	1,211	1,69	1,592	1,353	1,349	1,239	1,265	1,292	1,796
<b>135</b>	0,937	0,932	0,946	1,015	1,04	1,033	1,06	1,034	1,018	1,034	1,091
<b>138</b>	0,917	1,042	0,964	0,901	0,899	0,911	0,908	0,843	0,829	0,872	0,962
<b>141</b>	1,273	1,197	0,936	1,001	0,993	1,23	1,09	1,131	1,058	1,032	1,094
<b>149</b>	0,905	0,9	0,973	0,934	0,909	0,895	0,887	0,884	1,039	0,929	1,12
<b>151</b>	1,669	1,064	1,016	1,03	1,05	1,03	1,238	0,865	0,917	1,073	1,125
<b>152</b>	1,517	1,343	1,085	1,178	1,15	1,079	1,177	1,135	1	1,234	1,124
<b>153</b>	1,522	0,119	1,073	1,202	1,591	1,146	1,386	1,115	1,359	1,189	1,46
<b>154</b>	1,199	1,266	1,15	1,205	1,164	1,069	1,144	1,006	1,126	1,078	1,05
<b>A.</b>											
<b>STD*</b>	1,417	1,387	1,433	1,38	1,399	1,287	1,39	1,157	1,33	1,26	1,296
(*: <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 suşu)											



Kolistinin biyofilm hücrelerine etkisi 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağında boncukla BİK değerleri belirlenerek saptandı. Elde edilen MİK değerleri ve BİK değerleri tablo 6'da verildi. İzolatların %50'sini inhibe eden en düşük MİK konsantrasyonu MİK<sub>50</sub>, %90'nını inhibe eden en düşük konsantrasyon ise MİK<sub>90</sub> olarak tanımlandı. Ayrıca biyofilm oluşumunun %50'sini inhibe eden en düşük BİK konsantrasyonu BİK<sub>50</sub>, %90'nını inhibe eden en düşük konsantrasyon ise BİK<sub>90</sub> olarak tanımlandı.

**Tablo IX:** İzolatların MİK ve BİK değerleri.

<b>İzolat no</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>MİK</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
<b>BİK</b>	512	64	128	256	128	256	128
<b>İzolat no</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>28</b>
<b>MİK</b>	<b>1</b>	<b>0,125</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
<b>BİK</b>	512	512	512	256	128	512	512
<b>İzolat no</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>36</b>	<b>37</b>
<b>MİK</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>
<b>BİK</b>	256	512	512	512	128	256	512
<b>İzolat no</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>45</b>	<b>47</b>	<b>51</b>
<b>MİK</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>0,125</b>	<b>0,125</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>
<b>BİK</b>	512	512	512	32	32	64	64
<b>İzolat no</b>	<b>52</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>62</b>	<b>65</b>	<b>68</b>	<b>70</b>
<b>MİK</b>	<b>0,125</b>	<b>0,125</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>BİK</b>	256	256	64	512	128	512	256



<b>İzolat no</b>	<b>72</b>	<b>75</b>	<b>76</b>	<b>77</b>	<b>78</b>	<b>79</b>	<b>80</b>
<b>MİK</b>	0,125	1	1	1	1	0,5	0,5
<b>BİK</b>	128	128	256	64	128	64	512
<b>İzolat no</b>	<b>81</b>	<b>82</b>	<b>85</b>	<b>87</b>	<b>89</b>	<b>92</b>	<b>96</b>
<b>MİK</b>	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125
<b>BİK</b>	64	128	32	32	32	128	32
<b>İzolat no</b>	<b>97</b>	<b>98</b>	<b>100</b>	<b>104</b>	<b>105</b>	<b>106</b>	<b>108</b>
<b>MİK</b>	0,5	0,5	0,125	0,5	0,25	0,25	0,125
<b>BİK</b>	4096	64	128	128	128	32	32
<b>İzolat no</b>	<b>109</b>	<b>110</b>	<b>112</b>	<b>115</b>	<b>116</b>	<b>120</b>	<b>121</b>
<b>MİK</b>	0,25	0,125	0,125	0,125	0,5	1	1
<b>BİK</b>	128	512	128	256	64	4096	512
<b>İzolat no</b>	<b>123</b>	<b>126</b>	<b>128</b>	<b>129</b>	<b>130</b>	<b>132</b>	<b>135</b>
<b>MİK</b>	1	0,125	1	0,25	0,125	0,125	1
<b>BİK</b>	512	512	1024	4096	128	256	64
<b>İzolat no</b>	<b>138</b>	<b>141</b>	<b>149</b>	<b>151</b>	<b>152</b>	<b>153</b>	<b>154</b>
<b>MİK</b>	1	0,5	1	0,25	0,25	0,25	0,125
<b>BİK</b>	256	128	1024	512	256	32	32

Klinik izolatların kolistin MİK<sub>50</sub> değeri 0,25, MİK<sub>90</sub> değeri 1 µg/ml ve BİK<sub>50</sub> değeri 128, BİK<sub>90</sub> değeri 512 olarak hesaplandı. Buna göre izolatların kolistin için en düşük BİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 32 katı olarak 32 µg/ml ve BİK<sub>90</sub> değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 512 katı bulundu.

## 5. TARTIŞMA

Doğada, toprakta ve sularda yaygın olarak bulunan ve fırsatçı patojen olarak bilinen *Acinetobacter* türleri hastane ortamına yerleşerek personelden veya hastadan hastaya bulaş ile ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olabilirler. *A. baumannii* hastalardan ve hastane çevresinden en sık izole edilen *Acinetobacter* türü olarak bildirilmektedir. Son 30 yıldır geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması ve invaziv işlemlerin daha sık uygulanması ile bu bakteri hastane ortamında, özellikle YBÜ ve cerrahi kliniklerinde nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak sık izole edilen bakteriler haline gelmiştir (ASM Pres 2007; D'Agata ve ark, 2000; Kwon ve ark, 2007). Bu enfeksiyonlar sıklıkla hastane ekipmanının kontaminasyonu veya hastane çalışanlarının kolonize elleriyle çapraz geçiş ile ilişkili bulunmuştur. Kontamine tıbbi ekipman; ventilatör tüpü, solunum cihazı ve arteriyel basınç ölçme cihazı hastaya geçiş yolu olarak kabul edilmiştir. Ek olarak yataktaki şilteler, yastıklar, televizyon, perdeler, fan gibi değişik çevresel kaynakların *A. baumannii* ile kontamine olup salgın boyunca rezervuar görevi gördüğü bildirilmiştir (Javad ve ark, 1998).

*A. baumannii* bakteriyemisi gelişmesinde risk faktörleri olarak ileri yaş, diyabet, ventilatör ilişkili pnömoni, yanık enfeksiyonları, uzun süreli ventilatör desteği, yakın dönemde cerrahi işlem uygulanması, malignensiler, YBÜ'de uzun süreli yatış ve uygun olmayan antibiyotik kullanımının olduğu çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Chen ve ark, 2005; Koprnová ve ark, 2001).

