

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA VİRÜLANS
FAKTÖRLERİ VE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLLERİ
İLE İLİŞKİSİ

Dr. Nilüfer UĞUR ÖZLÜK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Canan KÜLAH

ZONGULDAK
2016

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA VİRÜLANS
FAKTÖRLERİ VE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLLERİ
İLE İLİŞKİSİ

Dr. Nilüfer UĞUR ÖZLÜK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Canan KÜLAH

ZONGULDAK
2016

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Acinetobacter baumannii İzolatlarında Virulans Faktörleri ve Antimikrobiyal Direnç Profilleriyle İlişkisi

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Nilüfer UĞUR ÖZLÜK

Tez Savunma Tarihi : 14/10/2016

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Canan KÜLAH

Prof.Dr. Canan KÜLAH
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Füsun CÖMERT

Prof.Dr. C. Elif ÖZTÜRK



ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, tez çalışmalarımın planlanma ve yürütülmesinde deneyimlerini benimle paylaşan, yol gösteren anabilim dalımızın değerli başkanı Sayın Prof. Dr. Canan KÜLAH'a,

Asistanlığım boyunca değerli bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan, her türlü konuda her zaman yanımda olan, hoşgörülü ve anlayışlı yaklaşımı ile herkese örnek olan Sayın Prof. Dr. Füsun CÖMERT'e,

Aramızdan ayrılmış olmasına rağmen asistanlığımın ilk yıllarında bana verdiği emeklerden dolayı Sayın Doç. Dr. Elif AKTAŞ SEPETÇİ'ye,

Tezimde yer alan "*Galleria mellonella* enfeksiyon modeli" deneyinde larvaların temininde ve bu deneyin her aşamasında verdiği desteklerden dolayı Sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI'ya,

Tezimin istatistiksel değerlendirme sürecinde verdiği desteklerden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Füzuran KÖKTÜRK'e,

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, laboratuvarımızın her biri çok kıymetli olan değerli çalışanlarına,

Hayatımın tüm yıllarında, iyi ve kötü günümde hep yanımda olan ve benden desteklerini esirgemeyen babama, ablama ve abime; özellikle varlığı ile huzur bulduğum, tüm sıkıntılı anlarımda her zaman hep yanımda olan ve dualarını benden eksik etmeyen canım annem Gülhan UĞUR'a,

Bu zorlu süreçte tecrübeleriyle bana yol gösteren, anlayışlı ve sabırlı tutumuyla her zaman destekçim olan, sevgili hayat arkadaşım, değerli eşim, Op. Dr. İzzet Özgür ÖZLÜK'e ve tez sürecinde kendisini oldukça ihmal ettiğim, evimizin neşesi, canım kızım Zeynep Nur'uma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Nilüfer UĞUR ÖZLÜK

Zonguldak, 2016

ÖZET

ÖZLÜK NU., *Acinetobacter baumannii* izolatlarında virülans faktörleri ve antimikrobiyal direnç profilleri ile ilişkisi. Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Zonguldak, 2016

Amaç: Fırsatçı patojen olan *Acinetobacter baumannii*'nin son yıllarda yapılan çalışmalarda, daha dirençli ve virülan hale gelerek temel nozokomiyal bir tehdit oluşturduğu gösterilmiştir. Farklı birtakım mekanizmalar kullanarak birçok antibiyotik grubuna karşı direnç geliştirebilen *A.baumannii*'de gelişen bu direnç beklenmeyen fizyolojik, fenotipik ve genotipik değişikliklere neden olabilmektedir Antibiyotiklere karşı oluşan adaptasyon sürecinde, antibiyotik direnci kazanmış bakterinin virülans özelliklerinde azalma olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bakteriye ait bugüne kadar az sayıda virülans faktörü tanımlanmış olup, bu faktörler ile duyarlı ve dirençli *A.baumannii* suşları arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışma sayısı sınırlıdır ve sonuçlar henüz netleşmemiştir. Bu çalışmada *A.baumannii* izolatlarının virülans özelliklerinin, ilaçlara karşı direnç durumuyla karşılaştırılarak incelenmesi ve yeni geliştirilecek anti-virülans tedavi stratejileri için yol gösterici olması hedeflenmiştir.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya, laboratuvarımıza 2005-2007 tarihleri arasında gönderilen klinik örneklerden izole edilen, daha önceki yıllarda farklı çalışmalarda kullanılmış olan 18 izolat ile Ocak 2015 -Aralık 2015 tarihleri arasında laboratuvara rutin olarak gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 12 izolat, toplamda 30 *Acinetobacter baumannii* izolatı olacak şekilde dahil edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testleri, Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda, Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. İzolatlar antibiyotik duyarlılık test profillerine göre üç gruba ayrılmıştır. Birinci grupta üç gruptan daha az antibiyotiğe dirençli bulunan (Duyarlı)10 suş, ikinci grupta üç ya da daha fazla antibiyotik grubuna dirençli olan (Multidrug resistant, MDR) 10 suş, üçüncü grup ise iki ya da daha az grup antibiyotiğe duyarlı olan (Extreme-drug resistant, XDR) 10 suş belirlenerek incelemeye alınmıştır.

Çalışmada *Galleria mellonella* enfeksiyon modeli kullanılmıştır. Virulans faktörlerinden biyofilm oluşumu, spektrofotometrik mikropalak yöntemi ile; siderofor üretimi, Chrome Azurol-S agarda fenotipik olarak; serum direnci, PBS içerisinde %40 konsantrasyondaki normal insan serumu ve ısı ile inaktive edilmiş serumda izolatların üreme oranları hesaplanarak; twitching hareketi, %1 oranında agar içeren Mueller Hinton besiyerinde; swarming hareketi % 0.25 oranında agar içeren Luria Bertani besiyerinde; proteolitik aktivite, azoalbumin deneyi uygulanarak spektrofotometrik değerlendirme ile; fosfolipaz C aktivitesi, kromojenik substrat p-nitrofenilfosforilkolin (NPPC) kullanılarak mikropalak yöntemi ile test edilerek spektrofotometrik ölçüm ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: *G.mellonella* enfeksiyon modelinin kullanıldığı çalışmamızda duyarlı izolatlardan oluşan birinci grup ile çok ilaca dirençli izolatlardan oluşan ikinci grubun mortalite hızlarının birbirine yakın düzeylerde oldukları görülmüş olup, ekstrem dirençli izolatlardan oluşan üçüncü grubun mortalite hızının ise 24. - 96. saat aralıklarında diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğu tespit edilmiştir. Tüm izolatların biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunlardan 8'i (%26.7) güçlü, 11'i (%36.7) orta, 11'i (%36.7) ise zayıf düzeyde biyofilm oluşturmuştur. Birinci grupta yer alan duyarlı izolatların, biyofilm oluşturma yeteneğinin diğer gruplardaki dirençli izolatlara oranla daha yüksek olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Üçüncü gruptaki zayıf biyofilm oluşturan beş suştan üç tanesinin kolistine dirençli izolatlar oldukları tespit edilmiştir. Hiçbir izolatta "twitching" hareketi tespit edilemezken, dirençli bakterilerden ikisinde "swarming" gözlenmiştir. Birinci grupta ortalama normal insan serum direnci %36.8, ikincide %63.5, üçüncü grupta ise %58.1 olarak tespit edilmiştir. Birinci gruptaki serum direnci, dirençli olan ikinci ve üçüncü gruplarla karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuş, serum direnci açısından gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. Üç gruptaki izolatların hepsinin inaktif serum direnci yüksek bulunduğundan gruplar arasından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Tüm izolatlarda fosfolipaz C aktivitesi, proteolitik aktivite ve siderofor üretiminin var olduğu tespit edilmiştir. Üç grup karşılaştırıldığında ise fosfolipaz C aktivitesi, proteolitik aktivite düzeyleri ve siderofor üretimi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, tüm izolatlarda biyofilm oluşturma, fosfolipaz C aktivitesi, proteolitik aktivite ve siderofor üretimi saptanmıştır. Duyarlı, çoğul ve ekstrem dirençli bakteri gruplarına göre sonuçlar karşılaştırıldığında ise sadece normal serum direnci açısından anlamlı fark bulunmuş olup, duyarlı grupta serum direncinin daha düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Ekstrem ilaç direnci bulunan üçüncü gruptaki izolatların ise enfeksiyon modelinde daha düşük virülans gösterdikleri görülmüştür. Bakterinin klinik başarısı ve ilaç direncinden tek bir virülans faktörünün sorumlu olmadığı, *A.baumannii*'nin virülansında multifaktöryel ve kombine bir stratejinin rol oynadığı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, virülans faktörleri, antimikrobiyal direnç, *Galleria mellonella* enfeksiyon modeli

ABSTRACT

ÖZLÜK NU.,The relationship between the virulence factors of *Acinetobacter baumannii* isolates and the antimicrobial resistance profiles. Bulent Ecevit University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Thesis. Zonguldak, 2016.

Objective: *Acinetobacter baumannii*, an opportunistic pathogen, has been shown in studies done in recent years to have become more resistant and virulent, posing a fundamental nosocomial threat. This resistance, which has developed in *A.baumannii*, and which can develop resistance against several antibiotic groups using certain different mechanisms, can lead to unexpected physiological, phenotypic and genotypic changes. Studies showing that the virulence properties of antibiotic resistant bacteria are reduced during the adaptation process against antibiotics exist. A small number of virulence factors pertaining to the bacteria have been identified so far and the number of studies investigating the relationship between these factors and the susceptible and resistant *A.baumannii* strains is limited, whose results have not yet become clear. In this study, it was aimed to investigate the virulence properties of *A.baumannii* isolates by comparing them with resistance to drugs and for this to provide guidance in developing new anti-virulence treatment strategies.

Materials and method: The study included a total of 30 *Acinetobacter baumannii* isolates consisting of 18 isolates which were isolated from clinical samples sent to our laboratory between 2005-2007 and had been used in different studies in previous years and 12 isolates isolated from various clinical samples sent routinely to the laboratory between January 2015-December 2015. Antibiotic susceptibility tests were conducted using the Kirby Bauer disk diffusion method in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations. The isolates were divided into three groups according to their antibiotic susceptibility test profiles. The first group included 10 strains which were found to be resistant to less than three groups of antibiotics (Susceptible), the second group included 10 strains which were resistant to three or more antibiotic groups (Multidrug resistant, MDR) and the third group

included 10 strains which were susceptible to two or less groups of antibiotics (Extreme-drug resistant, XDR) to be investigated.

The *Galleria mellonella* infection model was used in the study. Of the virulence factors, biofilm formation was evaluated using the spectrophotometric microplate method, siderophore production was evaluated phenotypically in a Chrome Azurol-S agar, serum resistance was evaluated by calculating the growth rates of isolates in normal human serum with a 40% concentration in PBS and heat inactivated serum, twitching motility was evaluated in a Mueller Hinton medium containing 1% agar, swarming motility was evaluated in a Luria Bertani medium containing 0.25% agar, proteolytic activity was evaluated with a spectrophotometric assessment using an azoalbumin assay and phospholipase C activity was evaluated with spectrophotometric measurement by testing with the microplate method using chromogenic substrate p-nitrophenylphosphorylcholine (NPPC).

Findings: In this study using the *G.mellonella* infection model, the mortality rates of the first group consisting of susceptible isolates and the second group consisting of multidrug resistant isolates were seen to be at close levels to one another and the mortality rate of the third group consisting of extreme-drug resistant isolates was found to be lower to a statistically significant degree than the other two groups at the 24th-96th hour intervals. All isolates were found to form biofilms. Of these, 8 (26.7%) formed strong biofilms, 11 (36.7%) formed moderate biofilms and 11 (36.7%) formed weak biofilms. The biofilm forming ability of susceptible isolates found in the first group was observed to be higher compared to resistant isolates found in the other groups but it wasn't found to be statistically significant. Three out of the five strains in the third group that formed weak biofilms were found to be colistin resistant isolates. While no "twitching" motility was detected in any isolates, "swarming" was observed in two of the resistant bacteria. Average normal human serum resistance was found as 36.8% in the first group, 63.5% in the second group and 58.1% in the third group. Upon comparison with the resistant second and third groups, the serum resistance of the first group was found to be lower and the difference between the groups in terms of serum resistance was found to be significant. Because the inactive serum resistance of all of the isolates in the three groups was found to be high, no significant difference was found between the groups. Phospholipase C activity, proteolytic activity and

siderophore production were detected in all isolates. When the three groups were compared, no significant difference was found in terms of phospholipase C activity, proteolytic activity levels and siderophore production.

Conclusion: In this study, biofilm formation, phospholipase C activity, proteolytic activity and siderophore production were detected in all isolates. When the results were compared according to the susceptible, multiple and extreme resistant bacteria groups, the only significant difference was found in terms of normal serum resistance and serum resistance was found to be lower in the susceptible group. The isolates in the third group with extreme-drug resistance showed lower virulence in the infection model. It was inferred that a single virulence factor is not responsible for the clinical success and drug resistance of the bacteria and that a multifactorial and combined strategy plays a role in the virulence of *A.baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, virulence factors, antimicrobial resistance, *Galleria mellonella* infection model.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖNSÖZ | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | vii |
| İÇİNDEKİLER | x |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xii |
| ŞEKİL DİZİNİ | xv |
| TABLO DİZİNİ | xvi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Taksonomi ve Tarihçe | 3 |
| 2.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler | 4 |
| 2.3. Epidemiyoloji | 5 |
| 2.4. Patogenez ve Patojenik Mekanizmalar | 6 |
| 2.5. Virülans Faktörleri | 8 |
| 2.5.1. Hücre yüzey yapısı ve enzimleri | 8 |
| 2.5.2. Toksik slaym polisakkaritler | 10 |
| 2.5.3. Verotoksinler | 10 |
| 2.5.4. Demir kazanım mekanizmaları | 11 |
| 2.5.5. Dokulara yapışma ve hasar oluşturma mekanizmaları | 12 |
| 2.5.6. Quorum sensing mekanizması | 13 |
| 2.5.7. Biyofilm oluşumu | 14 |
| 2.5.8. Hareket | 16 |
| 2.5.9. Hastane ortamında sağkalım | 18 |
| 2.6. Antibiyotik Duyarlılığı ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları | 18 |
| 2.6.1. Beta-laktam antibiyotiklere direnç | 19 |
| 2.6.2. Aminoglikozit direnci | 22 |
| 2.6.3. Kinolon direnci..... | 22 |
| 2.6.4. Tetrasiklin direnci | 22 |
| 2.6.5. Polimiksin (Kolistin) direnci..... | 22 |
| 2.7. Tedavi..... | 23 |

| | |
|---|----|
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 25 |
| 3.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> İzolatları | 25 |
| 3.2. İzolatların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri | 25 |
| 3.3. Mikroorganizmaların Tanımlanması | 25 |
| 3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri | 26 |
| 3.5. <i>Galleria mellonella</i> Enfeksiyon Modeli Çalışması | 27 |
| 3.5.1. <i>G.mellonella</i> larvaları..... | 28 |
| 3.5.2. Larvalara enjeksiyon yapılması | 28 |
| 3.6. Biyofilm Oluşturma | 29 |
| 3.7. Hareket Testi | 30 |
| 3.8. Serum Direnci | 30 |
| 3.9. Fosfolipaz C Aktivitesi | 31 |
| 3.10. Proteolitik Aktivite | 32 |
| 3.11. Siderofor Üretimi | 33 |
| 3.11.1. Chrome Azurol S (CAS) deneyi | 33 |
| 3.12. İstatistiksel Analiz | 35 |
| 4. BULGULAR | 36 |
| 4.1. İzolatların Genel Özellikleri | 36 |
| 4.2. Antibiyotik Duyarlılık Profilleri | 36 |
| 4.3. <i>Galleria mellonella</i> Enfeksiyon Modeli Çalışması | 39 |
| 4.4. Biyofilm Oluşumu | 41 |
| 4.5. Hareket | 43 |
| 4.6. Serum Direnci | 44 |
| 4.7. Fosfolipaz C Aktivitesi | 47 |
| 4.8. Proteolitik Aktivite | 48 |
| 4.9. Siderofor Üretimi | 49 |
| 5. TARTIŞMA | 52 |
| 6. SONUÇLAR | 70 |
| 7. KAYNAKLAR | 73 |
| 8. EKLER | 88 |
| EK 1. Etik Kurul Onayı | 88 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-------|--|
| AK | : Amikasin |
| AMC | : Amoksisilinklavulanikasit |
| AMP | : Ampisilin |
| ATM | : Aztreonam |
| °C | : Santigrad derece |
| CAS | : Chrome Azurol S |
| CAZ | : Seftazidim |
| CFU | : Coloni forming unit (Koloni oluşturan ünite) |
| CIP | : Siprofloksasin |
| CLSI | : Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CN | : Gentamisin |
| CO | : Kolistin |
| CRO | : Seftriakson |
| CTX | : Sefotaksim |
| ÇİD | : Çoklu ilaç direnci |
| dk | : Dakika |
| D | : Doksisiklin |
| ETP | : Ertapenem |
| FEP | : Sefepim |
| FOX | : Sefoksitin |
| gr | : Gram |
| GSBL | : Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz |
| HDTMA | : Hexadecyltrimethylammonium bromide |
| HCL | : Hidroklorik asit |

| | |
|---------------------------|--|
| IPM | : İmipenem |
| KH_2PO_4 | : Potasyum dihidrojen fosfat |
| LEV | : Levofloksasin |
| M | : Molar |
| MDR | : Multi-drug resistant |
| MEM | : Meropenem |
| mg | : Miligram |
| MİK | : Minimal inhibitör konsantrasyon |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| mM | : Milimolar |
| NaCl | : Sodyum klorür |
| Na_2HPO_4 | : Disodyum fosfat |
| OD | : Optik dansite |
| OMP A | : Outer membran protein A |
| NPPC | : p-nitrofenilfosforilkolin |
| PBS | : Phosphate buffer salin |
| PDR | : Pan - drug resistant |
| PRL | : Piperasilin |
| PİPES | : Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) |

SAM : Ampisilin sulbaktam
sn : Saniye
SXT : Trimetoprim-sulfometoksazol

TE : Tetrasiklin

TOB : Tobramisin
TZP : Piperasilin/tazobaktam
 μ g : Mikrogram
 μ l : Mikrolitre

XDR : Extreme-drug resistant

ŞEKİL DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 1. <i>A.baumannii</i> ile enfekte edilen larvaların yaşam eğrileri..... | 39 |
| 2. <i>Galleria mellonella</i> larvaları | 40 |
| 3. 96 kuyucuklu polistren mikropakta izolatların biyofilm oluşumu | 42 |
| 4. Biyofilm oluşumu (OD 550 ölçüm değerleri) | 42 |
| 5. Swarming hareketi oluşumu | 43 |
| 6. İzolatların normal serum ve ısı ile inaktive edilmiş serum direnci yüzdeleri..... | 45 |
| 7. Fosfolipaz C aktivite düzeyleri (U/L)..... | 47 |
| 8. Proteolitik aktivite düzeyleri (U/L) | 49 |
| 9. CAS agarda siderofor üretimi..... | 50 |

TABLO DİZİNİ

| <u>Tablo</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| 1. <i>Acinetobacter</i> türlerinin bazı temel tanımlayıcı özellikleri..... | 5 |
| 2. <i>Acinetobacter spp.</i> için zon çapları yorumlama standartları..... | 27 |
| 3. Kolistin MİK değerlendirme kriteri ($\mu\text{g/ml}$)..... | 27 |
| 4. <i>A.baumannii</i> izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı..... | 36 |
| 5. Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik duyarlılıkları..... | 38 |
| 6. <i>A.baumannii</i> izolatları ile oluşturulan enfeksiyon modelinde, deney saatlerine göre canlı kalan larva sayısı ve mortalite oranları..... | 40 |
| 7. Biyofilm oluşum derecesinin gruplar arasındaki dağılımı..... | 42 |
| 8. Normal ve inaktif serum direncinin gruplar arası dağılımı..... | 45 |
| 9. İzolatların normal insan serumu ve ısı ile inaktive edilmiş serum direnci yüzdeleri..... | 46 |
| 10. Gruplarda Fosfolipaz C ve Proteolitik aktivite düzeylerinin ortalama, standart sapma ve p değerleri..... | 48 |
| 11. Siderofor üretim düzeylerinin gruplar arası dağılımı..... | 50 |
| 12. Çalışılan tüm virülans faktörlerinin toplu olarak değerlendirilmesi..... | 51 |

1. GİRİŞ

Acinetobacter baumannii, non-fermentatif Gram negatif bir kokobasil olup *Moraxellaceae* ailesinin bir üyesidir. İlk olarak 1911 yılında Beijerinck tarafından taksonomik olarak sınıflandırılan *Acinetobacter*'in 32 farklı türü tanımlanmıştır. Bu türlerin çoğu çevresel olup insan hastalıklarıyla ilişkisi saptanmamıştır. Ancak son yıllarda *A.baumannii* özellikle nozokomiyal bir patojen olarak dikkat çekmektedir. Bunun yanında son 10 yıl içerisinde çok ilaca direnç geliştirmesi tüm dünyada önemini son derece artırmıştır (1).

A.baumannii deri ve solunum yollarında kolonize halde bulunabilmektedir. Çevrede toprak ve hayvanların doğal yaşam alanları olması, su ve yiyecekleri kontamine etmeleri nedeniyle insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Hemen hemen her yüzeye kolonize olmaları ve antibiyotik direnci geliştirebilmeleri *Acinetobacter* türlerini diğer enfeksiyöz bakterilerden ayırmaktadır. Enfeksiyon genellikle konak savunması bozulduğunda oluşmaktadır, ayrıca çalışmalar uzun süre hastanede kalmaya bağlı olarak kolonizasyonun arttığını göstermektedir (2, 3). *A.baumannii* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar arasında bakteriyemi, ventilatör ilişkili pnömoni, menenjit, kolanjit, peritonit, üriner sistem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, ventrikülit, infektif endokardit yer almaktadır (2).

A.baumannii enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde yaşanan zorluklar; bakterinin hastane ortamında ve tıbbi cihazlarda kısıtlı koşullar altında bile yaşayabilme ve yaygın antibiyotik direnci geliştirebilme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Farklı birtakım mekanizmalar kullanarak direnç geliştiren *A.baumannii*'de gelişen bu durum beklenmeyen fizyolojik, fenotipik ve genotipik değişikliklere neden olabilmektedir (3). Birçok antimikrobiyale karşı doğal dirençli olması ve ek olarak yeni direnç mekanizmalarını da kolaylıkla kazanabilmesi nedeniyle çok ilaca dirençli *A.baumannii* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır. Yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere hastane enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biri haline gelerek, bakteri hem Türkiye hem de dünyada önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir (4).

Günümüze kadar *A. baumannii* izolatlarıyla yapılan çalışmaların çoğunun antibiyotik direnci, tedavi protokolleri ve epidemiyolojik veriler üzerine odaklanmasına karşın bakterinin virulans faktörleriyle ilgili çalışmaların sayısı azdır (5). *A.baumannii* enfeksiyonun başlayış ve ilerleyiş mekanizmaları da henüz netlik kazanmamıştır. Toksin ve sitolizin üretimi saptanamamış olmakla birlikte, çeşitli virulans faktörleri tanımlanabilmiştir (2,4). Daha önce yapılan çalışmalarda moleküler düzeyde gösterilen virulans faktörleri arasında; dış membran proteini A (Omp A), penisilin bağlayan protein-7/8, lipolitik enzimler, lipopolisakkarit, polisakkarit kapsül, tip-1 pili, asinetobaktin ve dış membran kesecikleri bulunmaktadır. Sayılan virulans faktörleri bakterinin olumsuz koşullarda hayatta kalabilmesini sağlamakta, serum direnci, hemolitik aktivite, biyofilm oluşturma, hareket yeteneği, efluks pompası, demir kazanımı gibi kritik mekanizmalara etki ederek enfeksiyon patogenezi yönetmektedir.(4). Bununla birlikte halen, bu mikroorganizmaya karşı daha etkili kontrol ve tedavi stratejileri geliştirebilmek için virulans faktörlerinin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç vardır (2).

Hastanemiz de dahil olmak üzere ülkemizde çoğul dirençli ve hatta tümüyle dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları hastanelerde salgınlara ve önemli sorunlara yol açmaktadır. Genel virülans faktörleriyle ilgili birtakım çalışmalar olsa da; çoğul ya da tüm dirençli suşlarla, duyarlı olan suşlar arasındaki virülans özelliklerinin karşılaştırıldığı, çok sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup sonuçlar henüz netleşmemiştir. Bu çalışmada klinik önemi gittikçe artan *A.baumannii* izolatlarının virulansı ile ilişkili temel özelliklerin araştırılması, ve bu özelliklerin izolatların ilaçlara karşı direnç durumuyla karşılaştırılarak incelenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taksonomi ve Tarihçe

Acinetobacter baumannii, non-fermenter Gram negatif kokobasil olup *Moraxellaceae* ailesinin bir üyesidir ve son yıllarda nozokomiyal patojen olarak dikkat çekmektedir. İlk olarak 1911 yılında Beijerinck tarafından taksonomik olarak 32 farklı tür tanımlanmış olup, bu türlerin çoğu çevresel bakteriler olup insanlardaki hastalıklarla ilişkileri olmadığı saptanmıştır. Ancak son 10 yıl içerisinde *Acinetobacter* türlerinin çok ilaca direnç geliştirmesi tüm dünyada bu türlerin önemini son derece artırmıştır (1). '*Acinetobacter*' Yunanca orijinali 'akinetos' olarak geçen 'hareketsiz' anlamında olup motilite yeteneği olmayan fakat 'twitching' (seğirme) tarzında bir motiliteye sahip olabilen bakteri türünü tanımlar (2). Brisou ve Prevot tarafından ilk *Acinetobacter* kelimesi 1954 yılında, hareketli *Achromobacter* cinsi bakterilerden ayırabilmek amacıyla türetilmiştir ve 1971 yılında resmi olarak taksonomide yer almıştır (6). Bu cins içinde ilk olarak *Acinetobacter calcoaceticus* türü tanımlanmıştır. Bouvet ve Grimont 1986'da DNA-DNA hibridizasyonu ile *Acinetobacter* cinsi üyelerini 12 türe ayırmışlardır (7). Bunlar arasında *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* ve *A. lwoffii* bulunmaktadır. Farklı çalışmalar sonucunda ise 32'ye ulaşan genomik tür olduğu gösterilmiştir (8). Fenotipik olarak ayırt edilemeyen bir benzerlik *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, genomik tür 3 ve genomik tür 13 arasında bulunmaktadır. Farklı çalışmalar neticesinde bir çok araştırmacı bu türleri *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex olarak tanımlamıştır. Hastane infeksiyonlarında ise en sık görülen genomik tür *A. baumannii* olup, sonrasında *A. lwoffii* ve *A. johnsonii* etken olarak görülmektedir (9).

2.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler

Acinetobacter türleri gram negatif, non-fermentatif, sporsuz, hareketsiz, ince kapsül oluşturabilen bakterilerdir. Biyokimyasal özelliklerine bakıldığında, nitratları nitritlere indirgeyemeyen, oksidaz, deoksiribonükleaz ve indolü negatif olan, katalazı ise pozitif olan bir gruptur. Bakteriler seçici olmayan besiyerinde genelde kokobasil formunda iken, antibiyotik içeren bazı besiyerlerinde basil formunda

bulunabilmektedir. (10). *Acinetobacter spp.* türlerinin Gram boyama ile görülebilen morfolojileri yaşam döngüsündeki evresine göre farklılık gösterebilmektedir. Genellikle bakteriler logaritmik üreme fazında basil, üremenin duraklama fazında kokobasil olarak görülürler. Gram boyamada alkol ile yapılan dekolorizasyona direnç gösterebilmekte olup, bakteriler Gram negatif kok, kokobasil, diplokok şeklinde boyanabilmektedirler (11). *Acinetobacter* türleri koyun kanlı agar, triptik soy agar gibi laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan besiyerlerinde ve Mac Conkey/ Eozin -metilen blue (EMB) agarda iyi ürerler. Mac Conkey/ EMB agarda laktoz negatif koloniler oluştururlar. Koyun kanlı agarda, 18-24 saat inkübasyon periyodu ardından 0,5-2mm çapında düzgün, saydam ya da mat olabilen, *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan bakterilerden daha küçük, yüzeyden hafif kabarık S tipi koloniler oluştururlar. *Acinetobacter* türleri arasında sadece *Acinetobacter haemolyticus* koyun kanlı agarda hemolize neden olmaktadır (11). Gram boyanma özellikleri ve dekolorizasyona bazen direnç görülmesi nedeniyle *Neisseria* türleri ve *S. maltophilia* ile karıştırılabilmektedir. Oksidaz negatif özellik göstermeleri nedeniyle *Neisseria* ve *Moraxella* gibi diğer nonfermentatif bakterilerden ayrılırlar (12). *Acinetobacter* türlerinin ayırımında kullanılmak için, uygulanması zor olan ve uzun sürede sonuçlanan bir takım fenotipik özellikler değerlendirilebilmektedir. Bu fenotipik tanımlama özellikleri içerisinde üreme derecesi, hemoliz oluşturma, jelatin hidrolizi, glikozdan asit oluşturma ve farklı karbon kaynaklarının asimilasyonu bulunmaktadır (13).

