

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ACINETOBACTER İLE İLİŞKİLİ KATETER
ENFEKSİYONLARINDA ANTİBİYOTİK KİLİT TEDAVİ
MODELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE BİYOFİLM
İLİŞKİLİ GENLERİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. SİNEM SOLMAZ

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. MELTEM YALINAY ÇIRAK

ANKARA
MART 2015

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Meltem Yalınay ırak'a ve değerli hocalarım Prof. Dr. Semra Kuştımur'a, Prof. Dr. M. Nedim Sultan, Prof. Dr. Seyyal Rota'ya, Prof. Dr. Ayşe Kalkancı'ya, Prof. Dr. Gölendam Bozdayı'ya, Prof. Dr. Kayhan ağlar'a, Prof. Dr. Işıl Fidan'a, Doç. Dr. Funda Doğruman Al'a ve Doç. Dr. Nuray Büyükberber'e ihtisas sürem boyunca bana hocalık ve rehberlik yaptıkları için, tez hazırlama sürecimde bana destek olan Doç. Dr. Murat Dizbay'a ve Doç. Dr. Barış Otlu'ya, tüm arkadaşlarıma, yaşamım boyunca destek ve sevgilerini hep yanımda hissettiğim sevgili anneme, babama, kardeşime ve çok sevgili eşim Oruç Emre'ye ve canım kızım İlayda'ma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİL VE RESİMLER DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Taksonomi	3
2.2. Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler	4
2.3. Patogenez ve Virülans Faktörleri	6
2.4. Epidemiyoloji	6
2.5. <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonları	7
2.5.1. Solunum Sistemi Enfeksiyonları	7
2.5.2. Bakteriyemi	9
2.5.3. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları	9
2.5.4. Üriner Sistem Enfeksiyonları	10
2.5.5. Yumuşak Doku Enfeksiyonları	10
2.5.6. Diğer Enfeksiyonlar	11
2.6. <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonlarında Tedavi	11
2.6.1. Sulbaktam	12
2.6.2. Polimiksinler	13
2.6.3. Karbapenemler	15
2.6.4. Aminoglikozidler.....	16
2.6.5. Tigesiklin.....	17
2.6.6. Rifampisin	18
2.6.7. Antibakteriyel Ajanların Kombinasyonları	19

2.7.	Biyofilm Tabakası ve Özellikleri	20
2.7.1.	Biyofilm Yapısı	21
2.7.2.	Biyofilm Oluşum Mekanizması	21
2.7.3.	<i>Acinetobacter baumannii</i> 'de Biyofilm Oluşumunun Düzenlenmesi	22
2.8.	Kateter Enfeksiyonları	26
2.8.4.	Tedavi	32
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	35
3.1.	Gereçler	35
3.1.1.	Besiyerleri ve Kimyasal Bileşikler	35
3.1.2.	Cihazlar	36
3.1.3.	Bakteri İzolatları	37
3.2.	Yöntemler	37
3.2.1.	Bakterinin Konvansiyonel Yöntemlerle Tiplendirilmesi	37
3.2.2.	Besiyerlerinin Hazırlanması	40
3.2.3.	Antibiyotik Duyarlılık Testleri	41
3.2.4.	Antibiyotik Çözeltilerinin Hazırlanışı	42
3.2.5.	Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi	42
3.2.6.	Biyofilm Oluşmasını Sağlayan Genlerin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması	43
3.2.7.	Kateterlerin Hazırlanması.....	50
3.3.	İstatistiksel Yöntem	52
4.	BULGULAR.....	53
4.1.	Örnekler	53
4.2.	Antibiyotik Duyarlılıkları	54
4.3.	Biyofilm Yapımının Değerlendirilmesi	56
4.4.	Amplifikasyon Sonuçları	58
4.4.1.	<i>bfmR</i> Genininin Amplifikasyon Sonuçları	58
4.4.2.	<i>csuE</i> Genininin Amplifikasyon Sonuçları	59
4.4.3.	<i>bap</i> Genininin Amplifikasyon Sonuçları	60
4.5.	Antibiyotik Kilit Tedavi Modeli Sonuçları	65

4.5.1. İzolatlar.....	65
4.5.2. Antibiyotikler	65
4.5.3. In Vitro Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin Etkinliği.....	66
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇLAR	86
7. KAYNAKLAR	89
8. ÖZET	104
9. SUMMARY	105
10.ÖZGEÇMİŞ	106

SİMGELER VE KISALTMALAR

AK	: Amikasin
AKT	: Antibiyotik kilit tedavisi
ATCC	: American Type Culture Collection
bç	: baz çifti
°C	: Santigrat
CAZ	: Seftazidim
CES	: Sefoperazon-sulbaktam
CIP	: Siprofloksasin
CFU/ml	: Colony Formation Unit (Koloni Oluşturan Birim)/mililitre
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CT	: Kolistin
ÇiD	: Çoklu ilaç dirençli
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EMB	: Eozin-metilen blue
ETA	: Endotrekeal Aspirat
FEB	: Sefepim
g	: Gram
GÜTF	: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
IMP	: İmipenem
Kb	: Kilobaz
Kbp	: Kilobaz çifti
L	: Litre
LEV	: Levofloksasin
MEM	: Meropenem
ml	: Mililitre

mg	: miligram
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SAM	: Ampisilin-sulbaktam
sn	: Saniye
SXT	: Trimetoprim-sülfometoksazol
TE	: Tris EDTA
TGC	: Tigesiklin
TSA	: Triptik Soy Agar
TSI	: Üç Şekerli Demirli Besiyeri
TPZ	: Piperasilin-tazobaktam
UV	: Ultraviyole
ViP	: Ventilatörle ilişkili pnömoni
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No:
Tablo 1. KİE'ların Etiyolojisi	27
Tablo 2. Hareket Besiyeri İçin Kullanılan Besiyeri Bileşimi	39
Tablo 3. Triptofan Buyyon (%1 Triptofan) İçin Kullanılan Malzemeler	39
Tablo 4. Kovac's Ayırıcı	40
Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Gen Dizisi	46
Tablo 6. PZR Reaksiyon Karşımı	46
Tablo 7. <i>csuE</i> Gen Bölgesi İçin Amplikasyon Şartları	47
Tablo 8. <i>bap</i> Gen Bölgesi İçin Amplikasyon Şartları	47
Tablo 9. <i>bfmR</i> Gen Bölgesi İçin Amplikasyon Şartları.....	47
Tablo 10. Çalışmada Kullanılan Genlerin Gen Büyüklükleri	49
Tablo 11. Kateter Dışından İzole Edilen <i>A. baumannii</i> Örnekleri ve Dağılımı	53
Tablo12. Kateter ve Kateter Dışından İzole Edilen Örneklerin Hastaların Bölümlerine Göre Dağılımı.....	54
Tablo 13. KİE Etkeni Olan İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları	55
Tablo 14. Klinik Örneklerden İzole Edilen İzolatların Biyofilm Yapım Şiddeti	57
Tablo 15. Biyofilm Oluşumunun Kateter ve Kateter Dışı Örneklerdeki Dağılımı	57
Tablo 16. Genlerin Amplifikasyon Sonuçları	61
Tablo 17. İzolatlardaki Gen Varlığının Biyofilm Düzeyine Göre Dağılımı	62
Tablo 18. Çalışmaya Dahil Edilen Kateter Dışı Enfeksiyon Etkeni Olan İzolatların Biyofilm ve Gen Dağılımları.....	63
Tablo 19. Çalışmaya Dahil Edilen Kateterden Elde Edilen İzolatların Biyofilm ve Gen Dağılımları	64

Tablo 20.	Çalışmada Kullanılan Antibiyotik Konsantrasyonları.....	66
Tablo 21.	Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin K3 İzolatı Üzerine Etkisi.....	67
Tablo 22.	Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin K7 İzolatı Üzerine Etkisi.....	68

RESİM VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 1. Biyofilm Oluşumunun Kristal Viyole Kullanılarak Değerlendirilmesi	56
Resim 2. <i>bfmR</i> Geni Jel Görüntüsü.....	58
Resim 3. <i>csuE</i> Geni Jel Görüntüsü	59
Resim 4. <i>bap</i> Geni Jel Görüntüsü	60
Şekil 1. Biyofilm Yaşam Döngüsü	21

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

Grafik 1. K3 Tarafından Oluşturulan Biyofilme In Vitro Olarak Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin Etkinliği	69
Grafik 2. K7 Tarafından Oluşturulan Biyofilme In Vitro Olarak Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin Etkinliği	70

1. GİRİŞ

Acinetobacter baumannii, özellikle yoğun bakım ünitelerinde hastane salgınlarına yol açan ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili gram-negatif bakteriyel bir patojendir¹. Hastanede yatan hastaların *A. baumannii* tarafından kolonize ve enfekte olması önemli bir durumdur. Bakteriemi, üriner sistem enfeksiyonları ve sekonder menenjitden nozokomiyal pnömoniye kadar çok çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilmektedir². Çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarının hızlı gelişmesi, hastalar için sınırlı tedavi seçeneği ortaya çıkarmıştır. Bir çok izolat aminoglikozid, florokinolon, (karbapenem dahil) β -laktam, tetrasiklin ve trimetoprim sulfametoksazol gibi klinik açıdan kullanışlı antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençlidir^{3,4}.

Antibiyotik direncine ek olarak, biyofilm oluşturma yeteneği de *A. baumannii*'nin virülansına katkıda bulunan önemli faktörlerdendir. Biyofilmler, polisakkarid, protein ve DNA içeren hücre dışı bir malzemeden meydana gelen bir matriks içindeki sesil bakteriyel topluluklardır⁵. Bakteriyel patojenler tarafından oluşturulan biyofilm, konak bağışıklık savunması, dezenfektanlar ve antimikrobiallere karşı geliştirilmiş tolerans ile ilişkilendirilmiştir⁶.

A. baumannii suşları in vitro biyofilm oluşturmaktadır ve bu fenotip ile ilişkili moleküler mekanizmaların bazıları çalışılmıştır; biyofilm oluşumu ile ilgili genler *csu* lokusunu (şaperon-usher *Csu* fimbriyayı kodlayan), *pga* lokusunu (polisakarit poli-N-asetil glukozamini kodlayan, PNAG), *ompA*'yı (dış membran proteini kodlayan *OmpA*), *bap*'ı (biyofilm-ilişkili proteini kodlayan *Bap*) ve çoğunluğu algılama (quorum sensing) sistemini içermektedir⁷⁻¹².

Biyofilm oluşumu, hastane ortamındaki patojenik bakterilerin hayatta kalması ve kalıcı tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonların oluşmasına neden olmaktadır¹³. Bunların başında da biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bakterilerin etken olduğu kateter ilişkili enfeksiyonlar yer almaktadır¹⁴.

Santral venöz kateterler (SVK) enfeksiyonlarında en sık rastlanan etkenler gram-pozitif bakteriler olsa da, gram-negatif bakteriler de kateter ilişkili enfeksiyonlarda önemli role sahiptir¹⁵. Etiyolojide gram-negatif bakterilerin kateter ilişkili enfeksiyonlardaki (KİE) etkisi %19 - 21 arasında değişmektedir¹⁶. *A. baumannii* KİE'lara neden olabilen ve kan-dolaşım enfeksiyonlarından temizlenmesi zor olabilen önemli bir patojendir¹⁵.

KİE'larda kateterin çıkarılması ya da antimikrobiyal tedavi uygulanır. Kateter kurtarılabaksa sistemik antibiyotik ile birlikte antibiyotik kilit tedavisi uygulanmalıdır. Uygulanacak antibiyotiklerin laboratuvarında bakteri süspansiyonları ile yapılan duyarlılık testlerine göre seçilmesi gerekmektedir. Birçok çalışma 10 - 14 günlük ampirik tedavi dönemlerinin yeterli olduğunu göstermektedir^{14,17}.

Bu çalışma ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* izolatlarında biyofilm oluşumu ile ilgili genlerinin varlığının araştırılması ve biyofilm yapım şiddeti ile biyofilm oluşumunda rol aldığı düşünülen genler arasında ilişki olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda kateter ilişkili enfeksiyona sebep olan izolatlara in vitro olarak uygulanan antibiyotik kilit tedavi modeli ile etkin antibiyotiğin dozunun ve süresinin bulunması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Taksonomi

Acinetobacter'ler 1800'lü yılların sonunda, morfolojik özelliklerine ilk kez dikkat çeken iki bilim adamının adlarına ithafen 'Morax-Axenfeld basilleri' olarak adlandırılmışlardır. Daha sonraları *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolyans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii var. glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum*, *Achromobacter mucosus* olarak farklı adlandırmalar yapılmıştır. Brisou ve Pre'vot 1954'de benzer morfolojik özellikler gösteren bu mikroorganizmalar arasında bazılarının hareketsiz olduklarını göstermişler ve Yunanca hareketsiz anlamına gelen 'Akinetos' sözcüğünden esinlenerek bu bakterilere '*Acinetobacter*' adını vermişlerdir. 1968 yılında ise Baumann ve arkadaşları *Acinetobacter*'lerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini ayrıntılı olarak ortaya koymuşlardır. 1971 yılında da bu bakteriler Moraxellaceae ailesi içinde *Acinetobacter* cinsi olarak sınıflandırılmışlardır^{3,18}. Bergey'in Sistemik Bakteriyoloji Kılavuzunun 1974 baskısında, cinsi *Acinetobacter* cinsi ilk türün *Acinetobacter calcoaceticus* olduğu yayınlanmıştır³.

Bouvet ve Grimont 1986'da deoksiribonükleik asit hibridizasyon yöntemini kullanarak, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, and *A. lwoffii*'in dahil olduğu, *Acinetobacter* cinsi üyelerini 12 türe ayırmışlardır. Gruplar 1, 2, 3 ve 13TU arasında çok yakın bir ilişki olduğu

gösterilmiştir ve bu yüzden bu türler *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks adı altında incelenmektedir^{2,3}. Bugüne kadar, 32'den fazla *Acinetobacter* türü bildirilmiştir. Bunlardan en az 17 tür adlandırılmıştır. Kalan türler genellikle daha karakterizasyonu belli olmayan, genomik türler olarak adlandırılmaktadır¹⁹.

2.2. Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler

Acinetobacter cinsi bakteriler; gram negatif, zorunlu aerobik, hareketsiz, nonfermentatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, indol negatif, nitratları redükte etmeyen, üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif besiyerinde asit oluşturmayan, 35 - 37°C'de üremeyi seven ve DNA G+C içeriği %39 - 47 olan bakterilerdir. Gram-negatif basil, kokobasil veya diplokok şeklinde görülen bu mikroorganizmalar taze kültürlerinde gram-pozitif olarak görülebilmektedirler. Logaritmik büyüme fazında 1 - 1.5 x 1.5 - 2.5 µm boyutlarında basil olarak görülürler. Diğer dönemlerde ise kok, kokobasil, ikişerli, küme halinde veya kısa zincir morfolojisinde gözlenebilirler. Bu benzer morfolojik özellikleri nedeniyle *Haemophilus* ve *Neisseria* türleri ile karıştırılabilirler^{3,18,20}.

Acinetobacter cinsi bakteriler klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan koyun kanlı agar, triptik soy agar ve McConkey besiyerlerinde kolay ürerler. Bu organizmalar pürüzsüz, bazen mukoid, grimsi beyaz koloniler oluştururlar. Diğer *Acinetobacter* türleri daha küçük ve saydam koloniler oluştururken, *A. calcoaceticus*'dan-*A. baumannii* kompleksi kolonileri 1.5 ile 3 mm arasındaki koloni çapı ile Enterobacteriaceae kolonisine benzemektedir. Enterobacteriaceae'ların aksine, *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleksi

dışındaki bazı *Acinetobacter* türleri McConkey agarda üreyememektedir. *Acinetobacter haemolyticus* ve diğer türlerin çoğu (*Acinetobacter* genomik tür 6, 13BJ, 14BJ, 15BJ, 16 ve 17) koyun kanlı agarda hemoliz oluşturmalarına rağmen, *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks üyeleri hemoliz oluşturmazlar^{3,18}. *Acinetobacter*'lerden diğer benzer gram-negatif bakterileri ayırt edebilecek tek bir metabolik test yoktur.

Acinetobacter türlerinin belirlenmesi için doğrulanmış birkaç yöntem vardır, DNA-DNA hibridizasyon testleri referans test gibi görünmektedir. Bouvet ve Grimont tarafından 1987 yılında oluşturulan fenotipik tanımlama şeması; 37 °C, 41 °C ve 44 °C'de büyümeyi, glikozdan asit üretimi, jelatin hidrolizi ve 14 farklı karbon kaynağı asimilasyonunu içermektedir^{21,22}. Ama bu fenotipik testler yaygın *Acinetobacter* türlerinin kesin tanımlaması için uygun değildir. Hem DNA-DNA hibridizasyon ve hem de Bouvet ve Grimont fenotipik tanımlama sistemi zahmetli ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için uygun olmaktan uzaktır. Bu nedenle, *Acinetobacter*'lerin tanımlaması için moleküler yöntemler geliştirilmiştir³.