Çalışmamızda tespit edilen sonuçlara göre 152 *A. baumannii* izolatının en fazla bölümü YBÜ'den izole edildi ve ikinci sırada göğüs hastalıkları kliniği yer aldı. izolatlarımızın izole edildiği örnekler arasında ilk sırayı trakeal aspirat alırken kan kültürleri ikinci sırada yer almaktadır. Çetin ve ark.'nın yaptıkları çalışmadaki 129 *A. baumannii* suşunun sıklıkla yoğun bakımlardan gönderilmiş olan kan kültürlerinden ve trakeal aspirat örneklerinden izole edildiği görülmüştür. Beyin cerrahisi suşların ikinci sıklıkta izole edildiği servis iken, *A. baumannii*'nin ikinci sıklıkta izole edildiği klinik örnekler yara yeri örnekleri olmuştur (Çetin ve ark. 2006). Özdemir ve ark. 215 *A. baumannii* suşunu en sık olarak reaminasyon yoğun bakımdan ve ikinci sıklıkta ise göğüs hastalıkları yoğun bakım ünitesinden izole etmişlerdir. Bu suşların izole edildiği



örnekler içinde en fazla olan solunum yolu örnekleriyken, ikinci sırayı ise kan kültürü örnekleri almıştır (Özdemir ve ark. 2009). Çalışma grubumuz bu yönüyle değerlendirildiğinde, diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Literatürü incelediğimizde ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda bu çalışmada olduğu gibi etkenlerin büyük çoğunluğu solunum sistemi örneklerinden izole edilmiştir. (Özlu, 2007; Akın, 2009). *Acinetobacter* türleri sıklıkla YBÜ'deki mekanik ventilatörlü hastalarda solunum sistemi enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Bu çalışmada *A. baumannii*'nin yüksek oranda trakeal aspirattan izole edilmesinin ventilatör ekipmanlarındaki kolonizasyona bağlı olabileceği düşünülebilir.

1970'li yıllarda nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonları gentamisin, minosiklin, nalidiksik asit, ampisilin ve karbenisilin ile tek başına veya kombine kullanılarak kolayca tedavi edilebilmekte iken, 1971-1974 yıllarında gittikçe artan direnç görülmeye başlamıştır. Bugün *Acinetobacter* izolatları sıklıkla kullanılan aminopenisilinler, üreidopenisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefamisinler, aminoglikozidler gibi antibiyotiklerin büyük kısmına yüksek oranda direnç göstermektedir. Sefepim, sefaperazon-sulbaktam gibi geniş spektrumlu sefalosporinler, imipenem, tobramisin, amikasin ve florokinolonlara karşı duyarlılık halen değişik oranlarda devam etmekle birlikte, son on yılda bu antibiyotiklerin *Acinetobacter* türleri için elde edilen MİK değerlerinde artış saptanmaktadır (Bergogne-Berezin ve Towner, 1996). Bir çok çalışmada karbapenemler de dahil bir çok antibiyotiğe direnç gösteren *Acinetobacter* izolatları ile oluşan salgınlar bildirilmiştir (Manikal ve Landman, 2000).

Yaptığımız çalışmada *A.baumannii* izolatlarında kolistine %100, imipeneme %21, meropeneme %22.3, piperasilin tazobaktama %15.7, piperasiline %8.5, tetrasikline %17.1, trimetoprim sülfometaksazole %24.3, levofloksasine %17.1, siprofloksasine % 17.7, gentamisine %22.3, seftazidime %14.5, sefepime %14.5 ve amikasine %32.2 oranında duyarlılık saptanmıştır. İzolatlarımızın hiç biri PDR değildi ve 103 (%67,8) tanesi XDR, 22 (%14,5) tanesi MDR, 27 (%17,7) tanesi duyarlı olarak belirlendi. Biyofilm üreten 77 izolatın ise 52 (%67,5) tanesi XDR, 10 (%13) tanesi MDR ve 15 (%19,5) tanesi duyarlı olarak tespit edildi. Ülkemizde yapılan bir çalışmada 215 *A. baumannii* izolatının imipenem duyarlılığı %30, amikasin duyarlılığı %24, gentamisin duyarlılığı %18, siprofloksasin duyarlılığı %14, seftazidim duyarlılığı %11, piperasilin tazobaktam duyarlılığı %10, sefepim duyarlılığı %7'dir (Özdemir ve ark.



2009). Yapılan diğler bir çalışmada 200 *A. baumannii* izolatının 95'i (%47,5) oğul dirençli *A. baumannii* olarak tanımlanmış ve en yüksek direnç sefotaksim (%90) ve sefepime (%89) karşı saptamışlardır (Akın, 2010). Verilerimiz diğler çalışmalardaki direnç oranlarına uyumluydu ve bu sonuçlar bize hastanelerimizden izole edilen *A. baumannii* izolatlarındaki direnç problemini ortaya koymaktadır.

*A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde sık kullanılan karbapenem ve sulbaktamda görülen ve artış gösteren direnç oranları hekimleri, yeni tedavi seçeneklerinin arayışına sevk etmektedir. Bu suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin kullanımı tekrar gündeme gelmiştir (Vahapoğlu, 2008). Son yıllarda sadece kolistine duyarlı bulunan etkenler ile enfeksiyonlar ortaya çıkmakta ve kolistin kullanımı ile başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Aygün, 2007). *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* ile oluşan pnömoni, bakteriyemi, ve üriner sistem enfeksiyonu olan hastaların tedavisinde intravenöz polimiksin verilmesine ilişkin yeni çalışmalar, bu antibiyotiğin kabul edilebilir etkileri olduğu ve daha önce rapor edilenlere göre daha az toksik etki görüldüğü kanısına yol açmıştır (Falagas, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre; Hawley ve ark. 95 adet *A.baumannii* izolatının buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile kolistin, polimiksin B ve tigesiklin duyarlılıklarını araştırmışlar, kolistin ve polimiksin için %99 oranında duyarlılık bulmuşlardır (Hawley, 2007). 2008 yılında yayınlanan bir çalışmada buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle *A.baumannii*'nin kolistine %99 ve tigesikline %93 oranında duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Mezzatesta ve ark. 2008). Lolans ve ark. buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle tüm *A.baumannii* izolatlarını kolistine duyarlı bulmuşlardır (Lolans ve ark. 2006). Song ve ark. ise kolistin etkinliğini 43 *A.baumannii* izolatı üzerinde buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle değerlendirmişler, suşların tümünü kolistine duyarlı olarak bildirmişlerdir (Song ve ark. 2007). Ülkemizde kolistin ile ilgili yapılan çalışmalarda, Akın ve ark. 95 çoğul dirençli *A.baumannii* izolatının disk difüzyon, E-test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemleri ile yapılan kolistin duyarlılık testlerinde, her üç yöntem ile de %100 oranında duyarlılık saptamışlardır (Akın ve ark. 2010). Azap ve ark.'nın Ankara'da yaptıkları bir çalışmada kolistin duyarlılığını 48 suşta agar dilüsyon yöntemi ile %95,8 olarak bildirmişlerdir (Azap ve ark. 2005). zdemir ve ark.'nın 2008 yılında Konya'da yaptıkları bir çalışmada 215 *A.baumannii* izolatını %100 oranında kolistine duyarlı bulmuşlardır (zdemir ve ark. 2008). Bizim

çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile *A. baumannii* planktonik hücrelerinin kolistine %100 oranında duyarlı bulunması, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin sırasıyla 0,25 ve 1 µg/ml bulunması sonuçlarımızın diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermektedir.

*A. baumannii*'de karşımıza çıkan biyofilm üretimi, patojenlerin antimikrobiyal ajanlardan ve konağın immün yanıtından kaçmasına olanak sağlamasıyla enfeksiyonların patogeneze katkıda bulunmaktadır (Gaddy, 2009). *A. baumannii* için önceleri üzerinde fazla durulmayan bu konu, zaman ilerledikçe ve enfeksiyonların ciddiyeti ve insidansı artmaya başladıkça önem kazanmıştır (Aşık, 2011; Tomaras ve ark. 2008; Towner, 2009).

Biyofilm oluşumu en az üç basamakta gerçekleşmektedir. Başlangıç aşamasında mikroorganizmanın normal doku ve yabancı materyal yüzeyine adezyonu, ikinci aşamada yüzeylerde hücre proliferasyonu ve ekzopolisakkarit madde sentezi, üçüncü ve son aşamada içerisinde beslenme ve atıkların uzaklaştırılmasını da sağlayan kanalların bulunduğu üç boyutlu bir yapı oluşmaktadır. Bu yapı hakkında çok fazla bilgi olmamasına rağmen, konfokal mikroskopi ile üç boyutlu yapısı görüntülenebilmektedir (Rohde ve ark. 2006).