Herelea agar, Holton's agar, Leeds *Acinetobacter* Medium gibi birtakım seçici ve ayırt edici besiyerleri ile bakteriler klinik örneklerden izole edilebilir. Bu besiyerleri safra tuzları, şeker ve bromkrezol moru içermektedir. (14). Tür düzeyinde ayırım yapabilmek için glukoz oksidatif etkisi, hemoliz özellikleri ve 44°C sıcaklıkta üreyebilme yeteneği yeterli olabilmektedir. *A.baumannii* hemoliz yapmadan, glukozu oksidasyonu yapar ve 44°C sıcaklıkta üreyebilme yeteneği ile kolayca diğer *Acinetobacter* türlerinden ayırt edilebilmektedir. Glukoz oksidasyonu negatif olan kökenlerden hemoliz yapmayan *A.lwoffii*, hemoliz yapan tür ise *A.haemolyticus* olarak adlandırılır. *A.johnsonii* diğer *Acinetobacter* türlerinden 37°C'de üreyememesi nedeni ile ayırt edilebilmektedir (14,15).

Tablo 1: *Acinetobacter* türlerinin bazı temel tanımlayıcı özellikleri

| <i>Acinetobacter</i> türleri | 44°C'de üreme | Glukoz oksidasyonu | Hemoliz |
|------------------------------|---------------|--------------------|---------|
| <i>A.baumannii</i> | pozitif | pozitif | negatif |
| <i>A.calcoaceticus</i> | negatif | pozitif | negatif |
| <i>A. haemolyticus</i> | negatif | pozitif | pozitif |
| <i>A.lwoffii</i> | negatif | negatif | negatif |

2.3. Epidemiyoloji

Acinetobacter türleri, canlılığını koruyabilmek için oldukça az gereksinime ihtiyaç duyarlar ve çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilmeleri nedeniyle doğada toprak, su, sebze, bitki gibi canlılarda saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler (16). Özellikle pastörize sütlerde, dondurulmuş gıdalarda bulunabilen bu bakteriler ve hastanelerde havalandırma sistemlerinden, hasta odalarında çeşitli yüzeylerden, hasta yastıkları ve sabunluklardan da izole edilebilirler (17). *A. baumannii* canlı kalabilmek için az miktarda besin gereksinimi duyar ve biyofilm oluşturma yeteneği ile de kolaylıkla ilaçlara karşı direnç geliştirebilmektedir (18). *Acinetobacter* türleri yaklaşık beş ay kadar bir süre ile kuru ve cansız yüzeylerde yaşayabildikleri için insan rezervuarları ve hastane ortamlarındaki kolonizasyonları sayesinde hastadan hastaya kolaylıkla geçiş yapabilmektedir (19). Vücudun nemli bölgeleri olan koltuk altı, kasık gibi yerlerde derinin normal florasında bulunabilir ve sağlıklı insanlarda %25 oranında deride *Acinetobacter* türlerini taşıdığı düşünülmektedir (19). Ağız boşluğu ve solunum yollarında da taşıyıcılık bulunmakta olup faringeal kolonizasyon %7 oranındadır (20). Hastaneye yatırılmamış bireylerde taşıyıcılık oranı oldukça düşük olmakla birlikte hastanede izlenen hastalarda özellikle salgın dönemlerinde taşıyıcılık yükselmekte ve boğaz taşıyıcılığının %7-18'e kadar yükseldiği görülmektedir. Özellikle trakeostomili hastalardan alınan sürüntülerinde bu oranın %45'e kadar çıktığı görülmektedir (20). *Acinetobacter* türleri özellikle hastane çalışanlarının ellerinde ve trakeostomi kenarlarında en sık ve en uzun süre kolonize bakterilerdir (21).

Acinetobacter hastane çalışanlarında, özellikle ciltlerine kolonize olarak taşınan en yaygın Gram negatif mikroorganizmadır (22). Sağlık çalışanlarının *Acinetobacter*

bulaşındaki rollerinin araştırıldığı bir çalışmada, doktorların ve hemşirelerin %3-23 oranında ellerinde *Acinetobacter* kolonizasyonu tespit edilmiştir (23).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde özellikle yoğun bakım ünitelerinde *Acinetobacter*'e bağlı olarak gelişen pnömoni sıklığının National Nosocomial Infection Surveillance Control (NNIS) verilerine göre yıllar içerisinde arttığı görülmüş, 1986 yılında %4, 2003 yılında ise %7 olarak bulunmuştur. 2003 yılında yoğun bakım ünitelerinde gelişen hastane kökenli pnömonilerin %6,9'u, bakteriyemilerin %2,4'ü, cerrahi alan enfeksiyonlarının %2,1'i ve üriner sistem enfeksiyonlarının %1,6'sında *Acinetobacter* türleri etken olarak saptanmıştır (24).

Avrupa'da ise *Acinetobacter* türleri ile gelişen enfeksiyonlar değerlendirildiğinde, 2011 yılında özellikle yoğun bakımlarda gelişen pnömonilerin %4,2'sinin, bakteriyemilerin %4,1'i nin ve üriner sistem enfeksiyonlarının %1,9'unun bu bakteriler tarafından oluşturulduğu görülmektedir. Enfeksiyon oranı özellikle İtalya, Romanya ve Slovakya'da yüksek bulunmuştur (25). Türkiye'de 22 merkezin katılımıyla 2001 yılında bir çalışmada yoğun bakımlarda gelişen enfeksiyonlarda %18,2 oranla *Acinetobacter* türleri tespit edilmiştir (26).

2.4. Patogenez

Geçmişte klinik önemi az, çoğunlukla saprofit bakteri olarak kabul edilen *Acinetobacter* türleri yeni antibiyotiklerin klinikte kullanılmaya başlanması, tarım, invaziv prosedürlerin yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanması, ilaç direnci-toplum ilişkisi nedenleriyle hastane kaynaklı *Acinetobacter* enfeksiyonlarının sıklığı artmıştır (16,17). *A.baumannii* dünya çapında önemli bir Nozokomiyal patojen olup buna *A. lwoffii* ve *A. haemolyticus* bakterileri de eklenmiştir (8,9). *Acinetobacter spp.* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar arasında bakteriyemi, ventilatör ilişkili pnömoni, menenjit, kolanjit, peritonit, üriner sistem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, ventrikülit, infektif endokardit yer almaktadır. Bakteri aynı zamanda deri ve solunum yollarında kolonize halde bulunabilir (19,20). Enfeksiyon konağın ilk savunması tehlikeye girerse oluşur, ancak çalışmalar uzun süre hastanede kalmaya bağlı olarak kolonizasyonun arttığını göstermektedir. Kolonizasyon enfeksiyon oluşumundan çok daha sık görülmektedir, yapılan çalışmalar patojen suşların immun baskılanmış hayvanlarda %75-100 oranlarında ölümcül

enfeksiyonlara neden olduğunu göstermektedir. *A.baumannii* aynı zamanda neonatal yoğun bakım ve pediatrik onkoloji servislerinde de bakteriyemi nedeni olup, aynı zamanda toplum kökenli menenjit ve endoftalmit etkeni de olmaktadır. Süpüratif enfeksiyonları içerisinde beyin, akciğer ve tiroid abseleri; yara ve cerrahi travmalara bağlı sekonder enfeksiyonlar, gözün pürülan enfeksiyonları yer alır (24,25). Nozokomiyal etkenler içerisinde *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Enterococci*, *Serratiae* ve *Enterobacter*'den sonra 9. sıradadır; %34 mortalite ile seyretmekte olup, hastane kaynaklı enfeksiyonların %43'ünden sorumludur. İnsandan izole edilen nonfermenter bakteriler içerisinde *Pseudomonas aeruginosa* sonrasında 2. sırada sıklıktadır, insidanslarının artması mortalite oranlarını oldukça artırmaktadır. *A.baumannii* türlerinin çok sayıda fatal seyirli toplum kökenli pnömoni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *A.haemolyticus* ise endokardit, verotoksin üretimi sonucu ise kanlı ishal oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (2, 24).

Acinetobacter spp. bakterilerine ait patojenite mekanizmaları çok az araştırılmış ve tam olarak anlaşılammıştır. İnsan enfeksiyonlarındaki enfektif doz henüz tespit edilememiş olup, 40 klinik izolat ile farelere intraperitoneal enjeksiyon yapılan bir çalışmada LD50 değerinin her fare için 103-150 canlı hücre arasında olduğu tespit edilmiştir. En çok çalışılan tür *A.baumannii* olmasına rağmen bu tür için de enfeksiyonun başlayış ve ilerleyiş mekanizmaları henüz netlik kazanmamıştır. Toksin ve sitolizin üretimi bilinmemekle birlikte birkaç virulans faktörü tanımlanabilmiştir. Ancak *A.baumannii* ve *A.baylyi* ile yapılan karşılaştırmalı genomik çalışmalar pilus biyogenezi, demir alımı ve metabolizması, quorum sensing ve tip 4 sekresyon sistemine ait genleri tanımlamıştır (2, 27). Daha etkili kontrol mekanizmaları bulunabilmesi için virulans faktörlerinin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç görülmektedir.

2.5.Virülans Faktörleri

Fırsatçı patojen olan *A. baumannii*, son yıllarda giderek artan bir öneme sahip olmasına karşın bakterinin virulans faktörlerine dair bilgiler sınırlı kalmıştır (27). Genel olarak virulansının düşük olduğu kabul edilmekte olup ve bağışıklık sistemi normal olan bireylerde nadiren enfeksiyona neden olmaktadır fakat özellikle yoğun bakımlarda fırsatçı hastane enfeksiyonlarına neden oldukları bilinmektedir (28).

Acinetobacter türleri nadiren toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak da karşımıza çıkmaktadır. Özellikle *A. baumannii*'ye bağlı gelişen toplum kaynaklı pnömonilerde mortalite oranı yüksek seyretmektedir. Bu durum *A. baumannii*'nin yüksek patojeniteye sahip olabileceğini düşündürmektedir (29). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, *A.baumannii*'nin daha dirençli ve virülan hale geldiği belirtilerek temel nozokomiyal bir tehdit oluşturduğu görülmektedir(3).

2.5.1 Hücre yüzey yapısı ve enzimleri

Genel olarak bakterilerin hücre yüzey özellikleri ve oluşturdukları ürünler konak dokularında hasara neden olmakta ve bu durum enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. *A. baumannii*'de bulunan lipopolisakkarid O antijeni, yapısındaki tekrarlayan deoksiamino şekerler ve bu polimerlerin çoğundaki yapısal dallanmalar nedeniyle hidrofobik özellik göstermektedir (3). Bakterideki bu özellik bakteriyel adezyonun önemli bir belirleyicisidir. Başarılı bir enfeksiyon oluşması için bakterinin konak hücresine başarılı bir şekilde yapışması gerekmektedir. Bu hidrofobisite bakteriyi fagosite edilmekten korur ve bakterinin farklı polimerlere bağlanmasında önemli rol oynamaktadır (2). Bu konu ile ilgili çalışmalarda, *Acinetobacter* RAG-1 suşunun ince fimbria ve polisakkarid kapsül benzeri yapıları kullanarak, insan ağız içi epitel hücrelerine hidrofobik yüzey bileşenleri aracılığıyla tutunduğu gösterilmiştir. Hücre yüzey hidrofobisitesi ve kollajen, fibronektin, fibrinojen ve vitronektin gibi hücrel matriks proteinlerine bağlanma ile ilişkili sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu hidrofobisiteyi sağlayan faktörlerin patogeneindeki rolleri, hayvan deneyleri ve bunlarla kombine moleküler genetik yöntemler ile çalışılarak henüz doğrulanmamıştır (3). Hidrofobisite bakterinin katater ve protez gibi yüzeylere yapışma kabiliyetini de sağlamaktadır. Bakteri suşlarının hidrofobik özellikleri yüzey yapısına bağlıdır. Hücre yüzeyinin pürüzlü yapısı ya hidrofobisiteyi artırır ya da tam tersi etki eder. *Acinetobacter* türlerine ait hücre yüzeyinde bulunan protein uzantılarının varlığı hidrofobisite kazanmasına neden olur. Yeni bir çalışma elektron mikroskopik olarak *A. johnsonii* S35 ve *A. junii* S33 suşlarında hücre yüzeyine ait blister benzeri uzantıların varlığının diğer bakteri hücreleri ile birlikte koagregasyona izin verdiğini göstermiş, düz yüzeye sahip mutant suş *A. johnsonii* IAM1517 ise agragasyon yapamadığı gözlenmiştir (2).

Yüzey hidrofobisitesi kolonizasyon faktörlerine, fimbria, diğer dış membran komponentlerine ve konak hücrelerine bakteri hücrelerinin adezyonunu sağlayan adezyon enzimlerine aracılık etmektedir. Örneğin *Acinetobacter*'deki üreaz aktivitesi bakterinin fare midesine kolonizasyonuna aracılık eder. Üreaz aynı zamanda bakterinin insan midesinde hipoklorhidrik ve aklorhidrik yüzeyine kolonize olarak inflamasyonun başlamasına yardımcı olur. Bakteri hücre yüzeyindeki polisakkarid slime tabaka hidrofobikliği sağlamaktadır. Bakteri virülansında önemli olan diğer enzimler ise esteraz , aminopeptidaz, asit fosfatazlardır. Esterazlar kısa zincirli yağ asitlerine karşı güçlü hidroliz etme aktivitesine sahip olduğundan özellikle lipid dokulara zarar verirler. Hidrolitik enzimler bakteriye çok güçlü hemolitik aktivite sağlarlar. Üzerinde en çok çalışılan hidrofobik enzim *P.aeruginosa*'da plcS tarafından kodlanan fosfolipaz C(PLC)-H'dir. Asidik olup çok güçlü hemolitik aktiviteye sahiptir. plc-N tarafından kodlanan PLC-N daha basit olup hemolitik aktivitesi yoktur. Yapılan son çalışmalarda fosfolipaz C (plc) geninin 2 kopyasının %50 benzerlik ile *A.baumannii* bakterisinde de olduğunu ortaya koymuştur. Bu lipazların benzer fonksiyona sahip oldukları görülmüş fakat tam olarak aydınlatılamamıştır (1,2,5). Ayrıca fosfolipaz C yapısındaki bir enzimin epitel hücrelerine olan toksisiteye katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (30). Hořtacká ve Klokočnicková tarafından fosfatidilkolin ve sfingomyelin salınımının lökosit hücrelerine toksik etkide bulunduğu gösterilmiştir (2).

Russo ve ark., *A.baumannii*'nin virülans faktörlerini araştırdıkları çalışmalarında, AB307-0294 suşunda oluşturulan transpozon mutantları ile bakterinin in vitro vücut asitinde üremesini sağlayan genetik yapıları araştırarak, kapsül polimerizasyonu ve oluşumu ile ilişkili iki genin (protein tirozin kinazı kodlayan *ptk* ve polisakkarid-dış atım dış membran proteinini kodlayan *EpsA*) önemini ortaya koymuşlardır. Kapsülü bulunan fenotipin insan asit sıvısında rahatlıkla üreyebildiği ve hem insan serumunda hem de farelerin yumuşak dokusunda canlı kalmalarının arttığı; fakat kapsülü olmayan mutantların tamamen elimine edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada K1 kapsül yapısının bakterinin virülansında önemli olduğu bildirilmiştir (3).

2.5.2. Toksik slime polisakkaritler

A.baumannii izolatları, yapısı ve antijenik özellikleri iyi bilinen, klinik ve tanısal önemleri belirlenmiş olan farklı birtakım lipopolisakkaridler (LPS) üretmektedir. LPS yapılarının, serum direnci, konağın endotoksine karşı oluşturduğu immün yanıt ve klinik semptomlar ile ilişkili virülans faktörleri olabileceği düşünülmektedir (3). Toksik slime polisakkaritler genellikle büyümenin ekspanansiyel fazında üretilirler ve D-glucuronic acid, D-mannose, L-ramnose and D-glucose gibi glukoz yapı bloklarını oluştururlar. Bu polisakkaritler nötrofillere karşı toksik etkiye sahiptir. Konak immun sistemini bozmadan nötrofil migrasyonunu ve fagositozu önlerler. Oluşan enfeksiyonlarda etkili bir kontrol mekanizması geliştirebilmek için bu yapıları tam olarak anlamak gerekmektedir (2).

2.5.3. Verotoksinler

İlk olarak Grotius ve ark. *Acinetobacter (A.haemolyticus)* türlerine ait verotoksin salınımını tanımlamışlardır. Verotoksinler birçok enterik bakteri özellikle *E.coli* ve *Shigella dysenteriae* tarafından salgılanan kanlı ishal ile ilişkili toksinlerdir. Toksinler hücre ribozom sisteminde protein alt sınıfından RNA N-glycosidases ile ilişkili olup doğrudan protein sentezinin inhibisyonuna sebep olurlar. Verotoksinler vtx-1 ve vtx-2 olarak 2 antijenik gruba ayrılır ve bu gruplar önemli sayıda genotipik varyantlar içermektedir. *A.haemolyticus* tarafından üretilen bu toksinin mekanizması çok iyi anlaşılammıştır. Lambert ve ark. *A.haemolyticus* tarafından, üretilen vtx-2 toksini ile bakterinin bağırsak hücrelerine horizontal gen transfer yolu ile çok hızlı transforme olduğu ileri sürülmüştür. *E.coli* ve diğer bakterilere ait verotoksinler ile *Acinetobacter* türlerine ait toksinler temel yapı, kimyasal komponent ve patojenite açısından aynı özellikleri göstermektedir (2).

2.5.4. Demir kazanım mekanizmaları

Bakteriler enfeksiyonu devam ettirebilmek için çoğalmaları esnasında gereksinim duydukları demiri konak hücre ile yarışarak sağlayabilmeye çalışırlar. Demir, laktoferrin ve transferrin gibi demiri bağlayabilen bileşiklerde de bulunmakta olup, ortamda bulunmasına rağmen bakterinin çoğalması sırasında hazır olarak mevcut

değildir (2). Bu nedenle mikroorganizmalar konak hücrede yaşayabilmek için, yüksek afiniteli demir kazanım sistemlerini eksprese ederek öncü demir moleküllerini kullanabilme yeteneklerini gösterirler. Demir konsantrasyonu önemli bir çevresel sinyal olup, temel hücresel fonksiyonları kodlayan bazı genlerin ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilişkilidir. Sideroforlar bu amaçla bakteriler tarafından üretilirler, bakterinin demir kazanımını sağlayarak yine aynı zamanda, enfekte konakta hücre hasarına da neden olarak bir virülans faktörü özelliği gösterirler (3). Sideroforlar protein yapısında olup, bakterinin demiri bağlayarak hücre içine alımını sağlayan yapılardır. Bakteriler bu demir bağlayan proteinler ile serbest ekstrasellüler demir konsantrasyonunu azaltarak savunma mekanizmalarını sağlarlar. Vücutta serbest demir 10^{-8} M konsantrasyonda bulunmakta fakat bakterinin konak hücrede yaşayabilmesi için gerekli demir konsantrasyonu 10^{-6} M dir. *A.baumannii* suşları, demir kazanımını siderofor aracılı ve/veya hemin kazanım fonksiyonlarını eksprese etme gibi farklı yollarla sağlayarak bağımsız bir demir kazanım sistemi oluşturmuşlardır ve bu sayede konak hücreye kolonize olmayı başarabilmektedirler (3). Bakteriye siderofora aerobaktin adı verilir. *Acinetobacter* sideroforu acinetobactin adını alır ve histidin dekarboksilasyonu sonucu oluşan amin histidin yapılarından oluşmaktadır. Bakteri hücrelerine demir alımı ferrik regülasyon proteini tarafından transkripsiyonun baskılanarak siderofor sentezinin artırılması yolu ile düzenlenir (2).

Moleküler çalışmalarda, asinetobaktin ile ilişkili 18 açık okuma bölgesi (ORF) içeren bir bölge *A.baumannii* kromozomunda gösterilmiştir. Bu bölgede yer alan *bauA* asinetobaktin transportundan, *basD* asinetobaktin biyosentezinden, *barA* ve *barB* ise siderofor salınımından sorumlu genlerdir. Klinik izolatların analizi neticesinde, farklı *Acinetobacter* türlerinin farklı demir alım sistemlerini eksprese etme ve farklı biyofilm yapıları oluşturma yeteneklerine sahip olduklarını göstermiştir. Farklı çalışmalarda siderofor biyosentezi ve salınımından sorumlu genlerde oluşan delesyonlarda, suşlarda hemin ile ilişkili demir kazanım sistemlerinin devreye girdiği gösterilmiş olup, bu durum *A.baumannii*'nin demir elde etmek için oldukça başarılı bir sistem içerdiğini göstermektedir (3).

2.5.5. Dokulara yapışma ve hasar oluşturma mekanizmaları

Dış membran proteinleri ("Outer membrane proteins") (OMPs): Bakteride konak hücre yüzeyine bağlanma, fimbria ve bakteriye ait farklı membran komponentleri ile olmaktadır (3). Dış membran proteinlerinin bazı Gram negatif bakterilerde patogeneze ve konak hücreye adaptasyonda yine aynı zamanda antibiyotik direnci gelişiminde temel rolleri olduğu bilinmektedir (2). *A.baumannii* 'yüzeyinde bulunan OmpA (AbOmpA) proteini, 38 kDa moleküler ağırlığında olup küçük maddelerin geçişinde rol oynamaktadır. Daha önceki yıllarda Omp38 olarak bilinen bu protein, mikroorganizmanın epitelyal hücrelere yapışıp invazyonu gerçekleştirmesinden sorumludur. Ökaryotik hücrelere direkt olarak bağlanan AbOmpA, sitokrom c ve apoptozu indükleyici faktör (AIF) gibi proapoptotik moleküllerin salınımı sonucu ürettiği sinyallerle, epitel hücrelerinin apoptozuna neden olmaktadır (3). OmpA ailesine ait dış membran proteinleri (OMPs) çeşitli *Acinetobacter* suşlarında karakterizedir. Vila ve ark. *A. radioresistens*, *A. baumannii* ve *A. junii* suşlarına ait OmpA protein genom sekanslarında benzerlik olduğunu saptamışlardır. OmpA proteinleri epitel hücre apoptosisini indükler, gastrin ve interlökin B gen ekspresyonunu stimüle eder. Yeni bir çalışmada Vallenet ve ark. *A.baylyi* OmpA proteininin emülsifiye edici aktiviteye sahip olduğu ve aynı zamanda her *Acinetobacter* suşunda OmpA proteinini sadece bir genin kodladığını bildirmişlerdir. Diğer bir deyişle bu proteinler aminoasitlerinin %89 dan fazlasını paylaşarak aynı kromozomal bağlama sahip olurlar. *Acinetobacter* türleri konakçı hücreleri öldüren OmpA proteini ile çevrilidir. Enfeksiyon sırasında ökaryotik hücrelere bağlanarak nükleusa transloke olur ve hücre ölümü gerçekleşir.(2)

Konak ile patojen arasındaki etkileşim sonucu enfeksiyon veya kolonizasyon oluşması için etkenin hücre duvarına tutunması gerekir. Yapılan çalışmalar sonrasında *Acinetobacter* RAG-1 suşu ve *A.calcoaceticus* suşunun epitel ve lenfositlere yapıştığı gösterilerek insan hücreleri ile etkileşimi kabul edilmiştir. *A.baumannii* klinik izolatlarıyla yapılan sonraki çalışmalar da ise insan eritrositleri ve bronşiyal epitel hücrelerine tutunduğu belirlenmiştir (31).

De Breij ve ark. *A.baumannii* ATCC 19606 suşunun abiyotik yüzeylere, CsuA/BABCDE şaperonu öncülüğünde pili çeviri sistemini eksprese ederek yapıştığını göstermişlerdir. Bu suşun, CsuA/BABCDE şaperonundan bağımsız olarak

ürettiği kısa ve ince pililer ile insan solunum sistemi hücreleri gibi biyotik yüzeylere yapıştığı, CsuA/BABCDE aracılı pilusun ise abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumuna katkısı olduğunu ifade etmişlerdir (3). Farklı bir çalışmada ise, PER-1 tipi beta-laktamaz üreten *A.baumannii* klinik izolatlarının hücrelere daha iyi yapıştığı, ancak bakterinin PER-1 tipi beta- laktamaz üretimi ile dokulara adezyonu arasındaki ilişkinin önemi tam olarak aydınlatılamamıştır (32).

2.5.6. Quorum sensing mekanizması

Mikroorganizmaların patogenezinde, yeni çevreye karşı adapte olmak ve çevreden gelen uyarıyı algılayarak bunlara karşı yanıt geliştirmek önemli bir yere sahiptir. Bakteri birçok farklı mekanizma ile pH, ozmolarite, besin kaynağı ve popülasyon yoğunluğu gibi çevresel şartlardaki değişiklikleri algıladığında, metabolizmasında birtakım değişiklikler yaparak yeni şartlara kendini adapte etmeye çalışır. “Minimum popülasyon birimini algılama” olarak ifade edilen “Quorum Sensing (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 (3).

Oto-indükleyiciler, transkripsiyonel regülatör proteinlere bağlanarak ve böylece organizmada gen ekspresyonu aktivasyonu/regülasyonu yaparak işlev görürler. Açık Homoserin Laktonlar (AHL) aracılığı ile meydana gelen QS süreçlerinin sonunda AHL üreten komünitenin faydasına olan bazı fenotipler ortaya çıkmaktadır. Bu fenotiplere örnek olarak virülans faktörlerinin üretimi, motilite, nodülasyon, plazmid transferi, antibiyotik üretimi, bioemülsan üretimi, bioluminesans ve biofilm oluşumu verilebilir. Gram negatif bakterilerdeki tipik AHL sisteminde LuxI ve LuxR ailelerine mensup iki protein görev almaktadır. LuxI tipi proteinler, LuxR tipi aynı aileden proteinlerle direkt olarak etkileşime giren ve bunlarla bir kompleks yapan AHL’ları sentezler. Bu kompleks daha sonra *lux*-box adı verilen spesifik bir promotör dizisine bağlanır ve QS hedef genlerinin ekspresyonunu regüle eder (33).

Acinetobacter suşlarının %63'ü birden fazla AHL molekülü üretmektedir. Bununla birlikte bu AHL moleküllerinin hiçbirisi genus içindeki bir tek türe spesifik değildir. Ortamın besin koşulları, hücrel iletişimi ve quorum sensing ile kontrol edilen genlerin ekspresyonunu etkilemektedir. *Acinetobacter* quorum sinyalleri, virülan ve non-virülan suşlar arasında homojen olarak dağılmamaktadır. Bu nedenle quorum sinyallerine bakarak virülan/non-virülan ayrımı yapmak zordur (33).

Günümüzde, çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter*'ler ile savaşmak için alternatif stratejiler geliştirilmesi gerektiği açıktır QS'i inhibe eden ya da QS ile düzenlenen genlerin prematür ekspresyonuna neden olan stratejiler bazı bakteriyel hastalıklarda geniş spektrumlu bir kontrol sağlayabilirler. Quorum sensing sinyallerinin inhibisyonunu ve bu sayede hem biofilm oluşumunu hem de muhtemel diğer virülans genlerini engellemeyi hedefleyen yaklaşımlar yeni bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Quorum sensing'in regülasyonunu bozmak ya da bu süreci engellemek için bazı bitki ekstraktları, sentetik bileşikler, ve AHL parçalayıcı enzimler kullanılabilir. *Acinetobacter* türlerinde quorum sensing'in anlaşılması ve virülanstaki muhtemel rolünün bilinir hale gelmesiyle birlikte bu infeksiyonları kontrol edebilecek yeni biyomoleküller geliştirmek mümkün olacaktır (33).