Tür identifikasyonunda kullanılmakta olan API 20 NE, Vitek 2, Phoenix ve MicroScan WalkAway gibi manuel ve yarı otomatik ticari identifikasyon sistemlerinin, tür identifikasyonunda halen problemleri vardır. Özellikle klinik olarak önemli olan ve *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks içerisinde yer alan 3 *Acinetobacter* türü (*A. baumannii*, *Acinetobacter* gen. sp. 3 ve *Acinetobacter* gen. sp.13TU) ticari identifikasyon sistemleri ile ayırt edilememiştir^{23,24}.

2.3. Patogenez ve Virülans Faktörleri

Virulans potansiyelleri düşük patojen oldukları için, konak savunma mekanizması normal olan bireylerde enfeksiyon oluşturmaları güçtür. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Acinetobacter* cinsi bakteriler genel olarak düşük virulanslı olarak kabul edilirler, ancak virulanstan sorumlu bir takım faktörler de saptanmıştır:

- 1- İzolatların yüzeyinin daha fazla hidrofilik olmasını sağlayan ve fagositozdan koruyan L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukronik asitten oluşan polisakkarit kapsül.
- 2- İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı güçlendiren fimbria ve/veya kapsüler polisakkarit
- 3- Dokulardaki lipidleri yıkan enzimler üretirler, hücre duvarında bulunan lipid A potansiyel toksik etki göstererek patojeniteyi artırır.
- 4- Aerobaktin gibi siderofor ve demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile bakteri üremesi için gerekli demir temin edilmektedir^{20,25}.

2.4. Epidemiyoloji

Acinetobacter türlerinin sıklıkla toprakta, suda ve kuru çevrelerde bulunabilir, insanlardan ve hayvanlardan izole edilebildikleri gibi her yerde bulabilen mikroorganizmalar olarak kabul edilirler. *Acinetobacter* türlerinin insan florasında doğal olarak bulunabilir. Epidemiyolojik araştırmada ayaktan takip

edilen hastaların %43 kadarının bu organizmalar ile kolonize olduğu tespit edilmiştir.

Hastane personelinin derisinde sürekli taşınan en yaygın gram-negatif mikroorganizma olarak tanımlanmaktadır. Rezervuar insanlar ve hastane çevresindeki cansız materyellerdir, bu da hastalar arasında geçiş için elverişli bir durum sağlamaktadır. Çeşitli çalışmalarda; majör cerrahi, majör travma, yanıklar, prematüre doğum, bir yoğun bakımda kalmak, uzamış hastane ya da yoğun bakımda kalış, mekanik ventilasyon, kalıcı yabancı cihazların uzunluğu, invaziv prosedürlerin sayısı gerçekleştirilen ve önceki antimikrobiyal tedaviler *A. baumannii* ile enfeksiyon veya kolonizasyon için risk faktörleri olarak tespit edilmiştir^{2,3,26,27}.

2.5. *Acinetobacter* Enfeksiyonları

Acinetobacter türlerinin toplum kökenli enfeksiyonlar oldukça nadirdir, hastane kökenli fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar. Tüm organlarda süperatif enfeksiyonlara neden olabilirler. Tüm *Acinetobacter* türleri arasında en sık ve en ciddi klinik tablolara yol açan etken *A. baumannii*'dir. En sık hastane kaynaklı pnömoniye neden olurlar².

2.5.1. Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Hastanede gelişen pnömoni; genellikle hastaneye yatıştan 48 saat sonra gelişen ve hastanın yatışında inkübasyon döneminde olmadığı bilinen pnömoni olguları ile, hastaneden taburcu olduktan sonraki 48 saat içerisinde ortaya çıkan

pnömoni olarak tanımlanır. Hastaneye yatan hastalar arasında %0.5 - 2 oranında görülür. Dünyada hastane infeksiyonları içindeki hastanede gelişen pnömoni oranı %15 düzeyinde bildirilirken, ülkemizdeki veriler %11 - 30 arasında (ortalama %19) olduğunu göstermektedir. Hastanede gelişen infeksiyonlar arasında en sık mortalite nedeni pnömonilerdir. Ülkemizde hastanede gelişen pnömoni saptanan olgularda kaba mortalite oranı %30 - 87 arasında değişmektedir. Bakteriemi gelişen olgularda, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi sorunlu bakterilerle oluşan pnömonilerde, yaşlı hastalarda (>60 yaş), uygunsuz antibiyotik kullananlarda ve ventilatör ilişkili pnömonilerde (VİP) doğrudan pnömoniye bağlı mortalite oranı daha da artmaktadır.

Acinetobacter türleri ülkemizde yoğun bakım infeksiyonlarına, özellikle VİP'lere sebep olan sorunlu bakterilerdendir. Hastane kökenli *Acinetobacter* pnömonisinde multilober tutulum, kavitasyon, plevral efüzyon ve bronkopulmoner fistül oluşumu gözlenmiştir. Hastane kökenli *Acinetobacter* pnömonisinde mortalite %35 - 70 oranında bildirilmektedir. Bakteriemi ya da sepsis bulgularının olması ve daha önceki kolonizasyonun varlığı *Acinetobacter*'lere bağlı gelişen nozokomiyal pnömonilerde kötü prognoz göstergesidir. Toplum kaynaklı pnömoniye de neden olmaktadır. Toplum kökenli pnömoni, erişkinlerde konak immünesini zayıflatan alkolizm, sigara, diabetes mellitus, böbrek yetmezliği, altta yatan akciğer hastalığı gibi durumlarda oluşur. Tropikal iklimi olan bölgelerde daha yüksek prevalansa ulaşır. *Acinetobacter* türlerine bağlı gelişen toplum kaynaklı pnömoni ani başlangıçlı ve fulminan seyirlidir. Hastaların 1/3'ünde septik şok görülür. Literatürde, toplum kaynaklı

pnömonide, mortalite oranlarının %40 - 60 arasında değiştiğini bildiren çok sayıda yayın bulunmaktadır^{28,29}.

2.5.2. Bakteriyemi

Hastane kökenli bakteriyemilerinin %1,5 - %2,5'una *Acinetobacter* türleri neden olmaktadır. Hastane kökenli *Acinetobacter* bakteriyemisi sıklıkla solunum sistemi enfeksiyonu ve intravenöz kateter kullanımı ile ilişkili olup daha az sıklıkla da idrar yolu, yara, deri, batin enfeksiyonları ile ilişkilidir. *Acinetobacter* bakteriyemisi olan hastaların üçte birine yakınında septik şok gelişir. *Acinetobacter* bakteriyemisinde mortalite oranı %20 - 60 arasındadır. *Acinetobacter* pnömonisi ile ilişkili bakteriyeminin mortalitesi (%39), intravenöz katetere bağlı gelişen bakteriyemi mortalitesinden daha yüksektir (%4). *Acinetobacter* bakteriyemisi tek patojenli ya da polimikrobiyal olabilir. Polimikrobiyal bakteriyemilerde mortalite artmaktadır^{29,30}.

2.5.3. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları

Hastane kökenli *Acinetobacter* menenjitisi sık görülmez. *Acinetobacter* menenjitinin baskın formu sekonder menenjittir ve beyin omurilik cerrahisi girişimleri, beyin omurilik sıvısı kaçağı, intrakranial hemoraji ve önceden antibiyotik kullanımı sonrası *Acinetobacter*'e bağlı menenjit gelişebilmektedir. Ancak *Acinetobacter* menenjitinin mortalitesi yüksek (%20 - 30) olup yaşayan hastalarda ciddi nörolojik defisit bırakmaktadır^{31,32}.

Acinetobacter türlerine bağlı toplum kökenli menenjit çok nadir gelişir ve genellikle sıcak iklimlerde görülür. Toplum kaynaklı menenjitlerde bakteri genellikle dirençli değildir. *Acinetobacter* menenjitinde çoğu hastada ateş, meningeal iritasyon bulgusu vardır ve bu bulgulara nöbet eşlik edebilir. Beyin omurilik sıvısında ise nötrofillerin hakim olduğu pleositoz mevcuttur. Beyin omurilik sıvısının glukoza düşük ve proteini yüksektir. Gram boyamada *Acinetobacter*; morfolojik olarak *Neisseria meningitidis* ile karışabilir^{29,33}.

Metan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, beyin cerrahisi ameliyatları sonrasında gelişen gram negatif basıl menenjitlerinin %83'ünün *Acinetobacter* türleri tarafından oluşturduğu bildirilmiştir³⁴.

2.5.4. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Acinetobacter'e bağlı gelişen üriner sistem enfeksiyonu sık değildir. Genelde immün sistemi baskılanmış, yaşlı, sürekli üriner kateteri olan ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülmektedir. Kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyon sıklığı yaklaşık %1 olarak bildirilmektedir^{2,29}.

2.5.5. Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Acinetobacter türleri cerrahi, yanık ve travma yaralarında kolonize olabilir ve ağır yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açabilir, osteomyelite ilerleyebilir. *Acinetobacter*'e bağlı gelişen yumuşak doku enfeksiyonları sıklıkla prostetik materyal ile ilişkili olup geniş debritleme gerektiren enfeksiyonlar gelişebilir. *Acinetobacter* toplum kaynaklı ve hastane kökenli selülit, fronkültit gibi cilt

enfeksiyonlarına da yol açabilir. Kateter giriş yerinde selülit oluşumuna neden olabilir ve sadece kateterin çekilmesi ile iyileşebilir²⁹.

2.5.6. Diğer Enfeksiyonlar

Acinetobacter türleri gözde de kolonize olabilir. Korneal ülserasyonlara, endoftalmitte, preorbital selülitte neden olabilir. Travma ve cerrahi sonrası gözde enfeksiyona neden olabilir. Protez kalp kapağı endokarditi, periton diyalizi ile ilişkili peritonit, perkütan transhepatik kolanjiografi ve perkütan safra drenajıyla ilişkili kolanjit, pankreas ve karaciğer apseleri, otolog kemik iliği transplantasyonundan sonra gelişen tiftit, osteomyelit, septik artritis olguları bildirilmiştir^{2,29,30}.

2.6. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarında Tedavi

Acinetobacter ile ilgili asıl problem enfeksiyonun kendisinin tanınmasıdır. *A. baumannii* izolatları sıklıkla enfeksiyondan ziyade kolonizasyonu olan, hospitalize hastalardan elde edilen idrar ve solunum yolu örneklerinden izole edilmektedir. *A. baumannii*'ye bağlı enfeksiyon; enfeksiyonun klinik ve biyolojik bulgularına sahip olan hastada steril bir örnekten *A. baumannii*'nin izole edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Kolonizasyon ise; enfeksiyonun klinik veya biyolojik bulgularına sahip olmayan hastada tipik olarak steril olmayan örneklerden *A. baumannii*'nin izolasyonu olarak tanımlanabilir.

A. baumannii enfeksiyonlarında tedavi, olağan duyarlılık paternlerinde bile problemlidir. Tedavi başlangıcında duyarlı görünen bakteri tedavi sonlanmadan

dirençli hale gelebilir. Bu nedenle de kesin olmasa da kombine tedaviler seçilir. *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu hastane kökenli enfeksiyonların genellikle hem komorbidite hem de kötü prognoza sahip genel durumu kötü hastaları etkilemesinden dolayı klinik etkisi hala tartışmalıdır ve değerlendirmesi zordur. *A. baumannii*'ye bağlı enfeksiyonların mortalite oranları hastanelerde %7.8'den %23'e ve YBÜ'lerinde %10'dan %43'e kadar değişmektedir^{35,36}.

Mevcut antimikrobiyal ajanların kullanımını optimize etmek ve ilaç direnci gelişimi için olasılıkları en aza indirmek için tedavi stratejileri hayati önem taşımaktadır. İdeal tedavi antimikrobiyal duyarlılık testlerine göre belirlenmelidir. Ampirik tedavi için antibiyotik seçimi zordur ve belirli bir hastane ortamında endemik *A. baumannii* izolatlarının fenotipleri ve genotipleri ile ilgili verilere dayanılarak yapılmazdır³⁷.

2.6.1. Sulbaktam

Sulbaktamın başarılı tedavi kullanımı, az sayıdaki çalışmada belirtilmiştir. Ancak istisna olarak, *Acinetobacter* ve *Bacteroides* türlerine karşı sulbaktamın tek kullanımı ya da ampisilin ile kombine kullanımının intrinsik aktivitesi vardır. İmipenem dirençli ve duyarlı *A. baumannii* izolatlarının penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP) ile sulbaktam, klavulanik asit ve tazobaktam etkileşimi araştırıldığında, imipenem duyarlı izolatlardan bu beta-laktamaz inhibitörlerinin her üçünün de PBP'ne bağlandığı gösterilmiştir. Her üç antimikrobiyal de *A. baumannii*'ye karşı intrinsik olarak etkili görünse de, klinik kullanımda sulbaktam in vivo olarak tek aktif inhibitördür^{37,38}.

Sefoperazonların *Acinetobacter* türlerine karşı etkinliği azdır ancak sulbaktamla 1:1 oranında kombine formu *Acinetobacter* türlerine oldukça etkilidir. Türkiye’de 2007 yılında, 13 farklı merkezin katılımıyla gerçekleştirilen çalışma sonucuna göre *A. baumannii* izolatlarına karşı en düşük direnç sefoperazon-sulbaktam ve imipenemde saptanmış, ayrıca değişik merkezlere göre direnç oranlarının oldukça farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Türkiye’de farklı araştırmacılar *A. baumannii* izolatlarında sefoperazon-sulbaktam direncinin %8 - 78 oranları arasında olduğunu bildirmişlerdir. 2008 - 2010 yıllarında yapılan bir çalışmada ise sefoperazon-sulbaktam direnci yıllara göre %11 - 42, tüm izolatlarda %28; karbapenem direnci ise yıllara göre %50 - 83, tüm izolatlarda ise %70 - 71 oranlarında saptanmıştır^{38,39}.

2.6.2. Polimiksinler

Polimiksinler 5 farklı kimyasal bileşiğin (polimiksin A-E) yer aldığı polipeptid antibiyotiklerdir. Klinik pratikte kullanılan polimiksin grubu antibiyotikler polimiksin B ve polimiksin E (kolistin)’dir. 1949 yılında *Bacillus polymyxa*’dan izole edilmiştir. 1950 yılında ise Japonya ve Avrupa’da tedavi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Ancak nefrotoksik etkilerinden dolayı kullanımı terk edilmiştir. Son 20 - 30 yıldır çoklu ilaca dirençli kistik fibrozis hastalarının tedavisi için bu kısıtlama kaldırılmıştır.

Kolistin, kolistin sülfat ve kolistimetat sodyum olarak iki şekilde kullanımda yer alır. Kolistimetat sodyum hidrolize olana kadar inaktif olup, hem in vitro hem de in vivo ortamda hidrolize olabilir. Bu nedenle kolistimetat sodyum

yaklaşık dört ya da sekiz kat daha az aktif olan bir ajandır. Kolistimetat sodyum, kolistin sülfatla karşılaştırıldığında daha az teröpatik etkinliğe ve başta daha az yan etkilere sahiptir. Bununla birlikte kolistin sülfat ve polimiksin B ile karşılaştırıldığında daha az nefrotoksik etkiye sahiptir. Son yıllarda kolistimetat sodyum, polimiksin grubu antibiyotikler içinde en fazla kullanılan parenteral formları oluşturmaktadır. Kolistimetat sodyum, kistik fibrozisli hastalarda nebulizatör ile inhaler uygulanması, ayrıca intratekal ve intraventriküler enjeksiyona müsait olması ile önemli bir avantaja sahiptir. Kolistin sülfat olarak topikal ve oral formlar bazı ülkelerde kullanılmakla birlikte, ABD’de yalnızca kolistimetat sodyum ve polimiksin B kullanımı mevcuttur. Polimiksin B sülfat intramüsküler ve intravenöz yol dışında topikal olarak da kullanılan bir ajandır. Merkezi sinir sistemi infeksiyonlarının tedavisinde polimiksin B intratekal ve intraventriküler olarak da kullanılabilir.

İntravenöz kolistin, in vitro duyarlılık testleri ile doğrulandıktan sonra, diğer antimikrobiyal ajanlara dirençli gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde düşünülmelidir. Kolistin dışında tüm antibiyotiklere dirençli *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* infeksiyonlarının tedavisinde monoterapi yerine kombine kullanımı tercih edilmelidir. Yapılan çalışmalarda kolistinin gram-negatif bakterilere karşı karbapenemlerle sinerji oluşturduğu gösterilmiştir. Zamana bağlı öldürücü etkinin kombinasyon sonucunda standart yöntemlerle $2 \log_{10}$ CFU/ml düzeyinde bakteri popülasyonunu daha fazla azalttığı bildirilmiştir. Bunların dışında kolistinin seftazidim, rifampisin ve glikopeptidlerle sinerji oluşturduğu yönünde bildirimler de bulunmaktadır.