Yabancı materyallere yapışmada rol oynayan mikrobiyal hücrelerden salgılanan ekzopolisakkaridler hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar göstermektedir. Bakterinin yüzey polisakkarid yapısı slime olarak da adlandırılan biyofilmin (glikokaliks) ana yapısını oluşturmaktadır (Donlan, 2002). Polisakkaridler uzun, ince moleküler zincirlerdir ve 0,5 - 2,0 x 10<sup>6</sup> Da'luk moleküler bir yapıya sahiptirler. Biyofilm preparatlarında polisakkaridler bakteriyel hücre yüzeyine tutunmuş olan ince şeritler halinde ve hücrenin etrafında kompleks bir ağ oluşturmuş şekilde izlenmektedir (Leriche ve ark. 2000).

Birçok türde, biyofilm anyonik yapıda olup esansiyel mineraller ve besinlerin etraftan yakalanarak yoğunlaştırılmasını sağlayan bir sistem oluşturmaktadır. Esasta, biyofilm 3 boyutlu çekim gücü oluşturup, bulunduğu bakteriyi çevreleyerek bakterinin aderansını ve korunmasını sağlamaktadır. Primer adezyon olarak adlandırılan, bir çok fizikokimyasal değişkenin rol oynadığı bu bağlanma geri dönüşümlü ve gevşek bir bağlanmadır. Bakteri ve uygun inert yüzeyler arasında oluşmaktadır. Adezyonun oluşması için öncelikle bakteri, inert yüzeye yeteri kadar yaklaşabilmelidir (<1nm).



Bundan sonra adezyonun oluşumu her iki yüzeyin çekim ve itme gücüne bağlı olarak gelişmektedir. Burada elektrostatik, hidrofobik ilişki, van der Waals gücü, ısı ve hidrodinamik güç önemlidir. Bakterilerin hemen tümü ve inert yüzeyler negatif şarja sahip olup birbirleri için aslında itme gücü oluşturmaktadır. Primer aderanstaki en önemli faktörün bakteri ve yüzeyler arası hidrofobik ilişki olduğu bilinmektedir. Sekonder adezyon bakteri yüzeyindeki pili, fimbria veya fibriller gibi ligandların ökaryot hücrelerdeki spesifik ligandlara bağlanması ile oluşan özgül ve geri dönüşümsüz bağlanmadır. Biyofilmin maturasyonu, bakterinin yüzeye geri dönüşümsüz olarak yapışmasından sonra başlamaktadır. Biyofilm geliştikçe bakterinin aderans ve motilite faktörlerinin salınımında da baskılanma olmaktadır (Donlan, 2002; Carpentier ve Cerf, 1993)

Biyofilm ile ilişkili organizmaların insanda hangi mekanizmalarla hastalığa yol açtığı halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Öne sürülen mekanizmalar arasında medikal cihazlar (implantlar) üzerindeki biyofilmden kopan hücre veya hücre kümelerinin kanda veya üriner sistemde enfeksiyona neden olmaları, endotoksin üretimi, konak bağışıklık sistemine karşı yapısal direnç göstererek varlığını sürdürme, biyofilm içerisinde direnç plazmidi değişimi yapmak aracılığıyla, antimikrobiyal madde direnci kazanarak varlığını sürdürme bulunmaktadır. Planktonik bakteriyel hücreler biyofilmlerden salınmaktadır ve biyofilmden kopma işleminin doğal olarak programlanmış bir olay olduğu görüşünü destekleyen kanıtlar vardır. Bu nedenle, biyofilmler akut enfeksiyon için bir 'nidus' görevi görerek, salınan planktonik hücrelerin konak savunma mekanizmalarının başarısız kaldığı durumlarda akut enfeksiyon gelişimine neden olabilmektedirler (Donlan ve Costerton, 2002; Costerton, 1999).

Biyofilm gelişim sürecinin moleküler düzenlenmesi ve antibiyotik direncinin genetik temelleri farklı araştırmacılar tarafından birçok kez araştırılırken, çeşitli örneklerden elde edilen suşların, biyofilm üretme oranları hakkında literatürde kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Srinivasa Rao ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada çok ilaca dirençli *A. baumannii* klinik izolatlarında imipenem direnci ile biyofilm üretimi arasındaki korelasyona bakılmış ve 55 *A. baumannii* izolatında tüp yöntemi ve mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm üretimi tespit edilmiş. 34 (%62) izolatta biyofilm üretimi pozitif bulmuşlardır. Ek olarak mikrotitrasyon plak yöntemi ile 14 zayıf biyofilm oluşumu tespit edilmiş ve mikrotitrasyon plak yönteminin daha sensitif



olduğu vurgulanmıştır. Aynı çalışmada biyofilm pozitif izolatların %44'ünü yara enfeksiyonlarından ve %30'unu pnömonili hastalardan izole etmişlerdir (Srinivasa ve ark. 2009). Rodriguez-Bano ve ark. mikrotitrasyon plak yöntemi kullanarak 92 *A. baumannii* izolatının 56 (%63) tanesinde biyofilm oluştuğunu tespit etmişlerdir (Rodriguez-Bano ve ark. 2007). Sechi ve ark. 20 izolatın 16'sında biyofilm saptamışlar (Sechi ve ark. 2004). Rajamohan ve ark. tüp ve mikrotitrasyon plak yönteminde kristal viyole kullanılarak 83 *A. baumannii* izolatının 35'inde (%42) biyofilm üretimi tespit etmişlerdir ve bu çalışmada kan ve yara örneklerinin %65'inde, idrar örneklerinin %63'ünde, bronşiyal örneklerin %32'sinde biyofilm pozitif saptamışlardır (Rajamohan ve ark. 2009). Ülkemizde de Cevahir ve ark. 86 *A. baumannii* izolatında gelatinaz aktivasyonu, mannoz rezistan hemaglutinasyon ve biyofilm oluşumu değerlendirmişler ve 64'ünde (%74) biyofilm pozitif saptamışlardır. Örneklerin alındığı yere göre değerlendirdiklerinde biyofilm pozitif örneklerin %61'i trakeal örneklerden, %22'si yara ve kan örneklerinden oluşmaktadır (Cevahir ve ark. 2008). Can ve ark.'nın kan kültürlerinden izole ettikleri 17 *A. baumannii* izolatında polistren yüzeylerde biyofilm oluşumunu araştırmışlar ve 9'unda (%52,9) biyofilm oluşumunu tespit etmişlerdir (Can ve ark. 2006). Diğer bir çalışmada da Can ve ark. 2009 yılında mikrotitrasyon plağı yöntemi ile 59 *A. baumannii* izolatının 31'inde (%52,5) biyofilm üretimini tespit etmişlerdir (Can ve ark. 2009).