2.5.7. Biyofilm oluşumu

Biyofilm kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek tarafından ortaya konmuştur. Uzun yıllar konuyla ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır ancak 1978 yılından sonra biyofilmler ve özellikleri ile çalışmalar artarak bildirilmeye başlanmıştır (34). Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Bakteriler ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (35).

Acinetobacter spp. yüksek derecede kurutulmuş ortamlardaki abiyotik yüzeylerde uzun süre canlı kalabilme yeteneğine sahiptir. Örneğin Javad ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 39 adet klinik izolat kullanılmış olup bu izolatların cam lameller üzerindeki canlı kalabilme süreleri araştırılmış ve 27 gün *Acinetobacter* izolatlarının

bu cam lameller üzerinde canlı kalabildiği gözlenmiştir. Bu sonuç Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere oranla çok daha fazla yaygın bir durumdur (36). Yine yapılan bir çalışmada klinik *Acinetobacter spp.* izolatları toplanmış ve biyofilm oluşturma yetenekleri olanların özellikle katater ile ilişkili üriner sistem enfeksiyonu, katater ile ilişkili kan dolaşım sistemi enfeksiyonu ve şanta bağlı menenjit enfeksiyonları oluşmuş hastalardan elde edilen izolatlar olduğu saptanmıştır (36). *A.baumannii* için daha önceleri önemsenmeyen bu konu, zaman geçtikçe enfeksiyonların ciddiyeti ve sıklığı artmaya başladıkça önem kazanmış, bakterinin biyofilm oluşturma yeteneği ve bunu hangi mekanizmaları kullanarak gerçekleştirdiği ile ilgili bilgiler 2003 yılında açıklık kazanmaya başlamıştır (3).

Bakterinin klinik olarak solunumsal epitel hücrelerine ve polistren abiyotik yüzeylere yapışma yeteneği ile antibiyotik direnç geliştirme yeteneği arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (36). Çok ilaca dirençli izolatların daha fazla biyofilm oluşturduğu ve bunun bakteriye ait diğer membran proteinlerinin birikimi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Dirençli *A.baumannii* suşlarında PER-1 beta-laktamaz geni taşıyanların biyofilm oluşturma ve epitel hücrelere yapışma kapasitesinin bu geni içermeyen izolatlara göre daha fazla olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, önceden aminoglikozid türü bir ilaç kullanımının da biyofilm üretimini artırarak kolonizasyon ve enfeksiyon riskini de yükselttiği gösterilmiştir (3).

Acinetobacter yüzeyindeki ve hücresel komponentlerindeki çeşitlilik nedeniyle biyofilm oluşumu ve olgunlaşmasının düzenlenmesi çok basamaklı süreç şeklinde yürütülmektedir. Bir yüzeye bakterinin yapışarak biyofilm oluşturma ve başlatma süreci şans eseri oluşmuş bir durum değildir, ciddi anlamda moleküler düzenlenmeler içermektedir. Biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler içerisinde besin durumu, bakteriyel uzantılar (pili ve kamçı), bakteriyel yüzey bileşenleri (dış zar proteinleri, adhesinler), quorum sensing ve makromoleküler salgıları (polisakaritler, yani, nükleik asitler ve) sayılabilir (36).

Acinetobacter baumannii izolatlarının abiyotik polistren ve cam yüzeylerde biyofilm oluşturabilmesi için pili üretimine ihtiyacı vardır (36). Bu pililer csuA/BABCDE şaperonu öncülüğünde pili çeviri sisteminin eksprese edilmesi ürünüdür (37). Bakterideki uç adezini kodlayan gen olan csuE geninin inaktivasyonu pili üretimi ve biyofilm oluşmasının sonlanmasına neden olmaktadır. Bu gözlem,

csuA/BABCDE ilişkili pili sisteminin biyofilm oluşumunun başlangıç safhalarını yönettiğini, bakterinin abiyotik yüzeylere yapışmasında ve biyofilm oluşumunu başlatmasında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Bu operon iki adet düzenleyici sistem olan sensör kinazı kodlayan bfmS ve yanıt düzenleyici sistemi kodlayan bfmR tarafından regüle edilmektedir. Transkripsiyonel ve translasyonel analizler bfmR inaktivasyonunun cfu operon ekspresyonunun kaybına neden olarak pili sentezi ve plastik yüzeylerde biyofilm oluşumunu engellediğini göstermiştir (36). ‘Bap’ bakterinin hücre yüzeyinde bulunan ve flowsitometri ve immunofloresan yöntemlerle tanımlanabilen bir proteindir. *Staphylococcal* biofilm ilişkili protein (Bap) homologu olan bu proteinin sentezinde transpozon inaktivasyonu sonucu cam yüzeylerde biyofilm maturasyon aşamasında aksaklıklar olduğu gözlenmiştir (36). Biyofilm formasyonunun düzenlenmesinde etkili olan bir diğer durum *A.baumannii* bakterilerinde bulunan metal katyonlardır. *A.baumannii* 19606 tip suşunun kimyasal tanımlı demir-şelat kompleksleri oluşumu altında üretildiği ortam sonucunda 2,2'-dipyridyl ve ethylenediamine-di-(o-hydroxyphenyl) acetic acid gibi sentetik demir şelatörlerinden etkilenecek çok daha fazla oranda biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir (38).

Biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde ve ekstrasellüler sinyallerin algılanmasında etkili olan bir diğer yol ise quorum sensing'dir. *Acinetobacter* M2 suşu tarafından abaI gen ürünü olan acyl-homoserine lactone sentezi olmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar, sentezlenen bu ürünlerin biyofilm oluşumunun daha sonraki basamaklarında etkili olduğunu göstermektedir (39).

2.5.8. Hareket

Bakteriyel motilite "swimming" (yüzme), "swarming"(yayılma), "twitching" (seğirme), "gliding" (süzülme) ve "sliding"(kayma) adları verilen hareket tiplerini içeren ve çok farklı karmaşık süreçleri olan bir sistemdir. Bu mekanizmalar aynı zamanda hareket için flajella, pili gibi farklı uzantılara ihtiyaç duyarlar. Swimming ve swarming hareketleri flajellalar ile düzenlenir ve katı yüzeylerde ortaya çıkar. Twitching hareketi ise tip IV pili sistemi tarafından düzenlenmektedir. Gliding hareketi protein yapıda olan hücre yüzeyindeki adezin hareket motorları sayesinde olmaktadır. Sliding hareketi ise hücre yüzey özellikleri ile ilişkili olup genişleme

anlamına gelmektedir (40). *Acinetobacter* cinsi geçmişte flagella kaybına bağlı olarak hareketsiz olarak tanımlanmış olsa da çeşitli çalışmalar *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleksine ait hareket yeteneğinin olduğunu göstermiştir (41). 1975 yılında Henrichsen and Blom tarafından yapılan bir çalışmada fimbria varlığı ile *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleksinin hareketi arasındaki korelasyon gösterilmiştir (42). Twitching hareketi bulunan suşların karakteristik olarak daha kalın bir polar fimbriaya sahip oldukları hareketsiz olan suşların ise daha ince bir peritriköz fimbriaları bulunduğu tespit edilmiştir. *A.baumannii* suşlarına ait twitching hareketi son yıllarda daha birçok yayında bildirilmiştir (43, 44, 45, 46,47, 48, 49, 50). Swarming hareketi ise Barker ve Maxted tarafından yapılan bir çalışmada 1975 yılında bildirilmiştir (51). Motilite hareketinin genetik temeli motilite ilişkili genlerin tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır. *Acinetobacter* suşlarındaki hareket yeteneğinin yapısal temeli pili gibi bir ekstrasellüler uzantıya dayanmaktadır. PilA, pilD ve pilT mutant suşlarda twitching yeteneği olmadığı gösterilmiştir (44). Yine aynı zamanda motilite yeteneği bakteriyeye ait diğer hücresel karakteristik özellikler, oksidatif stres, pili sistemi gibi kompleks özelliklerin biraraya gelmesiyle düzenlenmektedir (46,52). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda *A.baumannii* strain ATCC 17978 suşuna ait hareket yeteneğinin mavi ışık ve demir kısıtlaması ile inhibe edildiğini göstermektedir (53,54). Demir seviyelerinin azalmasının *A. baumannii* bakterisinin hareketi ile ilişkili olan tip IV pili sistemini kodlayan genlerdeki regülasyonda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (54). *Acinetobacter baumannii* izolatlarında hareket ile patojenite arasındaki ilişki tam olarak belirlenememesine rağmen 2002’de Mattick tarafından yapılan bir çalışmada tip IV pili-twitching hareketinin tip IV pili sisteminin bakteriyel virulansa etki etmesi nedeniyle virulansa katkıda bulunacağı bildirilmiştir (40). Yine aynı zamanda 2014 yılında Bayrı Eraç ve ark. yaptığı *A.baumannii* türlerindeki çeşitli virulans faktörlerinin araştırıldığı çalışmada swarming hareketinin patojenite ile ilgili özellikler arasında yer aldığı bildirilmiştir (4).

2.5.9. Hastane Ortamında Sağkalım

Patojenik mikroorganizmalarda, sınırlı besin bulunan ortamlarda ve kuru yüzeylerde canlılığını sürdürebilme yeteneği bulunmakta olup, bu durum bakterinin

doğal ve tıbbi ortamlarda canlılığını koruyarak yayılmasına da yardımcı olmaktadır (17,18,21). Bu durumda bakteri, hastane ortamlarında bulunan cihazlarda uzun süreli kolonize olmakta ve bunun sonucu olarak da salgınlar ortaya çıkabilmektedir. *A.baumannii* tıbbi cihazlarda, hastalara ait yatak ve yastıklarda, kullanılan eldivenlerde, yoğun bakım ve servislerde bulunan bir takım elektrikli ekipmanlarda ve tıbbi giysiler gibi abiyotik yüzeylerde günlerce hatta haftalarca sürebilecek bir canlı kalabilme yeteneğine sahiptir (19, 21). Tüm bu veriler, immun sistemi baskılanmış hastaların çok bulunduğu özellikle yoğun bakım servislerinde meydana gelen nozokomiyal salgınlarda *A.baumannii* türlerinin bu ortamlardaki inatçı sağkalımının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bakterinin yüksek oranda antibiyotik direncine sahip olabilmesinin yanında doğal ve hastane ortamlarında uzun süre canlı kalabilme yeteneği, enfeksiyonun kontrolünü ve tedavisini güçleştirmektedir (3).

2.6. Antibiyotik Duyarlılığı ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

A.baumannii izolatlarında artan antibiyotik direnci, bu bakteri tarafından oluşturulan enfeksiyonların kontrolünü güçleştirmiş ve bakterinin eradikasyonunda zorluklar ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar 1980'li yıllardan sonra *A.baumannii*'nin klinik izolatlarında antimikrobiyal direncinin giderek arttığını göstermektedir (55). *A.baumannii* ampisilin, amoksisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere karşı doğal dirençlidir. Son yıllarda *Acinetobacter* izolatlarında büyük oranda aminopenisilinler, üreidopenisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler, aminoglikozidler, kinolonlar, kloramfenikol ve tetrasiklinler gibi sıkça kullanılan antibakteriyel ajanlara karşı direnç geliştirdiği görülmektedir. *Acinetobacter* türlerinde görülen bu çoklu ilaç direnci bu bakterilerin neden oldukları enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenemlerin (imipenem, meropenem) yoğun olarak kullanılmaya başlanmasına neden olmuştur. Bununla birlikte günümüzde *Acinetobacter* izolatlarında yüksek oranda karbapenem direnci görülmeye başlanmış olup, bu dirençli izolatlar tüm dünyadan bildirilmekte ve bazı *Acinetobacter* izolatlarında ise tüm geleneksel antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi bulunmaktadır (56).

Acinetobacter türlerinde ortaya çıkan çok ilaca karşı gelişen direnç ("Multidrug resistant" MDR) bakterinin üç ya da daha fazla antibiyotik grubuna karşı geliştirdiği direnci ifade etmektedir. Bu antibiyotik grupları; geniş spektrumlu sefalosporinler

(sefotaksim, seftriakson, seftazidim, sefepim), antipsödomonal karbapenemler (imipenem, meropenem, doripenem), ampicilin/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam, tikarsilin/klavulonik asit, antipsödomonal kinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin), aminoglikozidler (gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin), trimetoprim/sulfametaksazol, polimiksinler (kolistin, polimiksin B) ve tetrasiklinler (tetrasiklin, doksisisiklin, minosiklin)'dir. Yaygın/ekstrem ilaca dirençli ("Extreme-drug resistant" XDR) bakteri tanımlaması, iki ya da daha az antibiyotik grubuna duyarlı olmak anlamına gelmektedir. Tüm antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli ("Pan-drug resistant" PDR) olmak ise polimiksinler dahil kullanılan tüm antibiyotiklere gelişen direnç olarak tanımlanmaktadır (57).

2.6.1 Beta-laktam antibiyotiklere direnç

A.baumannii'nin beta-laktam antibiyotiklere karşı direncinden sorumlu önemli mekanizmalardan biri kromozom veya plazmid kontrolünde betalaktamaz enzimlerinin üretilmesidir. Antibiyotiğe özgü dış membran porinlerinin kaybı ve penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklikler de, *A. baumannii*'nin beta-laktam direncinde rolü olduğu bilinen diğer mekanizmalardır (57).

Doğal kromozomal beta-laktamazlar iki gruba ayrılmıştır. *A.baumannii* kompleksine ait doğal beta-laktamazlar izolatların neredeyse tamamında tanımlanmış olan OXA-51 benzeri beta-laktamazlar ve ampC-tipi sefaloporinazlardır (58). AmpC tipi sefolosporinazlar birinci kuşak sefalosporinleri, üreidopenisillinleri ve aminopenisillinleri etkili bir şekilde hidrolize ederler. Ancak bu enzimlerin bazal düzeylerde salınımı geniş spektrumlu sefalosporinlerin *Acinetobacter* türlerine karşı olan etkilerini azaltmazlar. blaAmpC geninin üst kısmına ISAbal olarak gösterilen Inersion Sequence (IS) elementinin eklenmesi yüksek düzeylerde beta-laktamaz ekspresyonunu artırır. Bunun sonucunda sefotaksim (CTX) ve seftazidim (CAZ) gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı yüksek düzeyde direnç gelişimi görülürken, karbapenemlere karşı olan direnci etkilemez (59). ISAbal *Enterobacteriaceae* veya *P. aeruginosa* gibi diğer organizmalarda günümüze kadar yapılan çalışmalarda bulunamamıştır fakat *Acinetobacter* türlerinde birkaç kopya olarak bulunur (60).

Birçok *A. baumannii* türlerinde sınıf D oksasilinazlardan OXA-51/OXA-69 enzim kümesi olarak bilinen ikinci bir doğal beta-laktamaz üretimi görülmektedir (61).

Çeşitli coğrafik bölgelerde şu ana kadar en az 18 OXA-51 varyantı saptanmıştır. Bu varyantlar 1-15 amino asit modifikasyonu ile birbirinden ayrılır. *A.baumannii* OXA-51 enzim kümesi üyelerinden sadece OXA-69 karbapenemler dahil tüm beta-laktamlara dirençte etkin rol oynamaktadır. *A.baumannii* OXA-51 benzeri enzim analizleri, tüm izolatlarda blaOXA-51 benzeri gen bulunmasına rağmen sadece ISAbal ile komşu olan blaOXA-51 benzeri genleri taşıyan suşların karbapenem dirençli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle ISAbal blaOXA-51 için düzenleyici gibi görünmektedir (58).

Acinetobacter türlerinde plazmid aracılı kazanılmış beta-laktamazlar ilk önce TEM, sonra da SHV enzimlerinin gösterilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu enzimler nedeniyle ampisilin, karboksipenisilinler ve üreidopenisilinlere karşı direnç geliştiği düşünülmektedir fakat geniş spektrumlu sefalosporinler ve karbapenemlere karşı bunların aktif olmadığı belirtilmiştir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerini (GSBL) *Acinetobacter* türlerinde saptamak pek kolay değildir. Bu enzimleri saptamak için yapılan ilk çalışmalarda Türkiye'den PER-1, Fransa'dan VEB-1, Çin'den SHV-12 ve Japonya'dan CTX-M tipi enzimler bildirilmiştir (58). *A. baumannii* türlerinde Ambler sınıflandırmasında A grubunda bulunan TEM-1, PER-1, VEB-1, SHV-12- TEM-116, TEM-92, CTX-M-2, CTX-M-43 gibi genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar önemli yer tutmaktadır (62).

Metallobetalaktamaz (MBL) üretimi *A.baumannii* türlerinde antibiyotik direncinde sorumlu bir diğer mekanizmadır. Monobaktam grubu antibiyotikler dışındaki tüm β -laktam gruplarını hidroliz ederler, ayrıca β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler. Bu enzimlerin aktiviteleri için çinko elementi gerekmektedir ve inhibisyonları ise etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ile olmaktadır (63). Yapılan çalışmalarda birçok MBL enzimi tanımlanmış olup bunlardan sadece IMP, VIM, SIM ve NDM *A.baumannii*'de belirlenmiştir. NDM dışındaki enzimler tipik olarak sınıf 1 integron içinde bazı aminoglikozit dirençleriyle birlikte bulunmaktadır (64). Son yıllarda, yeni bir MBL enzimi olan "New Delhi MBL" (NDM-1) *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarında tanımlanmıştır (65). Bu enzim de diğer MBL enzimleri gibi, aztrenam dışındaki tüm β -laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişimini sağlamaktadır. *A.baumannii* türlerinde ilk NDM, 2010 yılında, Hindistan'da

tanımlanmıştır. Bu kökünde NDM ile birlikte blaOXA-23 geni ve aminoglikozit direncini sağlayan armaA geni bulunmaktadır (66).

Beta-laktamazlar içerisinde karbapenemleri hidrolize eden oksasilinazlar (KHO) olarak adlandırılan Sınıf D oksasilinazlar oksasilinleri hidrolize etmektedir ve bu grup enzimlere *Acinetobacter* türlerinde daha az rastlanmaktadır. Tanımlanmış toplamda yaklaşık 120 civarında D grubu beta-laktamaz enzimi olup, bunlardan 45 tanesi karbapenemleri hidrolize eden oksasilinaz aktivitesi gösterirler. *A.baumannii* türlerinde doğal olarak sınıf D oksasilinaz grubu içerisinde bulunan ve karbapenemaz aktivitesi daha zayıf olan OXA-51 benzeri enzim kümesi bulunmaktadır. Bununla birlikte, karbapenemlere karşı direnç gelişiminde rol oynayan üç adet kazanılmış sınıf D oksasilinaz enzim kümesi de tanımlanmış olup, bu enzimlerin karbapenemleri hidrolize etme etkinliklerinin MBL sınıfından oldukça düşük olduğu belirtilmiştir. *Acinetobacter* türlerinde ilk tanımlanan kazanılmış KHO OXA-23 enzimidir. Kazanılmış ikinci grupta ise OXA-24, OXA-25, OXA-26 ve OXA-40 enzimleri bulunmaktadır. OXA-58 ilk olarak Fransa'dan bildirilen ve kazanılmış KHO üçüncü potansiyel kümesi olarak bilinmektedir. OXA-58 ile OXA-51 enzim kümeleri % 59 oranında benzerlik içermektedir. OXA-58 enziminin salınması ile *A.baumannii*'de karbapenemlere karşı duyarlılıkta azalma olduğu, aşırı salınımında ise yüksek karbapenem direncine neden olduğu bildirilmiştir. Bazı *Acinetobacter* türlerinde tanımlanan karbapenemleri hidrolize eden oksasilinazlar kromozomal olarak kodlanmaktadır fakat OXA-23 ve OXA-58'i kodlayan genlerin plazmidler tarafından da kodlandığı ve poliklonal olarak yayıldığı bildirilmiştir (58).

2.6.2 Aminoglikozit direnci

Fosfotransferazlar, asetiltransferazlar ve nükleotidiltransferazlar gibi aminoglikozit modifiye edici enzimlerin üretilmesi *Acinetobacter* türlerinde gelişen aminoglikozit direncinde önemli bir yer tutmaktadır (62). Bu enzimleri kodlayan genler plazmid ve transpozonlar ile bakteriler arasında yayılma göstermektedir (57).

2.6.3 Kinolon direnci

Acinetobacter türlerinde kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi 1990'lı yıllardan sonra ortaya çıkmıştır ve direnç gelişimi yıllar içerisinde hızlı bir şekilde yayılmıştır. Kinolon direnci DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerinin alt birimlerinde meydana gelen değişiklikler sonucunda oluşmaktadır. Bu değişiklikler ise *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlara bağlı olarak görülmektedir. Sadece *GyrA* geninde meydana gelen mutasyon orta düzeyde bir direnç oluştururken her iki gende oluşan mutasyon yüksek düzeyde direnç gelişimine neden olmaktadır. Kinolon direncindeki bir başka mekanizma da dış membran geçirgenliğinin azalması ya da ilacın efluks pompası ile dışarı atılmasıdır. Bu mekanizmalar ile kinolonların hücre içindeki konsantrasyonları azaltılarak bakterinin direnç gelişimi sağlanmaktadır (6).

2.6.4 Tetrasiklin direnci

Tetrasiklinlere karşı dirençte ilk mekanizma efluks pompa sistemleridir. *Acinetobacter* türlerinde bu dirençten *TetA* ve *TetB* genleri sorumlu olup, *TetA* tetrasiklin, *TetB* ise hem tetrasiklin hem de minosiklin direncine yol açmaktadır. Bunun dışında ribozomal koruma sistemi olarak adlandırılan, mutasyonlar sonucunda tetrasiklinin ribozomal hedefinde değişikliklerin olduğu farklı bir direnç mekanizması daha bulunmaktadır (62). Tigesikline karşı gelişen direnç ise *AdeABC* efluks pompa sistemi aracılığıyla gerçekleşmektedir (67).

2.6.5 Polimiksin (Kolistin) direnci

A.baumannii, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* gibi bakterilerde son yıllarda çok sayıda antimikrobiyal ilaca karşı direnç gelişmesi nedeniyle, bu bakterilerinin yol açtıkları enfeksiyonların tedavisinde kolistin aktif olarak kullanılmaya başlanmıştır (68). Kolistine karşı gelişen dirençte *A. baumannii*'nin lipopolisakkarit tabakasında meydana gelen mutasyon en önemli mekanizmayı oluşturmaktadır. Ayrıca hücre duvarındaki dış membran porinlerinde meydana gelen değişiklikler ve efluks pompası da kolistin direncinde rol oynamaktadır (69). Bazı çalışmalarda *Acinetobacter* türleri arasında kolistin için rutin duyarlılık testleri ile tespit edilmesi zor olan heterozistans tanımlanmıştır. İn vitro veriler bu direncin kolistin dozu ile ilgili olduğunu ve tespit

edilmesindeki sıkıntılardan dolayı tedavide de başarısızlığa neden olabileceğini göstermektedir. Kolistinin tedavide tek başına ve uygun olmayan dozlarda kullanımı, ayrıca tedavinin de uzun süreli olması heterorezistans için risk faktörleri olarak kabul edilmektedir (70,71).

2.7. Tedavi

Acinetobacter türleri nedeniyle gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak antimikrobiyal ilaçların sayısı bakterinin geliştirdiği ilaç direnci nedeniyle oldukça azalmıştır. Enfeksiyonlar 1970'li yıllardan önce aminoglikozitler, beta-laktamlar ve tetrasiklinler gibi antibiyotikler ile kolaylıkla tedavi edilebilirken, bazı suşlarda günümüzde kullanılan tüm antimikrobiyallere karşı direnç gelişimi söz konusu olmuştur (19). Çoklu ilaç direnci nedeniyle karbapenemler tedavide öncelikli olarak tercih edilir hale gelmişlerdir, fakat bu ilaçlara karşı direnç de tüm dünyada hızla bir artış göstermektedir (72). Kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi bildirildiğinden dolayı yeni geliştirilecek tedavi seçeneklerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır (73).

Acinetobacter türlerine karşı hem bakteriyostatik hem de bakterisidal etkisi olan betalaktamaz inhibitörü sulbaktamın *Acinetobacter* türlerine karşı intrensek aktivitesi bulunmaktadır (74). Bu antimikrobiyal ajan aynı zamanda, karbapenemlere dirençli kökenlerin de yer aldığı *Acinetobacter* türlerine karşı *in vitro* etkilidir. Ampisilin-sulbaktam veya sefoperazon-sulbaktam kombinasyonları tedavide kullanılmaktadır (75).

Duyarlı *Acinetobacter* türleri ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde karbapenemler seçilebilecek ilaç gruplarındandır. Fakat tedavi sırasında bu ilaçlara direnç gelişebilmektedir. Bu grup ilaçların kullanımının artması nedeniyle OXA beta-laktamaz enzimi üreten *Acinetobacter* türlerinde artış meydana gelmiş ve bu durum karbapenemlere karşı direnç artışına neden olmuştur. Doripenem, karbapenem grubunda yer alan ve *Acinetobacter* türlerine etkili olan yeni bir antibiyotiktir fakat metallo-beta-laktamaz veya OXA tip karbapenamazlar üreten dirençli türler tarafından inaktive edilmektedir (75). Karbapenemler çok ilaca dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan en önemli ilaçlar olma özelliklerini devam

ettirseler de bakteride artan direnç nedeniyle bu ilaçların etkinlikleri de azalmaktadır (76).

Karbapenem ve polimiksine karşı dirençli *Acinetobacter* türlerinde tigesiklinin in-vitro etkinliği bulunmaktadır (75). Çok ilaca dirençli kökenlerde de invitro etkinliğinin iyi olduğu gösterilmiştir. Bakteriyemi ve solunum yolu enfeksiyonlarında alternatif bir tedavi seçeneği olmadığı endikasyon dışı olarak kullanılmış ve %76 - %84 arasında klinik yanıt alındığı bildirilmiştir (77,78). Yapılan çalışmalarda tigesiklin MİK değerleri düşük olarak saptanmış ve özellikle çok ilaca dirençli *A.baumannii* suşlarında tedavi seçeneklerinin sınırlı olması nedeniyle tedavide alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (78).

Kolistin, MDR mikroorganizmaların tedavisinde son yıllarda artan oranlarda kullanılmaya başlanan eski bir antibiyotiktir. Tedavide kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara dirençli olan Gram negatif bakterilerin tedavisinde son seçenek, kurtarıcı ajanlar olarak kullanılmaktadır. MDR ve XDR kökenlerinin büyük bir kısmı polimiksinlere duyarlı olmaya devam etmektedir (79). İlacın güncel kullanımında devam eden nefrotoksisitesine rağmen tedavide kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Kolistin kullanımındaki artışa paralel olarak bu ilaca karşı gelişen direnç oranı da artış göstermektedir (80,81). 2004 yılında Duenas Diez Al ve ark. tarafından 221 *A.baumannii* - *A.calcoaceticus* kompleksi ile yapılan bir çalışmada *Acinetobacter* kökenlerinin % 98'inin in-vitro olarak kolistine duyarlı oldukları bulunmuştur (75). Dünyanın çeşitli bölgelerindeki Fransa (82), Arjantin (83), İspanya (84), Kuveyt (85), Hindistan (86) gibi farklı ülkelerden kolistin dirençli *A.baumannii* bildirimleri yapılmıştır. Türkiye'de ise kolistin direnci çok nadir olarak bildirilmiş olup direnç oranları %1 - %4 arasında yer almaktadır (87,88,89).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *Acinetobacter baumannii* İzolatları

Bu çalışmaya, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı Bakterioloji laboratuvarına 2005-2007 tarihleri arasında gönderilen klinik örneklerden izole edilen, daha önceki yıllarda farklı çalışmalarda kullanılmış olan 18 izolat ile Ocak 2015 -Aralık 2015 tarihleri arasında laboratuvara rutin olarak gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 12 izolat, toplamda 30 *Acinetobacter baumannii* izolatı olacak şekilde çalışmaya dahil edildi. Farklı direnç fenotiplerine sahip olan suşlar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere skim milk besiyeri (Oxoid, İngiltere) içinde -20°C'de saklandı.