Kolistin son yıllarda tüm dünyada gittikçe sıklığı artan panrezistan *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türü bakterilerin neden olduğu hastane kökenli enfeksiyonlarda adeta bir kurtarma tedavisi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bazı çalışmalar karbapenem dirençli izolatların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistinin faydalı olabileceğine, ancak kritik hastalarda artan kolistin kullanımının hızlı bir direnç artışına yol açabileceğine dikkat çekmektedir^{37,40,41}.

2.6.3. Karbapenemler

Beta-laktam antimikrobiyal ajanlar 1940'lı yıllarda penisilinin kullanılmaya başlamasıyla birlikte kullanıma girmiştir. Karbapenemler, geniş spektrumlu aktiviteye sahip, gram-pozitif ve gram-negatif aerop ve anaerop patojenler bulunan beta-laktam antibiyotiklerdir. Bu nedenle karbapenemler, tedavisi zor patojenler tarafından oluşturulan ciddi enfeksiyonların ampirik tedavisinde tercih edilmektedir.

Streptomyces cattleya'dan izole edilen tienamisin ilk karbapenemdir. Son derece kararsız bir molekül olmasından dolayı geliştirilerek imipenem bulunmuştur. Farklı antimikrobiyal aktiviteye sahip çok sayıda karbapenemin geliştirilmesi nedeniyle artık karbapenemler homojen bir antibiyotik sınıfı olarak kabul edilmemektedir. Mevcut sınıflamaya göre aerop ve anaerop patojenlere karşı etkin, ancak anti-psödomonal etkisi olmayan ve uzun yarılanma süresine sahip ertapenem, grup 1 karbapenem olarak sınıflanmıştır. Bu aktivite profili ile ertapenem, hastaneye başvuran toplum kökenli enfeksiyonu olan hastaların tedavisinde önerilmektedir. İmipenem, meropenem, panipenem, biapenem ve

doripenem ise grup 2 karbapenemleri oluşturmaktadır. Grup 2 ajanlar *Acinetobacter* spp. ve *P.aeruginosa* gibi non-fermentatif gram-negatif patojenleri de kapsayan geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir ve nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Grup 3, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı aktivitesi olan ajanlar için oluşturulmuştur. Ancak henüz bu gruptaki ajanlardan kliniğe sunulmuş bir üye bulunmamaktadır⁴²⁻⁴⁴.

Yatan hastalarda ciddi enfeksiyonlara sıklıkla neden olan patojenlerin karbapenemlere duyarlılığına ilişkin mevcut bilgi birikimini genişletmek amacıyla yürütülen COMPACT (The Comparative Activity of Carbapenem Testing Study) çalışmasına ait Türkiye verileri 2011 yılında yayınlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre *Acinetobacter* türleri için doripenem, diğer iki karbapenemden daha aktif bulunmuştur⁴².

2.6.4. Aminoglikozidler

Acinetobacter enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenem, sulbaktam ve kolistin ilk tercih edilen antibiyotiklerdir. Ancak, karbapenemlerin ampirik tedavide yaygın olarak kullanılması, bunlara karşı direnç oranlarının artmasına neden olmaktadır. Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında aminoglikozidler diğer antimikrobiyal ajanlarla kombine olarak kullanılabilir. Aral ve ark.'nın 2010 yılında yaptıkları çalışmada *A. baumannii* izolatlarında %85 gentamisin, %81 amikasin direnci bildirilmiştir; Iraz ve ark. 2012'de *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarını inceledikleri çalışmada %54

gentamisin, %69 amikasin, %87 tobramisin, %15 netilmisin direnci bildirmişlerdir ⁴⁵.

Aminoglikozidler, *A. baumannii* tedavisinde tek başına kullanılmamalıdır. Özellikle uzun süreli kullanımda ciddi yan etkileri bu kullanımı kısıtlamaktadır. Karbapenem-amikasin kombinasyonunun çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *A. baumannii* enfeksiyonlarının %38 - 46'sında etkili olduğu gösterilmiştir ⁴⁶.

2.6.5. Tigesiklin

Tigesiklin, glisisiklin grubu antibiyotiklerin ilk üyesi olup minosiklin derivativesidir ve 2005 yılında kullanıma girmiştir. Tetrasiklinlere benzemek ile birlikte bazı avantajları vardır. Eski tetrasiklinlere dirençli mikroorganizmalara etkili olması bunlardan biridir. Yine etki spektrumunun genişlemesi ile özellikle ağır enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. Gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin pek çoğuna etkilidir, aynı zamanda anti-anaerob aktiviteye de sahiptir. Ancak anti-pseudomonal aktivitesi azdır. Karbapenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarına karşı in vitro aktivitesi vardır.

A. baumannii'de tigesiklin MİK değerlerinde hızla gelişen artış ve direnç rapor edilmiştir. Dünya genelinde 2004 - 2009 yılları arasında, tigesiklinin ortalama MİK değerinde 0,3'den 0,5'e artış olduğu vurgulanmaktadır. Bir çalışmada 82 klinik izolattan elde edilen 19 farklı klon saptanan çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarının %66'sının tigesikline dirençli (MİK > 8 mg/L) ve %12'sinin orta düzey dirençli (MİK 4-6 mg/mL) olduğu gösterilmiştir ^{37,47,48}.

Acinetobacter enfeksiyonlarında tedavi sırasında sık direnç gelişimi nedeniyle tigesiklin MİK değerlerinin kontrolü gereklidir. *A. baumannii* santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tigesiklinle tedavisi konusunda yeterli deneyim yoktur. Tigesiklin-meropenem-netilmisin kombinasyonu ile başarılı bir şekilde tedavi edilen menenjit vakaları yanında; *A. baumannii* serebritinin tigesiklinle tedavisinde başarısızlık da bildirilmiştir^{37,47-50}.

2.6.6. Rifampisin

Artan ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarının varlığından dolayı, birçok çalışmacı rifampin gibi yeni antimikrobiallerin kullanımını test etmiştir. Rifampisinin tek başına kullanılmasıyla erken ve yüksek oranda direnç geliştiği gözlemlenmiştir⁵⁰. Bu nedenle çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonları uygulanmaktadır.

2010 yılında ÇİD *A. baumannii* ile enfekte menenjit ve pnömoni modeli üzerinde rifampisin, kolistin, imipenem ve sulbaktam kombinasyonları denemiştir. ÇİD *A. baumannii*'de rifampisinin kombinasyonlarının başarı olduğu bulunmuştur⁵¹.

Bassetti ve arkadaşlarının, bakteriyemi ve pnömonili hastalarda yaptığı bir çalışmada kolistin ve rifampisin kombinasyonları başarılı bulunsa da; 2013 yılında yapılan çok merkezli, randomize çalışmada ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarında kolistine rifampisin eklemenin mortaliteyi azaltmadığı belirtilmiştir^{52,53}.

2.6.7. Antibakteriyel Ajanların Kombinasyonları

Dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında kombinasyon tedavileri önerilmiştir. Kombine antibiyotik kullanımı özellikle yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonların tedavisinde, dirençli izolatlar karşı sinerjistik etki sağlanmasında, ilaçların doza bağlı toksisitesinin azaltılmasında ve polimikrobik enfeksiyonların tedavisinde prognozu etkileyen olumlu bir faktör olarak değerlendirilmektedir.

Deneysel pnömoni modelinde, amikasin ve imipenem kombinasyonunun, imipenemin tek başına kullanımına göre daha etkili bulunmuştur. Ayrıca karbapenemin tek başına kullanımının *A. baumannii*'nin neden olduğu VİP'de yararlı olduğu gösterilmiştir. Karbapenem ile ampisilin-sulbaktam kombinasyonunun (mortalite oranı %30.8) karbapenem ile amikasin kombinasyonuna (mortalite oranı %50) göre daha iyi olduğu saptanmıştır^{54,55}.

En sık kullanılan kombinasyonlar, düşük direnç oranları ve in vitro sinerji göstermesinden dolayı imipenem-amikasindir. İmipenem-siprofloksasin kombinasyonunun in vitro ve in vivo aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Sefoperazon-sulbaktam kombinasyonu *A. baumannii*'ye oldukça etkilidir. Ancak, ÇİD gösteren özellikle de karbapenemlere dirençli izolatların artması ile *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi zorlaşmıştır. ÇİD'li *A. baumannii* için yapılan in vitro çalışmalarda kolistin-imipenem veya kolistin-rifampisin; kolistin-imipenem-rifampisin; sulbaktam-rifampisin veya sulbaktam-kinolon kombinasyonlarının artmış etkinlik gösterdiği saptanmıştır. En iyi kombinasyonun rifampisin ile kolistin birlikte kullanıldığı kombinasyon olarak gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda ise kolistinin; karbapenem, aminoglikozid, kinolon veya

florokinolonu içeren antibiyotiklerden biri veya daha fazlasının kombinasyonları ile tedavi edilmiş olgular bildirilmiştir. Kombine kullanımın etkilerinin değerlendirilmesinde polimiksinlerin etkisi imipenemin aktivitesini değiştiren dış membran permeabilitesini arttırma ile ilişkili bulunmuştur. Sulbaktamın tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyonu özellikle *A. baumannii*'nin penisilin bağlayıcı proteinlere tutunma etkisindedir^{50,55}.

Tek veya bir kaç ajana karşı duyarlı olan enfeksiyonlar belki tek bir ajanla tedavi edilebilir. Ancak artan direnç riski göz önünde bulundurulmalıdır. Kontrollü tedavi denemeleri, yeni antibiyotik kombinasyonlarının etkinliği artırarak ve direnci azaltarak etkinliği belirleyebilecektir⁵⁴.

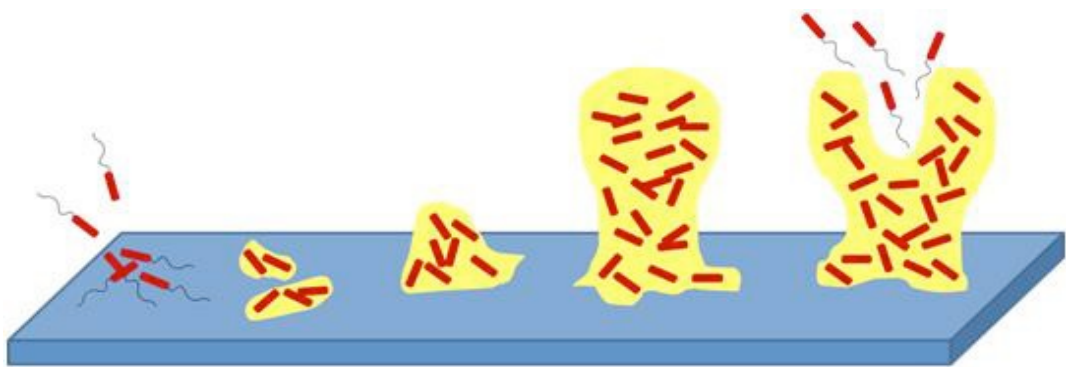
2.7. Biyofilm Tabakası ve Özellikleri

İlk olarak 17. Yüzyılda Leeuwenhoek tarafından tanımlanmıştır. Birçok farklı tanımlama yapılmıştır. Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir. Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen terminolojide “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakarit” ya da “ekzopolimer (EPS)” adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır^{56,57}. Bakteriler, doğal su ve toprak ortamlarında, yaşayan dokularda, tıbbi cihazlar veya endüstriyel ya da içme suyu boru sistemleri gibi farklı yüzeylerde biyofilm oluşturabilirler. Biyofilmin, mikrobiyal topluluğu çevresel streslere karşı koruduğu bulunmuştur⁵⁸.

2.7.1. Biyofilm Yapısı

Biyofilm matriksinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1 - 2 EPS, %1 - 2 globüler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1 - 2 nükleik asit, lipid, fosfolipitlerdir. Yerleşik hücrelerde birçok farklı türde yapı olabilir, bunlar sadece %5 oranında matrikse sahip olabilir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir⁵⁹. Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. Olgun bir biyofilmin kütlelerinin %75 – 90'ını EPS oluşturmaktadır

60



Şekil 1. Biyofilm Yaşam Döngüsü

2.7.2. Biyofilm Oluşum Mekanizması

Biyofilm oluşumu basamaklar halinde gelişen bir olaydır:

A. Mikroorganizmanın yüzeye tutunması: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır.

B. Geri dönüşümsüz tutunma: Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Ekzopolisakkarid aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır.

C. Kolonizasyon: Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır.

D. Kopma: Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odalarda biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluştuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajeller sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir ⁶¹.

2.7.3. *Acinetobacter baumannii*'de Biyofilm Oluşumunun Düzenlenmesi

A. baumannii canlı ve cansız yüzeylere yapışma ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Cansız yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneği sayesinde

hastane ekipmanları ve kalıcı tıbbi cihazların yüzeyinde kolonizasyon oluşturarak, hastane enfeksiyonları açısından önemli bir rol oynamaktadır. Tüm mikroorganizmalarda, yapışkanlık ve biyofilm oluşumu, hücresel ve çevresel ipuçlarına yanıt olarak, iyi yönetilen süreçlerdir. Çeşitli faktörlerin etkisi altında olan *A. baumannii*'nin biyofilm oluşumu için de aynı durum söz konusudur. Lee ve ark. (2008) *bla*PER-1 geninin varlığının bronş epiteli gibi biyotik yüzeylere ve plastik yüzeylere *A. baumannii*'nin yapışmasını artırdığını göstermiş olsa bile, mekanizması belirsizdir⁶². Öte yandan, bağımsız bir çalışmada sağlam bir biyofilm oluşumunda 11 insan izolatından sadece 2 tanesinin *bla*PER-1 genini taşıdığı saptanmıştır. Bu da *bla*PER-1 geninin biyofilm oluşumu üzerine etkili olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir⁶³.

Büyüme sıcaklığı, hücre dışı serbest demir konsantrasyonu gibi çevresel faktörler, *A. baumannii*'nin konak etkileşimi ile ilgilidir, ayrıca abiyotik yüzeylerdeki biyofilm miktarını da etkileyebilir. Biyofilm oluşumunun multifaktöriyel oluşuna bağlı olarak, biyotik ve abiyotik yüzeylerde *A. baumannii*'nin biyofilm oluşturmasında ve yapışmasında birçok gen ürününün rol aldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, abiyotik yüzeylerdeki biyofilm oluşumu ve konak hücrelerine yapışma arasında yakın bir ilişki yok gibi görünmektedir, hücre-hücre ve hücre yüzey etkileşimi farklı klinik izolatlar tarafından değişkenlik sergilemektedir. Bu değişkenlik, faklı pili-benzeri yapılar aracılığı ile biyotik ve abiyotik yüzeylerde yapışmayı gösterebilir. Tomaras ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *A. baumannii* ATCC 19606T izolatının, *CsuA/BABCDE* şaperon sistemi aracılığıyla üretilen pilusun abiyotik yüzeylere bakterinin tutunması için

gerekli olduğunu saptamıştır. *csuA/BABCDE* şaperon sisteminin bir parçası olan *csuE*'nin inaktive edilmesinin biyofilm oluşumunun yanı sıra pili üretiminin kaldırılmasına da neden olduğu sonucuna varmışlardır^{8,62}.

De Breij ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *A. baumannii* 19606T'nin insan solunum sistemine yapışmasında *CsuA/BABCDE* şaperonundan bağımsız olarak ürettiği kısa ve ince pililerin rol oynadığı ancak abiyotik yüzeylere yapışmak için ise *csuA/BABCDE*'ye ihtiyacı olduğu saptanmıştır⁶⁴.

CsuA/BABCDE operonunun üretilmesinin *bfmS* tarafından kodlanan sensör kinaz ve *bfmR* tarafından kodlanan yanıt düzenleyiciden oluşan iki-bileşenli sistem tarafından düzenlendiği bulunmuştur. *bfmR*'nin inaktive edilmesi sonucunda *csuA/BABCDE*'nin üretimi kaybolduğu ve pili üretiminde azalma olduğu tespit edilmiştir. *bfmS*'nin inaktive edilmesi azalma ile sonuçlanmış ama abiyotik yüzeylerde biofilm oluşumunu kaldırmamıştır^{65,66}.

Farklı proteinler, hücre yüzeyi ve hücre-hücre yapışmasını teşvik ederek, her iki biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumu için önemli bir rol oynamaktadır. Dış membran proteini, *OmpA*, 38 kDa moleküler ağırlığına sahip bir yüzey proteini olup küçük maddelerin geçişinde rol almaktadır. *A. baumannii*'nin plastik ve insan hücre epitel hücrelerine bağlanmasında rol oynamaktadır.

Bakteriyel adezin *Bap*'ın (biyofilm ile ilişkili protein), hücre yüzeyinde üretildiği ve farklı katmanlarındaki biyofilm olgunlaşmasını sağladığı gösterilmiştir. SEM analizi *Bap*'ın, polipropilen, polistiren ve titanyum içeren tıbbi yüzeylerdeki biyofilm yapısı için gerekli olduğunu göstermiştir. Yapılan aynı

çalışmada, Bap'ın muhtemelen bakteriyel hücre yüzeyi hidrofobikliğini arttırarak, *A. baumannii*'nin hem normal insan bronşiyal epitel hücrelerine ve hem de normal insan neonatal keratinositlerine yapışmasını artırdığı gösterilmiştir.