Yaptığımız çalışmada çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 152 *A. baumannii* izolatı kullanıldı. Bu suşların 54 tanesi trakeal aspirat örneklerinden (%35,5), 21 tanesi kan (%13,9), 22 tanesi idrar (%14,5), 16 tanesi balgam (%10,5), 15 tanesi yara (%9,8), 9 tanesi kateter (%5,9), 5 tanesi BOS (%3,3) ve diğer 10'u da çeşitli klinik örneklerden (akıntı, ameliyat materyali, diyalizat gibi) izole edildi. 152 *A. baumannii* izolatının tüp yöntemi ile 69'unda (%45,4) biyofilm oluşumu pozitif bulunurken ve mikrotitrasyon plağı yöntemi ile 77'sinde (%50,6) biyofilm üretimi pozitif bulundu. Çalışmamızda biyofilm oluşumu ile örneklerin alındığı bölgeler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm üretimi tespit edilen *A. baumannii* suşlarının izole edildiği örneklerin %47'si solunum sistemi örneklerinden oluşmaktadır. İdrar örnekleri %16,8, kan örnekleri %15,6, yara örnekleri %9 ve diğer çeşitli örnekler %11,6 olmak üzere biyofilm pozitif tespit edilen örnekleri oluşturmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

Gelişen teknolojiyle beraber, deneysel biofilm çalışmalarında kullanılan yöntemlerin sayısı da artmaktadır. Günümüzde *invivo*, *invitro* biofilm çalışmalarında, ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ya da floresan mikroskop kullanarak direkt sayım, canlı hücre sayım yöntemleri, metabolik aktif boya maddeleri, radyokimyasallar sıklıkla kullanılmaktadır (Yıldırım, 2006). Bu çalışmada 152 *A. baumannii* izolatının biyofilm üretim kabiliyetleri EPS'nin safranin ve kristal viole kullanarak boyanması esasına göre karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Literatürde, safranin (Fidan ve ark. 2005) ve kristal violenin (Toledo-Arana ve ark. 2001), biofilm tespiti için kullanıldığı birçok çalışma olmakla beraber, bu iki boyar maddenin birbirlerine üstünlüklerinden bahsedilmemektedir. Genel kanı, biyofilm tespiti için tüp yöntemi tercih edilecekse safranin, mikroplate yöntemi tercih edilecekse kristal viole kullanma yönündedir (Yassien ve ark 1995; Yıldırım, 2006; Fidan ve ark. 2005; Toledo-Arana ve ark. 2001). Bu çalışmada safranin tüp yönteminde, kristal viyole mikrotitrasyon plak yönteminde kullanılmıştır.

Mathur ve ark. doku kültürü mikrotitrasyon plağı, tüp yöntemi ve Kongo kırmızılı agar besiyerinde 152 klinik *S. aureus* izolatını biyofilm oluşumu yönünden karşılaştırmışlardır. Mikrotitrasyon plağı yönteminde izolatların 22'sini (%14.4) güçlü, 60'ını (%39.4) orta ve 70'ini de (%46.0) biyofilm zayıf veya negatif olarak bulmuşlardır. Tüp yönteminde izolatların 18'ini (%11.8) güçlü, 45'ini (%29.6) orta ve 89'unu (%58.6) zayıf veya biyofilm oluşturmayan olarak göstermişlerdir. Kongo kırmızılı agar besiyerinde 152 klinik *S.aureus* izolatının yalnızca 8'ini (%5.2) biyofilm pozitif olarak göstermişler. Bunların 6'sı orta, 2'si güçlü biyofilm oluşturan izolatlar olarak bildirilmiştir. Mikrotitrasyon plağı ve Kongo kırmızılı agar besiyeri arasında zayıf bir uyum olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada mikrotitrasyon plağı yönteminde yalnız TSB kullanıldığında 152 klinik *S.aureus* izolatının yalnız 7'si biyofilm oluştururken, %1 glukoz ilave edildiğinde 18 saatlik inkubasyonla 80 ve 24 saatlik inkübasyonla 82 izolatta biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Benzer sonuçlar şeker ilaveli BHI buyyonu kullanıldığında da elde edilmiştir (Mathur ve ark. 2006).

Çoğunlukla *S.epidermidis* izolatlarında görüldüğü gibi *in vitro* biyofilm oluşumu ortam şartlarına oldukça duyarlıdır. Örneğin besiyerine glukoz veya glukozamin eklenmesi kuvvetli biyofilm oluşturan izolatlarda bile gerekebilmektedir (Cramton ve ark. 2001).



Yaptığımız çalışmada biyofilm üretiminin tespitinde tüp yöntemi ve mikrotitrasyon plak yöntemi karşılaştırılmıştır. Tüp yöntemi kullanılarak yapılan değerlendirmede 152 izolatın 83'ünde (%54,6) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 69'unda (%45,4) biyofilm oluşumu pozitif bulunmuştur. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile kristal viyole kullanılarak yapılan absorbans ölçümlerine dayanan kantitatif değerlendirme sonucunda suşların 75'inde (%49,3) biyofilm üretimi negatif, 68'inde (%44,7) orta derece biyofilm üretimi ve 9'unda (%5,9) güçlü biyofilm üretimi belirlenmiştir. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile absorbans ölçümü yapılarak, tüp yönteminde 83 biyofilm negatif izolatın; yalnızca 8'inde biyofilm üretimi pozitif belirlendi. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ve tüp yöntemi biyofilm üretimini tespit etme yönünden karşılaştırıldığında uyumlu bulundu ( $p<0.001$ ). Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, mikrotitrasyon plağı yöntemi tüp yöntemine göre daha duyarlı saptanmıştır. Ayrıca bireysel, görsel değerlendirmeye bağlı farklı sonuçlara yol açmaması ve kantitatif değerlendirmeye olanak sağlamasında mikrotitrasyon plağı yönteminin diğer bir üstünlüğü olarak kabul edilmiştir. Buna karşın biyofilm üretim oranının kullanılan besiyeri içerisindeki glukoz miktarı ve diğer çevresel koşullarla değişmesi dezavantajı olarak değerlendirilmiştir (Baselga, 1993; Cramton ve ark. 2001).

Birçok bakteri türünde yaygın olan biyofilm üretimi, patojenlerin antimikrobiyal ajanlardan ve konağın immun yanıtından kaçmasına olanak sağlamak suretiyle enfeksiyonların patogeneze katkıda bulunmaktadır (Gaddy, 2009). Bir çok akut enfeksiyon antibiyotiklerle etkin bir şekilde tedavi edilebilmektedir. Ancak iki istisna durum vardır. Bunlardan ilki; antibiyotiğe duyarlılığı olmayan bakteri varlığıdır. İkinci ayrıcalıklı durum ise biyofilm içerisinde yaşayan bakteri varlığıdır. Biyofilm bakterilerinin, planktonik yaşayan aynı türdeki bakteriler oranla antibiyotik tedavisine 100-1000 kat daha dirençli olabildiği bildirilmiştir. İmplant edilmiş yabancı cisimlere veya hasarlı dokulara yapışan bakteriler persistan enfeksiyonlara neden olabilir. Bunun en önemli nedeni, bu bakterilerin polisakkarit ve proteinlerden oluşan ve biyofilm adı verilen bir matriks içerisinde yerleşmeleridir (Costerton ve ark. 1999; Davey ve O'toole, 2000; Georgopapadaku, 2006).

Biyofilmler yavaş büyüme özelliğine sahiptirler ve enfeksiyonları sıklıkla belirgin klinik semptom vermeden gelişir. Hareketsiz bakteriyel hücreler antijen



salgılayarak antikor üretimini uyarmaktadır. Bununla birlikte antikorların biyofilm içerisindeki bakterileri öldürebilme yeteneği yoktur. Biyofilmler bu yolla etraflarındaki dokularda immün kompleks hasarına yol açabilirler. Mükemmel hücresele ve hümöral immün yanıtları olan bireylerde bile, konak savunma mekanizmaları biyofilm enfeksiyonlarını sonlandıramamaktadır. Antibiyotik tedavisi biyofilmden ayrılmış olan planktonik hücrelerin neden olduğu semptomları ortadan kaldırır fakat biyofilmi yok edememektedir. Bu nedenle biyofilm enfeksiyonları, dönem dönem kullanılan antibiyoterapiye rağmen semptomlar göstermeye devam edebilmektedir. Bu durum biyofilm popülasyonunun cerrahi olarak vücuttan uzaklaştırılmasına kadar devam edebilir (Costerton ve ark. 1999).