3.2. İzolatların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Çalışmaya dahil edilen izolatlar antibiyotik duyarlılık test profillerine göre üç gruba ayrıldı. Birinci grupta üç gruptan daha az antibiyotiğe dirençli bulunan (Duyarlı)10 suş, ikinci grupta üç ya da daha fazla antibiyotik grubuna dirençli olan ("Multidrug resistant" MDR) 10 suş, üçüncü grup ise iki ya da daha az grup antibiyotiğe duyarlı olan ("Extreme-drug resistant" XDR) 10 suş belirlenerek incelemeye alındı. Bu farklı direnç paternleri "European Centre for Disease Prevention and Control" (ECDC) ve "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) tarafından *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae* (*Salmonelle* ve *Shigella* dışında), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* için tanımlanan uluslararası direnç terminolojisine uygun olarak değerlendirilmiştir (56).

3.3. Mikroorganizmaların Tanımlanması

Aerob, Gram negatif, hareketsiz, kok veya kokobasil morfolojisinde, katalaz pozitif, oksidaz negatif, glukoz ve laktoz fermentasyonu yapmayan bakteriler *Acinetobacter* şüphesiyle ileri identifikasyon testlerine alındı. 2005-2007 yılları arasında izole edilen izolatlar otomatize sistem MicroScan Walk Away Neg Combo Panel (Dade Behring, West Sacramento, USA) ve API 20 NE (bioMerieux, France) tanımlama kiti ile tür düzeyinde tanımlandı. 2014-2015 yılları arasında izole edilen

Acinetobacter izolatları ise BBL Crystal Enteric / Nonfermenter tanımlama kiti üretici firmanın önerilerine göre kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı.

3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya alınan suşların antibiyotik duyarlılık testleri, Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda, Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve tabloda önerilen zon çaplarına göre değerlendirildi. Test için dört mm kalınlığında dökülmüş Mueller Hinton agar besiyeri kullanıldı. Bakteri suşlarının yoğunluğu 0,5 Mc Farland olacak şekilde süspansiyon edildi ve bir eküvyon yardımı ile agar yüzeyine ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Türkiye) birbirlerine uzaklıkları merkezden merkeze en az 24 mm olacak şekilde yerleştirildi. 37°C'de 24 saat inkübasyon işlemi ardından zon çapları değerlendirildi. Kalite kontrol suşu olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılık testlerinde, imipenem (IPM, 10 µg), meropenem (MEM, 10 µg), seftazidim (CAZ, 30 µg), sefepim (FEP, 30µg), piperasilin (PRL, 100 µg), piperasilin-tazobaktam (TZP, 100/10 µg), seftriakson (CRO, 30µg), sefotaksim (CTX, 30µg), ampisilin-sulbaktam (SAM, 10/10µg), siprofloksasin (CİP, 5µg), levofloksasin (LEV, 5µg), gentamisin (CN, 10µg), tobramisin (TOB, 10µg), amikasin (AK, 30 µg), tetrasiklin (TE, 30µg), trimetoprim-sülfometaksazol (SXT, 1.25/23.75 µg), doksisiklin (D, µg), kolistin (CO, µg) kullanıldı. Antibiyogram sonuçları duyarlı (S), dirençli (R) ve orta duyarlı (I) olarak değerlendirildi. Tigesiklin duyarlılık sonuçları için CLSI standartlarına göre bir değerlendirme kriteri bulunmamaktadır. Kulah ve ark. tarafından (90) 2009 yılında yapılan bir çalışmada *A.baumannii* için tigesiklin duyarlılıkları referans metod broth mikrodilüsyon, Etest ve disk difüzyon yöntemleri çalışılarak birbirleri ile karşılaştırılmış ve minör hata ile disk difüzyon yöntemi için kullanılacak değerlendirme kriteri için önerilen sınır değerler $\geq 17 / \leq 13$ mm olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda tigesiklin duyarlılığını değerlendirebilmek için bu sınır değerler kullanılmıştır. Kolistin için ise CLSI önerileri doğrultusunda E test yöntemi ile MİK belirlenmiştir.

Tablo 2: *Acinetobacter spp* için zon çapları yorumlama standartları

| Antibiyotik* | Zon çapı sınır değerleri (mm) | | |
|-------------------|-------------------------------|--------------|----------|
| | Duyarlı | Orta Duyarlı | Dirençli |
| IMP (10 µg) | ≥22 | 19-21 | ≤18 |
| MEM (10 µg) | ≥18 | 15-17 | ≤14 |
| CAZ (30 µg) | ≥18 | 15-17 | ≤14 |
| FEP (30 µg) | ≥18 | 15-17 | ≤14 |
| PRL (100 µg) | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| TZP (100/10 µg) | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| CRO (30 µg) | ≥21 | 14-20 | ≤13 |
| CTX (30 µg) | ≥23 | 15-22 | ≤14 |
| SAM (10/10 µg) | ≥15 | 12-14 | ≤11 |
| CİP (5 µg) | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| LEV (5 µg) | ≥17 | 14-16 | ≤13 |
| CN (10 µg) | ≥15 | 13-14 | ≤12 |
| AK (30 µg) | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| TOB (10 µg) | ≥15 | 13-14 | ≤12 |
| TE (30 µg) | ≥15 | 12-14 | ≤11 |
| SXT(1.25/23.75µg) | ≥16 | 11-15 | ≥10 |
| D (30 µg) | ≥13 | 10-12 | ≤9 |

*IMP:İmipenem, MEM:Meropenem,CAZ:Seftazidim, FEP:Sefepim, PRL:Piperasilin, TZP:Piperasilin tazobaktam, CRO: Seftriakson, CTX: Sefotaksim, SAM: Ampisilin-sulbaktam, CİP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, CN: Gentamisin, AK: Amikasin, TOB: Tobramisin, TE: Tetrasiklin, SXT: Trimethoprim-sulfometaksazol, D: Doksisiklin

Tablo 3: Kolistin MİK değerlendirme kriteri (µg/ml)

| | MİK değerlendirme kriteri (µg/ml) | | |
|-----|-----------------------------------|----------|--|
| | Duyarlı | Dirençli | |
| CO* | ≤2 | ≥4 | |

*CO:Kolistin

Kaynak : CLSI. (2014) Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing;Twenty - Fourth İnformational Supplement M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards İnstitute

3.5. *Galleria mellonella* Enfeksiyon Modeli Çalışması

Mikroorganizmaların neden oldukları enfeksiyonların patogenezinin araştırılması için geçmiş yıllardan günümüze farklı canlı modelleri kullanılmaktadır. En sık memelilerin seçildikleri bu modellerde, fareler, sıçanlar ve tavşanlar ile de farklı çalışmalar yapılarak enfeksiyonların tanı ve tedavisinde yol gösterebilecek bilgiler

edinilmiştir. Ancak son yıllarda deneysel hayvan modellerinin kullanımında çeşitli kısıtlamalar yaşanması ve zorluklar nedeniyle omurgasız modellerin kullanımı gündeme gelmiştir. *Galleria mellonella* bal peteklerine zarar veren ve önemli miktarda ekonomik zarara yol açabilen bir canlıdır. Son yıllarda mikroorganizmaların neden oldukları enfeksiyonların patogenezinin araştırılmasında, memeli modellerinin yanında kullanılan mini modellerden biridir. 28-30°C arasında yaşayabilmesi ve kolay yetiştirilmesi nedeniyle patojenitenin değerlendirilmesinde avantaj sağlamaktadır (91). Bu enfeksiyon modeli Peleg ve ark. tarafından farklı *Acinetobacter* türleri ile çalışılarak, bu bakteri cinsi için konak-patojen ilişkilerinin ve antibakteriyel ajanların etkinliğinin değerlendirilebilmesi açısından kullanılabileceği belirtilmiştir (92). Bu nedenlerle çalışmamızda *G. mellonella* enfeksiyon modeli kullanılmıştır.

Bu çalışmada Kalkancı ve ark.'nın çeşitli bakteri ve mantarlar için *G. mellonella* enfeksiyon modelini kullanarak yaptıkları virulans araştırmasının çalışma protokolü esas alındı (91). Antibiyotik duyarlılıklarına göre üç gruba ayrılan toplam 30 *A. baumannii* izolatının Luria Bertani agar plaklarındaki 24 saatlik kültürleri kullanıldı. Her izolat için serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içinde 10^8 koloni oluşturan ünite (CFU)/mL konsantrasyonda inokulum olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı.

3.5.1. *Galleria mellonella* larvaları

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı tarafından üretilen *G. mellonella* larvaları kullanıldı. Larvalardan 0.33 gr ağırlığında, krem rengi olan ve yaklaşık 2-3 cm uzunluğunda olanlar çalışmaya dahil edildi.

3.5.2. Larvalara enjeksiyon yapılması

Bakteri süspansiyonlarından 10 µL'si larvaların sol arka ayağına denk gelecek şekilde 0.5 ml'lik insülin enjektörü ile enjekte edildi. Larva sayısının yetersiz olmasından dolayı çalışmada ilk grupta bulunan 10 izolattan dört tanesi ile çalışılarak, her izolat

için 6 adet larvaya enjeksiyon yapıldı, ikinci gruptaki 10 izolatin 8 tanesi ile çalışılarak üç izolat için 6 adet larvaya, 5 izolat için ise 10 adet larvaya enjeksiyon yapıldı. Üçüncü gruptaki 10 izolatin hepsi çalışılarak her izolat için 10 larvaya enjeksiyon yapıldı. Ayrıca 10'ar adet larva ise herhangi bir enjeksiyon yapılmamış sağlıklı kontrol, serum fizyolojik enjekte edilmiş SF kontrol deney grupları olarak ayrıldı. Larvalar 30°C sıcaklıkta 144. saate kadar izlendi ve her gün kontrol edilerek ölen larvalar (hareketsiz ve kahve renkli) kaydedildi.

3. 6. Biyofilm Oluşturma

Şuşların biyofilm oluşturma kapasiteleri, Stepanovic ve ark. (93), Judith H. Merritt ve ark. (94), Lusía C. S. Antunes ve ark. (30) kullandıkları mikroplak yöntemleri modifiye edilerek araştırıldı. Buna göre, %0.25 oranında glikoz içeren triptik soy broth (TSB) (Sigma, Almanya) besiyerleri her tüpte 5ml olacak şekilde hazırlandı. Bakteri hücreleri TSB içerisinde OD (Optik dansite) 600 değeri 1.0 olacak şekilde süspanse edildikten sonra 37 °C'de 14 saat inkübe edildi. Ardından kültürler 1/100 oranında dilüe edildi. Dilüe edilmiş olan kültürlerin her birinden 200 µl alınarak düz tabanlı mikroplak içerisine dağıtıldı. Her bir suş için 3 adet kuyucuğa dağıtım yapıldı. Negatif kontrol için 3 kuyucuğa sadece broth koyuldu. Plağın kapağı kapatılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Ardından kuyucuk içleri pipetle aspire edildi. Ardından 250µl steril serum fizyolojik ile her kuyucuk 3 kez iyice çalkalayarak yıkandı. Yıkama ardından tüm kuyucuklara 200 µl %99'lik metanol (Sigma, Almanya) dağıtıldı. 15 dk beklemenin ardından kuyucuklar pipetle boşaltılarak plak ters çevrildi ve kurumaya bırakıldı. 200µl %2'lik kristal viyole (Hucker kristal viyole Gram boyama için hazırlanmış) tüm kuyucuklara dağıtıldı ve 5 dk beklendi. Çeşme suyunun altında kuyucuklar yıkanarak plak ters çevrildi ve kurumaya bırakıldı. 160µl %33'lük glacial asetik asit (Riedel de Haen, Almanya) tüm kuyucuklara dağıtıldı, 5-10 dk beklemenin ardından spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak optik dansite değerlerine göre biyofilm oluşturma kapasiteleri negatif, zayıf, orta, güçlü olarak değerlendirildi.

Değerlendirmede kullanılacak cut-off (ODc) değeri negatif kontrol OD ölçüm değerinin üç standart sapma üzeri hesaplanarak tespit edilmiştir. Buna göre izolatlar aşağıdaki hesaplama uygun olarak kategorize edilmiştir.

| | |
|--|------------------------|
| $OD \leq ODc$ | biyofilm oluşturmayan |
| $ODc \leq OD \leq 2 \times ODc$ | zayıf biyofilm oluşumu |
| $2 \times ODc \leq OD \leq 4 \times ODc$ | orta biyofilm oluşumu |
| $4 \times ODc < OD$ | güçlü biyofilm oluşumu |

3.7. Hareket Testi

Suşların hareket özelliği Eijkelkamp ve arkadaşlarının (41) ve Luisa C. S. Antunes ve arkadaşlarının (30) kullandıkları metodlar modifiye edilerek araştırıldı. Buna göre "twitching" (seğirme) hareketi için Mueller Hinton (Oxoid, İngiltere) besiyeri, "swarming" (yayılma) hareketi için Luria Bertani (Sigma, Almanya) besiyeri kullanıldı. Luria Bertani (%1.5 agar) besiyerinde üretilen bakterilerden steril öze ile birer koloni alınarak "twitching" hareketi için %1 oranında agar içeren Mueller Hinton besiyerine; swarming hareketi için %0.25 oranında agar içeren Luria Bertani besiyerine besiyerinin dip kısma doğru batırma şeklinde ekim yapıldı. Besiyerleri 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. 24. ve 48. saatlerde değerlendirme yapıldı. "Twitching" hareketini değerlendirmek için besiyerinin agar kısmı kaldırılarak petri plağı %0.1'lik kristal viyole boyası ile 30 dk boyunca boyandı ve boyanmış olan halo şeklindeki zon çapı değerlendirilerek >10 mm olanlar pozitif olarak değerlendirildi. "Swarming" hareketi için besiyeri yüzeyindeki hareket değerlendirildi. Zon çapı > 20 mm olanlar pozitif olarak değerlendirildi.

3.8. Serum Direnci

İnsan serumuna direnç Kim ve ark. tarafından tanımlanan protokole göre araştırılmıştır (95). Kanlı agarda (Oxoid, İngiltere) 14 saat boyunca çoğaltılan bakteri kolonileri toplanarak PBS (Phosphate buffer salin) ile 2 defa yıkandı Bunun için her bir izolat için birer öze dolusu bakteri toplanarak 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 1 ml PBS solüsyonu koyuldu ve 5000 g'de 5 dk santrifüj edildi ve ardından OD 600 değeri 1.0 olacak şekilde (yaklaşık 1×10^9 cfu/ml) PBS ile tekrar süspanse

edildi. Beş sağlıklı gönüllüden toplanan serumlar havuzlandı ve PBS içinde %40 konsantrasyona denk gelecek şekilde her bakteri için 200 µ'lik dilüsyonlar yapıldı. Isı ile inaktivasyon için aynı serumdan alınan başka bir kısım 56 °C'de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra 10µ'lik (1×10^7 bakteri) bakteri süspansiyonları 200 µ'lik hem insan serumu + PBS hem de ısı ile inaktive edilmiş serum + PBS karışımına eklendi. Örnekler 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon ardından yaşayan bakteri sayısını hesaplamak için seri dilüsyonlar hazırlanarak kanlı agar (Oxoid, İngiltere) plaklarına ekimler yapıldı ve 37°C'de 20 saat inkübasyon sonucunda bakteri sayımları yapıldı.

Yaşayan bakteri sayısının inokulumun (1×10^7) yüzde kaçı olduğu hesaplandı.

PBS (Phosphate buffer salin) (0.067 M, Ph: 6.80) Hazırlanması:

Stok Alkali Tampon:

11.8 g Na_2HPO_4 1000 ml distile su içerisinde çözüldü. 1atm basınçta 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

Stok Asit Tampon:

9.47 gr KH_2PO_4 1000 ML distile su içerisinde çözüldü. 1atm basınçta 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

Her iki solüsyon eşit miktarlarda karıştırılarak pH kontrol edildi. pH'yı yükseltmek için az miktarda alkali buffer, azaltmak için az miktarda asit buffer kullanıldı.

3.9. Fosfolipaz C Aktivitesi

Ekstrasellüler fosfolipaz C aktivitesi Randy M. Berka ve ark. yaptıkları çalışma protokolüne uygun olarak çalışılmıştır (96). Buna göre Triptik Soy Broth (Sigma, Almanya) içerisinde 14 saat boyunca inkübe edilen kültürler 0.45 µm'lik sellüloz asetat membran filtre (Orange scientific, Belçika) ile sterilize edildi. Bu testte kromojenik substrat olarak p-nitrofenilfosforilkolin (NPPC) substratı kullanıldı. NPPC reaktifi; 250 mM tris-HCl (ph 7.2) (Amresco, A.B.D), %60 gliserol (Amresco, A.B.D), 1µM ZnCl_2 (Sigma, Almanya) ve 10 mM NPPC (Sigma, Almanya) içermektedir. Filtre ile sterilize edilmiş kültür süpernatantından 10µl alınıp NPPC reaktifinden 90µl

alınarak 96 kuyucuklu mikropklara aktarıldı. Reaksiyon karışımı 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra spektrofotometrede OD 405 ölçümü yapılarak değerlendirildi. Deneyde pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu kullanıldı. Fosfolipaz C aktivitesi U/L olarak hesaplandı. Bu hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır (88).

$$\text{Fosfolipaz C aktivitesi} = (\text{Toplam reaksiyon hacmi} / \text{Örnek hacmi}) \times (\text{Optik dansite} / \epsilon) \times 10^6$$

ϵ : Substratın molar ekstinksiyon katsayısı

3.10. Proteolitik Aktivite

Ekstrasellüler proteolitik aktivite değerlendirmesi için azoalbumin deneyi kullanılmıştır. Bu çalışmada Luisa C. S. Antunes ve ark. kullandığı çalışma protokolüne uygun olarak çalışılmıştır (30). Buna göre, tris-HCl (ph 7.7) içinde 1mg/ml konsantrasyonundaki azoalbumin (Sigma, Almanya) solüsyonu hazırlanmıştır. 14 saat boyunca TSB içinde yapılmış olan kültürler 0.45 µm’lik sellüloz asetat membran filtre ile sterilize edildikten sonra azoalbumin solüsyonunun 500 µl’si alınarak süpernatanın 500 µl’sine eklendi. Bu karışım 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda degrade olmamış proteinleri presipite etmek için ortama %13 son konsantrasyona sahip olacak şekilde 50 g/lt trikloroasetik asit eklendi. Örnekler -20 °C’de 20 dk inkübe edilmiş, 15000 g’de 10 dk santrifüjlendikten sonra final süpernatana spektrofotometrik olarak OD 440 ölçümü yapıldı. Deneyde pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu kullanılmıştır. Proteolitik aktivite U/L olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır (97).

$$\text{Proteolitik aktivite} = (\text{Toplam reaksiyon hacmi} / \text{Örnek hacmi}) \times (\text{Optik dansite} / \epsilon) \times 10^6$$

ϵ : Substratın molar ekstinksiyon katsayısı

3.11. Siderofor Üretimi

Düşük demir varlığında siderofor üretimi, Schwyn ve Neiland'ın (98) kullandığı yöntem esas alınarak CAS (Chrome Azurol S) deneyi ile fenotipik olarak araştırılmıştır. Bu yöntemde chrome azurol S (CAS) ve hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA) indikatör olarak kullanılmıştır. CAS /HDTMA ferrik demir ile sıkı bir kompleks oluşturmakta ve sonuç olarak mavi bir renk açığa çıkmaktadır. Eğer ortamda siderofor gibi güçlü bir demir şelatörü bulunur ve bu kompleksten demiri uzaklaştır ise renk maviden turuncuya dönüşmektedir. Kullandığımız yöntemin basamakları aşağıda belirtilmiştir.

3.11.1. Crome Azurol S (CAS) Deneyi:

Kullanılacak tüm cam malzemeler 6M HCL (Riedel de Haen, Almanya) ile herhangi bir element kalmaması için temizlendi ve distile su ile yıkandı.

A. Mavi boya hazırlanması

a. 1.solüsyon:

-50 ml distile su içerisinde 0.06 gr CAS (Sigma, Almanya) çözüldü.

b. 2.solüsyon:

- 10 ml 10 mM HCL içerisinde 0.0027 gr $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ çözüldü.

c. 3.solüsyon:

- 40 ml distile su içerisinde 0.073 gr HDTMA (Fluka, Almanya) çözüldü.

d. 1. solüsyon ile 2. solüsyonun 9 ml'si karıştırıldı. Ardından 3. solüsyon eklendi. Bu karışım ardından solüsyonun rengi mavi renge dönüştü. Bu karışım $121^{\circ}C$ 'de 1 atm basınç altında 15 dk otoklavlandıktan sonra plastik saklama kabına alındı.

B. Karışım solüsyonu

a. Minimal Media 9(MM9) Tuz Solüsyon Stoğu

- 500 ml distile su içerisinde 15 gr KH_2PO_4 (Riedel de Haen, Almanya), 25 gr NaCl (Riedel de Haen, Almanya) ve 50 gr NH_4Cl (Riedel de Haen, Almanya) çözüldü.

b. %20 Glukoz Stoğu

- 100 ml distile su içerisinde 20 gr glukoz (Merck, Almanya) çözüldü.

c. NaOH Stoğu

-150 ml distile su içerisinde 25 gr NaOH (Himedia,)çözüldü.. Çözelti ph'sı 12 olacak şekilde ayarlandı.

d. Casamino Asit Solüsyonu

-27 ml distile su içerisinde 3 gr Casamino asit (Sigma, Almanya) çözüldü.

- Kloroform (Sigma, Almanya) içerisinde %3'lük 8-hidroksikinolin (Sigma, Almanya) çözeltisi hazırlanarak 3 ml'si herhangi bir demir belirtisi kalmaması için eklendi.

- 0.45µl'lik selüloz asetat membran filtre ile sterilize edildi.

C. CAS Agar Hazırlanması

a. 750 ml distile su içerisine 100 ml MM9 solüsyonundan eklendi.

b. Bu solüsyon içerisinde 32.24 gr piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PİPES) (Amresco, A.B.D) çözüldü.

PİPES ph 5'in altında çözülmeyen bir madde olduğundan dolayı çözelti ph'sı öncelikle 6 ya çıkarıldı. Daha sonra çözünme işlemi başlatıldı. PİPES çözüldükçe ph düşeceğinden dolayı ph yavaşça 6.8 civarına getirilerek ve karıştırılarak çözünme sağlandı. Agar renginin yeşile dönüşmemesi için çözelti ph'sının 6.8'i geçmemesi sağlandı.

c. 15 gr agar (Himedia) eklendi.

d. 121°C'de 1 atm basınçta 15 dk otoklavlandıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutuldu.

e. Üzerine 30 ml sterile Casamino asit solüsyonu ve 10 ml sterile glukoz solüsyonu eklendi.

f. Son olarak 100 ml mavi boya solüsyonu da yavaş yavaş eklenerek yeteri kadar karıştırılmış ve mavi renkli bir besiyeri elde edildi.

g. Hazırlanan besiyeri plaklara döküldü.

Besiyeri kontrolü için doymuş 8-hidroksikinolin çözeltisi kullanıldı. Buna göre 1 ml'lik pastör pipet ucunun arka kısmı ile besiyeri delinip kesilen yuvarlak besiyeri

parçası çıkarıldıktan sonra oluşan çukurcuğa doymuş 8-hidroksikinolin çözeltisinden damlatılıp birkaç dk beklendikten sonra çukur etrafında turuncu halo oluşumu gözlemlendi.

İzolatlardaki siderofor üretimi Garcia ve ark. (99) tarafından *S.maltophilia* izolatlarındaki siderofor üretiminin değerlendirildiği çalışmaya uygun olacak şekilde değerlendirildi. Buna göre hazırlanan CAS besiyerlerine bakterilerin iğne öze ile nokta şeklinde ekimleri yapıldı, 37 °C’de 24. ve 48. saatlerde bakterilerin oluşturdukları turuncu haloların zon çapları ölçülerek oluşturdukları siderofor üretim dereceleri değerlendirildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak *A.baumannii* ATCC 19606 suşu kullanıldı. Oluşan haloların zon çapları aşağıda belirtilen ölçüm kriterlerine göre değerlendirildi.

- | | |
|------|---|
| (-) | Turuncu zon oluşumu yok (Siderofor üretimi yok) |
| (+) | ≤ 4 mm turuncu zon çapı |
| (++) | 4.5 mm - 11 mm turuncu zon çapı |

3.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler aritmetik ortalama±standart sapma, kategorik yapıdaki veriler için sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arasındaki farklılıklar Ki-kare testi ile incelendi. Sayısal değişkenler için iki grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, üç grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis varyans analizinde alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise Dunn testi ile yapıldı ve tüm analizler için p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 İzolatların Genel Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen toplam 30 *A.baumannii* izolatının klinik örnekler göre dağılımlarına bakıldığında %27 ile en yüksek oranda yara örneği olduğu gözlemlendi. Bunu sırasıyla trakeal aspirat, kan, doku, periton, bronkoalveoler lavaj ve balgam örneklerinin takip ettiği görüldü. (Tablo 4)

Tablo 4: *A.baumannii* izolatlarının izole edildikleri klinik örnekler göre dağılımı

| Klinik örnek | Sayı | % |
|----------------------|------|----|
| Yara | 8 | 27 |
| Trakeal aspirat | 7 | 23 |
| Kan | 7 | 23 |
| Doku | 4 | 14 |
| Periton | 2 | 7 |
| Bronkoalveoler lavaj | 1 | 3 |
| Balgam | 1 | 3 |

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Profilleri

Çalışmaya dahil edilen 30 izolatın disk diffüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 5' de gösterilmiştir. Disk diffüzyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda yapılan antibiyotik duyarlılık test profillerine göre tüm izolatlar üç gruba ayrılarak incelenmiştir. Birinci grup duyarlı (üç grup antibiyotikten daha azına dirençli olan) 10 adet izolattan, ikinci grup multi-drug resistant (MDR) (en az üç ve üzeri antibiyotik grubuna dirençli olan) 10 adet izolattan ve üçüncü grup extreme-drug resistant (XDR) (iki veya daha az grup ilaca duyarlı olan) 10 adet izolattan oluşmaktadır.

Birinci grupta izolatların tümünün imipenem, meropenem, sefepim, siprofloksasin, levofloksasin, ampisilin- sulbaktam, gentamisin, tobramisin, amikasin, tigesiklin ve kolistin duyarlı olduğu; piperasilin-tazobaktam, doksisiklin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametaksazol duyarlılık oranlarının %90 olduğu; piperasilin ve

seftriakson duyarlılık oranının %70 olduğu; seftazidim %80 ve sefotaksim duyarlılık oranının %60 olduğu tespit edilmiştir.