Yapılan son çalışmalarda, *bap* geninin 16 kb büyüklükte olduğu saptanmıştır. Bap antikorlarından arıtılmış Bap-pozitif izolatlar tarafından abiyotik yüzeylerdeki biyofilm oluşumu inhibe edilebilir.

Bazı yazarlar, glikoproteinlerdeki glikanların hücre-hücre yapışmasında bir işleve sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Glikoproteinlerde bulunan O-pentasakkarid sentezinden sorumlu farklı bir lokusu belirlemişlerdir. *pglC* lokusundaki mutasyonun glikoprotein ve kapsul sentezini önlediği ve bunun sonucunda anormal biyofilm yapısı oluştuğu ve farelerde virülansın azaltıldığı tespit edilmiştir.

A.baumannii klinik izolatlarındaki biyofilm oluşumu ve gelişimi ayrıca poli- β -1,6 Nasetilglukozamin (PNAG) üretimine de bağlıdır. Biyofilm ekzopolisakkarit matriksinin bu major bileşimi, dört gen kümesi (*pgaABCD*) tarafından kodlanmaktadır ve hemen hemen tüm klinik izolatları tarafından üretilmektedir⁶².

A. baumannii'nin biyofilm oluşturması için bir başka yol da çoğunluğu algılamadır (quorum sensing). *A. baumannii* M2 izolatı, *abaI* otoindüktör sentez geninin bir ürünü olan, açil-homoserin lakton molekülü üretmektedir. *abaI* genindeki mutasyon, biyofilm oluşumunun sonraki basamaklarında rol oynadığını göstermiştir. Bu genin inaktivasyonu sonucunda biyofilm oluşumunun %30 - 40 azaldığı saptanmıştır⁸.

2.8. Kateter Enfeksiyonları

Modern tıp uygulamaları içerisinde vazgeçilmez araçlardan biri olan damar içi kateterler, sıvı tedavileri, parenteral beslenme, yakın izlem, kan ve kan ürünleri uygulanması, çeşitli ilaçların infüzyonu gibi pek çok girişim için gerekli uygulamalardır. Kateterler boylarına göre uzun, orta, kısa; uygulama süresine göre uzun süreli, kısa süreli; uygulama yerine göre periferik veya santral olarak alt gruplara ayrılır. Kateter yapımında en sık kullanılan materyal, silikon, poliüretan, polivinilklorid, polipropilen ve teflondur. İn vitro çalışmalar, polivinil klorid veya polietilenden yapılmış kateterlerin, teflon, silikon, elastomer veya poliüretandan yapılmış kateterlere göre, mikroorganizmaların adersansına daha az dirençli olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, bazı kateter materyalleri, diğerlerinden daha trombojeniktir ki, bu da kateter kolonizasyonuna ve kateter ilişkili enfeksiyona eğilim yaratabilecek bir özelliktir ⁶⁷⁻⁶⁹.

2.8.1. Etiyopatogenez

Deri flora mikroorganizmaları, çeşitli bakteriler ve mantarlar KİE neden olurlar. Etkenler kateterin yapıldığı maddeye, bulunduğu yere, konağın durumuna ve etkenin virulans faktörlerine göre farklılık gösterir. Sırasıyla koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *S. aureus*, aerobik gram negatif çomaklar ve *Candida albicans* kateter enfeksiyonlarından en sık üretilen etkenlerdir ^{16,70}. KİE'a neden olan etken mikroorganizmalar Tablo 1'de belirtilmiştir ¹⁴.

Tablo 1. KİE'ların Etiyolojisi

Mikroorganizma	Yüzde
Koagülaz-negatif Stafilokok (KNS)	30 – 40
<i>S.aureus</i>	5 – 10
<i>Enterococcus</i> spp.	4 – 6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 – 6
<i>Candida</i> spp.	2 – 5
<i>Enterobacter</i> spp.	1 – 4
<i>Acinetobacter</i> spp.	1 – 2
<i>Serratia</i> spp.	<1
Diğerleri	<1–5

Staphylococcus'lar, KİE'ların en sık nedenidir ve tüm katetere bağlı bakteriyemilerin %50 - 75'ine neden olur (*Staphylococcus epidermidis* %35 - 50, *S. aureus* %15 - 25). *Staphylococcus*'lar içinde *S. epidermidis* kateter enfeksiyonlarının en sık nedenidir. KNS'ler kateterlerin polimer yüzeylerine diğer etkenlere göre daha kolay yapışmaktadır. Bazılarında bulunan pili benzeri adezin molekülleri, kateterlere kolaylıkla yapışmayı sağlar. Aynı zamanda ekstrasellüler polisakkarid yapısında biyofilm salgılayarak konak savunması ve antibiyotiklerden kendilerini koruyabilmektedirler. *S. aureus*'a bağlı KİE'ların çoğu deriden köken almaktadır. Nötrofillerin *S. aureus*'a karşı konak savunmasında önemli rolleri vardır ve buna bağlı olarak bağışıklığı baskılanmış hastalarda *S. aureus*'un etken olduğu kateter enfeksiyonları riski artmıştır. *Enterococcus* türleri, *Corynebacterium* türleri (özellikle *C. jeikeium*),

Propionibacterium acnes, *Bacillus* türleri, *Micrococcus* türleri etken olarak sık rastlanan diğer gram pozitif bakterilerdir ^{68,71}.

Gram negatif bakteriler de KİE'larda YBÜ ve YBÜ dışında sıklıkla görülen etkenlerdendir. En sık görülen etkenler; %19 - 21 oranında Enterobacteriaceae üyeleri (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* türleri, *Citrobacter* türleri), non-fermentatif gram negatif çomaklardır (*P. aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri, *Acinetobacter* türleri, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*). Bu mikroorganizmalar, özellikle invazif monitorizasyon cihazlarının kontaminasyonu, komplike uzak alan enfeksiyonları veya yüksek düzey oro-trakeal kolonizasyondan kaynaklanabilir ^{16,70}.

Özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalar ve yoğun olarak geniş spektrumlu antibiyotik kullananlarda *Candida* türleri (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) ve diğer mantarlara (*Fusarium* türleri, *Malassezia furfur*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* türleri) bağlı KİE sıklığı giderek artmaktadır ⁶⁸.

Mikroorganizmalar, intravasküler kateterlere kateter giriş yerinden, kateter birleşme yerinden, kontamine infüzyon sıvısından veya başka bir enfeksiyon odağından hematogen yayılımla ulaşabilir. Kateter giriş yeri ve kateter birleşme yeri, kateter enfeksiyonlarının en sık kaynağını oluşturmaktadır. Nadiren, kateter diğer bir enfeksiyon odağından hematogen olarak enfekte olabilmekte veya infüzyon sıvısı kontaminasyonu kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarına yol açabilmektedir. Kısa süreli kalan periferik olarak takılmış kateterlerde enfeksiyon kaynağı çoğunlukla kateter giriş yeridir ve kateter giriş yerindeki

mikroorganizmalar kateter dış yüzeyi boyunca ilerleyerek kateter ucuna ulaşır, kan dolaşım enfeksiyonuna neden olur. Uzun süre takılı kalan kalıcı kateterlerde enfeksiyon kaynağı çoğunlukla kateter birleşme yeridir. Kalıcı SVK manipülasyon ve kullanma sıklığının daha fazla olması sonucu kateter birleşme yerine genellikle sağlık çalışanlarının ellerinden bulaşan mikroorganizmalar, kateter iç yüzeyi boyunca ilerleyerek kan dolaşım enfeksiyonuna neden olur. KİE'lerin patogeneğinde en önemli faktörler kateterin yapıldığı materyal, enfekte eden organizmanın intrensek virülans faktörleri ve konak savunma mekanizmalarıdır⁶⁹.

Mikroorganizmaların konakla ilişkisinde yapışma özellikleri önemlidir. Örneğin; *S.aureus* kümelenme faktörü salgılayarak konak proteinlerine yapışabilir. Yapışma, mikroorganizma tarafından üretim yoluyla geliştirilebilir. KNS, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, ve *Candida* türlerinde olduğu gibi mikrobiyal bir biyofilm tabakasını oluşturacak olan bir hücre-dışı polimerik madde üretirler. Bu biyofilm tabakası da konak savunma mekanizmasına ve antimikrobiyal ajanlara karşı koruma sağlar¹⁶.

2.8.2. Risk Faktörleri

KİE ile ilgili risk faktörleri; konakla, kateterle, hastane ve ekiple ilgili olmak değişebilir.

Altta yatan hastalık, yaş, kötü beslenme ve invaziv girişimler YBÜ'de yatan hastalarda immün sistemi baskılamaktadır. Mekanik ventilasyon ve var olan diğer enfeksiyonlar da KİE riskini artırmaktadır.

Hastanede kalış süresi, SVK kullanma süresi, kateter takma tekniği, kateter tipi ve kateter yerleşim yerine göre enfeksiyon riski değişmektedir. Erişkinlerde alt ekstremitedeki kateter takılma yerleri, üst ekstremitedekilere oranla daha yüksek enfeksiyon riski ile birlikte dir. İnfeksiyon riskini azaltmak için, SVK'lerin juguler veya femoral bölge yerine subklavyen bölgeye takılması önerilmektedir. Kateter takılmadan önce ve takılı bulunduğu süre içinde el hijyenine özen gösterilmesi ve kateter manipölasyonu sırasında aseptik teknik kullanılması enfeksiyona karşı etkin korunma sağlar Acil takılan ve tecrübesiz personel tarafından takılan kateterlerde enfeksiyon riski fazladır^{69,70,72}.

2.8.3. Tanı

Damar içi katetere bağlı enfeksiyon tanısı için laboratuvar kriterleri kesin olarak belirlenmiştir. Semikantitatif ("roll plate", yuvarlama) veya kantitatif (vorteks veya sonikasyon) kateter kültür teknikleri, kalitatif yöntemlere oranla özgülüklerinin daha yüksek olması nedeniyle daha güvenilir tanı yöntemleridir. Kalitatif yöntemlerde tek bir mikroorganizmanın kontaminasyonu bile pozitif kültür sonucuna neden olabilir. Bununla birlikte kantitatif veya semikantitatif yöntemlerin prediktif değeri de, kateterin tipine ve lokalizasyonuna, kullanılan kültür yöntemine ve kateter kolonizasyonunun kaynağına göre değışkenlik gösterebilir. Örneğin; yeni takılmış bir kateter (kalış süresi < 1 hafta) sıklıkla dış yüzeyi boyunca cilt florasından bir mikroorganizma ile kolonize olur. Bu nedenle kolonizasyonun saptanmasında semikantitatif yöntemin duyarlılığının daha yüksek olması beklenir. Ancak uzun süre kalan kateterlerde (kalış süresi > 1

hafta) kateter bileşke yerinden lümen içine yayılım daha ön plandadır. Bu durumda semikantitatif yöntemin duyarlılığı daha düşüktür. Sonikasyon, santrifüj ve vorteks kullanılan kantitatif kültürler kateterin hem içindeki hem de dışındaki mikroorganizmaları tespit edebilir.

Kültüre edilecek en ideal segment seçimi tartışmalıdır. Proksimal deri içi ucu, kolonizasyon için önerilmekteyken, pozitif distal uçların kültürü daha duyarlı ve KİE'lar için daha spesifiktir.

KİE'ların hızlı tanısı, gram veya akridin orange teknikleri ile boyanmış kateter ucunun direkt mikroskopik incelemesi ile elde edilir. Ancak diğer yöntemlere göre duyarlılığı çok düşüktür.

Semi-Kantitatif Kültür (Maki) Yöntemi: 1977 yılında Maki tarafından tanımlanan bir tekniktir. KİE'ların klinik tanısında en sık kullanılan laboratuvar tekniği, semikantitatif kültür yöntemidir. Steril koşullarda çekilen kateterin 5cm'lik distal parçası steril yollarla laboratuvara gönderilir. Bu kateter parçası steril penset yardımı ile dört-beş kez çevrilerek koyun kanlı, eozin-metilen mavisi (EMB), saboraaud-dekstroz (SDA) ve çikolatamsı agarlara ekilir. İnkübasyon sonunda (37°C'de 24-48 saat) 15'ten fazla bakteri kolonisi olması, kateterin kolonizasyonundan ziyade enfeksiyonunu gösterir. Bu teknikte sadece kateter yüzeyindeki mikroorganizmalar kültüre edilebilmekte ve bir haftadan daha kısa sür kalan kateterlerde güvenilirdir.

Tam Kantitatif Kültür Yöntemi: Kateter lümenindeki bakterileri de değerlendirmek için, kesilen kateter parçasının içinden 1ml beyin-kalp infüzyon besiyeri geçirilir. Daha sonra bu besiyerinin 1/100'lük dilüsyonu hazırlanır ve bu

dilüsyondan steril mikropipet ile 100'er mikrolitre sıvı koyun kanlı, EMB, SDA ve çikolatamsı agarlara ekilerek, 37°C'de 24 - 48 saat inkübe edilir. Bu yöntemde >10³ cfu saptanması pozitif üreme olarak kabul edilir. Klinik uygulamada rutin olarak kullanılmayan bu teknik, antibakteriyel tedavinin etkinliğini izlemek amacıyla kateterin yerinde bırakılacağı durumlarda kullanılır⁶⁸⁻⁷⁰.

2.8.4. Tedavi

KİE'lar için iki kilometre taşı; kateterin çıkarılması ve antimikrobiyal tedavidir.

Damar içi kateterlerin çıkarılma endikasyonları:

Uygun antimikrobiyal tedaviye rağmen infeksiyon bulgularının 48 saatte azalmaya başlamaması, kan kültürü pozitifliğinin devam etmesi (> 72 saat)

Lokal komplikasyon varlığı (Tünel enfeksiyonu – port enfeksiyonu)

Metastatik komplikasyon varlığı (Septik trombofilebit, port cebi apsesi, tıkalı kateter, endokardit gelişimi)

Virulan veya "yapışkan özelliği" belirgin mikroorganizmalarla infeksiyon: *S. aureus*, *C.jejikeium*, *Bacillus* spp., VRE, *Lactobacillus casei*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *Mycobacterium* spp., *Candida* spp., *Fusarium*, *M. furfur*

Sıklıkla nükseden çıkış yeri infeksiyonu

Buna karşılık aşağıdaki tüm durumlar sağlandığı takdirde damar içi kateter çıkarılmadan antimikrobik tedavinin başlanabilir.

Değiştirilmesi zor kateterler

48 - 72 saat içinde kan kültürlerinin steril hale gelmesi

Metastatik komplikasyonun olmaması

Tünel ve port enfeksiyonunun olmaması

Tedavi edilebilir mikroorganizmalar

Hemodinamik olarak stabil hasta

Antimikrobiyal tedavi; ampirik olarak ya da iyi tanımlanmış bir mikrobiyolojik tanı sonrasında uygulanabilir. Kültür ve duyarlılık verileri olmadan önce ampirik antibiyotik tedavisi başlanması gerekir. Gerektiğinde, mikrobiyolojik sonuçlara göre tedavi yeniden düzenlenebilir. Eğer kateter kurtarma uygulanacak ise, hem sistemik hem de antimikrobiyal kilit tedavisi, mikroorganizmaya bağlı olarak, kateter boyunca uygulanabilir^{14,17}.

2.8.4.1. Antibiyotik kilit tedavisi

Lümen içi kolonizasyon ve SVK enfeksiyonu kateter yüzeyindeki mikrobiyal biyofilm oluşumu ile ilişkilidir. Geleneksel sistemik antibiyotiklerle biyofilm oluşturmuş bakteriyi yok etmek zordur. Planktonik bakteri ile karşılaştırıldığında biyofilm içindeki sessil bakterileri öldürmek için 100 - 1000 kat daha fazla antibiyotik konsantrasyonu kullanmak gerekmektedir. Antibiyotik kilit, heparin gibi bir antikoagülanla birlikte kullanılan yüksek yoğunluklu antibiyotik solüsyonudur. Kateter lümeninin antibiyotik solüsyonu ile yıkanması,

doldurulması ve solüsyonun kateter lümeninde bırakılması ile yapılan antibiyotik kilit profilaksisinin amacı KİE'leri önlemektir. Antikoagülanlar, mikrobiyal biyofilm içine antibiyotik girişini artırarak AKT'nde fayda sağlamışlardır. Kateter kullanımında değilken, solüsyonun stabilitesine bağlı olarak bekleme süresi 4 saat ve 3 gün arasında değişmektedir. Özellikle uzun süreli kullanımlarda, antibiyotik ve antikoagülanın yüksek konsantrasyonlarda kullanılması toksik etkilere neden olabilir. Bu durumlarda antibiyotik kilit solüsyonları durdurulabilir^{69,73}.