Biyofilmlerin özellikle nozokomiyal enfeksiyonlardaki önemlerinin artması ile birlikte biyofilm direnci konusu da daha sık olarak gündeme gelmektedir. Bakterinin biyofilm oluşturarak yüzeye yapışmış formu (sesile) ile süspansiyon formu (planktonik) arasında antibiyotik duyarlılık farkının olduğu gösterilmiştir. Bakteriler antibiyotiklere MBK konsantrasyonlarının 1000 katına kadar direnç gösterebilmektedirler. Biyofilm oluşumunun antibiyotiklerin etkisini önleyici fonksiyonu olduğu bildirilmektedir. Biyofilm fenotipinin diğer önemli özelliği ise konak immun hücrelerinden korunabilmesidir. Biyofilm bakteriyi fagositoz ve degranülasyondan korumaktadır. Kemotaksisi, nötrofillerin etkisini önlemekte ve lenfosit aktivitesini azaltmaktadır (Costerton ve ark. 1999; Maha ve O'Toole, 2001). Biyofilmle ilişkili enfeksiyonların tedavisi gittikçe daha da sorun olmaktadır. Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere dirençli davranışı planktonik formu ile arasındaki en önemli farkı oluşturmaktadır (Ceri ve ark. 1999; Gilbert ve ark. 1997).

Biyofilmin antibiyotik direnç oluşturmada bazı mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir. Moleküler filtre mekanizmasının özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesinde en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir. Biyofilmin bariyer fonksiyonunu destekleyen önemli bulgulardan biri Suci ve ark.'nın yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa*'ya siprofloksasinin penetrasyonunun normalde 40 saniye iken, aynı genetik yapıya sahip biyofilm oluşturmuş formda 21 dakika olarak tespit etmeleridir (Suci ve ark. 1994). Antibiyotiklerle tedavi edilmiş olan biyofilmlerin kenar kısımlarında bakterisidal etki izlenirken, daha derin kısımlarda yaşayan bakteriler hayatta kalmakta yeniden

enfeksiyon gelişiminde bir nidus teşkil etmektedirler. Biyofilmin dış tabakaları hasarı absorbe ederken, iç tabakalarda stres yanıtının başlaması için zaman kazanılmış olur (Mathur ve ark. 2005; Post 2004; Costerton ve ark.1999).

Bakterilerin büyüme oranlarındaki değişiklikler antibiyotik cevaplarını da değiştirmektedir. Başka bir deyişle, bir çok antibiyotik hızla bölünen bakterileri hedeflediği için, özellikle biyofilmin derin tabakalarında bulunan ve azalmış metabolik ve bölünme hızları sergileyen bakterilere etkili olamamaktadır. Biyofilimli bakterilerin büyüme hızları planktonik bakterilerden belirgin bir şekilde düşük olduğu tesbit edilmiştir. Eng ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada durağan fazdaki Gram-negatif bakterilere sadece flurokinolonlar aktif olabilirken, beslenmesi zayıflatılarak çoğalma hızları düşürülen *S. auerus*'lara hiçbir antibiyotiğin yeteri kadar etkili olmadığı gösterilmiştir. Bu bulgular biyofilmin bakteri beslenme ve büyümesini etkileyerek antibiyotik direnç gelişimini sağladığını göstermektedir (Post 2004; Costerton ve ark. 1999; Eng ve ark. 1991).

Direnç mekanizmalarının saptanması, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önemlidir. Yeni geliştirilecek antibiyotiklerin durağan (stationary) fazdaki ve biyofilm içindeki mikroorganizmalara etkili olması istenen bir durumdur. Bu amaçla farklı antibiyotiklerin farklı bakteri türlerindeki biofilmlere olan etkisi, çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Nishimura ve ark. 2006; Williams ve ark. 1997; Aaron ve ark. 2002; El-Azizi ve ark. 2005). Kolistin çok ilaca dirençli *Acinetobacter* suşları için son yıllarda ön plana çıkan, tedavide önemli bir antibiyotiktir. Ancak *A. baumannii* için kolistin ve diğer antibiyotiklerin biyofilm üzerine etkisini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Cai ve ark.'nın 2009 yılında yaptığı bir çalışmada kolistinin *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'da in vitro bakterisidal aktivitesini farklı biyofilm evrelerine karşı değerlendirmişlerdir. Çalışılan izolatların 24, 48 ve 72. saatlerdeki biyofilmleri kolistin (8µg/ml MİK) ile muamelesinden 8 saat sonra değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 24. saat biyofilmleri için kontrol grupları ve kolistinin verildiği grup arasında hafif bir azalma gözlenirken, 48 ve 72. saatlerdeki biyofilmlerde anlamlı azalma saptamışlardır. Bu sonucun açıklamasında, kolistinin başlangıç konsantrasyonunun *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarının eradikasyonu için belirli bir düzeye ulaşması gerektiğinin ve kolistinin başlangıç evresi biyofilmleri üzerine olana göre matür olgun biyofilm üzerine



çok daha etkili olduğunu vurgulamışlardır. Kolistinin stabil evredeki hücrelere karşı mükemmel bir bakterisidal etkisinin olduğunu ve aktif evredeki izolatlara karşı iyi bakterisidal aktivite için çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonunun biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda kolistin ile tedavide araştırılmasının uygun olacağına değinmişlerdir (Cai ve ark. 2009).

Literatürde çeşitli bakterilerde bir çok farklı antibiyotiklerin biyofilm üzerine etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışmalardan bazılarını inceleyecek olursak, biyofilm gelişiminin antibiyotik duyarlılığını anlamlı bir şekilde azalttığını görebilmekteyiz (Can ve ark. 2009; Moskowitz ve ark. 2004; Yıldırım, 2006; Şahin, 2007).

Ülkemizde 2009 yılında Can ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada *A. baumannii* planktonik ve biyofilm hücrelerine tigesiklinin etkisini araştırmışlardır. Biyofilm duyarlılık testleri sonucunda suşların BİK değerlerini 0,5-4096 µg/ml aralığında bulmuşlardır. Tüm suşlarda sesil hücrelere karşı tigesiklinin inhibitör konsantrasyonlarının 1->4096 kat artış gösterdiğini belirtmişlerdir (Can ve ark. 2009).

İn vivo şartlarda biofilm-antibakteriyel ilişkisini araştıran farklı çalışmalar bulunmaktadır. Moskowitz ve ark. 41 kistik fibrozis hastasından elde ettikleri 94 *P.aeruginosa* izolatı ile yaptıkları kapsamlı çalışmada, antipseudomonal etkinliği olan 12 antibiyotik için saptanan MİK ve BİK değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda amikasin, siprofloksasin ve tobramisın için saptanan BİK ve MİK değerleri birbirine yakın bulunurken, gentamisin ve meropenem için BİK değeri, MİK'in birkaç katı bulunmuştur. Çalışma kapsamına alınan aztreonem, seftazidim, piperasilin/tazobaktam ve tikarsilin/klavulanat gibi β-laktam antibiyotikler ve doksisisiklinde ise BİK değerleri MİK değerinin çok daha yüksek katlarında bulunmuştur (Moskowitz ve ark. 2004). 2006 yılında yapılan bir çalışmada, 10 tane *P. aeruginosa* izolatı kullanılarak kinolon grubu 3 antibiyotiğin BİK ve MİK değerlerini saptamışlardır. Buna göre 10 izolat için, siprofloksasinin ortalama MİK değeri 2,9 µg/ml bulunurken, ortalama BİK değeri %34,5'lük bir artış göstererek 3,9 µg/ml bulunmuştur. Levofloksasin ortalama MİK değeri 6,6 µg/ml bulunurken, BİK değeri %130'lük bir artışla 15,2 µg/ml bulunmuştur. Moksifloksasinin ortalama MİK değeri ise 12,4 µg/ml bulunurken, BİK değeri %161'lik artışla 32,4 µg/ml bulunmuştur (Yıldırım, 2006).