İkinci grupta tüm izolatların kolistine duyarlı olduğu görüldü. İkinci sırada %90 oranında duyarlılık ile tobramisin ve doksisiklin olduğu, bunları sırası ile %80 duyarlılık ile tigesiklin, %60 ile trimetoprim-sulfametaksazol, %50 ile amikasin, imipenem, meropenem, %40 ile gentamisin, tetrasiklin,%30 ile levofloksasin, %20 ile ampisin- sulbaktam, %10 ile sefepim ve siprofloksasinin takip ettiği tespit edilmiştir. Bu gruptaki tüm izolatların ise seftriakson, sefotaksim, piperasilin ve piperasilin-tazobaktama dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Üçüncü grupta tüm izolatların seftazidim, seftriakson, sefotaksim, sefepim, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, ampisilin-sulbaktam ve tetrasikline dirençli oldukları tespit edilmiştir. Bunu ikinci olarak %90 oranında direnç ile imipenem, merpoenem, doksisiklin, siprofloksasin ve levofloksasinin takip ettiği tespit edilmiştir. İzolatların amikasin ve tobramisin direncinin %80 olduğu, gentamisin %70, tigesiklin %50, kolistin ve trimetoprim-sulfamtaksazole %40 oranında dirençli oldukları tespit edilmiştir. Bu grupta en yüksek duyarlılık oranının %60 ile kolistin duyarlılığı olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5: Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik duyarlılıkları

| | Tüm İzolatlar (n=30) | | | Grup 1 (n=10) | | | Grup 2 (n=10) | | | Grup 3 (n=10) | | |
|-------------|-------------------------|-----------|------------|------------------|-----------|-----------|------------------|-----------|-------------|------------------|-----------|-------------|
| | S% (n) | I% (n) | R% (n) | S% (n) | I% (n) | R% (n) | S% (n) | I% (n) | R % (n) | S% (n) | I% (n) | R% (n) |
| IMP | 53 (16) | - | 47 (14) | 100 (10) | - | - | 50 (5) | - | 50 (5) | 10 (1) | - | 90 (9) |
| MEM | 53 (16) | - | 47 (14) | 100 (10) | - | - | 50 (5) | - | 50 (5) | 10 (1) | - | 90 (9) |
| CAZ | 27 (8) | 10 (3) | 63 (19) | 80 (8) | 20 (2) | - | - | 10 (1) | 90 (9) | - | - | 100 (10) |
| CRO | 23 (7) | 7 (2) | 70 (21) | 70 (7) | 20 (2) | 10 (1) | - | - | 100 (10) | - | - | 100 (10) |
| CTX | 20 (6) | 10 (3) | 70 (21) | 60 (6) | 30 (3) | 10 (1) | - | - | 100 (10) | - | - | 100 (10) |
| FEP | 37 (11) | 3 (1) | 60 (18) | 100 (10) | - | - | 10 (1) | 10 (1) | 80 (8) | - | - | 100 (10) |
| CIP | 37 (11) | 7 (2) | 56 (17) | 100 (10) | - | - | 10 (1) | 10 (1) | 80 (8) | - | 10 (1) | 90 (9) |
| LEV | 43 (13) | 3 (1) | 54 (16) | 100 (10) | - | - | 30 (3) | - | 70 (7) | - | 10 (1) | 90 (9) |
| PIP | 23 (7) | 10 (3) | 67 (20) | 70 (7) | 30 (3) | - | - | - | 100 (10) | - | - | 100 (10) |
| PIP- TAZ | 30 (9) | 3 (1) | 67 (20) | 90 (9) | 10 (1) | - | - | - | 100 (10) | - | - | 100 (10) |
| SAM | 40 (12) | - | 60 (18) | 100 (10) | - | - | 20 (2) | - | 80 (8) | - | - | 100 (10) |
| CN | 57 (17) | - | 43 (13) | 100 (10) | - | - | 40 (4) | - | 60 (6) | 30 (3) | - | 70 (7) |
| TOB | 70 (21) | - | 30 (9) | 100 (10) | - | - | 90 (9) | - | 10 (1) | 20 (2) | - | 80 (8) |
| AK | 57 (17) | - | 43 (13) | 100 (10) | - | - | 50 (5) | - | 50 (5) | 20 (2) | - | 80 (8) |
| TGC | 60 (18) | 23 (7) | 17 (5) | 100 (10) | - | - | 80 (8) | 20 (2) | - | - | 50 (5) | 50 (5) |
| CO | 87 (26) | - | 13 (4) | 100 (10) | - | - | 100 (10) | - | - | 60 (6) | - | 40 (4) |
| D | 63(1 9) | 3(1) | 33(10) | 90 (9) | 10 (1) | - | 90 (9) | - | 10 (1) | 10 (1) | - | 90 (9) |
| SXT | 66 (20) | 7 (2) | 27 (8) | 90 (9) | - | 10 (1) | 60 (6) | 10 (1) | 30 (3) | 50 (5) | 10 (1) | 40 (4) |
| TE | 43 (13) | - | 57 (17) | 90 (9) | - | 10 (1) | 40 (4) | - | 60 (6) | - | - | 100 (10) |

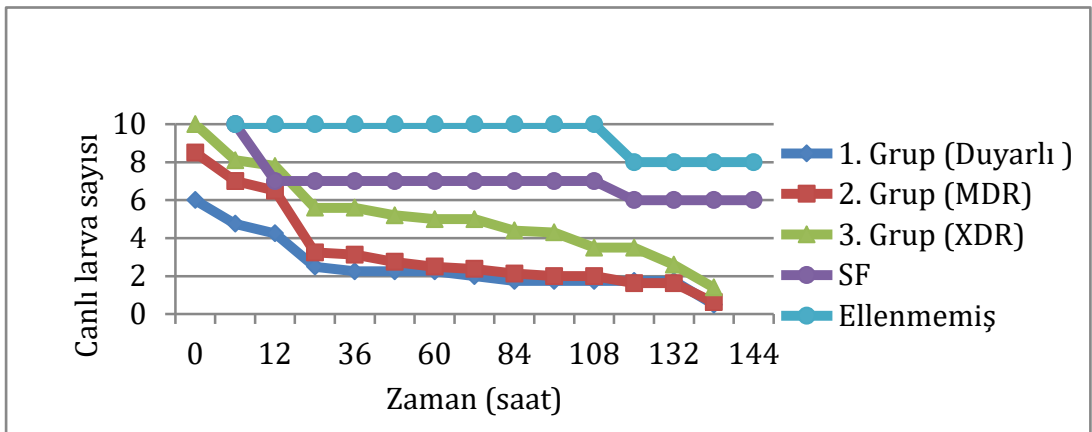
S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R:Dirençli

Grup 1: Duyarlı izolatlar, Grup 2: MDR izolatlar, Grup 3: XDR izolatlar

4.3. *Galleria mellonella* Enfeksiyon Modeli

G.mellonella larvaları ile *A.baumannii* izolatları kullanılarak oluşturulan enfeksiyon modelinde larvalar 12 saat aralıklarla 144 saat boyunca değerlendirilmiştir. İlk 24 saatlik değerlendirmede birinci gruptaki larvaların ortalama %58'inin, ikinci gruptaki larvaların ortalama %62'sinin, üçüncü gruptaki larvaların ise ortalama olarak %44'ünün öldükleri tespit edilmiştir. Enfeksiyon modelinde deney saatlerine göre canlı kalan larva sayıları ve mortalite oranları tabloda gösterilmiştir. Buna göre duyarlı izolatlardan oluşan birinci grup ile çok ilaca dirençli izolatlardan oluşan ikinci grubun larvalar üzerindeki mortalite hızlarının birbirine yakın düzeylerde oldukları görülmüş olup, ekstrem dirençli izolatlardan oluşan üçüncü grubun mortalite hızının ise diğer iki gruptan düşük olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde üçüncü gruptaki izolatların mortalite hızının 24. - 96. saatler arasında ikinci gruptan anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Diğer saatlerde ise fark bulunamamıştır. Duyarlı izolatlardan oluşan birinci gruptaki larva sayısının yetersiz olması nedeniyle, ilk grup ile ikinci ve üçüncü gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirme yapılamamıştır.

Şekil 1: *A.baumannii* ile enfekte edilen larvaların yaşam eğrileri



Tablo 6: *A.baumannii* izolatları ile oluşturulan enfeksiyon modelinde deney saatlerine göre canlı kalan larva sayısı ve mortalite oranları

| Deney Saati | Canlı kalan larva ortalaması (mortalite oranı, %)* | | |
|-------------|--|----------------|-----------------|
| | 1. Grup n=4 | 2. Grup n=8 | 3. Grup n=10 |
| 6. | 4.75 (21) | 7.00 (18) | 8.10 (19) |
| 12. | 4.25 (29) | 6.50 (24) | 7.80 (22) |
| 24. | 2.50 (58) | 3.25 (62) | 5.60 (44) |
| 36. | 2.25 (62) | 3.13 (63) | 5.60 (44) |
| 48. | 2.25 (62) | 2.75 (68) | 5.20 (48) |
| 60. | 2.25 (62) | 2.50 (71) | 5.00 (50) |
| 72. | 2.00 (67) | 2.38 (72) | 5.00 (50) |
| 84. | 1.75 (71) | 2.13 (75) | 4.40 (56) |
| 96. | 1.75 (71) | 2.00 (76) | 4.30 (57) |
| 108. | 1.75 (71) | 2.00 (76) | 3.50 (65) |
| 120. | 1.75 (71) | 1.63 (81) | 3.50 (65) |
| 132. | 1.75 (71) | 1.63 (81) | 2.60 (74) |
| 144. | 0.50 (92) | 0.63 (93) | 1.40 (86) |

*Birinci gruptan 4 izolat ile çalışılarak, her izolat için 6 adet larvaya enjeksiyon yapılmıştır, ikinci gruptaki 10 izolatın 8 tanesi ile çalışılarak üç izolat için 6 adet larvaya, 5 izolat için ise 10 adet larvaya enjeksiyon yapılmıştır, üçüncü gruptaki 10 izolatın hepsi çalışılarak her izolat için 10 larvaya enjeksiyon yapılmıştır.



Şekil 2: *Galleria mellonella* larvaları.

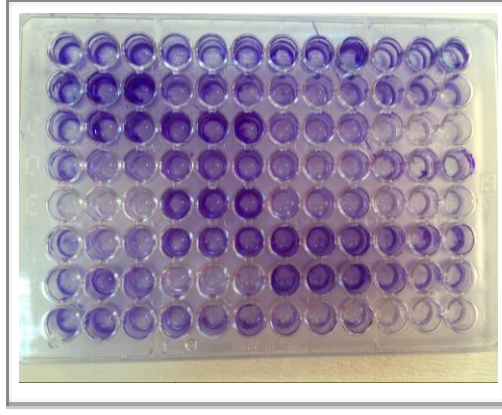
Sağlıklı larvalar açık renkli, enfektif larvalar koyu renkli görünmektedir.

4.4. Biyofilm Oluşumu

A.baumannii izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri, 37°C’de 24 saatlik inkübasyonu takiben bakterilerin polistren mikroplak yüzeylerine adezyonu OD 550 ölçümü ile değerlendirilmiştir. (Şekil 3) Tüm izolatlar biyofilm oluşturmayan, zayıf biyofilm oluşturan, orta biyofilm oluşturan ve güçlü biyofilm oluşturan izolatlar şeklinde kategorize edilmiştir.

Çalışmamızda bulunan tüm izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri olduğu gözlenmiştir. Toplamda 8 izolatın (%26.7) güçlü biyofilm oluşturduğu, 11 izolatın (%36.7) orta düzeyde biyofilm oluşturduğu, 11 izolatın (%36.7) ise zayıf düzeyde biyofilm oluşturdıkları tespit edilmiştir. Güçlü biyofilm oluşturma yeteneği olan 8 izolatın 6 tanesinin duyarlı izolatlardan oluşan birinci grupta yer aldığı tespit edilmiştir. Diğer güçlü biyofilm oluşumu gösteren izolatların ise birisinin multi-drug resistant izolatların yer aldığı ikinci grupta diğerinin ise extreme-drug resistant suşların yer aldığı üçüncü grupta olduğu gözlenmiştir. Orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatlar da ise 3 tanesinin birinci grupta, 4 tanesinin ikinci grupta, 4 tanesinin de üçüncü grupta yer aldığı görülmüştür. Zayıf biyofilm oluşturan izolatların 1 tanesinin birinci grupta, 5 tanesinin ikinci grupta, 5 tanesinin ise üçüncü grupta yer aldıkları görülmüştür.

Bu sonuçlara göre birinci grupta yer alan duyarlı izolatların biyofilm oluşturma yeteneğinin diğer gruplardaki dirençli izolatlarla oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fakat gruplar arasında değerlendirme yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p=0.084$, $p>0.05$). MDR ve XDR izolatlarının yer aldıkları ikinci ve üçüncü gruplarda biyofilm oluşumunun orta ve zayıf düzeylerde oldukları tespit edilmiştir. İkinci ve üçüncü gruplar arasında orta ve zayıf düzeylerde biyofilm oluşturmaları açısından anlamlı bir fark görülemediği ($p>0.05$). XDR izolatların yer aldığı son gruptaki 5 adet zayıf biyofilm oluşturan suştan üç tanesinin kolistine dirençli izolatlar oldukları tespit edilmiştir.

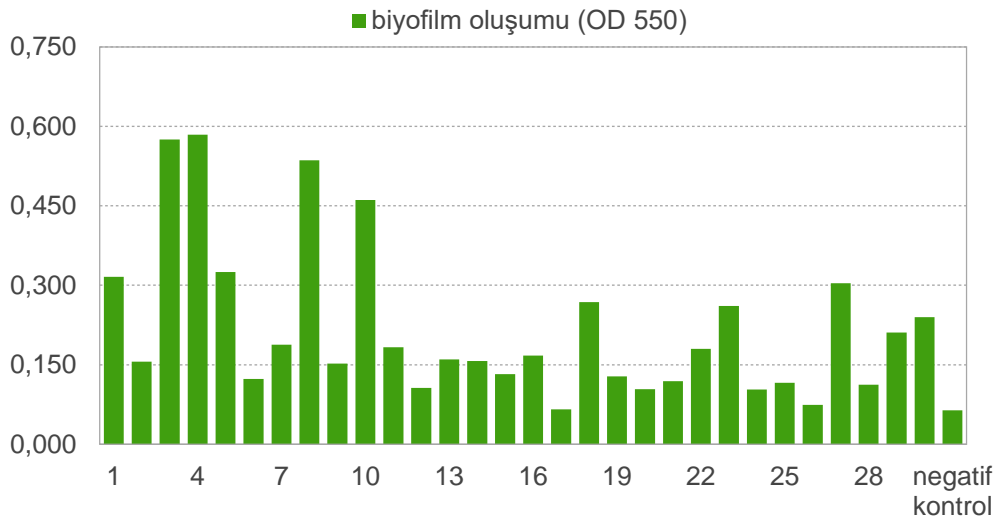


Şekil 3: 96 kuyucuklu polistren mikropakta izolatlardan biyofilm oluşumu

Tablo 7: Biyofilm oluşum derecesinin gruplar arasındaki dağılımı

| Biyofilm oluşumu | 1. Grup DUYARLI n=10 | | 2. Grup MDR n=10 | | 3. Grup XDR n=10 | | p |
|------------------|-------------------------|----|---------------------|----|---------------------|----|-------|
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | |
| Zayıf | 1 | 10 | 5 | 50 | 5 | 50 | 0.084 |
| Orta | 3 | 30 | 4 | 40 | 4 | 40 | |
| Güçlü | 6 | 60 | 1 | 10 | 1 | 10 | |

Şekil 4: Mikropak yöntemi ile biyofilm oluşumu. OD 550 ölçüm değerleri



4.5. Hareket

Referans olarak aldığımız çalışmada “swarming” hareketi tespiti için farklı yüzdelerde (%0.25, %0.5, %0.75, %1) agar miktarları içeren Luria Bertani ve Mueller Hinton besiyerleri kullanılmış olup en etkili sonuç en düşük agar düzeyinde hazırlanmış olan besiyerinde bulunmuştur (41). Ön deneylerimize dayanarak çalışmamızda “swarming” hareketi tespiti için en iyi sonucu veren % 0.25 oranında agar içeren Luria Bertani besiyeri tercih edilmiştir. İzolatların 37 C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonrasında “twitching” ve “swarming” hareketleri açısından 24 ve 48 saat arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir.

Toplam 30 izolatın hiçbirinde “twitching” yeteneği olmadığı tespit edilmiştir. İzolatlarda “twitching” hareketinin tespit edilememesinin ardından test %1 oranında agar içeren Luria Bertani besiyeri ile tekrar edilmiştir. Kullanılan her iki besiyeri arasında "twitching" hareketi açısından herhangi bir fark gözlenmemiştir. “Swarming” hareketinin ise sadece 2 suşta pozitif olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 5) “Swarming” hareket yeteneği olan izolatların birisinin MDR izolatların bulunduğu ikinci grupta diğerinin ise XDR izolatlarının yer aldığı üçüncü grupta oldukları tespit edilmiştir. Duyarlı izolatlardan oluşan ilk gruptaki hiçbir izolatın “swarming” ya da “twitching” hareket yeteneği olmadığı tespit edilmiştir. İkinci ve üçüncü gruptaki izolatların hareket yetenekleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 5: "Swarming" hareketi oluşumu. Alta görülen 16 numaralı izolatta pozitif.

4.6. Serum Direnci

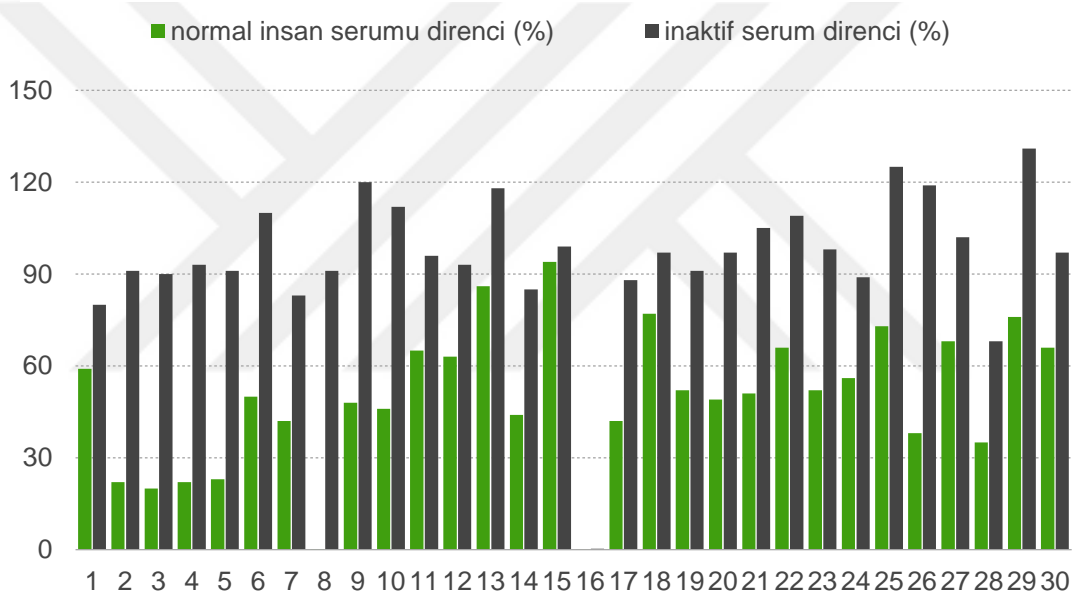
Referans olarak aldığımız çalışmada farklı yüzdelerde serum örnekleri kullanılmış ve normal insan serumunun PBS içerisindeki yüzdesinin %20'nin altında olduğunda yaşayan bakteri sayısında anlamlı bir değişim olmadığı, serum yüzdesinin %40'ın üzerine çıktığında ise yaşayan bakteri sayısında anlamlı ölçüde azalma görüldüğü tespit edilmiştir (95). Bu sebeple bizim çalışmamızda serum direnci tespiti için PBS içerisinde %40 oranında serum ile çalışılmıştır. Her izolat için hem normal insan serumu hem de ısı ile inaktive edilmiş serum örneklerindeki yaşayan bakteri sayısı kanlı agar plaklarına yapılan seri dilüsyon ekimleri sonucunda tespit edilerek yaşayan bakteri sayısı yüzde olarak hesaplanmıştır.

Tüm izolatlar değerlendirildiğinde, normal insan serumunda yaşayan bakteri sayısı açısından inokulumun %1'inin altında olan iki adet bakteri olduğu tespit edilmiştir. Bu bakterilerden birisi duyarlı izolatlardan oluşan birinci grupta, diğeri ise MDR izolatların yer aldığı ikinci grupta bulunmaktadır. Birinci grupta yer alan izolatın normal serum direnci %1'in altında olmasına rağmen inaktif serum direnci %91 olarak, ikinci grupta yer alan izolatın inaktif serum direnci ise %1'in altında tespit edilmiştir. Normal insan serumuna olan direncin araştırılmasında, sadece bir izolatın serumda yaşayan bakteri sayısı açısından inokulumun %90'ının üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu izolat ikinci grupta yer almaktadır. Diğer tüm izolatların normal serum ve inaktif serum direnci oranları %20'nin üzerinde bulunmaktadır.

Normal insan serumuna olan direnç incelendiğinde, birinci grupta ortalama normal insan serum direnci %36.8, ikinci grupta %63.5, üçüncü grupta ise %58.1 olarak tespit edilmiştir. Duyarlı izolatlardan oluşan birinci grupta bakterilerin serum direnci yüzdeleri %0.017 ile %59 arasında, MDR izolatlarından oluşan ikinci grupta %0.001 ile %94 arasında XDR izolatlarından oluşan üçüncü grupta ise %35 ile %76 arasında bulunmuştur. Duyarlı izolatların yer aldığı birinci gruptaki serum direncinin, dirençli izolatların yer aldığı ikinci ve üçüncü gruplarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu belirlenmiş, aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Birinci ve üçüncü grup arasında anlamlı farkın P değeri 0.035, birinci grup ile ikinci grup arasında anlamlı farkın p değeri 0.020 olarak tespit edilmiştir. İkinci grup ile üçüncü grup arasında serum direnci açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

İzolatların inaktive edilmiş serum direnci incelendiğinde direnç oranı %1'in altında olan sadece bir izolat olduğu tespit edilmiştir. Diğer tüm izolatların direnç oranları en az %68 olarak tespit edilmiştir. Toplam 23 adet izolatın inaktive edilmiş serum direnci yüzdesinin %90 ve üzerinde oldukları tespit edilmiştir. Üç gruptaki izolatların hepsinin inaktif serum direnci yüksek bulunduğundan dolayı gruplar arasından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlara göre normal insan serumu direnci ile inaktive edilmiş serum direnci arasında anlamlı derecede fark olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 6) Tüm izolatların normal insan serumu ve ısı ile inaktive edilmiş serum direnç yüzdeleri Tablo 8 ve 9'de gösterilmiştir.

Şekil 6: İzolatların normal ve ısı ile inaktive edilmiş serum direnci yüzdeleri



Tablo 8: Normal ve inaktif serum direncinin gruplar arası dağılımı

| | Serum Direnci Ort ± Std.dev. (% min-%max) | p | İnaktif Serum Direnci Ort ± Std.dev. (%min-%max) | P |
|------------------------------|---|-------|--|-------|
| 1. Grup(Duyarlı) n=10 | 36.8 ± 15.0 (0.01 - 59) | 0.011 | 96.1 ± 13.2 (80-120) | 0.231 |
| 2. Grup (MDR) n=10 | 63.5 ± 18.7 (0.001 - 94) | | 96.0 ± 9.4 (0.28 - 118) | |
| 3. Grup (XDR) n=10 | 58.1 ± 14.1 (35 - 76) | | 104.3 ± 18.3 (68 -131) | |

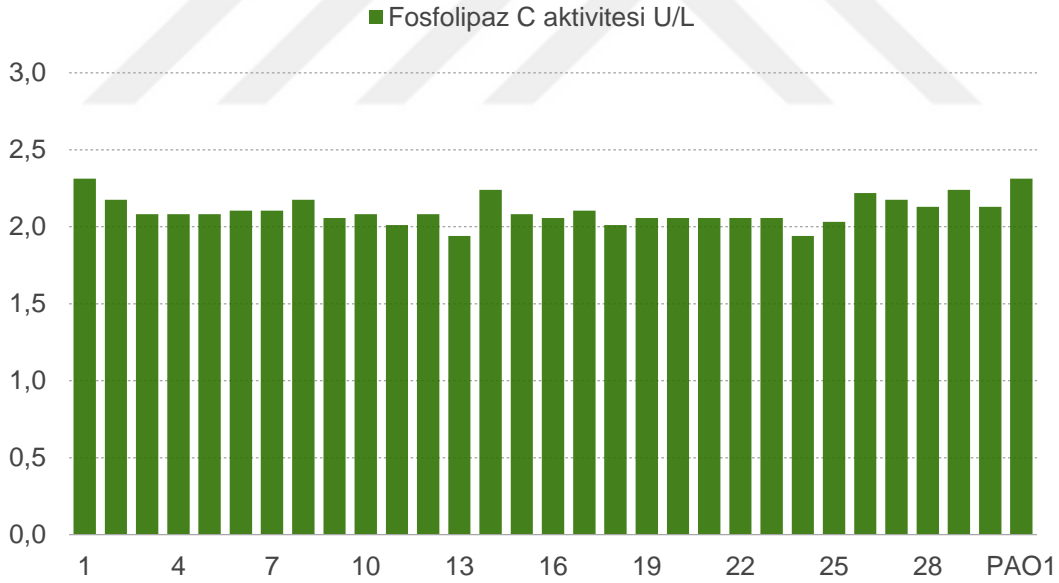
Ort: Ortalama, min: Minimum değer, Std. dev.:Standart deviasyon , max:Maksimum değer
n: Grupta bulunan izolat sayısı

Tablo 9: İzolatların normal insan serumu ve ısı ile inaktive edilmiş serum direnci yüzdeleri

| İzolat no | Serum direnci % | İnaktif serum direnci % |
|-----------|-----------------|-------------------------|
| 1 | 59 | 80 |
| 2 | 22 | 91 |
| 3 | 20 | 90 |
| 4 | 22 | 93 |
| 5 | 23 | 91 |
| 6 | 50 | 110 |
| 7 | 42 | 83 |
| 8 | 0,017 | 91 |
| 9 | 48 | 120 |
| 10 | 46 | 112 |
| 11 | 65 | 96 |
| 12 | 63 | 93 |
| 13 | 86 | 118 |
| 14 | 44 | 85 |
| 15 | 94 | 99 |
| 16 | 0,001 | 0,28 |
| 17 | 42 | 88 |
| 18 | 77 | 97 |
| 19 | 52 | 91 |
| 20 | 49 | 97 |
| 21 | 51 | 105 |
| 22 | 66 | 109 |
| 23 | 52 | 98 |
| 24 | 56 | 89 |
| 25 | 73 | 125 |
| 26 | 38 | 119 |
| 27 | 68 | 102 |
| 28 | 35 | 68 |
| 29 | 76 | 131 |
| 30 | 66 | 97 |

4.7. Fosfolipaz C Aktivitesi

Tüm izolatlarda ekstrasellüler fosfolipaz C aktivitesi saptanmıştır. İzolatların aktivite ölçüm değerleri birbirlerine oldukça yakın bulunmuştur. (Şekil 7) Pozitif kontrol *P.aeruginosa* PAO1 suşunun aktivitesinden daha yüksek aktivite gösteren herhangi bir izolat tespit edilememiştir. Duyarlı izolatlardan oluşan birinci gruptaki bir izolatın fosfolipaz C aktivitesi kontrol suşu ile aynı değerde tespit edilmiştir. Bu izolatın antibiyotik duyarlılık profili incelendiğinde sadece trimetoprim-sulfametaksazol ve tetrasiklin dirençli, doksisisiklin orta duyarlı olduğu görülmüştür. Duyarlı izolatlardan oluşan birinci gruptaki bakterilerin fosfolipaz C aktivite ortalaması 2.126 U/L, MDR izolatlardan oluşan ikinci grubun 2.065 U/L, XDR izolatlardan oluşan üçüncü grubun ise 2.104 U/L olarak hesaplanmıştır. Birinci grupta bulunan izolatların ortalama fosfolipaz C aktivitesi diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur. Üç grup arasında fosfolipaz C aktivitesi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 7: İzolatların fosfolipaz C aktiviteleri U/L olarak görülmektedir.
PAO1 :Pozitif kontrol suşu

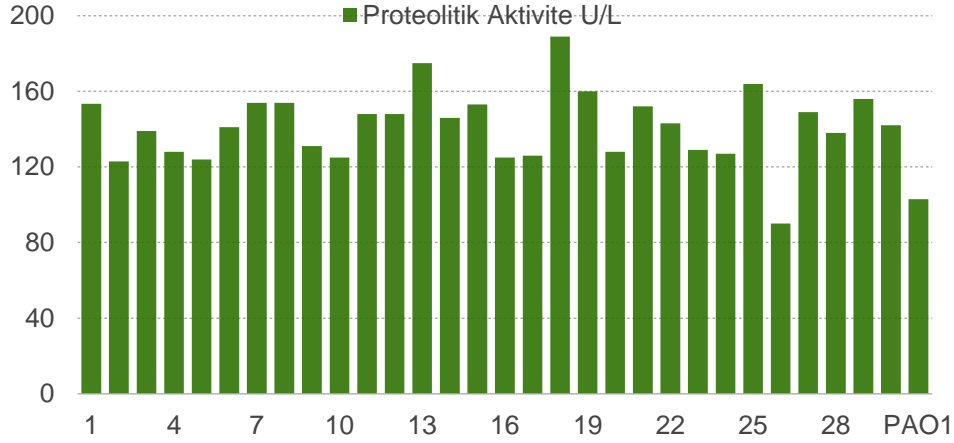
4.8. Proteolitik Aktivite

Tüm izolatlarda proteolitik aktivite pozitif tespit edilmiştir. Şekil 8' de izolatların proteolitik aktivite düzeyleri U/L olarak görülmektedir. Üçüncü grupta yer alan bir izolat dışında tüm izolatlardaki proteolitik aktivite düzeylerinin pozitif kontrol suşu olan *P.aeruginosa* PAO1 suşundan yüksek olduğu tespit edilmiştir. Proteolitik aktivite düzeyi en düşük olacak şekilde tespit edilen bu izolata ait antibiyotik duyarlılık profili incelendiğinde siprofloksasin, levofloksasin, tigesiklin orta duyarlı; doksisisiklin ve kolistin duyarlı olarak tespit edildiği ve XDR izolatı olarak değerlendirildiği görülmüştür. Duyarlı izolatlardan oluşan birinci gruptaki bakterilerin ortalama proteolitik aktiviteleri 137.27 U/L, MDR izolatlardan oluşan ikinci grupta 149.84 U/L, XDR izolatlardan oluşan üçüncü grupta ise 139.02 U/L olacak şekilde hesaplanmıştır. İkinci gruptaki proteolitik aktivite düzeyinin diğer gruplardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Üç grup arasında proteolitik aktivite düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 10: Gruplarda fosfolipaz C aktivitesi ve proteolitik aktivite düzeylerinin ortalama, standart sapma ve p değerleri

| | 1. Grup DUYARLI n=10 | 2. Grup MDR n=10 | 3. Grup XDR n=10 | p |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------|
| Fosfolipaz C aktivitesi | 2.126±0.076 (2.05-2.31) | 2.065±0.077 (1.94-2.24) | 2.104±0.092 (1.94-2.24) | 0.146 |
| Proteolitik aktivite | 137.2±12.9 (123.1-154.5) | 149.8±21.0 (124.7-189.5) | 139.0±20.8 (89.7-164.5) | 0.390 |

Fosfolipaz C ve Proteolitik aktivite değerlendirmesinde tabloda üç gruba ait aktiviteler ortalama ± standart sapma değerleri ve parantez içinde minimum-maksimum değerler şeklinde belirtilmiştir.