İdeal olarak seçilen solüsyonun kimyasal olarak stabil, biyofilm ilişkili organizmalara karşı aktif ve benzer klinik durumlarda kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu tedavisi için çalışılmış olması gereklidir. Çoğu KİE'lara *Staphylococcus*'lar ve gram-negatif basiller neden olur. Bu nedenle, AKT'nde yaygın kullanılan antibiyotikler vankomisin, sefazolin, seftazidim, siprofloksasin ve gentamisindir. Antibiyotik kilit solüsyonunun seçimini kateter tipine bağlıdır. AKT'nde antibiyotik ve doz için kesin bir tedavi protokolü yoktur. Çalışmalar arasında antibiyotik kilit solüsyonlarını karşılaştırmak zordur. Çünkü farklı izolatlar çeşitli duyarlılık profillerine sahiptir ve antimikrobiyal etkileri çalışmalar arasında değişmektedir. Bir biyofilm içerisindeki bakterileri öldürmek için yüksek antibiyotik seviyeleri gereklidir, solüsyon içindeki son antibiyotik konsantrasyonu tedavi edilen organizmanın minimum inhibitör konsantrasyonunun 1000 kat daha yüksek olması gerekmektedir. Buna rağmen, kilit solüsyonları daha düşük antibiyotik ve heparin konsantrasyonları içermektedir. Bu düşük konsantrasyonlarda da biyofilm içerisine gömülü bakteriyi öldürerek etki etmesi olası değildir⁷³.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Besiyerleri ve Kimyasal Bileşikler

Mueller Hinton Agar (Himedia, Hindistan)

Triptik Soy Broth (Oxoid, İngiltere)

Agar (Oxoid, İngiltere)

Dekstroz (Oxoid, İngiltere)

%0.9 İzotonik NaCl Solüsyonu (Eczacıbaşı, Türkiye)

Kristal Viyole (Merck, Almanya)

Phosphate buffered saline (Oxoid, İngiltere)

Gliserol (Sigma, ABD)

Etanol (Sigma, ABD)

Tigesiklin (50 mg) (Pfizer, İngiltere)

Kolistin (150mg) (Koçak Farma, Türkiye)

Rifampisin (250 mg) (İbrahim Etem Ulagay, Türkiye)

Tris base (Amiesco, ABD)

Borik asit (Scharlau, İspanya)

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Applichem, Almanya)

MgCl₂ (İnvitrogen, ABD)

Buffer (İnvitrogen, ABD)

Taq Polimeraz (İnvitrogen, ABD)

dNTP (Dr. Zeydanlı, Türkiye)

Primerler (Metabion, Almanya)

Agaroz (Sigma, ABD)

Etidyum Bromid (Sigma, ABD)

Orange G (Fluka, Almanya)

DNA moleküler ağırlık standardı (Bioron, Almanya)

Yükleme Tamponu (Fermentas, Litvanya)

3.1.2. Cihazlar

DEN-1 McFarland Densitometer (Microscan, ABD)

96 Kuyucuklu Mikrotitrasyon Plağı (Orange Scientific, İtalya)

Spektrofotometre (Biotek, ABD)

API 20 NE (Biomereux, Fransa)

Kateter (Certofix® Duo, B.Braun Melsungen, Almanya)

Santrifüj tüpü(15ml) (Citotest, Çin)

DNA İzolasyon Kiti (Geneproof, Çek Cumhuriyeti)

Isı Bloğu (Bio TDB100, Boeco, Almanya)

NanoDrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, Amerika)

Hassas Terazı (Radwag, Polonya)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Etüv (Nüve, Türkiye)

Pastör Fırını (Electro-mag, Türkiye)

Vorteks (MS2 Minishaker, IKA)

Mikrodalga (Beko, Türkiye)

İnkübatörlü Dijital Orbital Çalkalayıcı (Biosan, Letonya)

Mikropipetler (Eppendorf Research, Almanya)

Isı döngü aleti (GeneAmp PZR System 9700,Applied Biosystems,ABD)

Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich,Almanya)

Yatay elektroforez

Jel Görüntüleme sistemi (Syngene, Ingenius,ABD)

- 20 derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

-80 derin dondurucu (Nuaire, Japonya)

3.1.3. Bakteri İzolatları

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2012 - 2014 tarihleri arasında yatan hastaların kateter ve kateter dışı örneklerinden izole edilen 60 adet *A. baumannii* izolatu çalışmaya dahil edildi. Alınan örneklerin her birinin farklı hastaya ait olmasına dikkat edildi. *A. baumannii* olarak tiplendirilen izolatlar çalışma yapılana kadar -80°C'de saklandı. Kontrol olarak güçlü biyofilm oluşturan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 izolatu, biyofilm negatif *E.coli* ATCC 25922 izolatları kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Bakterinin Konvansiyonel Yöntemlerle Tiplendirilmesi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan toplanan nonfermentatif bakterileri tiplendirmek için üç şekerli demirli besiyeri, üre agar besiyeri, hareket besiyeri, indol besiyeri

ve oksidaz testleri yapıldı. Gerekli durumlarda API 20 NE (Biomereux, Fransa) otomatik tiplendirme kiti kullanıldı.

3.2.1.1. Fenotipik yöntemler

3.2.1.1.1. Üç şekerli demirli besiyeri

Toz halindeki Triple Sugar Iron Agar (HI MEDIA) 65 gram (gr) tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra steril cam tüplere dağıtıldı ve yatık olarak katılaştırıldı. Ekimi yapılan besiyerleri 35°C'de 18 - 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerinin yatık ve dip kısımlarında asit ve H₂S üretimi değerlendirildi.

3.2.1.1.2. Üre besiyeri

2.4 gr üre agar (OXOID) 95 ml distile su içerisinde çözüldü ve pH 6.8'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50 - 55°C'ye soğutulduktan sonra 5 ml distile su içerisinde çözülen 2 gr üre, filtreden süzülerek besiyerine ilave edildi. 35°C'de 18 - 24 saat inkübasyonun sonunda kırmızı renk oluşması pozitif sonuç, hiç renk değişmemesi negatif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.1.1.3. Hareket besiyeri

Tablo 2'de belirtilen maddelerle hazırlanan besiyeri pH 7.0'ye ayarlandı ve cam tüplere dağıtımını yapıp 121°C'de 15 dakika steril edildi. Ekimi yapılan besiyerleri 35°C inkübe edilip besiyerinde hareketli bakterilerin inokülasyon

çizgisinden yanlara doğru dağılarak bulanıklık oluşturmaları pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

Tablo 2. Hareket Besiyeri İçin Kullanılan Besiyeri Bileşimi

Malzeme	Miktar
Sığır Eti Özütü	3 gr
Pepton	10 gr
Sodyum klorür	5 gr
Agar	4 gr
Distile Su	1000 ml

3.2.1.1.4. İndol testi

Tablo 3'de belirtilen maddelerle hazırlanan besiyeri pH 7.2'ye ayarlandı ve cam tüplere 3'er ml dağıtımını yapıp 121°C'de 15 dakika steril edildi.

Tablo 3. Triptofan Buyyon (%1 Triptofan) İçin Kullanılan Malzemeler

Malzeme	Miktar
Pepton veya Triptikaz	2gr
Sodyum klorid	0.5gr
Distile su	100ml

Ekimi yapılan besiyerlerinin 35°C'de 18 - 24 saat inkübasyonu sonunda Tablo 4'te belirtilen Kovac's ayracı (15 damla) tüpün kenarından damlatılarak besiyeri üzerinde tabakalandırıldı. Birkaç saniye içerisinde besiyeri ile ayrac arasında parlak kırmızı bir halkanın oluşması olumlu sonuç olarak kabul edildi.

Tablo 4. Kovac's Ayracı

Malzeme	Miktar
Saf amil veya izoamil alkol	150ml
p-dimetilaminobenzaldehit	10gr
Konsantre HCl	50ml

3.2.1.1.5. Oksidaz testi

Tetrametil parafenilen diamin hidrokloridin saf sudaki %0.5 - 1'lik eriyiği hazırlandı. Besiyerindeki kolonilerden steril kürdan yardımıyla ayıraçla ıslatılmış süzgeç kağıdının üzerine bir miktar sürüldü. 5 - 10 saniye içinde kolonilerin mor renge dönüşmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

3.2.2.1. Triptik Soy Broth(TSB) hazırlanması

Pankreatik kazein	17 gr
Soya peptonu	3 gr
Sodyum klorür	5 gr
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.5 gr
Dekstroz	2.5 gr

Toz haldeki Triptik Soy Broth'dan 30 gr tartılıp, 1000 ml distile suda çözüldü. pH 7.3'e ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.

3.2.2.2 Triptik Soy Agar'ın (TSA) hazırlanması

Triptik Soy Broth aynı şekilde hazırlanıp, besiyeri içerisine 15 g agar eklendi. Aynı yöntem ile steril edildikten sonra plaklara döküldü.

3.2.2.3. Mueller Hinton Agar'ın hazırlanması

Besiyerinin içeriği

Sığır infüzyonu	300 g/L
Kazein hidrolizat	17,50 g/L
Nişasta	1,50 g/L
Agar	17,00 g/L
pH	7,3±0,2

Toz besiyerinden 38 g tartılmış ve üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Steril petri kaplarına kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er ml dökülerek katılaşıncaya kadar bekletildi ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır ⁷⁴.

3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya alınan *A. baumannii* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. İçinde 1 ml serum fizyolojik bulunan tüplerde 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Agar içeren petrilere steril

eküvyon aracılığı ile yayıldı ve kurumaya bırakıldı. Standart antibiyotik diskleri steril bir penset yardımı petri üzerine yerleştirildi. Bu işlem yapılırken, oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için diskler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklık olmasına dikkat edildi. Daha sonra besiyerleri 18 - 24 saat süreyle 35°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her diskin çevresinde bulunan inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçüldü. Test sonuçları, izolatlar için duyarlı (S), orta dirençli (I) veya dirençli (R) olarak CLSI'in kriterlerine göre değerlendirildi⁷⁵.

Kullanılan antibiyotik diskleri: Ampisilin-sulbactam (10/10µg), kolistin(10 µg), levofloksasin (5 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg), trimetoprim/sulfametaksazol (25 µg), amikasin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), İmipenem (10 µg), meropenem (10 µg), sefaperazon/sulbaktam (25 µg), sefepim (30 µg), tigesiklin(15 µg), seftazidim (30 µg).

3.2.4. Antibiyotik Çözeltilerinin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan tigesiklin antibiyotiğinin stok çözeltisi 50 mg/5 ml, kolistin antibiyotiğinin stok çözeltisi 150 mg/2 ml, rifampisin antibiyotiğinin stok çözeltisi 250 mg/ 5 ml olacak şekilde hazır olarak firmadan temin edildi⁷⁵.

3.2.5. Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi

İzolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri, Stepanovic ve arkadaşlarının spektrofotometrik mikroplak yöntemi modifiye edilerek araştırıldı. İzolatlar, triptik soy agarda 37°C'de 18 - 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, 180 µl

%0.25 glikoz eklenmiş triptik soy buyyon (TSB, Oxoid) besiyeri düz tabanlı mikropaklar içerisine dağıtıldı; üzerine 20 µl 0.5 McFarland standardına göre ayarlanmış bakteri süspansiyonu 1:100 sulandırılarak eklendi. 18 - 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri pipet yardımıyla boşaltılıp, steril fosfat tamponu ile yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Son olarak %1'lik kristal viyole çözeltisinden 200 µl dağıtılarak 20 dk bekletildi. Süre sonunda kuyucuklar 3 kez steril fosfat tamponu ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Spektrofotometrede ölçüm yapılmadan 30 dk önce kuyucuklara %80 etanol %20 asetik asit karışımı ilave edildi ve 570 nm'de okunan optik dansite değerlerine göre biyofilm oluşumu zayıf, orta ve güçlü olarak yorumlandı ⁷⁶.

Test sonuçları *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 izolatının absorbans değeri %100 kabul edilerek karşılaştırmalı olarak yorumlandı.

3.2.6. Biyofilm Oluşmasını Sağlayan Genlerin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Çalışmada biyofilm özellikleri belirlenmiş olan 60 izolatın biyofilm oluşumunda görev yaptığı düşünülen *bfmR*, *csuE*, *bap* genleri araştırıldı. Bu izolatların biyofilm genleri daha önce tanımlanmış primerler kullanılarak kromozomal DNA'nın PZR yöntemi ile amplifikasyonu yapılarak saptandı ⁸.

3.2.6.1. Bakteri DNA'sının elde edilmesi

✎ DNA ekstraksiyon kiti ile DNA elde edilmesi

Bu yöntemde DNA eldesi için ekstraksiyon kiti (Geneproof) ile üretici firmanın önerdiği için tasarlanmış DNA ekstraksiyon protokolü kullanıldı.

1. Lizis aşaması

- ➔ Triptik soy agar besiyerine pasajları yapılan *A. baumannii* kolonilerinden alınarak 200 µl PBS içeren mikrosantrifüj tüpünde ezilerek karıştırıldı.
- ➔ Örneklerin üzerine 25 µl Proteinaz K ve 200 µl B3 karışımı eklendi ve tüpler vortekslendi.
- ➔ Örnekler 30 dakika 70 °C'de ısı bloğunda inkübe edildi.

2. DNA bağlanma aşaması

- ➔ Örneklerin üzerine 210 µl (%96 - 100) etanol eklenerek, vortekslendi.

3. Spin filtre yüzeyine DNA'nın bağlanması

- ➔ Mikrosantrifüj tüplerindeki örnekler spin filtrelere aktarıldı.
- ➔ Örnekler 11.000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- ➔ Toplayıcı tüp yenisi ile değiştirildi.

4. Yıkama aşaması

- ➔ 500 µl 'Buffer BW' eklendikten sonra 11.000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- ➔ Toplayıcı tüp yenisi ile değiştirildi.

→ 600 µl '*Buffer B5*' eklendikten sonra 11.000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi.

→ Toplayıcı tüp yenisi ile değiştirildi.

5. Silika membranın kurutulması

→ Tüpler 11.000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi.

6. DNA elüsyon aşaması

→ Spin filtreleri 1.5 ml'lik *Receiver tube*'lere aktarıldı.

→ Üzerine 70 °C'de ısıtılmış '*Elution Buffer BE*'den 200 µl eklendi.

→ Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 11.000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi.

→ Filtre atılarak altta kalan kısım DNA eldesi için kullanıldı. DNA örnekleri kullanılmaya kadar – 20°C'de saklandı.

7. DNA ölçüm aşaması

→ Elde edilen DNA'lar Nanodrop ND-1000 spektrofotometre cihazı ile ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi.

3.2.6.2. Biyofilm Oluşturan Genlerin Amplifikasyonu

Çalışmada biyofilm oluşum mekanizmasında rol alan *bfmR*, *csuE*, *bap* genleri için önceden tasarlanmış olan oligonükleotid primerler kullanıldı^{65,77,78}. Kullanılan primerler Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Gen Dizisi

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
<i>bfm</i>	5- CACCATGAGCCAAGAAGAAAAG- 3	5-GACCAACCTTATAGGAAG-3
<i>csuE</i>	5-CGTAAAGCTACTCATGTC-3	5-AAGTGCCTGATGTTCTGG-3
<i>Bap</i>	5- TGCTGACAGTGACGTAGAACCAC A-3	5- TGCAACTAGTGGAATAGCAGCCC A-3

Biyofilm oluşumunda rol oynadığı düşünülen *bfmR*, *csuE*, *bap* genlerinin PZR amplifikasyon karışımı herbir örnek için toplam 25 µl olacak şekilde aşağıdaki Tablo 6’da belirtildiği gibi düzenlendi.

Tablo 6. PZR Reaksiyon Karışımı

Bileşenler	Bir tüp için gereken miktar
10X “Amplifikasyon Tamponu”	2,5 µl
MgCl₂ (25 mM)	2 µl
dNTP miks (2 mM)	2 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0.25 µl
Primer Forward (100 pmol)	1,5 µl
Primer Reverse (100 pmol)	1,5 µl
Distile su	7,25 µl
Toplam Hacim	25 µl

Çalışmada *bfmR*, *csuE*, *bap* kodlayan bölgenin amplifikasyonu için kullanılan PZR amplifikasyon şartları Tablo 7,8 ve 9’da verilmiştir.

Tablo 7. *csuE* Gen Bölgesi İçin Amplifikasyon Şartları

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön ısıtma	94°C	5 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	40
Primer bağlanması	50°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	10 dakika	1
Muhafaza	4°C	□	

Tablo 8. *bap* Gen Bölgesi İçin Amplifikasyon Şartları

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön ısıtma	94°C	5 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	40
Primer bağlanması	65°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	10 dakika	1
Muhafaza	4°C	□	

Tablo 9. *bfmR* Gen Bölgesi İçin Amplifikasyon Şartları

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön ısıtma	94°C	5 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	40
Primer bağlanması	55°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	10 dakika	1
Muhafaza	4°C	□	

Örneklerin amplifikasyonları “termal döngü cihazı” (GeneAmp PZR System 9700, Applied Biosystems, ABD)’nda yapıldı.