Yapılan diğer bir çalışmada, 8 adet *S. aureus* izolatında bazı antibiyotiklerin MİK ve BİK değerleri karşılaştırmışlar ve vankomisin için en dūřuk BİK değer MİK<sub>90</sub> değerinin 8 katı olarak 16 μg/ml, linezolid için en dūřuk BİK değer MİK<sub>90</sub> değerinin 2 katı olarak 8 μg/ml, dalfopristin için en dūřuk BİK değer MİK<sub>90</sub> değerinin 80 katının üzerinde >1280 μg/ml, quinupristin için en dūřuk BİK değer MİK<sub>90</sub> değerinin 160 katı olarak 640 μg/ml ve dalfopristin/quinupristin için en dūřuk BİK değer MİK<sub>90</sub> değerinin 2 katı olarak 2 μg/ml bulmuşlardır. (şahin, 2007)

Yassien ve ark. 50 klinik *P.aeruginosa* izolatı kullanarak kinolon grubu antibiyotiklerle yaptıkları duyarlılık çalışmasında, 1/2, 1/4, 1/8 MİK'lik konsantrasyonlarda, *P.aeruginosa* biyofilm oluşumunu, kontrol grubuna göre anlamlı Şekilde azalttıklarını göstermişlerdir. Aynı çalışmada bu antibiyotiklerin, 2 günlük biyofilm oluşumu üzerine 12,5-400 μg/ml arasında değerren konsantrasyonlarda etkilerine bakmışlar ve kontrol grubuna göre optik dansiteyi 12,5 μg/ml konsantrasyonda %77- 69, 400 μg/ml konsantrasyonda ise % 60-39 arasında değerren oranlarda azalttığını göstermişlerdir (Yassien ve ark. 1995).

Çalışmamızda 77 klinik izolatın 33'nde, yüksek konsantrasyonlarda (64μg/ml) kolistin daha önceden mikrotitrasyon plağı tabanında oluşturulan biyofilm tabakasının optik dansitesinde azalma saptanmıştır. Bu etki doza bağımlıydı ve yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin olarak gözlenmiştir. Bu klinik izolatların BİK ve MİK<sub>90</sub> değerleri karşılaştırıldı. Klinik izolatların kolistin MİK<sub>50</sub> değer 0,25 μg/ml, MİK<sub>90</sub> değer 1 μg/ml ve BİK<sub>50</sub> değer 128 μg/ml, BİK<sub>90</sub> değer 512 μg/ml olarak hesaplandı. Bakterinin biyofilm oluşturarak yzeeye yapışmış formu (sesil) ile süspansiyon (planktonik) formu arasında, antibiyotik duyarlılık farkının 100-1000 kat olduğu gösterilmiştir (Lewis, 2001; Ceri ve ark. 1999; Schierholz ve ark. 1999). Bizim sonuçlarımıza göre klinik izolatların kolistin için BİK<sub>90</sub> değer MİK<sub>90</sub> değerinin 512 katı olarak bulundu. İzolatların kolistin için en dūřuk BİK değer de MİK<sub>90</sub> değerinin 32 katı olarak 32 μg/ml bulundu. Bu sonuçlar diğer çalışmalarda olduğu gibi biyofilmin antibiyotik etkinliğini azalttığını göstermiştir ancak farklı antibiyotiklerin farklı mikroorganizma biyofilmleri üzerindeki etkinliklerinin değerşiklik gsterdiğide çalışmalarda gösterilmiştir. Bu durum, yöntem farklılığı veya biyofilmlerin strüktürel yapısındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi, bölgeler arası farklılıktan da kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle bu konuda epidemiyolojik çalışmalar önemlidir.

Ayrıca biyofilm oluşum süresinde antibiyotik etkinliğinde önemi vardır. 24. saat, 48 ve 72. saatlerdeki biyofilmlere kolistinin etkisindeki farklılıklar yapılacak yeni çalışmalarla gösterilmelidir. Elde ettiğimiz sonuçlar biyofilm oluşturmuş bakterilerin inhibisyonunun güç olduğunu ve antibiyotiklerin MİK değerlerinin çok daha üzerinde dozlara ihtiyaç olabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak; *A. baumannii* izolatlarında biyofilm oluşumunu etkileyen bir çok faktör vardır. Bu çeşitlilik bir suşun farklı koşullarda farklı biyofilm oluşturma eğilimi gösterebileceğini göstermektedir. Biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerin antimikrobiyellerle tedavide güçlük gösterdiği çeşitli çalışmalarla BİK değerinin MİK değerlerinden çok yüksek bulunmasıyla gösterilmiştir. Bu durum özellikle sorunlu bölge enfeksiyonlarında tedaviyi zorlaştıracaktır ve tedavi protokolleri oluşturulurken dikkate alınması gerekmektedir. *A. baumannii*'nin yüksek oranda biyofilm oluşturma özelliği göz önüne alınacak olursa, bu bakteriye bağlı enfeksiyonlarda kolistin ile tedavi planlanırken aktivitenin farklı olabileceği dikkate alınmalıdır. Bütün bu verilerin ışığında *A. baumannii* izolatlarının biyofilm oluşumunun farklı antibiyotiklerin varlığında ne ölçüde etkilendiklerini başka çalışmalarla denenmesi gerekmektedir. Ayrıca biyofilm oluşumunun önlenmesi için moleküler, genotipik ve fenotipik düzeyde daha açıklanması ve araştırılması gereken çok sayıda noktalar bulunmaktadır.

## 6. SONUÇLAR

1. Tüp yöntemi ile yapılan değerlendirmeler sonucunda 152 örneğin 69'unda (%45.4) biyofilm oluşumu pozitif bulunurken, 83'ünde (%54.6) biyofilm oluşumu negatif bulundu.

2. Kristal viyole kullanılarak yapılan absorbans ölçümlerine göre örneklerin 9'unda (%5,9) güçlü biyofilm üretimi, 68'inde (%44,7) orta derece biyofilm üretimi ve 75'inde (%49,3) biyofilm üretimi negatif belirlendi.

3. Biyofilm oluşumunun tespitinde kullanılan mikrotitrasyon plağı yöntemi ve tüp yöntemi arasındaki uyum %89,5'dir ve istatistiksel olarak bu uyum anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ).

4. Biyofilm oluşumu ile örneklerin alındığı bölgeler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde en yüksek biyofilm oranları solunum sistemleri örneklerinde gösterildi (%47).

5. İzolatlarımızın antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde en yüksek direnç piperasilin (%91,5) ve meropenem'e (%83,8) karşı görüldü.

6. Tüm izolatlarımız kolistine duyarlı bulundu.

7. İzolatlarımızın hiç biri PDR değildi ve 103 (%67,8) tanesi XDR, 22 (%14,5) tanesi MDR, 27 (%17,7) tanesi duyarlı olarak belirlendi.

8. Biyofilm üreten 77 izolatın 52 (%67,5) tanesi XDR, 10 (%13) tanesi MDR ve 15 (%19,5) tanesi duyarlı izolat olarak tespit edildi.

9. Biyofilm tabakası üzerine kolistin etkisi mikrotitrasyon plağında OD ölçülerek antibiyotik öncesi ölçülen OD ile antibiyotik sonrası ölçülen OD arasında anlamlı fark bulunmadı ( $P>0,05$ ).



10. 77 klinik izolatın 33'ünde, yüksek konsantrasyonlarda (64µg/ml) kolistinin daha önceden mikrotitrasyon plağı tabanında oluşturulan biyofilm tabakasının optik dansitesinde azalma saptandı.

11. Klinik izolatların kolistin için en düşük BİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 32 katı olarak 32 µg/ml bulundu.

12. Klinik izolatların kolistin için BİK<sub>90</sub> değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 512 katı olarak bulundu.