Şekil 8: İzolatların proteolitik aktivite düzeyleri.
PAO1: Pozitif kontrol suşu

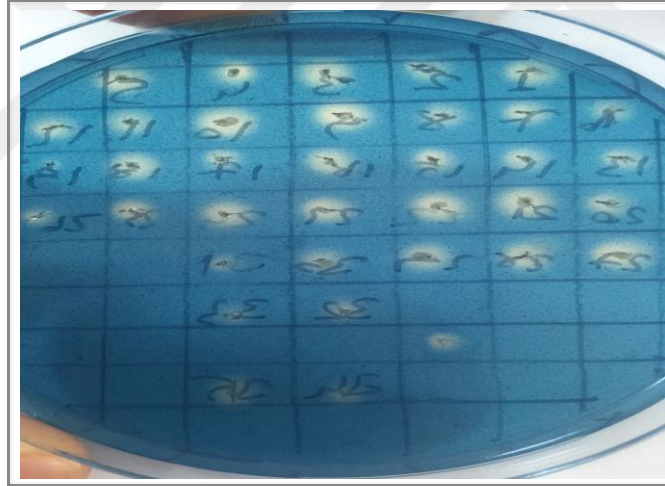
4.9. Siderofor Üretimi

İzolatlar 24. ve 48. saatlerde turuncu halo oluşumu açısından değerlendirilmiştir. İlk 24 saat içerisinde turuncu halo oluşumu gerçekleşmiş olup ve 48. saatte herhangi bir zon çapı artışı saptanmamıştır. Şekil 9'de CAS agarda siderofor üretimi ile ilişkili olarak izolatların etrafında turuncu /sarı halo oluşumu görülmektedir. Konak hücrede yaşamayı sağlayan önemli virülans faktörlerinden birisi olan siderofor üretiminin tüm izolatlarda var olduğu tespit edilmiştir. İzolatların %73'ünün oluşturduğu zon çapının ≤ 4 mm olduğu ve siderofor üretiminin zayıf olduğu tespit edilmiştir. Toplam yedi izolatın 5 mm, bir izolatın ise 6 mm turuncu zon çapı oluşturarak diğer bakterilerden daha güçlü siderofor üretimi gerçekleştirdiği görülmüştür. Farklı ilaç duyarlılığı olan izolatları içeren üç grubun siderofor üretimleri birbirleri ile kıyaslandığında oluşan zon çaplarının 3-6 mm arasında değiştiği, 5 ve 6 mm zon çapı oluşturan izolatların özellikle bir grupta yoğunlaşmadığı ve üç grup arasında siderofor üretimi açısından anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Tablo 11'de gruplara göre siderofor üretimi gösterilmektedir.

Tablo 12'de çalışılan tüm virülans faktörlerine ait sonuçlar derlenmiştir.

Tablo 11: Siderofor üretim düzeyinin gruplar arası dağılımı

| Siderofor üretimi | 1. Grup DUYARLI n=10 | | 2. Grup MDR n=10 | | 3. Grup XDR n=10 | | P |
|-------------------|----------------------------|----|------------------------|----|------------------------|----|-------|
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | |
| + | 7 | 70 | 9 | 90 | 6 | 60 | 0.450 |
| ++ | 3 | 30 | 1 | 10 | 4 | 40 | |



Şekil 9: CAS agarda siderofor üretimi.

Tablo 12: Çalışılan tüm virülans faktörlerine ait sonuçlar

| VİRULANS FAKTÖRÜ | | | | | | | | |
|------------------|--------------------|----------------------------|---|-------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------|------|
| İsolat no | Biyofilm oluşturma | Hareket twitching swarming | | Fosfolipaz C aktivitesi (U/L) | Proteolitik aktivite (U/L) | Siderofor üretimi | Serum direnci (%) NS | İAS |
| 1 | GÜÇLÜ | - | - | 2,312 | 153.4 | + | 59 | 80 |
| 2 | ORTA | - | - | 2,175 | 123.1 | + | 22 | 91 |
| 3 | GÜÇLÜ | - | - | 2,083 | 139.0 | + | 20 | 90 |
| 4 | GÜÇLÜ | - | - | 2,083 | 127.7 | + | 22 | 93 |
| 5 | GÜÇLÜ | - | - | 2,083 | 124.3 | ++ | 23 | 91 |
| 6 | ZAYIF | - | - | 2,104 | 140.9 | + | 50 | 110 |
| 7 | ORTA | - | - | 2,104 | 153.8 | + | 42 | 83 |
| 8 | GÜÇLÜ | - | - | 2,175 | 154.5 | + | 0,017 | 91 |
| 9 | ORTA | - | - | 2,058 | 131.3 | ++ | 48 | 120 |
| 10 | GÜÇLÜ | - | - | 2,083 | 124.7 | ++ | 46 | 112 |
| 11 | ORTA | - | - | 2,012 | 148.4 | + | 65 | 96 |
| 12 | ZAYIF | - | - | 2,083 | 147.7 | + | 63 | 93 |
| 13 | ORTA | - | - | 1,941 | 174.7 | + | 86 | 99 |
| 14 | ORTA | - | - | 2,241 | 146.1 | + | 44 | 85 |
| 15 | ZAYIF | - | - | 2,083 | 152.7 | + | 94 | 118 |
| 16 | ORTA | - | + | 2,058 | 124.7 | ++ | 0,001 | 0,28 |
| 17 | ZAYIF | - | - | 2,104 | 126.3 | + | 42 | 88 |
| 18 | GÜÇLÜ | - | - | 2,012 | 189.5 | + | 77 | 97 |
| 19 | ZAYIF | - | - | 2,058 | 160.4 | + | 52 | 91 |
| 20 | ZAYIF | - | - | 2,058 | 127.9 | + | 49 | 97 |
| 21 | ZAYIF | - | - | 2,058 | 152.0 | ++ | 51 | 105 |
| 22 | ORTA | - | - | 2,058 | 143.1 | + | 66 | 109 |
| 23 | ORTA | - | + | 2,058 | 128.8 | ++ | 52 | 98 |
| 24 | ZAYIF | - | - | 1,941 | 127.5 | + | 56 | 89 |
| 25 | ZAYIF | - | - | 2,033 | 164.5 | + | 73 | 125 |
| 26 | ZAYIF | - | - | 2,220 | 89.7 | + | 38 | 119 |
| 27 | GÜÇLÜ | - | - | 2,175 | 148.8 | ++ | 68 | 102 |
| 28 | ZAYIF | - | - | 2,129 | 137.9 | + | 35 | 68 |
| 29 | ORTA | - | - | 2,241 | 156.1 | ++ | 76 | 131 |
| 30 | ORTA | - | - | 2,129 | 141.8 | + | 66 | 97 |

NS:Normal serum direnci İAS:İnaktif serum direnci

5. TARTIŞMA

Acinetobacter baumannii olarak sınıflanan Gram-negatif kokobasiller, tüm Gram-negatif hastane enfeksiyonlarının %2-10'undan sorumlu olan önemli fırsatçı bakteriyel patojenlerdir (100). Bakteri, hastane ortamında yayılabilme kabiliyeti ve antibiyotiklere kolaylıkla direnç geliştirebilmesi sayesinde tıp dünyası için global bir sorunu teşkil etmektedir (30). Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, *A. baumannii*'yi tüm dünyada yaygın görülen en önemli 6 çok ilaca dirençli mikroorganizma içerisinde saymaktadır. *A. baumannii* genusu yıllar içinde birçok taksonomik değişikliğe uğramıştır. 1986 yılına kadar *A. baumannii* türü resmi olarak tanımlanmamıştır. Bu da bu senenin öncesinde bilimsel ve medikal literatürde kayıt altına alınmış olan *Acinetobacter* enfeksiyonlarının yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Bugün *A. baumannii* olarak adlandırılan mikroorganizmaların yarattığı enfeksiyonların bir problem haline gelmesi muhtemelen 1970'lere kadar dayanmaktadır (100). Popülasyonlarda *Acinetobacter* ile meydana gelen enfeksiyon hızları (%28,6) alarme edici derecede yüksektir ve *Staphylococcus aureus*'un enfeksiyon hızlarının (%30,9) ardından ikinci sırada bulunmaktadır. *Acinetobacter* ilişkili enfeksiyon olguları artık metisilin-dirençli *S. aureus* olgularıyla kıyaslanacak hale gelmiştir ve olgular artık "Gram-negatif MRSA" olarak adlandırılmaktadır. Kliniklerde *Acinetobacter* ile kolonize hastaların enfekte hastalara olan oranı 10:1 iken bu oran MRSA için 2:1'dir (29). Çalışmalar pediatrik ve erişkin *Acinetobacter* enfeksiyonlarının birbirine eşit olduğunu göstermektedir (101). Hastanelerdeki günümüz hasta popülasyonları, 1970'lerdeki popülasyonlara kıyasla *A. baumannii*'ye daha duyarlıdır. Bunun birkaç nedeni şöyle sayılabilir: Hastaların altta yatan ciddi hastalıkları, buna bağlı olarak selektif antibiyotiklerin yüksek oranda kullanılması, kateterlerin kullanımında artış, ve invaziv cihaz kullanımında artış (100).

Belirli *A. baumannii* klonlarına dahil enfeksiyon suşlarının çoğu çok ilaca direnç (MDR) fenotipi göstermektedir (100). ABD'de 'The National Nosocomial Infections Surveillance' (NNIS) tarafından yapılan ve 1986- 2003 yılları arasını kapsayan bir çalışmada *A. baumannii*'de seftazidim direncinin %24'den %67'ye, amikasin

direncinin %3'den %20'ye, imipenem direncinin de %20'lere çıktığı ortaya konmuştur (102). Onbir Avrupa ülkesinin katıldığı bir diğer izlem çalışmasında (MYSTIC Program 1997-2000) 37 hastaneden toplanan *Acinetobacter* izolatlarının %14'ü meropeneme, %16'sı imipeneme dirençli bulunmuştur. Bu çalışmada piperasilin-tazobaktam, tobramisın, seftazidim ve siprofloksasine direnç daha yüksek oranlarda bulunmuş olup bu oranlar sırasıyla %39, %41, %45 ve %53'dür. Türkiye'nin farklı bölgelerinin de dahil olduğu bu çalışma, ülkemize ait *Acinetobacter* izolatlarında imipenem direncinin %38, meropenem direncinin %34 olduğunu ve izolatların %80'inden fazlasının piperasilin-tazobaktam, seftazidim ve siprofloksasine dirençli olduğunu ortaya koymuştur (103). MYSTIC grubunun 2000-2003 yılları arasında yaptıkları çalışmada ise Türkiye'de izole edilen *Acinetobacter* izolatlarının %42'sinin meropeneme, %48'inin imipeneme, %84'ünün seftazidime, %91'inin sefotaksime, %76'sının sefepime, %82'sinin piperasilin-tazobaktama, %79'unun siprofloksasine, %57'sinin tobramisine dirençli olduğu görülmüştür (104). Son çalışmalar kuvvetle göstermektedir ki çok ilaca direnç (MDR) fenotipi kazanımı, bakterinin bir hastane patojeni olarak başarılı olmasının belirleyicilerinden birisidir (100).

Bakteriyel adaptasyon ve direnç mekanizmaları bakterilerin konak ve çevre ile olan ilişkilerini etkilemektedir. Bu bakteriyel direnç, tek ya da çoklu antibiyotik gruplarına karşı olabilmekte ve ciddi şekilde antibiyotiklerin patojenlere karşı etkilerinde azalmalar görülmektedir. *A.baumannii*'de antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi farklı mekanizmalar yolu ile olmakta ve gelişen bu direnç sonucunda, beklenmeyen fenotipik, genotipik ve fizyolojik değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Bakterilerde antibiyotiklere karşı oluşan bu adaptasyon "biyolojik uyum bedeli (biological fitness cost)" olarak tanımlanmaktadır. Bu uyum sürecinde bakterilerde üreme yeteneğinde düşüş gözlenirken, antibiyotik direnci kazanmış bakterinin virülans özelliklerinde de azalma olduğu bildirilmektedir (105).

Son yıllarda genomik, fenotipik ve enfeksiyon modeli analizleri yaklaşımlarının beraberce kullanılması *A. baumannii* patojenitesi için önemli virülans faktörlerinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Bugüne kadar dış membran proteinlerinin, hidrolitik enzimlerin, ve bazı multifaktöriyel fenotiplerin patojenitede rol aldığı teyit edilmiştir (100). Yapılmış çalışmaların çoğu *A. baumannii*'nin epidemiyolojisi ve

antibiyotik direnci konularını ele almıştır. Bununla birlikte bakterinin virülansı ile ilgili detayların tanımlanması ise eksik kalmıştır (30). İnsan sağlığı için önemli olan *A.baumannii*'nin patojenitesinin ortaya çıkarılması için antimikrobiyal direnç mekanizmalarının araştırılmasının yanında bakteri tarafından eksprese edilen virülans faktörlerinin mekanizmasının anlaşılması da oldukça önemlidir (3).

Bakteri popülasyonunda antibiyotik direncinin ortaya çıkması sonrası süreç, dirence karşı gelişen mutasyon oranı ve bu mutantların uyum bedeli (fitness cost) gibi kritik kabul edilen birkaç faktör tarafından düzenlenir. Eflüks pompası gibi direnç mekanizmalarının aşırı ekspresyonu ve kromozomal mutasyonların ilacın hücre sel hedefinde meydana getirdiği yapısal değişiklikler sonucunda bakteride uyum bedeli (fitness cost) ortaya çıkmaktadır. Bakterilerde ortaya çıkan kinolon direnci, eflüks pompa artışı ve DNA giraz, topoizomeraz enzimlerindeki mutasyonlar nedeniyle olmaktadır. Bu direncin *Escherichiae coli* ve *Salmonella enterica*'da büyümeyi ve virülansı azalttığı gösterilmiştir (106).

Prokaryotlarda özellikle *Acinetobacter* cinsinde biyolojik uyum bedeli süreç ve sonuçları ile ilgili yeterli çalışma bulunmadığı için bilgilerimiz sınırlı kalmış olsa da konu ile ilgili yapılan bir çalışmada *A.baumannii* ATCC 19606 suşunun kolistin dirençli mutanı (RC64), dirence karşı oluşan bakteriyel adaptasyon sürecinde dış membran proteinlerinde, metabolik bazı enzimlerin salınımında bir takım değişiklikler oluşturmuş ve bakterinin üremesinde yavaşlama olduğu görülmüştür. Oluşturulan fare hayvan modelinde düşük virülans saptanmıştır (107). Kang Y.S ve ark.'nın rifampin dirençli *A.baumannii* suşuyla yaptıkları virülans çalışmasında, duyarlı suş ile karşılaştırıldığında bakteride quorum sensing kaybı, swimming ve swarming hareketlerinde azalma, fimbria ekspresyonunda zayıflık, membrandaki yağ asiti kompozisyonunda değişiklik meydana geldiği görülmüştür. Bakteride farklı antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direncin farklı genotipik ve fenotipik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (105). Rifampisin direnci ve biyolojik uyum bedeli arasındaki bağlantı, daha önce de *Mycobacterium tuberculosis* ve *Staphylococcus aureus*'da tanımlanmıştır (108,109).

Son yıllarda enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin ortaya çıkarılmasında, memeli modelleri yanında kullanılmaya başlanan mini modellerden biri olan *Galleria*

mellonella enfeksiyon modelidir. *A.baumannii* ile oluşturulan *G.mellonella* enfeksiyon modeli çalışmalarında Antunes ve ark. farklı klonlara ait üç klinik *A.baumannii* suşları arasında virulans açısından herhangi bir fark olmadığını, klinik olmayan SDF suşunu ise avirulan olarak tespit etmişlerdir. Hemolitik aktivite, fosfolipaz, proteaz aktiviteleri gibi virülans faktörleri açısından ise suşlar arasında fark tespit edilememiş olup, bakterinin patojenitesinde metabolik yetenekler ve çevresel stres ile başa çıkma mekanizmalarının, spesifik virülans faktörlerinin üretilmesinden daha önemli olduğu bildirilmiştir (30). Yine Ayşe Kalkancı ve ark. kolistin duyarlı ve dirençli *A.baumannii* suşları arasında bu enfeksiyon modelinde virulans açısından fark tespit edememişlerdir (91). Peleg ve ark. *A.baumannii* suşlarının *A.baylyi* ve *A.lwoffii* suşlarına göre daha patojen olduklarını tespit ederek, bu enfeksiyon modelinin *Acinetobacter spp.* suşlarının patojenitesinin araştırılmasında kullanılabilecek uygun bir model olduğunu bildirmişlerdir (92).

Çalışmamızda *Galleria mellonella* enfeksiyon modeli kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde ekstrem ilaç dirençli üçüncü grubun diğer duyarlı ve çok ilaca dirençli gruplara oranla daha düşük virülans oluşturduğu görülmüştür. Fakat tüm izolatlarda biyofilm oluşumu, siderofor üretimi, fosfolipaz C ve proteaz aktivitesi gibi spesifik virülans faktörleri tespit edilmiş olup, ekstrem dirençli bu izolatların düşük virülansını spesifik virülans determinantlarını taşıyamama ya da biyolojik uyum bedeli sürecinde kaybetmelerine bağlayabilmek mümkün olmamaktadır. Bu enfeksiyon modelinde üçüncü grupta bulunan izolatların total virülansında azalma mevcut olduğundan dolayı çalışmamızda bulunmayan quorum sensing sinyal molekülleri ile ilişkili direnç ve virülans regülasyonu gibi farklı faktörlerin araştırılması gerekmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar bakterinin direnç kazanması ile oluşan biyolojik uyum sürecinde virülansının azaldığını gösteren çalışmalarla uyumludur. Ancak biyolojik uyum bedeli olmaksızın ya da daha düşük uyum bedeli ile kazanılmış antibiyotik direncinin bulunduğu da farklı bakteriler ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ve *Acinetobacter* türleri için konunun aydınlatılması gerekmektedir (109, 110).

Birçok bakterinin virülansında önemli bir rol oynayan biyofilm oluşumu *A.baumannii*'de de biyotik ve abiyotik yüzeylerde görülmekte olup, bu sayede bakteri

hastane ortamlarındaki çeşitli yüzeylerde kolayca kolonize olabilmekte, ayrıca antibiyotik direnci geliştirmesi ve konak immün sisteminden kaçması kolaylaşmaktadır (4). Aynı zamanda *A.baumannii* biyofilm ile ilişkili medikal cihaz kontaminasyonunun da en yaygın sebebi olan bakteridir (111).

Biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki şu an net değildir. Son yirmi yılda yapılan birçok çalışma çelişkili sonuçlar vermiştir. Lee HW ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 23 çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatu ile çalışılarak solunum yolu epitel hücrelerine yapışma ve polistren yüzeylerde oluşan biyofilm araştırılmış, bu iki durumun birbiri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre bla (PER-1) geni içeren suşların içermeyenlere göre biyofilm oluşumunun ve solunum yolu epitel hücre adezyonunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda çoklu ilaç direncinin bakterinin hayatta kalmasına ve çevresel olarak yayılmasına da katkı sağlayabileceği düşünülmüştür (112). Benzer bulgular Rao ve ark. tarafından da rapor edilmiştir. Biyofilm yapılarının antimikrobiyal tedaviye karşı direnç geliştirme yeteneğini artırdığı ve aynı zamanda çevresel stres, sınırlı besin ve dehidratasyona karşı dayanmada rol oynadığı belirtilmiştir (113).

Hui Liu ve ark. tarafından Çin’de yapılan bir çalışmada 122 hastaya ait alt solunum yolu örneklerinde biyofilm ile ilişkili *abaI*, *csuE*, *ompA*, *bla-PER1* genleri PCR ile araştırılmış ve *abaI*- ve *csuE*- pozitif suşların 14 farklı antimikrobiyal ajana daha fazla direnç gösterdikleri görülmüştür. Bu antimikrobiyal ajanlar arasında; amikasin, ampicilin, sefepim, sulbaktam, sefotaksim, seftazidim, siprofloksasin, gentamisin, imipenem, meropenem, piperasilin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametaksazol ve levofloksasin bulunmaktadır. Aynı çalışmada biyofilm oluşumu ile ilgili olarak farklı görüşler ileri sürülmüştür. Bunlar; yüksek düzey yoğunlukta biyofilm oluşumunun antibiyotik penetrasyonunda azalmaya yol açtığı, ayrıca biyofilm içindeki bakterilerin metabolizmalarının ve büyümelerinin yavaş olması onları antibiyotiklere karşı daha az duyarlı hale getirdiği belirtilmiştir. Biyolojik membranların, suşları dirençli fenotip oluşturmaları yönünde uyardığı, efluks pompa direnci ekspresyonu ve antibiyotik direnç gen sayısında artış oluştuğu ve direnç geliştiği belirtilmiştir. Yine biyofilm oluşumunun bakterinin bağışıklık sistemi

tarafından öldürülmesini engelleyen doğal bir bariyer sistemi olduğu ve biyofilm içerisindeki bazı bakterilerin quorum sensing sayesinde bağımsız olarak planktonik büyüme göstererek enfeksiyonun yayılmasına ve relapsına neden olabileceği ileri sürülmüştür (114).

Biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir başka çalışmada Badave ve ark. ampisilin-sulbaktam, amikasin, siprofloksasin ve seftazidim direncinin imipenem ve piperasiline oranla biyofilm üreten suşlarda çok daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre ise imipenem ve piperasilin türü antimikrobiyal ajanların florokinolon ve aminoglikozit gruplarına oranla biyofilm penetrasyonunun daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür (115). Türkiye’de Bayrı Eraç ve ark. tarafından yapılmış çok ilaca dirençli *A.baumannii* izolatlarında virulans faktörlerinin araştırıldığı çalışmada incelenen 16 suştan 12’sinin güçlü biyofilm üreten suşlar oldukları tespit edilmiş ve çoklu ilaç direnci ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (4).

Farklı yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde biyofilm oluşturma yeteneği olan suşların daha fazla antibiyotik direnci geliştirdiğini bildiren çalışmaların sayısı az değildir (112-118). Fakat bununla birlikte birçok ilaca duyarlı olan *A.baumannii* suşlarının çok ilaca dirençli suşlardan daha fazla biyofilm ürettiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. 2016 yılında yayınlanmış olan, Lihua Qi ve ark. tarafından Çin’de yapılmış antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmada 272 klinik izolattan 249’unda biyofilm oluşumu gözlenmiş, duyarlı olan suşların, çok ilaca dirençli ve ekstrem ilaç dirençli suşlara oranla daha güçlü biyofilm oluşturdukları tespit edilmiştir. Biyofilm kapasiteleri ile antibiyotik grupları arasındaki direnç ilişkisi de araştırılmış olup aminoglikozit, karbapenem, florokinolonlar, ampisilin-sulbaktam, trimetprim-sulfametaksazol, tetrasiklin ve penisilin gruplarına duyarlı olan suşlarda biyofilm oluşumu, bu gruplara dirençli olan suşlardan daha güçlü bulunmuştur. Sefalosporinler ve lipopeptitler için duyarlı ve dirençli suşlar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (119). Lauren B. King ve ark. tarafından yapılan serum direnci ve biyofilm üretiminin araştırıldığı çalışmada, yedi suş içerisinde en güçlü biyofilm üreten iki suşun da antibiyotiklerin çoğuna duyarlı oldukları, zayıf biyofilm üreten dört suşun ise çok ilaca dirençli izolatlar oldukları tespit edilmiştir. Bu

sonuçlar ile antibiyotik duyarlılığı ile biyofilm oluşumu arasında ilişki olabileceği ileri sürülmüştür (120). Yine 2007 yılında Jian Li ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kolistin dirençli suşların biyofilm üretme gücünün kolistine duyarlı olan suşlardan daha az olduğu tespit edilmiştir (121). Bizim alışmamızda da benzer şekilde güçlü biyofilm üretimi olan 8 izolattan 5'inin kullanılan tüm ilaçlara duyarlı oldukları, 1'inin sadece trimetprim-sulfametaksazol ve tetrasiklin direncinin olduğu, diğer iki izolatin ise dirençli grupta yer aldıkları belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda bulunan dört kolistin dirençli izolatin  tanesinin zayıf biyofilm ürettiği de tespit edilmiştir. Bu durum bize biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasında negatif bir korelasyon olabileceğini düşündürmektedir.

Özellikle bazı çalışmalarda belirli bazı antibiyotiklerin düşük dozda kullanımının biyofilm oluşumunu uyarabileceği ve aynı zamanda biyofilm regülasyonunun antibiyotikleri de içeren dış streslere karşı global bir yanıtı içerdiği bildirilmiştir (122). Bununla birlikte biyofilm ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki şu an net değildir. Son yirmi yılda yapılan birçok çalışma çelişkili sonuçlar vermiştir. Örneğin Abidi. ve ark. yaptıkları bir çalışmada 22 *Pseudomonas* izolatu çalışılmış ve çok ilaca dirençli izolatlarda biyofilm oluşumu anlamlı derecede yüksek çıkmıştır (123). Atashili ve ark. yaptığı çalışmada çok ilaca dirençli ve duyarlı *S.aureus* suşları arasında biyofilm ve antibiyotik direnci arasında bir ilişki tespit edilememiştir (124). Perez 116 *A.baumannii* izolatu ile çalışmış ve meropenem direnci ve biyofilm arasında ters bir ilişki tespit etmiştir (125).