3.2.6.3. Amplikonların görüntülenmesi için gerekli solüsyonlar

✦ **5X Tris-Borik asit- EDTA (TBE) Solüsyonu Hazırlanışı**

Tris-Base	54 g
Borik Asit	27,5 g
EDTA (0,5 M, pH: 8,0)	20 ml

Kimyasallar çözüldükten sonra distile su ile 1L’ye tamamlandı. pH 8,0’e ayarlanarak oda ısısında saklandı.

✦ **Elektroforez yürütme tamponu (1X TBE)**

5X TBE stok tampon solüsyonundan alınan bir hacim, dört hacim distile su ile karıştırıldı, böylece agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez işleminde gerekli olan 1X TBE tamponu hazırlanmış oldu.

✦ **Etidyum bromid (Et-Br) çözeltisi hazırlanışı**

10 mg etidyum bromid 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı ve +4 °C’de saklandı.

✦ **Agaroz jel hazırlanışı (%2)**

Elektroforez için %2’lik agaroz jelin hazırlanmasında, 2 g agaroz tartılarak 1X TBE tamponu ile 100 ml’ye tamamlandı ve mikrodalga fırında homojen bir şekilde şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Jel tarağı yerleştirilerek jel tepsisine dikkatlice döküldükten sonra yaklaşık 30 dakika oda ısısında beklenerek jelin

katılaşarak donması sağlandı. Daha sonra jel içerisinden tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

3.2.6.4. PZR rnlerinin görüntülenmesi

Isı döngü cihazında oğaltılmış olan PZR rnleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edildi. PZR ürünlerinden 9'er μ l alınarak 3 μ l yükleme tamponuyla karıştırılarak yüklendi. Jelde her sıranın baş ve son kuyucuğuna moleküler ağrılık standardı yüklendi. Elektroforez yürütme tamponu olarak 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) kullanıldı. Elektroforez işlemi sonrasında jel 0,5 μ g/ml etidyum bromür içeren 1X TBE zltisinde 30 dakika boyandıktan sonra UV translimunator üzerine aktarılan jel UV ile görüntülendi. Görüntüler kamera kullanılarak kaydedildi (Syngene Bio Imaging, Ingenius, İngiltere). Elde edilen sonuçlar DNA moleküler ağrılık standardı ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Tablo 10. Çalışmada Kullanılan Genlerin Gen Büyüklükleri

Genler	Gen büyüklükleri
<i>bfmR</i>	750
<i>csuE</i>	810
<i>bap</i>	190

3.2.7. Kateterlerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan poliüretan santral venöz kateterlerin uç kısımları kesilerek, geriye kalan kateter bölümleri 1'er cm uzunluğunda parçalara ayrıldı ve bu parçalar etilen oksit gazı ile steril edildi.

3.2.7.1. Kateterlerde biyofilm oluşmasının sağlanması

Steril kateter parçalarından 15 ml'lik santrifüj tüplerine 7'şer adet kateter parçası koyuldu. Tüm kateter parçaları insan plazmasında 37⁰C'de çalkalayıcı inkübatörde 24 saat bekletildi. Çalışmaya alınan izolatlar TSA besiyerine ekilerek, 37⁰C'de bir gece inkübe edildi. McFarland cihazı ile ölçümleri yapılarak, TSB besiyerinde 0,5 Mcfarland standardına göre bakteri süspansiyonları hazırlandı. Son inokulum miktarı 10⁷ cfu/ml olacak şekilde TSB besiyeri ile dilüsyonları yapıldı. Kateterlerin içinde bulunduğu santrifüj tüplerindeki plazma hazırlanan bakteri süspansiyonları ile yer değiştirilerek, biyofilm oluşmasını sağlamak amacıyla santrifüj tüpleri yeniden 37⁰C'de çalkalayıcı inkübatör içerisinde 24 saat inkübe edildi ^{79,80}.

3.2.7.2. In vitro antibiyotik kilit tedavi modeli

24 saat sonunda, kateter parçaları planktonik bakterileri uzaklaştırmak amacıyla, PBS solüsyonu ile 3'er kere yıkandı. Daha sonra kateter parçaları TSB ile takviyeli kolistin, tigesiklin, kolistin/tigesiklin, kolistin/rifampisin ve tigesiklin/rifampisin içeren tüplere aktarıldı. Kolistin ve tigesiklin tek başına kullanıldığında antibiyotik konsantrasyonları her biri için 1, 5 ve 10 mg/ml,

antibiyotikler kombine olarak kullanıldıklarında ise konsantrasyonlar 5 mg/ml'dir. Antibiyotiksiz TSB ise, her bir çalışmada kontrol amacıyla kullanılmıştır. Antibiyotik solüsyonlarının bakteri öldürme aktivitesi 1,3,5,7,10 veya 14. günlerdeki kilit periyodlarından sonra denendi. Her bir kilit periyodunda farklı kateter parçası kullanıldı ve antibiyotikli solüsyonlar 48 saatte bir değiştirildi. Antibiyotikli bakteri solüsyonlarından çıkarılan her bir kateter parçası, planktonik bakterilerden ve antibiyotik kalıntılarından uzaklaştırmak amacıyla, yeni tüplere aktararak 3 kere PBS solüsyonu ile yıkandı. Yıkanan parçalar 3 ml steril PBS içeren tüplere alınarak, yüksek hızda aralıklı olarak 3 kere 30 sn vortekslendi. Bu şekilde, katetere bağlı bakterilerin PBS solüsyonu içerisine geçmesi sağlanmış oldu. Bu sıvılarda uygun dilüsyonlar yapılarak TSA besiyerine yapılan ekimler sonrasında katetere tutunan bakteri sayıları mililitrede koloni oluşturan ünite cinsinden (cfu/ml) hesap edildi ^{80,81}.

3.2.7.3. Bakteri sayım yöntemi

Her bir tüpten 100 µl alınarak önce TSA besiyerine direkt ekimi yapıldı. Ardından içerisinde 900 µl TSB besiyeri bulunana tüplere 100'er µl eklenerek seri dilüsyonları yapıldı ve tüm tüpler vortekslendi. Her bir tüpten 100'er µl alınarak TSA besiyerine ekimleri yapıldı ve öze ile tüm plağa yayıldı. 18 - 24 saat inkübasyondan sonra koloni sayımları yapıldı ve cfu/ml cinsinden bakteri sayımları gerçekleştirildi. Her ekim üç ayrı çalışma ile yapıldı ve ortalama değerler gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.3. İstatistiksel Yöntem

Çalışmadaki verilerin analizinde “SPSS 15.0 for Windows” paket programı kullanıldı. Genel verilerinin değerlendirilmesinde ve biyofilm yapımı ile genlerin karşılaştırılmasında ki-kare testi ve fisher testi kullanıldı ($p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi).

4. BULGULAR

4.1. Örnekler

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2012 - 2014 tarihleri arasında yatan hastaların kateter ve kateter dışı örneklerinden izole edilen 60 adet *A. baumannii* izolatu çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan 30 adet kateter dışı *A. baumannii* izolatının dağılımı Tablo 11’de verilmiştir. Çalışmaya alınan örnekler koroner YBÜ, anestezi ve reanimasyon YBÜ, göğüs hastalıkları YBÜ, nöroşirürji YBÜ, erişkin hematoloji servisi, kemik iliği transplantasyon ünitesi, dahiliye YBÜ, genel cerrahi YBÜ’sinden izole edilmiştir. Elde edilen örneklerin bölümlere göre dağılımı Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 11. Kateter Dışından İzole Edilen *A. baumannii* Örnekleri ve Dağılımı

Örnek Türü	Örnek Sayısı (%)
ETA kültürü	22 (73,3)
Yara yeri	3 (10)
İdrar kültürü	2 (6,6)
Balgam kültürü	3 (10)
Toplam	30 (100)

Tablo12. Kateter ve Kateter Dışından İzole Edilen Örneklerin Hastaların Bölümlerine Göre Dağılımı

Bölümler	Örnekler (%)
Koroner YBÜ	5 (%8,3)
Anestezi ve Reanimasyon YBÜ	20 (%33,3)
Göğüs hastalıkları YBÜ	6 (%10)
Nöroşirürji YBÜ	5 (%8,3)
Erişkin Hematoloji Ünitesi	5 (%8,3)
Kemik İliği Ünitesi	3 (%5)
Dahiliye YBÜ	12 (%20)
Genel Cerrahi YBÜ	4 (%6,6)
Total	60 (%100)

4.2. Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmaya dahil edilen 30 tane KİE etkeni olan *A.baumannii* izolatlarının duyarlılıkları “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. KİE yapan izolatların antibiyotik duyarlılık profilleri Tablo 13’te verilmiştir.

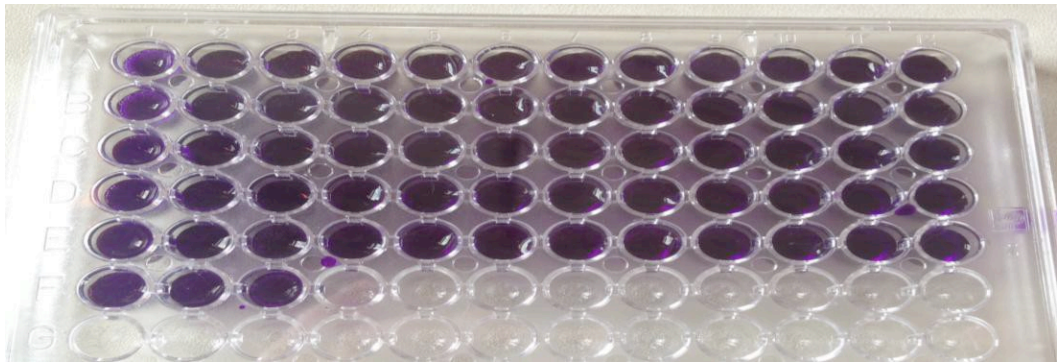
Tablo 13. KİE Etkeni Olan İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

Izolot No	SAM	CT	LEV	TPZ	SXT	AK	CİP	İMP	MEM	CES	FEP	TGC	CAZ
K1	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R
K2	I	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K3	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K4	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K6	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K7	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K8	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
K10	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K11	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K12	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K13	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K14	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
K15	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K16	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K17	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K18	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K19	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K20	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
K21	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K22	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K23	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K24	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K25	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K26	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R
K27	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K28	S	S	R	I	R	R	R	S	S	S	I	R	R
K29	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
K30	I	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R

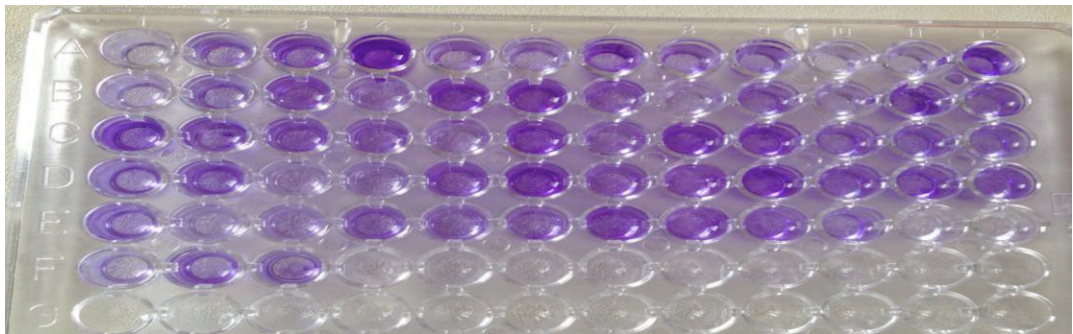
KİE etkeni olan 30 (%100) izolatın hepsi kolistine duyarlı, bunlardan 14 tanesi (%46,6) tigesikline duyarlı, 14 tanesi (%46,6) tigesikline dirençli ve 2 tanesi de (%6,6) tigesikline orta duyarlı olarak tespit edilmiştir.

4.3. Biyofilm Yapımının Değerlendirilmesi

Çalışılan izolatların fenotipik olarak biyofilm oluşturma durumları mikrotitrasyon plak yöntemi ile değerlendirildi. Sonuçlar; *E. faecalis* ATCC 29212 izolatından elde edilen absorbans değerlerine göre oranlarak değerlendirildi. Bu izolatın %100'ünün üzerinde absorbans değeri verenler kuvvetli biyofilm, %50 - %100'ü arasında absorbans verenler orta kuvvetli biyofilm, %50'sinden az absorbans verenler zayıf biyofilm olarak değerlendirildi. Her izolat 3 kere çalışıldı.



A: Kristal viyole eklendikten sonraki görüntüsü



B: Etanol karışımı eklendikten sonraki görüntüsü

Resim 1. Biyofilm Oluşumunun Kristal Viyole Kullanılarak Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 60 izolatın 10 tanesinde (%16,6) zayıf biyofilm, 19 tanesinde (%31,6) orta kuvvetli biyofilm, 31 tanesinde de (%51,6) kuvvetli biyofilm olduğu saptandı. KİE etkeni olan 30 izolatın 5 tanesinin (%50) zayıf biyofilm, 10 tanesinin (%52,6) orta kuvvetli biyofilm, 15 tanesinin (%48,4) kuvvetli biyofilm oluşturduğu, kateter dışı enfeksiyon oluşturan izolatların ise 5 tanesinin (%50) zayıf biyofilm, 9 tanesinin (%47,4) orta kuvvetli biyofilm, 16 tanesinin de (%51,6) kuvvetli biyofilm oluşturduğu tespit edildi. Biyofilm oluşumu açısından kateter ilişkili ve kateter dışı enfeksiyon oluşturan izolatlar karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız bulundu ($p=0.958$).

Tablo 14. Klinik Örneklerden İzole Edilen İzolatların Biyofilm Yapım Şiddeti

Biyofilm şiddeti	Örnekler (%)
Zayıf biyofilm	10 (%16,6)
Orta kuvvetli biyofilm	19 (%31,6)
Kuvvetli biyofilm	31 (%51,6)
Total	60

Tablo 15. Biyofilm Oluşumunun Kateter ve Kateter Dışı Örneklerdeki Dağılımı

		Kateter	Kateter dışı	Toplam (%)
Biyofilm oluşumu	Zayıf	5 (%50)	5 (%50)	10 (%16,6)
	Orta kuvvetli	10 (%52,6)	9 (%47,4)	19 (%31,6)
	Kuvvetli	15 (%48,4)	16 (%51,6)	31 (%51,6)
Toplam		30 (%50)	30 (%50)	60 (%100)

4.4. Amplifikasyon Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen ve biyofilm yapımı araştırılan 60 izolattın biyofilm oluşumuna katkısı olduğu düşünülen *bap*, *bfmR* ve *csuE* genleri PZR yöntemi ile araştırıldı. Bu genlere ait bant büyüklükleri kullanılan DNA moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Her deneyde negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

4.4.1. *bfmR* Geninin Amplifikasyon Sonuçları

bfmR geninin varlığı spesifik primer dizileri kullanılarak incelendi. 750 bp hızında bant elde edilmesi pozitif olarak kabul edildi.



M: Moleküler ağırlık standardı
NK: Negatif Kontrol
2 - 8, 10 - 13 nolu kuyucuklar pozitif
1, 9 nolu kuyucuklar negatif

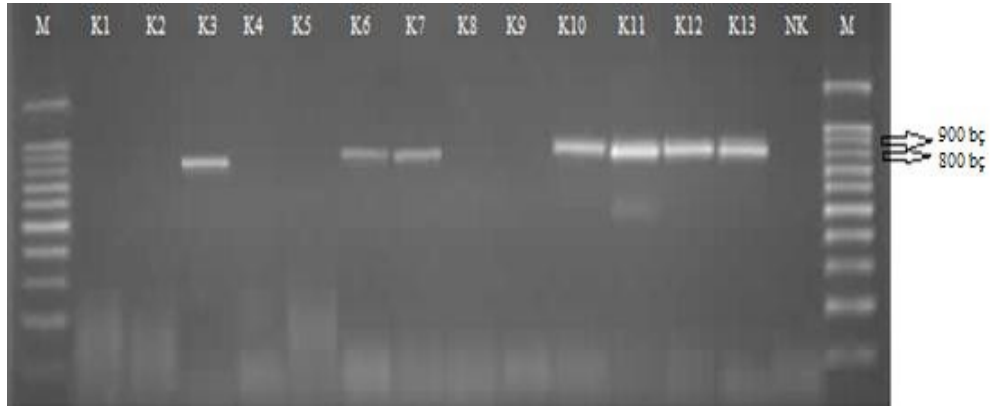
Resim 2. *bfmR* Geni Jel Görüntüsü

Çalışmaya dahil edilen 60 izolattan 57 (%95) tanesinde *bfmR* geninde amplifikasyon ürünü saptanırken, 3 (%5) izolatta *bfmR* geninde amplifikasyon ürünü saptanmamıştır. Bu suşlardan KİE yapan 30 izolattın 27 (%90) tanesinde

bfmR geni pozitif olarak saptanırken, 3 (%10) tanesinde negatif olarak saptanmıştır.