## 7. Kaynaklar

- Aaron S.D, Ferris W, Ramotar K. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 40(11):4172-4179, 2002.
- Akalın H. Çoklu ilaç direncinde tedavi yaklaşımı ve ilaç politikaları. Ankem Derg 2007;21 (Ek2):186-191
- Akalın H. Kolistin. Ankem Derg 2007;21(Ek 2):26-28
- Akın EÖ, Bayram A, Balcı İ. Çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında kolistin polimiksin B ve tigesiklin direncinin saptanmasında disk difüzyon, E-TEST ve buyyon mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2010; 44: 203-210
- Akın EÖ. Çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında kolistin polimiksin B ve tigesiklin direncinin saptanmasında disk difüzyon, E-TEST ve buyyon mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Uzmanlık tezi. 2009
- Akova M. Sulbaktam-Sefoperazon: In Vitro Çalışmalar ve Klinik Kullanımında Yeni Veriler. Flora 2006;11(Ek 2)
- Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.6 th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005;2:2632-2636
- Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. FEMS Microbiol Lett 1998; 167(2): 179-84
- Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. J Clin Microbiol 1999; 37: 3235–3238.
- Appleman MD, Belzberg H, Citron DM et al. *In vitro* activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1035-40.
- Arda B, Ulusoy S. Kinolonlar. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds.Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;497-512

- Ardıç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T. Yatan Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* Suşlarının Karbapenemlere ve Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*. 2004;18(3):145-148.
- Assanta M.A. (2000). The war against invasive bacteria that stick to surfaces. <http://www.frd.gov.ca>.
- Aşık G. *Acinetobacter baumannii* virülansında güncel yaklaşımlar. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2011; 45(2): 371- 380.
- Aygün G, Dikmen Y, Mete B, Utku T, Murtezaoğlu A, Demirkıran O ve ark. Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin antibiotik duyarlılığı. *Aknem Derg* 2002;16:85-8.
- Aygün G. Yoğun bakım birimlerinde antibiotik direnç problemi ve tedavide güncel durum: Nonfermentatifler. III. Ulusal Yoğun Bakım İnfeksiyonları Simpozyumu. Simpozyum Kitabı 2007;16-18.
- Azap Ö, Arslan H, Ergin F, İnci E, Yapar G. İn vitro activity of colistin against nonfermentative gram-negative bacilli. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2005; 58:65-67.
- Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008; 2195-2201.
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (9):4382- 4390.
- Baselga R, Albizu I, Cruz MDL, Cacho ED, Barberan M, Amorena B. Phase Variation of Slime Production in *Staphylococcus aureus*: Implications in Colonization and Virulence. *Infection and Immunity* 1993; 61: 4857-4862.
- Baskın H. Mikroorganizmanın çevreye uyumu ve biyofilm: "QUORUM SENSİNG" (çoğunluğu algılama). TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ve ENFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ, 2005.
- Beech IB, Gaylarde CC. Adhesion of bacteria to mild steel surfaces. *J Appl Bacteriol* 1989; 67: 2017-2020.



- Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148- 65.
- Bothwell MR, Smith AL, Phillips T. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 129: 599-560.
- Bullitt R, Makowski L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. Nature 1995; 373: 164-167.
- Cai Y, Wang R, Liang B, An M. In vitro bactericidal activity of colistin against biofilm associated *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Elsevier The hospital infection society. 2009.
- Can F, Azap Ö, Demirbilek ve ark. Kan kültürlerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında biyofilm oluşumu. İnfeksiyon dergisi, 2006; 20(3): 159-163.
- Can F, Kaya M, Bayındır Bilman F, Uncu H, Demirbilek M, Yazıcı C. Tigesiklinin *Acinetobacter baumannii* planktonik ve biyofilm hücrelerine etkisi. Mikrobiyoloji Bülteni 2009; 43: 587-595.
- Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. J Appl Bacteriol 1993; 75: 499-511.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1771-1776.
- Cevahir N, Demir M, Kaleli İ ve ark. Evaluation of biofilm production, gelenatinase activity, and mannose resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. J Microbiol İmmunol Infect. 2008; 41: 513-518.
- Chen PH, Chen TL, Lai CH, et al. Predictor of mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. J Microbiol Immunol Infect 2005; 38: 127- 36.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985; 22: 996–1006.
- Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance Standads for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty- First Informational Supplement. M100-S21.2011;61.

- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin- Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-45.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 5427–5433.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418): 1318-22.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; 67: 5427–5433.
- Cramton SE, Ulrich M, Gotz F, Doring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; 69: 4079-4085.
- Çakır N, Gram negatif etkili antibakteriyel ajanlar ve klinik kullanımları (antipsödomonal penisilinler). Ulusoy S, Lelebicioğlu H, Usluer G (Editörler). Önemli ve sorunlu gram negatif bakteri infeksiyonları. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.s.399-408.
- Çakır N, Gram negatif etkili antibakteriyel ajanlar ve klinik kullanımları (sefalosporinler). Ulusoy S, Lelebicioğlu H, Usluer G (Editörler). Önemli ve sorunlu gram negatif bakteri infeksiyonları. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.s.410-28.
- Çakır N, Karbapenemler. Lelebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Editörler). Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003.s.275-86.
- Çalık N, Akova M. Tigesiklin. *Ankem Derg* 2007;21(Ek 2):29-33.
- Çetin ES, Kaya S, Tetik T ve ark: Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 2006;20(4):202-5.
- Çiftçi İ. H, Aşık G, *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. *ANKEM Derg* 2011;25(3):196-207
- Çitçi Z, Kronik tonsillitte biyofilmin rolü. İstanbul: Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 2005.

- D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 588-591.
- Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 847-867.
- Demirtürk N, Demirdal T. Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 2004;5(2):17-21.
- Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J Microbiol* 2005; 43: 101-9.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
- Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 881-890.
- Donlan R.M. (2002). Biofilms:Microbial life on surfaces.*Emerg. Inf.Disease*.8:881 890.
- Douglas L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol*. 11:30-36.
- Dökmeci İ. Kemoterapötik ilaçlar. Dökmeci İ (Editör). Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar'ında. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri; 1992.s.705-86.
- Dökmeci İ. Aminopenisililer. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Editörler). Güncel bilgiler ışığında antibiotikler. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003.s.239-48.
- Dunne, W. M., Jr., and Buckmire, F. L. *Microbios* 43, 1985; 193-216.
- El-Azizi M, Rao S, Kanchanapoom T, Khardori N. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin and linezolid against intact and disrupted biyofilms of staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4: 2.
- Eng RH, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1824-1828.
- Esen Ş. Tigesiklin. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Editörler). Güncel bilgiler ışığında antibiotikler. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2008.s.275-86.



- Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1333-41.
- Fidan I, Yüksel S, Gürelık F. Ç. Koagülaz negatif Stafilokok suşlarında biyofilm oluşumu ve siprofloksasinin biyofilm üzerine etkisi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* (2005) 35:149-152.
- Fletcher M, Lessman JM, Loeb GI. Bacterial surface adhesives and biofilm matrix polymers of marine and freshwater bacteria. *Biofouling* 1991; 4: 129-140.
- Gaddy JA, Actis L. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 2009; 4(3): 273-8.
- Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 2009; 77(8): 3150-60.
- Georgopapadakou NH. Antibiotic resistance in biofilms. In: Pace JL, Rupp M, and Finch RG. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Taylor & Francis Group NW, 2006: 401-405.
- Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997;11: 160-167.
- Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(3): 219-26.
- Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;39-52.
- Hawley J, Murray CK, Griffith ME, et al. Susceptibility of *Acinetobacter* strains isolated from deployed U.S.military personnel. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 376-8.
- Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH: Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52 (1):351-2.
- Hooper GC. Quinolones. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.p.404–19.

- Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, et al. Identification of a new variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: characterizing a new family of Class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2941-2948.
- Hussain M, Willcox M.H, White P.J. (1993). The slime of coagulase negative Staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol.*10:191-207.
- Javad A, Seifert H, Snelling A.M, Heritage J, Hawkey P.M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 1938-1941.
- Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds Acinetobacter Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter spp.*, and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2353- 58.
- Jenkinson H.F, Lapin-scott H.M. (2000). Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol.* 9:9-10.
- Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Yong D, Woo GJ. Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended spectrum beta-lactamase in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2005;59:242-48.
- Karageorgopoulos D, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:751-62.
- Kjelleberg S, Molin S. (2002). Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Ecology Indust. Microbiol.* 5:254-258.
- Koprnová J, Svetlanský I, Babel'á R et al. Prospective study of antibacterial susceptibility, risk factors and outcome of 157 episodes of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia in 1999 in Slovakia. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 891- 5.
- Kwon KT, Oh WS, Song JH, et al. Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(3): 525-30.
- Leblebicioğlu H. Parenteral Sefalosporinler. İn. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, eds. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2008;285-298.

- Leblebicioğlu H. Polimikrobiyal İnfeksiyonlarda Tedavi ve Ampisilin-sulbaktam Kullanımı. *Flora* 2004;9(Ek 2).
- Lee HW, Kah YM, Kim J, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 49-54.
- Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003;9:868-871.
- Leriche V, Sibille P, Carpentier B. (2000). Use of ELLSA to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1851-6.
- Leriche V, Sibille P, Carpenter B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1851-1856.
- Levin AS, Oliveira MS. The Challenge Of Multidrug Resistance: The Treatment of Gram-Negative Rod Infection. *Shock*. 2008;30(7):30-33.
- Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
- Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microb Rev* 1995;8:557–84.
- Lolans K, Rice TW, Munoz-Price SL, Quinn JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2941-5.
- Looveren VM, Goossens H, the ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:684–704.
- Lo-Ten-Foe JR, Smet AM, Diederer BMW, Kluytmans JAJ, Keulen PH. Comparative Evaluation of the VITEK 2, Disk Diffusion, Etest, Broth Microdilution, and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in Clinical Isolates, Including Heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(10):3726-3730.
- Magiorakos A.P, Srinivasan A, Carey R.B, Carmelia Y, Falagas M.E et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an



- international expert proposal for interim Standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 2011.
- Mah TFC and O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34-39.
- Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis*. 2000;31:101-6.
- Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PM, Waites KB. Comparative *in vitro* antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 881- 5.
- Marshall KC. *Interfaces in Microbial Ecology*. Boston: Harvard University Press, 1976.
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Adverse Effect of Staphylococci Slime on In Vitro Activity of Glycopeptides *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 353-357.
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 25-29.
- Mezzatesta ML, Trovato G, Gona F. In vitro activity of tigecycline and comparators against carbapenemsusceptible and resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 7: 4-7.
- Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004 May;42(5):1915-22.
- Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* Infection. *N Engl J Med* 2008;358 (12):1271-1281.
- Nishimura S, Tsurumoto T, Yonekura A, Adachi K, Shindo H. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *J Orthop Sci* 2006; 11: 46–50.

- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
- Özdemir M, Erayman İ, Gündem N.S, Baykan M. Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının araştırılması. *ANKEM Derg* 2009;23(3):127-132.
- Özlü N. Hastanemizde izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının moleküler ve epidemiyolojik değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, 2007.
- Öztürk ŞB, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul M.B, Biyofilmler ve Yabancı Cisim İnfeksiyonları *Klimik Dergisi* 2008cilt 21 sayı 3:79-86.
- Pankey GA. Tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(3): 470-80 Çalık N, Akova M. Tigesiklin. *Ankem Derg* 2007;21(Ek 2):29-33.
- Peleg AY, Adams J, Peterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2065-2069.
- Perez F, Hujer AM, Hujer MK, Decker KB, Rather NP, Bonomo AR. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3471-3484.
- Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12: 185- 190.
- Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, Terleckyj OD, Young JM. Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 417-423.
- Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *ClinInfect Dis* 2006; 43: 95- 9.
- Rajamohan J, Srinivasan V.B, Gebreyes WA. Biocide tolerant multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains are associated with higher biofilm formation. *Journal of Hospital Infection*, 2009.
- Redfield R. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* 2002; 10:365-70.

- Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 2006; 188(10): 3572-81.
- Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press; 2003.p.1074–101.
- Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(3): 276-8.
- Rohde H, Mack D, Christner M, Burdelski C, Franke G, Knobloch JKM. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev Med Microbiol* 2006; 17:45–54.
- Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1109-1117.
- Sakarya S, Biyofilm Yapısı ve enfeksiyon Hastalıklarının Virülans ve Tedavisindeki Rolü 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.
- Saltoğlu N. *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonları ve tedavisi. In. XIII. Türk Klinik Kongresi (14-18 Mart 2007 Antalya), Kongre Kitabı. İstanbul: 2007;20(özel sayı):204-207.
- Saraçlı MA. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi* 2006; 48: 244-250.
- Schierholz JM, Beuth J, König D, Nürnberg A, Pulverer G. Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. *Zentralblatt Bacteriol* 1999; 289(2): 165-77.
- Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology* 9 th ed. Washington ASM Press 2007: 770- 802.
- Song JG, Kee SY, Hwang IS, et al. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against



- carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 317-22.
- Speller DCE, Humphreys H. Hospital-acquired infection. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. 9th ed. London: Arnold; 1998. p.187-229.
- Srinivasa Rao R, Uma Karthika R, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Indian Journal of Medical Microbiology. 2008; 26(4): 333-7.
- Stickler DJ, Morris NS, McLean RJ, Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. Appl Environ Microbiol 1998; 64(9): 3486-90.
- Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 1991; 38(9): 2125-33.
- Sutherland I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*. 147:3-9.
- Tatman-Otkun M, Gürcan Ş, Özer B, Türe M. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde 1994'den 2000'e yıllık antibiyotik direnç değişimi. *AnkEm*2003;17:1-6.
- The Turkish Antimicrobial Resistance Study Group, Pfaller MA, Korten V, Jones RN, Doern GV. Multicenter evaluation of the antimicrobial activity for seven broad spectrum beta-lactams in Turkey using E-test method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;35:65-73.
- Thomson MJ, Bonomo AR. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria:  $\beta$ -lactams in peril!. *Curr Opin Microbiol* 2005;8:518-24.
- Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003; 149: 3473-84.
- Tomaras AP, Dorsey CW, McQueary CN, Actis LA. Molecular basis of *Acinetobacter* virulence and pathogenicity, pp: 265-97. In: Gerischer U (ed), *Acinetobacter Molecular Biology*. 2008, Caistr Academic Press, Norfolk, UK.

- Towner KJ. *Acinetobacter*. In: Collier L, Balows A, Susman M, eds. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. London:1998;1229-1239.
- Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect 2009; 73(4): 355-63.
- Tre-hardy M, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. Int J Antimicrob Agents 2008; 31:329-36.
- Usluer G, Ünal S. İmipenem. Flora 2004;9(Ek7):3-16.
- Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2265-69.
- Vahaboğlu H. Beta-laktamaz inhibitörlü beta-laktamlar. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Editörler). Güncel bilgiler ışığında antibiotikler. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2003.s.249-52.
- Vahapoğlu H. *Acinetobacter* infeksiyonları. Ankem Derg 2008;22:44-45.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm. Clin Microbiol Rev 2005;18:306-325.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm city of microbes. Minireview. J Bacteriol 2000;182: 2675-2679.
- Weaver R, Actis LA. Identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol 1994;32 (7): 1833-1838.
- Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature 2001; 413(6858): 860-4.
- Willke A. Aminoglikozidler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Editörler). Güncel bilgiler ışığında antibiotikler. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003.s.313-24.
- Williams I, Venables WA, Lloyd D, Paul F, Critchley I. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. Microbiology 1997; 143: 2407-2413.
- Williams JD. Beta-lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefaperazone. Clin Infect Dis 1997;24:494-7.

- Yassien M, Khardori N, Ahmedy A, Toama M Modulation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 October; 39(10): 2262–2268.
- Yıldırım U, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik varlığında biofilm ve alginat üretiminin araştırılması. Uzmanlık tezi. 2006.
- Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.*2007;60: 1206–1215.