Luisa C.S. Antunes ve ark. tarafından üç farklı klinik *A.baumannii* suşu ve bir adet insan bitinden izole edilen, klinik olmayan ve duyarlı bir suş olan SDF suşu ile virulans faktörlerinin araştırıldığı çalışmada klinik olmayan SDF suşunun biyofilm oluşturma yeteneği klinik suşlara kıyasla 10 kat daha fazla bulunmuştur (30). Bu durum *A.baumannii* suşlarının biyofilm yetenekleri ve bunun kliniğe yansımaları arasında bir korelasyon olmadığđ görüşünü düşündürmektedir. Antibiyotik direnci biyofilm oluşturma kapasitesi ve biyofilm özgü direnç arasındaki niceliksel ilişki ile ilgili yeterli yayın yoktur.

Bakterilerin etkili olarak kolonize olup hastalık oluşturabilmeleri için konak hücreye bağlanmaları gerekir. Çoğu bakteri konağa spesifiktir ve sadece

yüzeylerinden bakteriyel adezyon faktörü için belirli reseptörleri salgılayan konaklarda enfeksiyon oluşturabilirler ve uygun reseptör içeren doku ve hücreleri enfekte ederler. Enfeksiyon sürecinde bağlanma ilk basamağı oluşturur. Bunu derin doku penetrasyonu ve sistemik dağılım izler. Bakteriler yüzeylere yapışmak için pili, fimbria, flajella gibi yüzeyel uzantılarını kullanırlar (126). Swimming ve swarming hareketleri flajellalar ile düzenlenir ve katı yüzeylerde ortaya çıkar. Twitching hareketi ise tip IV pili sistemi tarafından düzenlenmektedir (40). *Acinetobacter* cinsi geçmişte flagella kaybına bağlı olarak hareketsiz olarak tanımlanmış olsa da ilk olarak 1975 yılında Henrichsen ve Blom tarafından fimbria varlığı ile *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleksinin hareketi arasındaki korelasyon gösterilmiştir (42). Daha sonraki yıllarda yapılan bazı çalışmalarda *A.baumannii* ATCC 19978 suşunun hareket yeteneğinin sınırlı demir bulunan ortamlarda ve mavi ışık ile inhibe olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (53,54). İndirgenmiş demir seviyelerinin tip IV pili sistemini kodlayan bir çok gende azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (54). *Acinetobacter anitratus* türlerinde Barker ve Maxted tarafından ‘ditching’ isimli bir hareket türü tanımlanmıştır. Bu harekette hücreler agar yüzeyinde karışık dallanmalar şeklinde çizgisel görüntüler oluşturarak bu çizgiler boyunca hareket etmektedir (127). Bu tip hareketin swarming hareketinin bir tipini temsil ettiği öne sürülmüş fakat daha sonra yapılan çalışmalarda twitching hareketi olarak tanımlanmıştır (128).

Motilite yeteneğinin bakterinin artan virulansı ile ilişkili olduğu, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Dichelobacter nodosus* gibi farklı bakteri türleri ile yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir (129,130). Eijkelkamp ve ark. 2011 yılında 52 klinik *A.baumannii* izolatında twitching ve swarming hareketlerini araştırmışlardır. Uluslararası klon 1 içerisinde bulunan tüm suşlarda twitching hareketi görülmüştür. Diğer twitching hareketi pozitif suşların ise bu klona ait olmadığı ve biyofilm üretme yeteneklerinin de diğer twitching hareketi pozitif olan suşlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu zayıf olan suşlarda twitching hareketinin zon çapının da daha az olduğu görülmüştür. Swarming hareketi ise 3 uluslararası klona da ait olmayan farklı suşlarda tespit edilmiştir. Ayrıca bazı twitching pozitif suşlarda swarming hareketi olmaması ya da swarming pozitif olanlarda twitching hareket yeteneğinin olmaması nedeniyle bu iki hareket şeklinin birbiri ile bağlantılı olmayıp, farklı fenotipik özellikler olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada hareket yeteneği

araştırılırken testler Mueller-Hinton ve Luria Bertani besiyerlerinde ayrı ayrı ve farklı agar konsantrasyonlarında çalışılmış ve hareket özelliğinin hem besiyerine hem de besiyerinde bulunan agar miktarına bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir (41). Bizim çalışmamızda da her iki hareket Luria Bertani ve Mueller Hinton besiyerlerinde ayrı ayrı çalışılmış olup sonuçlar açısından herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Bayrı Erač ve ark.'nın yaptıkları çok ilaca dirençli *A. baumannii* suşlarındaki virulans faktörlerinin araştırıldığı çalışmada incelenen 16 izolatın yedisinde swarming hareketi belirlenmiş, bunlardan birinin orta, diğerlerinin ise güçlü biyofilm üreten suşlar oldukları gözlenmiştir. Ayrıca sadece bir suşta twitching hareketi gözlenmiş olup, bu suşta aynı zamanda swarming hareket yeteneği de olduğu saptanmıştır (4). Luisa C. S. Antunes ve ark., tüm genom dizisi belirlenmiş üç farklı klinik *A.baumannii* suşu ve bir adet insan bitinden izole edilen, klinik olmayan ve duyarlı bir suş olan SDF suşunda %0.5 agar içeren Luria-Bertani (LB), Chelex 100 ile muamele edilmiş triptikaz soy broth diyalizat (TSBD) ve 0.4 mM MgCl₂ katkılı kazamino asit (CAA) besiyerlerinde hareket özelliği araştırmışlardır. Sadece bir suşta (çok ilaca dirençli ve uluslararası klon I içinde yer alan) hem twitching (LB ve TSBD plaklarında) hem de swarming (TSBD plağında) hareketi gözlenmiş olup, bir suşta da (ATCC 17978, çoğu ilaca duyarlı) sadece swarming hareketi (CAA plağında) tespit edilmiştir (30).

Bizim çalışmamızda ise twitching hareketi hiçbir izolatta tespit edilememiş olup, swarming hareketi ise sadece iki izolatta görülmüştür. Swarming hareketi pozitif olan izolatlardan birinin çok ilaca dirençli grupta, diğerinin ise ekstrem ilaca dirençli grupta yer aldıkları ve bu izolatların orta düzeyde biyofilm oluşturdukları tespit edilmiştir. Ayrıca bakterideki hareket yeteneğinin laboratuvar ortamında suşların sık pasajlanıp kültüre edilmesi nedeniyle genetik olarak yok olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bu durum özellikle swarming hareketi için geçerlidir (131). Motilitenin *Acinetobacter* virulansındaki rolü ve ilaç direnci ile ilişkisi tam olarak aydınlatılamamış olup daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

A.baumannii tarafından oluşturulan fırsatçı enfeksiyonlarda en sık özellikle solunum yolu enfeksiyonları ve bakteriyemiler görülmektedir. Yüksek mortalite altında yatan en önemli nedenler bakteriyemi nedeniyle gelişen septik şok ve mekanik ventilasyon ihtiyacıdır. Buna ek olarak çoklu ilaç direnci gelişmesi ve yayılması da

dünya çapında halk sağlığı için endişe verici bir durum haline gelmiştir. İnvaziv özellikleri ve konaktaki yaşam süreleri göz önüne alınırsa patojenik bakterilerin immun yanıtta kaçma yeteneklerinin olduğu görülmektedir. İnvaziv bakterilerin ortak özelliği serumun bakterisidal etkisini önleme yeteneklerinin olmasıdır (132). Birçok patojenik bakteri kompleman sisteminin aktivasyonuna karşı direnç göstererek ölümden kaçmaktadır. Bakterilerin bu sisteme direnç gösterebilmesindeki en önemli durum yüzeylerinde buldukları kompleman regülatörleridir. Bakteri yüzeyine C4b-binding protein bağlanması ile klasik kompleman yolu inhibe olur. Faktör H ve H-like protein 1 (FHL1) ile de alternatif yol inhibe olur. Patojenik bakteriler kompleman yolunu farklı noktalarda farklı birçok mekanizma ile regüle etmektedir (132). Dış membran proteinlerine (Omps) kompleman regülatörlerinin bağlanması birçok Gram negatif patojen için kompleman aktivasyonunu önlemede önemli bir yoldur (120).

Literatüre bakıldığında *A.baumannii* serum direncinin araştırıldığı farklı çalışmalar bulunmaktadır. Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada bakteriyemik hastaların kanından izole edilen dört klinik *A.baumannii* izolatu serum direnci açısından incelenmiş, özellikle serum konsantrasyonunun %40 ve üzeri olduğu zaman canlı bakteri sayısının oldukça azaldığı görülmüştür. Dört klinik izolatta da serum direnci olduğu görülmüş ve ayrıca test ısı ile inaktive edilen serumlarda da tekrarlandığında bu serum direnci oranlarının çok daha fazla arttığı gözlenmiştir. Klasik ve lektin kompleman yollarını aktive etmek için enzim kofaktörü olarak kalsiyuma ihtiyaç duyulmaktadır. Magnezyum alternatif yol aktivasyonu için gereklidir. EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) kalsiyum ve magnezyumu bağlayarak her üç yolu da inaktive etmektedir. MgCl₂-EGTA (etilen glikol tetraasetik asit) klasik yol ve lektin yolunu inhibe etmektedir. Bu çalışmada EDTA eklenmiş serumda izolatların hayatta kalması artmıştır. MgCl₂-EGTA eklenmiş serumda izolatların hayatta kalması belirgin azalmıştır (132). Bu durum bize *A.baumannii* öldürülmesinde alternatif kompleman yolunun direkt etkili olan yol olduğunu göstermektedir.

Lauren B. King ve ark. tarafından yapılan çalışmada yedi klinik *A. baumannii* izolatının normal ve ısı ile inaktive edilmiş serum direnci, aynı zamanda alternatif

kompleman yolunun aktivasyonunu değerlendirebilmek için C2 faktörü eksik olan serum örneği kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca flow sitometri ile bakterinin kompleman bağlayıcı protein H'ı bağlayarak hücre yüzeyinde C3 birikimini sağlaması gösterilmeye çalışılmıştır. Dört izolatin seruma duyarlı, üç izolatin ise dirençli oldukları, aynı zamanda ısı ile inaktive edilen serumlarda ise bakteri ölümü gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Seruma duyarlı olan suşlar, C2 faktörü eksik olan serum ile muamele edildikten sonra bu bakterilerde yine de serum direnci gelişmediği gözlenmiş olup, bu sonuç ile bakterilerin öldürülmesi için alternatif kompleman sisteminin aktivasyonunun olması gerektiği vurgulanmıştır. Flow sitometrik inceleme ile de bakteri yüzeyinde C3 faktör birikimi araştırılmıştır. Duyarlı olan suşlarda C3 birikiminin seruma dirençli suşlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, serum dirençli suşlarda daha güçlü biyofilm üretimi görülürken, serum duyarlı olanlarda biyofilm oluşumu daha zayıf olarak tespit edilmiştir (120). Liao ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise özellikle çok ilaca dirençli suşlarla infekte hastalarda serum direncinin hastaların mortalite oranıyla direkt ilişkili olduğu tespit edilmiştir (133).

Bayrı Eraç ve ark. tarafından yapılan çalışmada incelenen klonal grupların temsilcisi suşlardan çoğunun serumun bakterisidal etkisine duyarlı olduğu, iki alt grup temsilcisinin ise dirençli olduğu gözlenmiştir. Suşların temsil ettikleri grupların sayıları dikkate alındığında, çalışmadaki serum dirençli bakteri oranı %30.7 olarak bulunmuştur (4). Cevahir ve ark. 48 klinik *A.baumannii* suşunda insan serumunun etkisini incelemişler ve seruma dirençli suşların oranını %81.2 olarak tespit etmişlerdir (134). Farklı su kaynaklarından izole edilen *Acinetobacter* türlerinde virulansın araştırıldığı bir çalışmada, seruma direnci kaynağa göre %30 ile %64 arasında bulunmuştur (135). *Acinetobacter* türlerinde serum direncinin yapılan çalışmalarda oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Bunun nedeninin ise kullanılan yöntemlerin çeşitliliği ya da suşların izole edildiği kaynakların farklılığından dolayı olabileceği düşünülebilir.

Bizim çalışmamızda ise normal insan serumuna olan direnç incelendiğinde, duyarlı izolatların yer aldığı birinci gruptaki serum direncinin, dirençli izolatların yer aldığı ikinci ve üçüncü gruplarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmüş ve

serum direnci açısından birinci grup ile ikinci ve üçüncü gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Isı ile inaktive edilmiş serum direnci oranının ise normal serum direncine göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yine ayrıca Lauren B. King ve ark. yaptıkları çalışma (120) sonucundan farklı olarak bizim çalışmamızda güçlü biyofilm üretimi yapan sekiz izolattan altısının serum direnci oranı daha düşük olan ve antibiyotiklerin çoğuna duyarlı olan izolatların yer aldığı birinci grupta buldukları tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışma ve daha önceki yıllarda serum direnci ile ilgili yapılan çalışmalar; *A.baumannii* öldürülmesinde alternatif kompleman yolunun direkt etkili olan yol olduğunu, *A.baumannii*'nin öldürülmesinde normal insan serumunda ısıya duyarlı kompleman proteinlerinin önemli role sahip olduğunu ve serum direncinin direkt olarak *A.baumannii* patogeneziye katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Demir çevresel ve biyolojik sistemlerde fazla bulunmasına rağmen, insanda serbest demir çok sınırlı olarak bulunmaktadır (10^{-8} M). Demirin çözünürlüğü düşüktür ve aerobik koşullarda düşük molekül ağırlıklı hem proteini ya da yüksek afinite ile demir bağlayan laktoferrin, transferrin gibi proteinlere bağlı olarak bulunurlar (5,136). Sınırlı demir bulunan ortamlarda bakteriler siderofor gibi yüksek afiniteli demir şelasyonu yapabilen maddeler üretirler. Bazı bakteriler hem ve hemoglobini demir kaynağı olarak kullanabilirken bazıları da transferrin ve laktoferrinden demiri uzaklaştırabilmektedir (136). *A.baumannii* transferrine bağlanmadığı gibi, laktoferrinden ve transferrinden demir kazanılmasını sağlayan protein yapısını kodlayan herhangi bir genetik determinant da içermemektedir (137). Fakat bununla birlikte *A.baumannii* ATCC 19606 suşu hem molekülünü demir kaynağı olarak kullanabilmektedir (136).

A.baumannii'nin siderofor sentezi için birden fazla gen lokusu içerdiği de yapılan genetik analizler sonrasında gösterilmiştir (138,139). Antunes ve ark., genotipik olarak farklı oldukları tespit edilen 50 klinik *A.baumannii* izolatında demir kazanım mekanizmasında rol oynayan 16 geni araştırmışlar ve tüm suşlarda hem asinetobaktin hem de hidroksamat tipi genlerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca suşlar arasında demir şelatörlerinin miktarı ve aktivitesi açısından büyük farklar olduğu da bildirilmiştir (4). Bayrı Eraç ve ark. farklı klonları temsil eden 16 *A.baumannii* suşu

ile Chrome Azurol S (CAS) agarda fenotipik olarak siderofor üretimini araştırdıkları çalışmalarında, hiçbir suşta siderofor üretimi saptanamamıştır, bu durumun kullanılan yöntemin analitik duyarlılığının dşuk olmasından veya pH, sıcaklık gibi birtakım fiziki ve kimyasal koşullardan kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, sideroforların daha çok enfeksiyon süreci içerisinde in vivo olarak salgılandığı da bu çalışmada vurgulanmıştır (4).

A.baumannii'de siderofor sentezi ve sideroforun demirin kazanımında kullanılabilmesi için beş adet gen dizisi tanımlanmıştır (139). Ayrıca insan bitinden izole edilen ve klinik olmayan bir suş olan SDF suşunun sideroforları demir alımı sürecinde kullanamadıklarının belirlenmesi siderofor üretiminin bakteri virülansında etkin rol oynayabileceğini düşündürmektedir (30). Gaddy ve ark. yaptıkları çalışmada, insan epitel hücresi, *Galleria mellonella* tırtıl deneyi, fare enfeksiyon modeli deneylerinde asinetobaktin ilişkili sistemin hücre hasarı oluşurmada önemli rolü olduğunu göstermişlerdir (140). Prakasam ve ark. 108 klinik *A.baumannii* izolatu ile 28 sağlıklı insan derisinden izole edilen *A.lwoffii* ve *A.junii* izolatlarını siderofor üretimi açısından CAS (Chrome Azurol S) agar deneyi ile araştırmışlardır. Klinik izolatlar ile sağlıklı insan derisinden izole edilen izolatlar siderofor üretimi açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılıklar bulunmuş olup klinik izolatların siderofor üretimi çok daha fazla olarak tespit edilmiştir ve bu mikroorganizmanın deri kolonizasyonunun ardından siderofor üretimi yeteneği kazanarak daha güçlü bir patojen haline geldiği ileri sürülmüştür (136).

Rafael Lpez-Rojas ve ark. tarafından *A.baumannii* ATCC 19606 suşu ve bu suşun kolistin dirençli olan mutanrı RC64 (MİK: 64 mg/l) ve 11 klinik kolistin dirençli *A.baumannii* izolatu ile yapılan çalışmada, demir şelatörü olan 2,2'-bipyridine kullanılarak bakterilerin sınırlı demir bulunan ortamlarda üreyebilme yetenekleri ve demir ile zenginleştirilmiş ortamlardaki üreme durumları birbirleri ile karşılaştırılmıştır. ATCC 19606 suşunun demir bakımından kısıtlı olan ortamda kolistin dirençli olan mutanrıdan daha iyi üreyebildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte demir ilave edilmiş ortamda ise RC64 suşunun üreme miktarının ATCC 19606 suşundan çok daha fazla miktarda arttığı tespit edilmiştir. Test 11 klinik kolistin dirençli izolat ile tekrar edilmiş olup sekiz izolatu demir bakımından sınırlı olan

ortamda üreme miktarının oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak *A.baumannii*'de kolistin direnci kazanımı ile demir miktarının düşük olduğu ortamlarda azalmış üreme durumu birbirleri ile bağlantılı bulunmuştur (141). Bu sonuç bakterinin ilaç direnci geliştirmesine karşı oluşan biyolojik uyum bedelinde virülansının azaldığını gösteren çalışmalarla uyumludur. Bizim çalışmamızda siderofor üretiminin tüm izolatlarda var olduğu tespit edilmiştir. İzolatların %73'ünün oluşturduğu siderofor üretiminin zayıf olduğu görülmüş olup, kolistin dirençli izolatların da bu grupta yer aldığı tespit edilmiştir. Diğer izolatlar da ise daha güçlü siderofor üretimi gerçekleştirdiği görülmüştür fakat oluşturulan enfeksiyon modelinde ekstrem dirençli izolatların azalan virülansı ile ilişkilendirilememiştir.

Fosfolipitler insanda fazla miktarlarda bulunmakta olup, biyolojik membranların önemli yapıtaşını da oluşturmaları nedeniyle önemli bir karbon ve enerji kaynağıdır. Fosfolipitlerin yapısında yaklaşık %50 oranında bulunan fosfatidilkolin de ökaryotik membranlarda fazlaca bulunmaktadır. Bu oran akciğerde %80 'lere kadar çıkmakta olup; fosfatidilkolin, trakeobronşiyal sekresyonlarda bulunan en önemli ve mukusa ıslaklık özelliğini kazandıran fosfolipittir (142).

A.baumannii'nin esteraz, fosfolipaz ve proteaz aktivitelerinin olduğu bilinmektedir. Üzerinde en çok çalışılan hidrofobik enzim *P.aeruginosa*'da plc-S tarafından kodlanan fosfolipaz C(PLC)-H'dir. Asidik olup çok güçlü hemolitik aktiviteye sahiptir. plc-N tarafından kodlanan PLC-N daha basit olup hemolitik aktivitesi yoktur. Yapılan son çalışmalarda fosfolipaz C (plc) geninin 2 kopyasının %50 benzerlik ile *A.baumannii* bakterisinde de olduğunu ortaya koymuştur. Bu lipazların benzer fonksiyona sahip oldukları görülmüş fakat tam olarak aydınlatılamamıştır (2). Ayrıca fosfolipaz C yapısındaki bir enzimin epitel hücrelerine olan toksisiteye katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (30). Hořtacká ve Klokočnicková tarafından fosfatidilkolin ve sfingomyelin salınımının lökosit hücrelerine toksik etkiye bulunduğu gösterilmiştir (2). Özellikle *P.aeruginosa* ile yapılan çalışmalarda, solunum yolu enfeksiyonları sırasında fosfatidilkolinin patojen mikroorganizma için önemli bir besin kaynağı olduğu, fosfolipaz C aktivitesinin bakterinin virülansında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (142, 143,144).

Ventilatör ilişkili pnömoni *A.baumannii* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar arasında en sık görülen enfeksiyon tipi olup, fosfatidilkolinin mukus içerisinde fazlaca bulunması *A.baumannii* tarafından besin kaynağı olarak kullanılıp kullanılmadığı sorusunu akıllara getirmektedir. Şimdiye kadar sadece fosfolipaz C ve fosfolipaz D, *A.baumannii* ATCC 17978 suşu ve bazı klinik izolatlarda virulans faktörü olarak tanımlanmıştır. Mutasyon çalışmaları bu iki enzimin sitotoksisite ve epitel hücre invazyonu ile ilişkili olarak virulansında etkin olabileceğini göstermektedir (142). Julia Stahl ve ark. *Galleria mellonella* enfeksiyon modelini kullanarak üç fosfolipaz D (PLD1, PLD2, PLD3) enziminin *A.baumannii* ATCC 19606 suşunun virulansındaki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, her üç fosfolipaz D enziminin de *A.baumannii* ATCC 19606 suşunun konak hücre invazyonu ve virulansında önemli rol oynadığını tespit ederek, fosfolipaz D enzimlerinin *A.baumannii* virulansında major virulans faktörü oldukları bildirilmiştir (142). Farklı bir çalışmada da *A.baumannii*'de azalmış fosfolipaz D aktivitesinin, bakterinin serumda gelişme yeteneğinin azalmasına, epitel hücre invazyonunun bozulmasına, fare pnömoni modelinde azalmış patojeniteye neden olduğu gösterilmiştir (145). Fosfolipaz D aktivitesinin enfekte hayvanlarda, bakteriyel patojenlerin hematojen yayılımında önemli rol oynadığı ve *Corynebacterium pseudotuberculosis* tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda major bir virulans faktörü olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (142,146). Antunes ve ark. tarafından *A.baumannii* virulans faktörlerinin araştırıldığı farklı klonlara ait *A.baumannii* temsilcilerini ve klinik olmayan SDF suşunun yer aldığı çalışmada fosfolipaz C ve proteaz aktivitelerinin tüm suşlarda var olduğu gösterilmiştir (30). Bizim çalışmamızda ise tüm izolatlarda ekstrasellüler fosfolipaz C aktivitesi saptanmıştır. İzolatların aktivite ölçüm değerleri birbirlerine oldukça yakın bulunmuş olup farklı ilaç duyarlılığında bakterileri içeren üç grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

A.baumannii'ye ait farklı proteaz aktiviteleri de geçmiş yıllarda farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Cevahir ve ark. tarafından *A.baumannii* izolatlarındaki O ve AB grup eritrositleri ile hemagglütinasyon aktivitesi gösterilmiş olup, yine aynı çalışmada jelatinaz üretimi ile hemoglobinin, kollajen ve jelatin hidrolizi kapasitesi test edilerek, *A.baumannii* izolatlarının %41'ünde ve özellikle trakeal kolonizasyon bulunan hastalarda jelatinaz aktivitesi tespit edilmiştir (147). Üreaz aktivitesi ve farklı

A.baumannii suşlarına ait genomlarda üreaz genleri tespit edilmiştir (148,149). Esteraz aktivitesi yapılan bir çalışmada tüm suşlarda tespit edilmiş olup, bu proteazın yüksek oranda çeşitlilik göstermesi nedeniyle klinik izolatların tiplendirilmesine de olanak sağladığı belirtilmiştir (150). Bizim çalışmamızda ise proteaz aktivitesi tüm izolatlarda tespit edilmiş olup gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Önceki yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde klinik suşlarda mevcut olup klinik olmayan suşlarda mevcut olmayan ya da *A.baumannii*'de bulunup da diğer *Acinetobacter* türlerinin genomunda bulunmayan herhangi bir virulans faktörünün bulunmadığı gösterilmiştir (100). *A.baumannii* virulansının regülasyonu için farklı hipotezler ortaya konulmuştur. Bu hipotezlerden birincisi, *A.baumannii*'nin insan konağındaki virulansında virulans faktörlerinin tek tek önemli olmadığı fakat bununla birlikte bu faktörlerin bazılarının sadece hayvan modellerinde önemli oldukları bildirilmiştir (5). İkincisi, aynı virulans faktörü farklı habitatlarda farklı rollere sahip olabilir. Örneğin uluslararası klonlara ait olan klinik *A.baumannii* suşları ile klinik olmayan (SDF) bir suşun yüksek oranda biyofilm oluşturdukları tespit edilmiştir (30). Bu durum *A.baumannii*'de biyofilmlerin birden çok işlevi olabileceğini düşündürmektedir. Son olarak ise virulans ile ilişkili genlerin ekspresyonunun patojenik ve patojenik olmayan türlerde farklı şekilde regüle ediliyor olabileceği bildirilmiştir. Karşılaştırmalı genomik analizlerin sonucunda *A.baumannii* ve patojen olmayan *Acinetobacter spp.* türlerinin kor genom ve pan-genomlarında yüksek oranda transkripsiyon faktörü regülatörüne rastlanmıştır (151). Fakat bu gen regülatörlerinin *A.baumannii* virulansını nasıl kontrol ettiği konusu bilinmezliğini büyük oranda korumaktadır.

A.baumannii virülans faktörlerinin araştırılarak anti-virülans tedavi stratejilerine katkı sağlamak istediğimiz çalışmamızda, antibiyotik duyarlılık test profillerine göre üç gruba ayrılan *A.baumannii* izolatlarında *Galleria mellonella* enfeksiyon modeli kullanılmış olup; biyofilm oluşumu, serum direnci, siderofor temelli demir alım mekanizması, hareket, fosfolipaz C aktivitesi, proteolitik aktivite gibi çeşitli virulans faktörlerinin varlığı fenotipik yöntemlerle tespit edilerek, bu virulans faktörlerinin ilaç dirençleri ile ilişkisi tespit edilmiştir. Ortaya çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde, *G.mellonella* enfeksiyon modelinde ekstrem ilaç dirençli izolatlarda görülen düşük

virülansın antibiyotiklere karşı oluşan bakteriyel uyum bedeli (fitness cost) sürecinin bir sonucu olarak oluştuğu düşünülmüştür. Fakat çalışmamızda araştırdığımız virülans faktörleri tek tek ele alındığında hiçbirisi bu enfeksiyon modelinde oluşan düşük virülansı açıklayamamaktadır. Virülansın azalmasına neden olabilecek farklı mekanizmalar araştırılmalıdır. Örneğin bakteriler tarafından üretilen quorum sensing sinyal molekülleri transkripsiyonel regülatör proteinlere bağlanarak mikroorganizmada gen ekspresyonunun aktivasyonu/regülasyonu sürecinde rol oynamaktadır (33). Bu sistemin *Acinetobacter* gibi fırsatçı patojenlerde çeşitli virülans faktörlerinin otoindüksiyonunda temel mekanizma olabileceği düşünülmektedir (3). Bu sebeple quorum sensing mekanizması araştırılarak bakterinin ilaç direnci geliştirmesi ve virülans faktörlerinin üretimi sürecindeki rolleri daha fazla aydınlatılmalıdır.

Çalışmamızda araştırılan virülans faktörlerinin hiçbirisinin bakterinin patojenik başarısından tek başına sorumlu olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum bize *A.baumannii*'nin virülansında multifaktöryel ve kombine bir stratejinin rol oynadığını düşündürmektedir. *A.baumannii* farklı ortamlara uyum sağlama yeteneği ile donatılmıştır. 1950'li yıllarda antibiyotik tedavilerinin kullanıma girmesi sonucunda bakterinin genetik çeşitliliğinde meydana gelen bir redüksiyon sonucunda, yüksek homojenlik düzeyine sahip az sayıdaki klon evrimleşip yaygınlaşmış ve spesifik olarak hastane ortamlarına adapte olmuştur (100). Bakteri insan konağına adaptasyon sağlamak için muhtemelen virülans ve direnç faktörlerinin farklı kombinasyonlarını kullanmaktadır (100). *A.baumannii*'nin virülansı ile ilgili yaptığımız çalışmada bakterinin klinik başarısından ve ilaç direnci geliştirmesinden bütünüyle sorumlu olabilecek spesifik bir virülans faktörü tespit etmekte yetersiz kalmamızın altında yatan muhtemel nedenin de bu durumlar olduğunu düşünmekteyiz.