4.4.2. *csuE* Geninin Amplifikasyon Sonuçları

csuE geninin varlığı spesifik primer dizileri kullanılarak incelendi. 810 bp hızında bant elde edilmesi pozitif olarak kabul edildi.



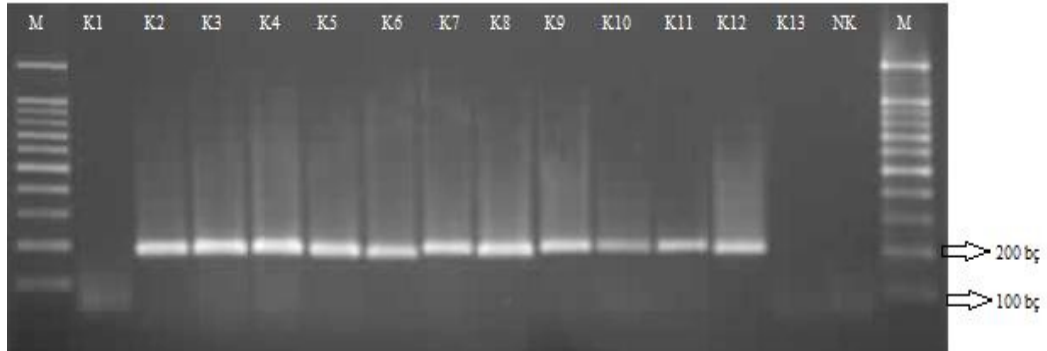
M: Moleküler ağırlık standardı
NK: Negatif Kontrol
3, 6, 7, 10 - 13 nolu kuyucuklar pozitif izolatlar
1, 2, 4, 5, 8, 9 nolu kuyucuklar negatif izolatlar

Resim 3. *csuE* Geni Jel Görüntüsü

Çalışmaya dahil edilen 60 izolattan 45 (%75) tanesinde *csuE* geninde amplifikasyon ürünü saptanırken, 15 (%15) izolatta *csuE* geninde amplifikasyon ürünü saptanmamıştır. Bu şuslardan KİE yapan 30 izolatın 17 (%56,6) tanesinde *csuE* geni pozitif olarak saptanırken, 13 (%43,3) tanesinde negatif olarak saptanmıştır.

4.4.3. *bap* Geninin Amplifikasyon Sonuçları

bap geninin varlığı spesifik primer dizileri kullanılarak incelendi. 190 bç hizasında bant elde edilmesi pozitif olarak kabul edildi.



M: Moleküler ağırlık standardı
NK: Negatif Kontrol
2 - 12 nolu kuyucuklar pozitif izolatlar
1, 13 nolu kuyucuklar negatif izolatlar

Resim 4. *bap* Geni Jel Görüntüsü

Çalışmaya dahil edilen 60 izolattan 52 tanesinde (%86,6) *bap* geninde amplifikasyon ürünü saptanırken, 8 tanesinde (%13,3) *bap* geninde amplifikasyon ürünü saptanmamıştır. Bu şuşlardan KİE yapan 30 izolattın 24 tanesinde (%80) *bap* geni amplifikasyon ürünü tespit edilmişken, 6 tanesinde (%20) amplifikasyon ürünü tespit edilememiştir.

Çalışmaya dahil edilen 60 izolattın genlere göre amplifikasyon sonuçları Tablo 16'da verilmiştir. Buna göre kateter ilişkili ve kateter dışı enfeksiyon oluşturan izolatlar *bap* geninin varlığı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,254$). Kateter ilişkili ve kateter dışı enfeksiyon oluşturan izolatlar *bfmR* geninin varlığı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p=0,237$). Ancak, kateter ilişkili ve kateter

dışı enfeksiyon oluşturan izolatlar *csuE* geninin varlığı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,002$).

Tablo 16. Genlerin Amplifikasyon Sonuçları

	<i>bap</i> pozitif	<i>bap</i> negatif	<i>bfmR</i> pozitif	<i>bfmR</i> negatif	<i>csuE</i> pozitif	<i>csuE</i> negatif	Toplam
Kateter dışı	28 (%93,3)	2 (%6,7)	30 (%100)	0 (%0)	28 (%93,3)	2 (%6,6)	30 (%100)
Kateter	24 (%80)	6 (%20)	27 (%90)	3 (%10)	17 (%56,6)	13 (%43,3)	30 (%100)
Toplam	52 (%86,7)	8 (%13,3)	57 (%95)	3 (%5)	45 (%75)	15 (%15)	60 (%100)

Biyofilm yapımı yönünden çalışmaya alınan 60 izolatın 10 tanesinin zayıf, 19 tanesinin orta kuvvetli, 31 tanesinin kuvvetli biyofilm yaptıkları saptandı. Genlerin biyofilm düzeylerine göre dağılımı Tablo 17’de gösterilmiştir. Kuvvetli ve orta kuvvetli biyofilm yapan suşların 45 tanesinde (%90) *bap* geni varlığı, 48 tanesinde (%96) *bfmR* geni varlığı, 40 tanesinde (%80) *csuE* geni varlığı saptanmıştır. Çalışmamızda zayıf biyofilm, orta kuvvetli biyofilm ve kuvvetli biyofilm yapan izolatların arasında *bap*, *bfmR* ve *csuE* genlerinin varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 17. İzolatlardaki Gen Varlığının Biyofilm Düzeyine Göre Dağılımı

		<i>bap</i> pozitif	<i>bap</i> negatif	<i>bfmR</i> pozitif	<i>bfmR</i> negatif	<i>csuE</i> pozitif	<i>csuE</i> negatif	Toplam
Biyofilm oluşumu	Zayıf	7 (%70)	3 (%30)	9 (%90)	1 (%10)	5 (%50)	5 (%50)	10 (%100)
	Orta kuvvetli	16 (%84,2)	3 (%30)	18 (%94,7)	1 (%5,3)	14 (%73,7)	5 (%26,3)	19 (%100)
	Kuvvetli	29 (%93,5)	2 (%6,4)	30 (%96,8)	1 (%3,2)	26 (%83,9)	5 (%16,1)	31 (%100)
Toplam		52 (%86,6)	8 (%13,3)	57 (%95)	3 (%5)	45 (%75)	15 (%15)	60 (%100)

Çalışmaya dahil edilen 30 tane kateter dışı enfeksiyon etkeni olan ve 30 tane KİE etkeni olan *A. baumannii* izolatlarının hepsinin biyofilm ve gen dağılımları Tablo 18 ve Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 18. Çalışmaya Dahil Edilen Kateter Dışı Enfeksiyon Etkeni Olan İzolatların Biyofilm ve Gen Dağılımları

Izolot No	<i>bap</i>	<i>bfmR</i>	<i>csuE</i>	Biyofilm şiddeti
1	+	+	-	Zayıf
2	+	+	+	Kuvvetli
3	+	+	+	Kuvvetli
4	+	+	+	Kuvvetli
5	+	+	+	Orta kuvvetli
6	+	+	+	Orta kuvvetli
7	+	+	+	Kuvvetli
8	+	+	+	Kuvvetli
9	+	+	+	Kuvvetli
10	+	+	-	Zayıf
11	-	+	+	Zayıf
12	+	+	+	Kuvvetli
13	+	+	+	Orta kuvvetli
14	+	+	+	Orta kuvvetli
15	+	+	+	Kuvvetli
16	+	+	+	Orta
17	+	+	+	Kuvvetli
18	+	+	+	Kuvvetli
19	+	+	+	Orta kuvvetli
20	-	+	+	Zayıf
21	+	+	+	Orta kuvvetli
22	+	+	+	Zayıf
23	+	+	+	Kuvvetli
24	+	+	+	Kuvvetli
25	+	+	+	Kuvvetli
26	+	+	+	Kuvvetli
27	+	+	+	Kuvvetli
28	+	+	+	Orta kuvvetli
29	+	+	+	Orta kuvvetli
30	+	+	+	Kuvvetli

Tablo 19. Çalışmaya Dahil Edilen Kateterden Elde Edilen İzolatların Biyofilm ve Gen Dağılımları

Izolot No	<i>bap</i>	<i>bfmR</i>	<i>csuE</i>	Biyofilm şiddeti
K1	-	-	-	Orta kuvvetli
K2	+	+	-	Kuvvetli
K3	+	+	+	Kuvvetli
K4	+	+	-	Orta kuvvetli
K5	+	+	-	Orta kuvvetli
K6	+	+	+	Orta kuvvetli
K7	+	+	+	Kuvvetli
K8	+	+	-	Kuvvetli
K9	+	-	-	Kuvvetli
K10	+	+	+	Orta kuvvetli
K11	+	+	+	Kuvvetli
K12	+	+	+	Kuvvetli
K13	-	+	+	Orta kuvvetli
K14	+	+	+	Kuvvetli
K15	+	+	+	Zayıf
K16	-	+	-	Kuvvetli
K17	+	+	+	Kuvvetli
K18	+	+	-	Kuvvetli
K19	+	+	+	Kuvvetli
K20	+	+	+	Zayıf
K21	+	+	-	Zayıf
K22	+	+	+	Orta kuvvetli
K23	-	+	+	Orta kuvvetli
K24	+	+	-	Orta kuvvetli
K25	+	+	+	Kuvvetli
K26	-	+	+	Kuvvetli
K27	+	+	+	Kuvvetli
K28	+	+	-	Orta kuvvetli
K30	-	-	-	Zayıf
K31	+	+	-	Zayıf

4.5. Antibiyotik Kilit Tedavi Modeli Sonuçları

4.5.1. İzolatlar

Çalışmaya dahil edilen 60 izolattan 2 tanesine antibiyotik kilit tedavi modeli uygulandı. Bu 2 izolat seçilirken, KİE'a neden olan *A. baumannii* izolatlarından fenotipik ve genotipik olarak biyofilm oluşturma özelliklerine ve antibiyotik duyarlılık profillerine dikkat edildi. Buna göre, fenotipik olarak kuvvetli biyofilm oluşturan ve genotipik olarak *bfmR*, *csuE* ve *bap* genlerine sahip olan izolatlar seçildi. Ayrıca yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre tigesiklin ve kolistin antibiyotiklerine duyarlı izolatlar seçildi. Bu kriterlere uygun olan K3 ve K7 izolatlarına in vitro antibiyotik kilit tedavi modeli uygulandı.

4.5.2. Antibiyotikler

Antibiyotik kilit tedavi modelinde etkinliği gösterilmek üzere seçilen antibiyotikler kolistin, tigesiklin ve rifampisindir. Kolistin ve tigesiklinin 1 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonlarında her iki izolatla ayrı ayrı biyofilm oluşturulmuş kateter modelleri üzerine etkinliği denendi. Kombine olarak kullanılan antibiyotikler ise K7 izolatının biyofilm oluşturduğu kateter modeline denendi. Kullanılan antibiyotik konsantrasyonları Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. Çalışmada Kullanılan Antibiyotik Konsantrasyonları

Antibiyotikler	Konsantrasyonlar
Kolistin	1 mg/ml
Kolistin	5 mg/ml
Kolistin	10 mg/ml
Tigesiklin	1 mg/ml
Tigesiklin	5 mg/ml
Tigesiklin	10 mg/ml
Kolistin + Tigesiklin	5 mg/ml + 5 mg/ml
Kolistin + Rifampisin	5 mg/ml + 5 mg/ml
Tigesiklin + Rifampisin	5 mg/ml + 5 mg/ml

4.5.3. In Vitro Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin Etkinliği

Başlangıçta, biyofilm oluşturulmuş canlı bakteri sayısı K3 izolatında, tigesiklin ve kolistin antibiyotikleri için sırasıyla $(2\pm 0,2) \times 10^6$ ve $(1,8\pm 0,2) \times 10^6$ cfu/ml olarak bulunmuştur. K7 izolatı için ise biyofilm oluşturulmuş canlı bakteri sayısı $(1,4\pm 3) \times 10^8$ cfu/ml olarak saptanmıştır. 1,3,5,7,10 ve 14. günlerde biyofilm oluşturmuş canlı bakteri sayıları cfu/ml olarak Tablo 21 ve 22’de verilmiştir. K3 izolatı için, kateter parçalarındaki biyofilm oluşturmuş bakterilerin tigesiklin 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml ve kolistin 5 mg/ml, 10 mg/ml konsantrasyonlarının hepsinde 5. günün sonunda ortadan kalktığı tespit edildi. Bununla birlikte, kolistin 1 mg/ml konsantrasyonunu içeren kilit solüsyonunda ise 3. günün sonunda kateter parçalarının steril olduğu saptandı.

K7 izolatı için, kateter parçalarındaki biyofilm oluşturmuş bakteriler tigesiklin 1 mg/ml, 5 mg/ml ve kolistin 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml

konsantrasyonlarının hepsinde 5. günün sonunda ortadan kalktığı tespit edildi. Bununla birlikte, tigesiklin 10 mg/ml konsantrasyonunda ise 3. günün sonunda kateter parçalarının steril olduğu gözlemlendi. Antibiyotik kombinasyonlarını içeren solüsyonların olduğu gruptaki kateter parçalarında, tigesiklinin bulunduğu kombinasyonlarda 1. günden itibaren kateter parçalarındaki biyofilm oluşturmuş bakterilerin ortadan kaldırıldığı, kolistin ve rifampisin içeren kombinasyonda ise 3. günden itibaren kateter parçalarının steril olduğu tespit edildi.

Tablo 21. Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin K3 İzolatı Üzerine Etkisi

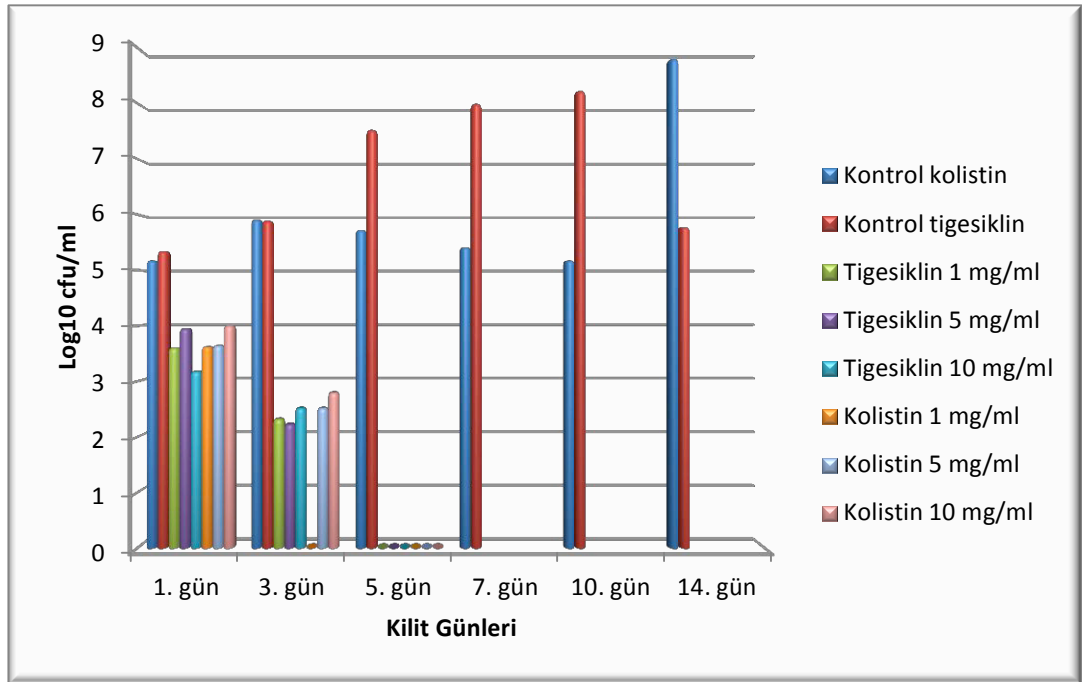
	Konsantrasyon (mg/ml)	0.gün	1. gün	3. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
Tigesiklin	Kontrol	(2±0,2) x 10 ⁶	(2,2±0,9) x 10 ⁵	(7,8±1,4) x 10 ⁵	(3,4±3,4) x 10 ⁷	(1±0,1) x 10 ⁸	(1,7±0,2) x 10 ⁸	(6±1,1) x 10 ⁵
	1	–	(4±2,2) x 10 ³	(2,1±0,4) x 10 ²	Ø			
	5	–	(8,9±1,2) x 10 ³	(1,7±0,7) x 10 ²	Ø			
	10	–	(1,5±0,7) x 10 ³	(3,3±1,1) x 10 ²	Ø			
Kolistin	Kontrol	(1,8±0,2) x 10 ⁶	(1,5±0,4) x 10 ⁵	(8,2±1,9) x 10 ⁵	(5,3±1,2) x 10 ⁵	(2,6±0,9) x 10 ⁵	(1,5±0,4) x 10 ⁵	(6,4±1,2) x 10 ⁸
	1	–	(4,2±1,2) x 10 ³	Ø	Ø			
	5	–	(4,4±2,2) x 10 ³	(3,3±1,5) x 10 ²	Ø			
	10	–	(1±2) x 10 ⁴	(6,3±1,6) x 10 ²	Ø			

Tablo 22. Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin K7 İzolatı Üzerine Etkisi

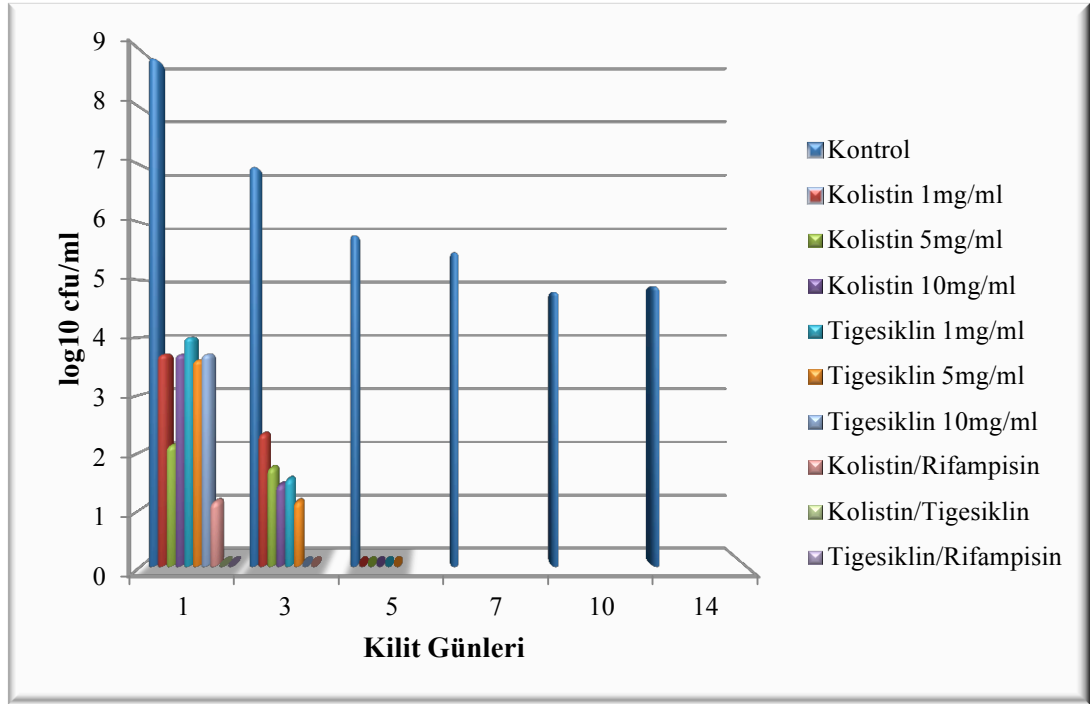
	Konsantrasyon (mg/ml)	0.gün	1. gün	3. gün	5. gün	7. gün	10. gün	14. gün
Kontrol		(1,4±3) x 10 ⁸	(8,6±1,5) x 10 ⁸	(1±2) x 10 ⁷	(7,6±1,6) x 10 ⁵	(3,8±1,3) x 10 ⁵	(7,5±2,1) x 10 ⁴	(8,8±0,8) x 10 ⁴
Tigesiklin	1	–	(1,1±2) x 10 ⁴	(3,6±0,5) x 10 ¹	Ø			
Tigesiklin	5	–	(4,8±0,7) x 10 ³	(1,3±0,5) x 10 ¹	Ø			
Tigesiklin	10	–	(5,7±1,3) x 10 ³	Ø	Ø			
Kolistin	1	–	(6,2±0,8) x 10 ³	(2,2±1,5) x 10 ²	Ø			
Kolistin	5	–	(1,3±7) x 10 ²	(5,6±3) x 10 ¹	Ø			
Kolistin	10	–	(5,3±0,8) x 10 ³	(2,6±1,5) x 10 ¹	Ø			
Kolistin/ Rifampisin	5/5	–	(1,3±1,5) x 10 ¹	Ø				
Kolistin/ Tigesiklin	5/5	–	Ø					
Tigesiklin/ Rifampisin	5/5	–	Ø					

Grafik 1 ve 2’de K3 ve K7 izolatları tarafından oluşan biyofilme in vitro olarak antibiyotik kilit tedavi modelinin etkinliği (log₁₀ cfu/ml) gösterilmektedir. Kontrole kıyaslandığında, tigesiklin uygulanan grupta tüm konsantrasyonlarda, K3 izolatı için, 1. günde 2 log azalma varken, 3. günde 3 log azalma saptanmış, K7 izolatında ise 1. günde 4 - 5 log azalma görülürken, 3. günde yaklaşık 6 - 7 log azalma izlenmiştir.

Kolistinin tüm konsantrasyonları, kontrollerle kıyaslandığında K3 izolatında 1. günde yaklaşık olarak 1 - 2 log azalma saptanırken, 3. günde 3 log azalma görülmektedir. K7 izolatında ise 1. ve 3. günde yaklaşık olarak 5 - 6 log azalma tespit edilmiştir.



Grafik 1. K3 Tarafından Oluşturulan Biyofilme In Vitro Olarak Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin Etkinliği



Grafik 2. K7 Tarafından Oluşturulan Biyofilme In Vitro Olarak Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin Etkinliği

5. TARTIŞMA

Acinetobacter türleri aerob, gram-negatif, nonfermentatif bakterilerdir. Son 10 yıldır, hastanede yatan kritik hastalarda kolonizasyon ve enfeksiyon salgınlarına yol açan önemli bir nozokomiyal patojen olarak küresel bir sorun ortaya çıkarmaktadır. *A. baumannii* nozokomiyal enfeksiyon, pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi ve KİE gibi pek çok enfeksiyona sebep olmaktadır^{3,18,64}. *A. baumannii* ile hastane salgınları, ağır enfeksiyonlar ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki üzerine çok sayıda araştırma yapılmasına rağmen, bu mikroorganizmanın ölümcüllüğünü ve patojenitesini belirleyen faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır. Buna rağmen, *A. baumannii* klinik izolatlarının büyük çoğunluğunda ortak virülans faktör olarak, biyofilm oluşturma yeteneğinin varlığı kabul edilmektedir⁶². Ayrıca, yüzeylere yapışma yeteneği, *Acinetobacter* izolatlarının patojenitesinde önemli bir mekanizma olarak görülmektedir⁸².

Biyofilmler, polimerik hücre dışı matriks içinde yer alan yüzeyel mikrobiyal hücre topluluklarıdır. Biyofilm oluşumu, hastane ortamındaki patojenik bakterilerin hayatta kalması ve kalıcı tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonların oluşması ile ilişkilendirilmiştir. Tıbbi cihazların yaygın kullanımı birçok hastalığın tedavisinde büyük ilerlemelere neden olmuştur. Kalıcı tıbbi cihazlar, giderek artan çok sayıda tıbbi alanda işlevsel bozuklukların tedavisi için kullanılmaktadır. Yeni cihazlar ile önemli başarılar elde edilmesine rağmen, bu abiyotik yüzeyler önemli bir sağlık sorunu olan bakteri kolonizasyonuna yatkınlığı ortaya çıkarmaktadır. Geçici vasküler kateter, üriner kateter ve

endotrakeal tüp bakteriyel yapışma ve enfeksiyon için bir alan oluşturabilir. Dünya çapında, hastane kökenli enfeksiyonların %60'ından fazlası tıbbi cihazlarda biyofilm oluşturan bakteriler nedeniyle oluşmaktadır. Bu cihazlar ile ilgili enfeksiyonlar, hayatı tehdit edebilir ve cihazın kaldırılmasına neden olabilecek sorunları ortaya çıkarabilir. Bu durumlarda da, bu cihazların yönetimi zor ve masraflıdır¹³. Tıbbi cihazların tasarımı ve kullanımında farklılıklar olsa da, özel faktörler mikrobiyal kontaminasyon ve biyofilm oluşumuna neden olmaktadır. Sentetik yüzeylerde biyofilm oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerin yüzeyin yapısı, hidrofobitesi ve bakterinin türü olduğu yapılan in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Tıbbi cihazlar üzerinde biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalar, implantasyon sırasında hastanın cilt veya mukozasından kaynaklanabildiği gibi personellerin elleri de kaynak olabilir.

Epidemiyolojik verilere göre, tıbbi cihazlara nüfuz etme kabiliyetleri nedeniyle *Acinetobacter* biyofilminin kistik fibrozis, üriner sistem enfeksiyonları gibi enfeksiyon hastalıklarındaki oynadığı rol açıktır. Bu enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde çoklu antibiyotik direncinden dolayı zorluklarla karşılaşmaktadır^{13,83}.

A. baumannii'nin biyofilm yapımının incelendiği çalışmalarda mikrotitrasyon plağı yöntemi, polistren tüp yöntemi gibi biyofilm tabakasının absorbans ölçümü temeline dayanan farklı yöntemler kullanılmaktadır^{62,84-87}.

2008 yılında Rodriguez Bano ve arkadaşlarının yaptığı 92 tane *A. baumannii* izolatlarının mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumu araştırılmıştır. Bu çalışmada, 56 (%63) izolatın in vitro olarak biyofilm

oluşturduğu, 33 izolatın (%36) ise biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm KİE'a neden olan izolatların biyofilm oluşturduğu saptanmıştır⁸⁷.

Rao ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir çalışmada, 55 tane *A. baumannii* izolatının kalitatif olarak tüp yöntemi ile biyofilm üretme özelliği ve kantitatif olarak da mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm düzeyleri ölçülmüştür. *A. baumannii* ATCC 19606 izolatı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak, kalitatif olarak 34 izolatın (%62), kantitatif olarak ise 34 izolatın (%62) güçlü biyofilm, 14 izolatın ise zayıf biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumu tüp yöntemine göre daha duyarlı bulunmuştur⁸⁸.

Hendiani ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı 75 tane klinik izolattan elde edilen *A. baumannii*'nin biyofilm oluşumu 2 farklı yöntem ile farklı yüzeylerde değerlendirilmiştir. Polikarbon plak ve polipropilen falkon içeren yüzeylerde kristal viyole ve 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5- karboksanilid tuzu (XTT tetrazolium sodyum tuzu) metodu ile biyofilm oluşumu incelenmiştir. Biyofilm oluşumu açısından, her iki boyanın da doğru orantılı olduğu, kullanılan iki farklı yüzeyde de ortak sonuçlar elde edildiği saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 75 izolattan 57 tanesinin polipropilen falkon ile, 50 tanesinin de polikarbon plak ile biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir⁸⁵.

Abdi-Ali ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı 75 tane *A. baumannii* izolatının mikrotitrasyon plak ve tüp yöntemi ile biyofilm oluşumu araştırılmıştır.

Bu çalışmada tüp metodu ile %80 izolatta biyofilm oluşumu tespit edilirken, mikrotitrasyon yöntemi ile %75 izolatta biyofilm oluşumu tespit edilmiştir ⁸⁶.

Bizim çalışmamızda; ETA, balgam, yara ve kateter örneklerinden izole edilen 60 *A. baumannii* izolatının biyofilm oluşturma özellikleri mikrotitrasyon plağı yöntemi ile 24 saatlik inkübasyon sonunda, kristal viyole kullanılarak değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilen 60 izolatın 10 tanesinde (%16,6) zayıf biyofilm, 19 tanesinde (%31,6) orta kuvvetli biyofilm, 31 tanesinde de (%51,6) kuvvetli biyofilm oluştuğu saptandı. KİE etkeni olan izolatların 5 tanesinin (%50) zayıf biyofilm, 10 tanesinin (%52,6) orta kuvvetli biyofilm, 15 tanesinin (%48,4) kuvvetli biyofilm oluşturduğu, kateter dışı enfeksiyon oluşturan izolatların ise 5 tanesinin (%50) zayıf biyofilm, 9 tanesinin (%47,4) orta kuvvetli biyofilm, 16 tanesinin de (%51,6) kuvvetli biyofilm oluşturduğu tespit edildi. Yapılan istatistik analizi sonucunda kateterden ve kateter dışından elde edilen örneklerde biyofilm oluşumu açısından anlamlı bir fark elde edilemedi. Çalışmaya alınan 60 izolatın 50 tanesinin güçlü ve orta kuvvetli biyofilm oluşturmaları *A. baumannii* ile oluşmuş enfeksiyonların özellikle YBÜ ve hematoloji ünitesi gibi birimlerde bu enfeksiyonların ciddiyetinin ve öneminin büyüklüğünü göstermektedir.

Enfeksiyon hastalıklarındaki ve cihaz ile ilişkili enfeksiyonlardaki rolü nedeniyle, biyofilmler halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Hasta yönetiminde biyofilm kontrolü için yeni ve etkili stratejiler geliştirilmelidir. Biyofilm oluşumu, antibiyotik direnç mekanizmaları, direncin plazmid ile transferleri ve hücreler arası iletişim için ortam sağlaması ile ilgili bir süreçtir ⁸⁹.

ÇİD'li *A. baumannii*, biyotik ve abiyotik yüzeylerde kolonize olabilme ve biyofilm oluşturabilme yeteneği ile birlikte hastane ortamında yaygınlığı ve kalıcılığı ile önemli bir rol oynamaktadır ^{87,89,90}. *A. baumannii*'nin çevrede, kurutulmuş abiyotik yüzeylerdeki kalıcılığı, nadiren diğer gram-negatif bakterilerde de bulunan, dormant hücrelerin varlığı nedeniyle oluşmaktadır ⁹¹.

Acinetobacterin biyofilm ilişkili virülans belirleyicileri olarak tanımlanan gen bölgeleri ve proteinleri; iki bileşenli sistem tarafından düzenlenen *CsuA/BABCDE* şaperon sistemi (*bfmS/bfmR*), dış membran proteini olan *OmpA*, dış membran proteini olan biyofilm-ilişkili protein (*bap*), çoğunluğu algılama (quorum sensing) sisteminin parçası olan otoindüktör sentezi *AbaI* ve poli- β -1,6 Nasetilglukozamin (PNAG) üretiminden sorumlu olan *pgaABCD* operonudur ⁶².

2013 yılında Rumbo-Feal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *A. baumannii* ATCC 17978 izolatındaki planktonik ve sesil hücrelerin komple genom profili ortaya çıkarılmış ve ikisi arasındaki gen farklılıkları araştırılmıştır. Bu çalışmada, 1621 genin biyofilm oluşturan hücrelerden salgılandığı ve 55 genin sadece sesil hücreden salgılandığı, planktonik hücrelerde engellendiği saptanmıştır. Bu çalışmada, biyofilm oluşumunu destekleyen, sadece biyofilm hücrelerinden salgılanan 9 tane transkripsiyon düzenleyicisi bulunmuştur ⁹².

Biyofilm oluşumu ile ilgili düzenleyici süreç, bakteriyel yoğunluk algılama, besin varlığı ve serbest katyon konsantrasyonunu içermektedir. Bu hücre dışı bazı sinyaller *BfmR/S* gibi iki bileşenli düzenleyici sistemler tarafından kontrol edilebilmektedir ⁸. Tomaras ve arkadaşları 2003 ve 2008 yılında yaptıkları çalışmada *A. baumannii* 19606 izolatında *BfmR/S* sistemini incelemişlerdir. Bu

çalışmalarda iki bileşenli dzenleyici sistemin aktive olabilmesi için, pili oluşumunda rol oynayan şaperon sistemine ihtiyaç duyulduğu ortaya konulmuştur. *bfmR* geninin inaktivasyonunun *csu* salınımını tamamen ortadan kaldırdığı ve pili üretimini ve biyofilm yapımının kaybına neden olduğu ancak *bfmS* geninin inaktivasyonunun kısmi biyofilm kaybına neden olduğu ortaya koyulmuştur^{11,65}. Bu özelliklerinden dolayı *bfmR*, canlı terapötik ilaç hedefi konumundadır⁹³.

İki bileşenli dzenleyici sistem, mikroorganizmanın çeşitli çevrelerde yaşayabilmesi ve büyüebilmesi için anahtar faktördür⁹⁴. Birçok bakteride, bu iki bileşenli sistem üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte, *A. baumannii*'nin virölansı üzerine etkisi hakkında az sayıda bilgi mevcuttur. 2012 yılında Liou ve arkadaşlarının *A. baumannii* 17978 izolatında yaptığı çalışmada, *bfmS* geninin *A. baumannii*'de ikili rol oynadığı saptanmıştır. *bfmS* genin biyofilm oluşumuna ve dış membran proteinleri üzerinden antimikrobiyal dirence etki ettiği saptanmıřtır⁶⁶.

Loehfelm ve arkadaşları 2008 yılında ilk defa, *A. baumannii*'de biyofilm oluşumuna katılan hücre yüzey proteinini tanımlamışlardır ve Bap'ın olgun biyofilmdeki hücreler arası yapışmaya dahil olduğunu desteklemiřlerdir¹⁰.

Brossard ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada, medikal yüzeylerdeki olgun biyofilm oluşumunda Bap'