Enfeksiyöz hastalıklar için tedavilerin geliştirilmesine yönelik yeni bir yaklaşım, bakteri üremesini inhibe etmeden ve bakteriyi öldürmeden spesifik olarak bakteri virülansını bloke etmektir. Bakterinin konakçı hücreye adezyonunu engellemek, toksinleri veya özel salgılama sistemlerini inhibe etmek ve virülans özelliklerine ait genlerin düzenlemesine müdahale etmek de dahil olmak üzere pek çok anti-virülans stratejisi araştırılmaktadır. Pilsidlerle yapılan tedavinin üriner sistemdeki

üropatojenik *E.coli* izolatlarının kolonizasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Anti-virülans tedaviye yönelik araştırmalar bakterilerin konak hücre ve çevre ile yararlı bir etkileşim içinde olduklarını ve polimikrobiyal ortamda dengeli olarak yaşadıklarını göstermektedir (126). Virülans kontrol edilebilirse konak immün sistemi antimikrobiyal ajanlara gerek kalmadan enfeksiyonun üstesinden gelebilecektir. Bunun mümkün olmadığı durumlarda ise anti-virülans tedaviler geleneksel antimikrobiyal ajanlarla birlikte kullanılarak sinerjistik etki oluşturulacak ve antibiyotiklerin kullanımı azaltılarak, bu ajanlara karşı direnç gelişimi de önlenmiş olacaktır. Ayrıca *A.baumannii*'nin önemli bir insan patojeni haline gelmesine yol açan bu evrimsel süreci tam olarak anlayabilmek için, virulans faktörlerinin rolleri daha fazla çalışmalar yapılarak aydınlatılmalıdır.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmaya 30 *A.baumannii* izolatu dahil edilerek, antibiyotik duyarlılık test profillerine göre; birinci grup duyarlı (üç grup antibiyotikten daha azına dirençli olan) 10 adet izolattan, ikinci grup multi-drug resistant (MDR) (en az üç ve üzeri antibiyotik grubuna dirençli olan) 10 adet izolattan ve üçüncü grup extreme-drug resistant (XDR) (iki veya daha az grup ilaca duyarlı olan) 10 adet izolattan oluşacak şekilde gruplandırılmıştır.
2. İzolatların elde edildikleri klinik örneklerle göre dağılımlarında %27 ile en yüksek oranda yara örneği olduğu, bunu sırasıyla trakeal aspirat, kan, doku, periton, bronkoalveoler lavaj ve balgam örneklerinin takip ettiği görülmüştür.
3. Çalışmada *Galleria mellonella* enfeksiyon modeli kullanılmıştır. Ekstrem dirençli izolatlardan oluşan üçüncü grubun mortalite hızınının 24. - 96. saatler arasında ikinci gruptan anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Diğer saatlerde ise fark bulunamamıştır.
4. Tüm izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri olduğu gözlenmiştir. Toplamda 8 izolatin (%26.7) güçlü biyofilm oluşturduğu, 11 izolatin (%36.7) orta düzeyde biyofilm oluşturduğu, 11 izolatin (%36.7) ise zayıf düzeyde biyofilm oluşturdukları tespit edilmiştir.
5. Güçlü biyofilm oluşturma yeteneği olan 8 izolatin 6 tanesinin birinci grupta yer aldığı tespit edilmiştir. Diğer güçlü biyofilm oluşumu gösteren izolatların ise birisinin ikinci grupta diğerinin ise üçüncü grupta olduğu gözlenmiştir. Zayıf biyofilm oluşturan izolatların 1 tanesinin birinci grupta, 5 tanesinin ikinci grupta, 5 tanesinin ise üçüncü grupta yer aldıkları tespit edilmiştir.
6. 30 izolatin hiçbirinde twitching yeteneği olmadığı tespit edilmiştir. Swarming hareketinin ise sadece 2 suşta pozitif olduğu tespit edilmiştir. Swarming hareket yeteneği olan izolatların birisinin ikinci grupta diğerinin ise üçüncü grupta olduğu tespit edilmiştir.
7. *A.baumannii* izolatlarındaki hareket yeteneğinin araştırılmasında iki farklı besiyeri (Mueller Hinton agar ve Luria Bertani besiyeri) kullanılmış olup, kullanılan her iki besiyeri arasında bakterinin hareket yeteneği açısından herhangi bir fark gözlenmemiştir.

8. Tüm izolatlar değerlendirildiğinde normal insan serumunda yaşayan bakteri sayısı açısından, serum direncinin %1'in altında olan iki adet bakteri olduğu tespit edilmiştir. Bu bakterilerden birisinin birinci grupta, diğerinin ise ikinci grupta yer aldıkları görülmüştür.
9. Normal insan serumuna olan direncin araştırılmasında, sadece 1 izolatın serum direncinin %90'ının üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu izolat ikinci grupta yer aldığı görülmüştür. Diğer tüm izolatların normal serum ve inaktif serum direnci oranları %20'nin üzerinde olarak tespit edilmiştir.
10. Normal insan serumuna olan direnç incelendiğinde, duyarlı izolatlardan oluşan birinci grupta bakterilerin serum direnci yüzdeleri %0.017 ile %59 arasında değişmektedir. MDR izolatlarından oluşan ikinci grupta serum direnci yüzdeleri %0.001 ile %94 arasında tespit edilmiştir. XDR izolatlarından oluşan üçüncü grupta ise serum direnci yüzdeleri %35 ile %76 arasında bulunmuştur. Birinci grupta ortalama normal insan serum direnci %36.8, ikinci grupta %63.5, üçüncü grupta ise %58.1 olarak tespit edilmiştir.
11. Duyarlı izolatların yer aldığı birinci gruptaki serum direncinin dirençli izolatların yer aldığı ikinci ve üçüncü gruplarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu ve serum direnci açısından birinci grup ile ikinci ve üçüncü gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).
12. İzolatların inaktive edilmiş serum direnci incelendiğinde direnç oranı %1'in altında olan sadece bir izolat olduğu tespit edilmiştir. Diğer tüm izolatların direnç oranları en az %68 olarak tespit edilmiştir. 23 adet izolatın inaktive edilmiş serum direnci yüzdesinin %90 ve üzerinde oldukları tespit edilmiştir.
13. Tüm izolatlarda ekstrasellüler fosfolipaz C aktivitesi saptanmıştır. Birinci gruptaki bakterilerin fosfolipaz C aktivite ortalaması 2.126 U/L, ikinci grubun 2.065 U/L, üçüncü grubun ise 2.104 U/L olarak hesaplanmıştır. Üç grup arasında fosfolipaz C aktivitesi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).
14. Tüm izolatlarda proteolitik aktivite pozitif tespit edilmiştir. Birinci gruptaki bakterilerin ortalama proteolitik aktiviteleri 137.27 U/L, ikinci grupta 149.84 U/L, üçüncü grupta ise 139.02 U/L olacak şekilde hesaplanmıştır. Üç grup arasında proteolitik aktivite düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

15. Siderofor üretimi CAS agarda fenotipik olarak araştırılmış olup, tüm izolatlarda pozitif olarak tespit edilmiştir. Üç grup arasında siderofor üretimi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



7. KAYNAKLAR

1. Gordona NC, Warehama DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010; 35 219–22.
2. Dugharı HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. Minireview The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter spp.*: An Overview. *Virulans Microbes Environ.* 2011; 26, No. 2, 101–112.
3. Aşık G. *Acinetobacter baumannii* virülansının açıklanmasında güncel yaklaşımlar. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 371-380.
4. Eraç B, Yılmaz FF, Limoncu MH, Öztürk İ. Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(1): 70-81.
5. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 130–155.
6. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews* 2008; 21:538-58.2.
7. Bouvet PJ, Grimont PA. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36:228-240.
8. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 1989; 97:595-605.
9. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection* 2009 ; 73, 355-363.
10. 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.). Manuel of Clinical Microbiology 9 th ed. Washington ASM Pres 2007: 770-802.

11. Koneman WE, Procop WG, Schreckenberger CP, Woods LG. Nonfermentative Gram negative bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins 2006; 8th ed Chapter 7: 303-91.

12. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (editörler). Önemli ve Sorunlu Gram-negatif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2012.

13. Bouvet PJ, Grimont PA. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* spp. *Acinetobacter haemolyticus* spp. *Acinetobacter johnsonii* spp. and *Acinetobacter junii* spp. and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol 1986; 36:228-40.

14. Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev, 1996, 9, 148- 65.

15. 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.

16. Towner KJ. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. J Med Microbiol 1997; 46:721-722.

17. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy Journal of Hospital Infection 2009 ; 73, 355-363.

18. Getchell-White SL, Donowitz LG, Groschel DHM. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 1989; 10:402-407.

19. Bergogne-Berezin E., Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological and epidemiological features. Clin Microbiol Rew. 1996; 148-165.

20. Mulin B., Talon D., Viel JF., Vincent C., Leprat R., Thouverez M., Michel- Briand Y. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14: 569-576.

21. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B. Factors influencing survival in patients with multi-drug-resistant *Acinetobacter* bacteraemia. *Eur J Intern Med* 2009; 20: 540–4.
22. Larson EL. Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands. *Am J Infect Control*. 1981;9:112-119.
23. Bayuga S, Zeana C, Sahni J, Della-Latta P, el-Sadr W, Larson E. Prevalence and antimicrobial patterns of *A.baumannii* on hands and nares of hospital personel and patients: the iceberg phenomenon again. *Heart Lung*. 2002;31(5):382-90.
24. Gaynes R, Edwards J.R, Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clin. Infect. Dis*. 2005; 41:848-854.
25. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2011. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data: ECDC Stockholm, Sweden 2011.
26. Esen S, Leblebicioğlu H. Prevalence of nosocomial infections of intensive care units in Turkey: A multicentre 1-day point prevalence study. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 144-8.
27. Bergogne-Berezin E, Friedman H, Bendinelli M. *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis. Infectious agents and pathogenesis Springer 2008.
28. Taşova Y, Akgün Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, Kara O, Dündar İH. Nozokomiyal *Acinetobacter* enfeksiyonları. *Flora* 1999;4: 170–6.
29. Joly Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(11):868-73.
30. Antunes LCS, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *Plos One* 2011; 6(8): e22674. doi:10.1371/journal.pone.0022674.
31. Russo TA, Luke NR, Beanan JM. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun* 2010; 78(9): 3993-4000.
32. Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. *Med Sci Monit* 2004; 10(6): 1804.
33. Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Critical Reviews in Microbiology*, 2010; 36(4): 349–360.

34. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ: How bacteria stick. *Sci Am* 1978, 238(1):86-95.
35. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD: The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004, 12(3):185-190.
36. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation *Future Microbiol.* 2009 April ; 4: 273–278. doi:10.2217/fmb.09.5.
37. De Breij A, Gaddy J, van der Meer J. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol* 2009; 160(3): 213-8.
38. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann 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;149:3473–3484.
39. Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:67–84.
40. Katy M. Clemmer, Robert A. Bonomo, Philip N. Rather. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* 2011, 157, 2534–2544.
41. Eijkelkamp BA, Stroehel UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2011, 323 ,44-51.
42. Henrichsen J, Blom J. Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 1975, 83: 103–115.
43. Bitrian M, Gonzalez RH, Paris G, Hellingwerf KJ, Nudel CB. Blue-light-dependent inhibition of twitching motility in *Acinetobacter baylyi* ADP1: additive involvement of three BLUFdomain- containing proteins. *Microbiology* 2013, 159:1828–1841.
44. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS Jr. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio* 2013, 4:e00360-13.

45. Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E. DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol* 2013, 195:4146–4153.
46. Heindorf M, Kadari M, Heider C, Skiebe E, Wilharm G. Impact of *Acinetobacter baumannii* superoxide dismutase on motility, virulence, oxidative stress resistance and susceptibility to antibiotics. *PLoS One* 2014; 9:e101033.
47. Hidalgo-Romano B, Gollihar JD, Brown SA, Whiteley M, Valenzuela E, Kaplan HB, Wood TK, McLean RJ. Indole inhibition of AHL-mediated quorum signaling is widespread in gram-negative bacteria. *Microbiology* 2014; doi:10.1099/mic.0.081729-0.
48. Jacobs AC, Thompson MG, Black CC, Kessler JL, Clark LP, McQueary CN, Gancz HY, Corey BW, Moon JK, Si Y, Owen MT, Hallock JD, Kwak YI, Summers A, Li CZ, Rasko DA, Penwell WF, Honnold CL, Wise MC, Waterman PE, Lesho EP, Stewart RL, Actis LA, Palys TJ, Craft DW, Zurawski DV. A highly virulent isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a model strain for the evaluation of pathogenesis and antimicrobial treatments. *MBio* 2014; 5: e01076-14.
49. Nait Chabane Y, Mlouka MB, Alexandre S, Nicol M, Marti S, Pestel- Caron M, Vila J, Jouenne T, Dé E. Virstatin inhibits biofilm formation and motility of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 2014; 14:62.
50. Withers R, Doherty GP, Jordan M, Yang X, Dixon NE, Lewis PJ. AtfA, a new factor in global regulation of transcription in *Acinetobacter spp.* *Mol Microbiol* 2014; 93:1130–1143.
51. Jung J, Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99:2533–2548.
52. Gohl O, Friedrich A, Hoppert M, Averbhoff B. The thin pili of *Acinetobacter sp.* strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:1394–1401.
53. Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R & Actis LA. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol* 2010; 192: 6336–6345.

54. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. BMC Genomics 2011; 12: 126.
55. Dal T, Dal MS, Ağır İ, *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri: Literatürün Gözden Geçirilmesi. Van Tıp Dergisi 2012; 19 (3): 137-148.
56. Goic-Barisic I, Tonkic M. The review of carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, Acta Med Croatica 2009; 63(4), 285-96.
57. A.-P. Magiorakos. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim Standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012; 18:268-281.
58. Çiftçi İ.H, Aşık G., *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. Ankem Derg 2011; 25(3):196-207.
59. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J Antimicrob Chemother 2003; 52:629-35.
60. Segal H, Garny S, Elisha BG. Is IS(Aba1) customized for *Acinetobacter*? FEMS Microbiol Lett 2005; 243:425-9.
61. Brown S, Amyes SGB. The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. Clin Microbiol Infect 2005; 11:15-23.
62. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK. Global challenge of multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 3741-84.
63. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54, 969–76.
64. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front Microbiol. 2012;3:148.
65. Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1 and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 5046–54.

66. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:2253–4.
67. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug – resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13(47): 1-11.
68. Akalın H. Çoklu İlaç Direncinde Tedavi Yaklaşımı ve İlaç politikaları. *Ankem Derg* 2007; 21:186-191.
69. Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J. Hosp Infect*, 2006; 64(1): p. 7-15.
70. Aygencel G, Dizbay M, Çiftçi A, Türkoğlu M. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia: a case report from Turkey. *Yoğun Bakım Derg* 2010; 9:164-167.
71. Yau W, Owen RJ, Poudyal A, Bell JM, Turnidge JD, Yu HH, Nation RL, Jian Li. Colistin heteroresistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the sentry antimicrobial surveillance programme. *J Infect* 2009; 58:138-144.
72. Eraksoy H. Susceptibility of bacterial isolates from Turkey--a report from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program. *J Chemother*, 200; 19(6): p. 650-7.
73. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51:79–84
74. Williams JD. Beta-Lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. *Clin Infect Dis*, 1997; 24(3): p. 494-7.
75. Duenas Diez AI, Bratos Perez MA, Eiros Bouza JM. Susceptibility of the *Acinetobacter calcoaceticus-A.baumannii* complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin; *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23(5):487-93.
76. Fischbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections *Clin Infect Dis* 2010; 51(1):79-84.

77. Schafer JJ, Goff DA, Stevenson KB, Mangino JE. Early experience with tigecycline for ventilator-associated pneumonia and bacteremia caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Pharmacotherapy* 2007; 27:980–7.
78. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 45–55.
79. Park YK, Jung SI, Park KH et al. Independent emergence of colistin resistant *Acinetobacter spp.* isolates from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64:43–51.
80. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from sentry Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010) . *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:354–60.
81. Queenan AM, Pillar CM, Deane J et al. Multidrug resistance among *Acinetobacter spp.* in the USA and activity profile of key agents: results from capital Surveillance 2010. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 ; 73(3):267-70.
82. Rolain JM, Roch A, Castanier M, Papazian L, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin with impaired virulence: a case report from France. *J Infect Dis* 2011; 204: 1146–1147.
83. Rodriguez CH, Bombicino K, Granados G, Nastro M, Vay C, Famiglietti A. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65: 188–191.
84. Lopez-Rojas R, Jimenez-Mejias ME, Lepe JA, Pachon J. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin alters its antibiotic resistance profile: a case report from Spain. *J Infect Dis* 2011; 204: 1147–1148.
85. Al-Sweih NA, Al-Hubail MA, Rotimi VO. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *J Chemother* 2011; 23: 13–16.
86. Taneja N, Singh G, Singh M, Sharma M. Emergence of tigecycline & colistin resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with complicated urinary tract infections in north India. *Indian J Med Res* 2011; 133: 681–684.

87. Evren E, Göçmen JS, Demirbilek M, Eda Alıskan H, Imipenem, meropenem, colistin, amikacin and fosfomycin susceptibilities of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from various clinical specimens. Gazi Medical Journal 2013; 24:1-4.
88. Kirisci O., Ozkaya E, Caliskan A., Özden S., Alkıs Koçtürk S. Investigation of resistance profiles of *Acinetobacter* spp. isolated from clinical specimens. Ankem dergi 2013; 27:140-6.
89. Aygencel G., Dizbay M., Ciftci A., Turkoglu M. Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from Ventilator-Associated Pneumonia: A Case Report from Turkey. Turkish Journal of intensive Care 2010; 9:164-7.
90. Kulah C., Celebi G., Aktas E., Mengeloğlu Z., Comert F., Ankaralı H. Unexpected tigecycline resistance among *Acinetobacter baumannii* isolates: High minor error rate by Etest: Journal of chemotherapy 2009; vol. 21-n.4(390-395).
91. Kalkancı A., Fouad A.A., Erdoğan M., Altay A., Aliyeva Z., Bozdayi G., Çağlar K. Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. Mikrobiyol Bul 2015; 49(3): 366-376.
92. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics, antimicrobial agents and chemotherapy, June 2009; p. 2605–2609.
93. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods 2000; 40, 175–179.
94. Judith H. Merritt, Daniel E. Kadouri, George A. Growing and Analyzing Static Biofilms. O'Toole *Curr Protoc Microbiol.* 2005; 01: Unit–1B.1. doi:10.1002/9780471729259.mc01b01s00.
95. Sang Woo Kim, Chul Hee Choi, Dong Chan Moon, Jong Sook Jin, Jung Hwa Lee, Ji-Hyun Shin, Jung Min Kim, Yoo Chul Lee, Sung Yong Seol, Dong Taek Cho, Je Chul Lee. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins :FEMS Microbiology Letters 2009; DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01820.

96. Berka RM, Gray G, Vasil M. Studies of Phospholipase C (Heat-Labile Hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa* : Infection and immunity Dec. 1981; p. 1071-1074 0019-9567/81/121071-04\$02.00/0.
97. Çakatay U., Aydın S., Belce A. Biyokimyada temel hesaplamalar, İstanbul Üniversitesi basın ve yayınevi müdürlüğü İstanbul 2010; ss.1-64.
98. Brian C. Loudon, Daniel Haarmann, Aaron M. Lynne. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection : Journal of microbiology & biology education, May 2011; p. 51-53.
99. Garcia CA, De Rossi BP, Alcaraz E, Vay C, Franco M. Siderophores of *Stenotrophomonas maltophilia*: detection and determination of their chemical nature: Revisit Argentina de Microbiologia 2012; 44:150-154.
100. Luisa C.S. Antunes, Paolo Visca, Kevin J. Towner. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathogens and Disease 2014; 71, 292–301.
101. Kurcuk-Trajkovska B. *Acinetobacter spp.* :A serious enemy threatening hospitals worldwide. Maced J Med Sci 2009; 2, 2, 157–162.
102. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005; 41:848-854.
103. Turner PJ, Greenhalgh JM. MYSTIC Study Group (Europe): The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. Clin Microbiol Infect 2003; 9:563-567.
104. Korten V , Ulusoy S, Zarakolu P , Mete B. Turkish MYSTIC Study Group. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59:453-457.
105. Kang YS, Park W. Trade-off between antibiotic resistance and biological fitness in *Acinetobacter sp.* Strain DR1. Environ Microbiol 2010; 12: 1304–1318.
106. Y. Smani, R. Lopez-Rojas, J. Dominguez-Herrera, F. Docobo-Perez, S. Martı, J. Vila, J. Pachon. In vitro and in vivo reduced fitness and virulence in ciprofloxacin-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2012; 18: E1–E4
107. Rojas RL, Herrera JD, McConnel MJ, Perez FD, Smani Y, Reyes MF, Rivas L, Pachon J. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin resistant of *A.baumannii*. The Journal of Infectious Diseases 2011; 203:545–548.

108. O’Sullivan, D.M., McHugh, T.D., Gillespie, S.H. Analysis of *rpoB* and *pncA* mutations in the published literature: an insight into the role of oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis* evolution? *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 674–679.
109. O’Neill, A.J., Huovinen, T., Fishwick, C.W., and Chopra, I. Molecular genetic and structural modeling studies of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase and the fitness of rifampicin resistance genotypes in relation to clinical prevalence. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 298–309.
110. Enne, V.I., Delsol, A.A., Roe, J.M., and Bennett, P.M. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 203–207.
111. Singhai, M., Malik, A., Shahid, M., Malik, M. A., Goyal, R. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *J. Glob. Infect. Dis.* 2012; 4, 193–198. doi: 10.4103/0974- 777X.103896.
112. Lee HW, Koh YM, Kim J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:49–54.
113. Rao RS, Karthika RU, Singh SP. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26:333–337.
114. Liu H, Wu YQ, Chen LP, Gao X, Huang HN, Qiu FL, Wu DC. Biofilm-Related Genes: Analyses in Multi-Antibiotic Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates From Mainland China. *Med Sci Monit*, 2016; 22: 1801-1807.
115. Badave GK, Dhananjay K. Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(1).
116. Rajamohan G , Srinivasan V B , Gebreyes WA. Biocide-tolerant multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains are associated with higher biofilm formation . *J Hosp Infect* 2009 ; 73 : 287 – 9 .
117. Kaliterna V, Goic-Barisic I. The ability of biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* belonging to two different European clones causing outbreaks in the Split University Hospital. Croatia . *J Chemother* 2013 ; 25 : 60 – 2 .
118. Davey ME, O’toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics . *Microbiol Mol Biol Rev* 2000 ; 64 : 847 – 67 .

119. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, Du X, Liu X, Qiu S, Song H. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2016; 7: 483.
- 120 King LB, Swiatlo E, Swiatto A, McDaniel LS. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55, 2009; 414–421.
121. Li J., Nation R.L., Owen R.J., Wong S., Spelman S., Franklin C. Antibigrams of Multidrug-Resistant Clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising Therapeutic Options for Treatment of Infection with Colistin-Resistant Strains. *Clin. Infect. Dis* 2007; 45(5):594-8.
122. Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* 2011;34, 737–751. doi: 10.5301/ijao.5000027.
123. Abidi, S. H., Sherwani, S. K., Siddiqui, T. R., Bashir, A., and Kazmi, S. U. Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. *BMC Ophthalmol.* 2013; 13:57. doi: 10.1186/1471-2415-13-57.
124. Atashili, J., Lyonga, E. E., Mandi, H., Ikomey, G., Mukwele, B., Eyoh, A. B. Relationship between multiple drug resistance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from medical and non-medical personnel in Yaounde, Cameroon. *Pan Afr. Med. J.* 2014; 17:186. doi: 10.11604/pamj.2014.17.186.2363.
125. Perez, L. R. *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. *J. Chemother* 2015; 27, 13–16. doi: 10.1179/1973947813Y.0000000159.
126. David A. Rasko, Vanessa Sperandio. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature reviews drug discovery* volume 9, february 2010;117.
127. Barker, J., Maxted, H. Observations on the growth and movement of *Acinetobacter* on semi-solid media. *J Med Microbiol* 1975; 8, 443–446.

128. Henrichsen, J. Not gliding but twitching motility of *Acinetobacter calcoaceticus*. J Clin Pathol 1984; 37, 102–103.
129. Alarcon I, Evans DJ., Fleiszig SM. The role of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* exit from and translocation of corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009; 50: 2237–2244.
130. Han X, Kennan RM, Davies JK et al. Twitching motility is essential for virulence in *Dichelobacter nodosus*. J Bacteriol 2008; 190: 3323–3335.
131. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol. 2010 ; 8(9): 634–644.
132. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, Kim JM, Lee YC, Seol YS, Cho DT, Lee JC. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins, FEMS Microbiology Letters. October 2009; 301(2):224-31.
133. Liao CH, Sheng WH, Chen YC, Hung CC, Wang JT., Chang SC. Predictive value of the serum bactericidal test for mortality in patients infected with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Infect 2007; 55: 149–157.
134. Cevahir N, Kaleli İ, Demir M, Yıldırım U, Çevik E, Gürbüz M. Investigation of serum resistance for *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains. Mikrobiyol Bul 2006; 40(3): 251-5.
135. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. Virulence, resistance genes, and transformation amongst environmental isolates of *Escherichia coli* and *Acinetobacter* spp. J Microbiol Biotechnol 2012; 22(1): 25-33.
136. Prakasam G, Rohit A, Kumar S, Ramesh SS. Siderophore production among clinical and healthy skin isolates of *Acinetobacter* species, Indian J Med Microbiol 2013; 31:208-9.

137. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, Snyder M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* 2007; 21: 601–614.
138. Antunes LC, Imperi F, Towner KJ, Visca P. Genome- assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol* 2011b; 162: 279–284.
139. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics* 2011; 12: 126.
140. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars and mice. *Infect Immun* 2012; 80: 1015–1024.
141. Lopez-Rojas R, Garcia-Quintanilla M, Labrador-Herrera G, Pachon J, McConnell MJ. Impaired growth under iron-limiting conditions associated with the acquisition of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* , *International Journal of Antimicrobial Agents* 2016; 47, 473–477.
142. Stahl J, Bergmann H, Göttig S, Ebersberger I, Averhoff B. *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0138360.
143. Murray W. Stinson, Cheryl Hayden. Secretion of Phospholipase C by *Pseudomonas aeruginosa*. Department of microbiology, School of medicine, state university of New York at Buffalo 1979; 14214.
144. Berka RM, Gray GL, Vasil ML. Studies of Phospholipase C (Heat-Labile Hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa* infection and immunity, Dec. 1981; p. 1071-1074.

145. Jacobs AC1, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, Sayood K, Iwen PC, Skaar EP, Dunman PM., Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and immunity*, May 2010; p. 1952–1962.
146. Hodgson A.L., Bird P, Nisbet IT. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* 1990; 172:1256–1261.
147. Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M, Tikvesli S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41(6):513-8.
148. Rathinavelu S, Zavros Y, Merchant JL. *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis. *Microbes Infect.* 2003; 5(7):651-7.
149. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Oztas S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie JM, Raoult D, Médigue C, Weissenbach J, Cruveiller S. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One.* 2008; 19;3(3):e1805.
150. Pouedras P, Gras S, Sire JM, Mesnard R, Donnio PY, Picard B, Avril JL. Esterase electrophoresis compared with biotyping for epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 75(2-3):125-8.
151. Imperi F, Antunes LC, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P & Carattoli A. The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life* 2011; 63: 1068–1074.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

TOPLANTI TARİHİ : 04/11/2015
TOPLANTI NO : 2015/10

KARARLAR :

- 10- B.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2015-108-04/11 Protokol no'lu "*Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Virulans Faktörleri ve Antimikrobiyal Direnç Profilleriyle İlişkisi" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

Doç. Dr. Günnur ÖZBAKİŞ DENGİZ
B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

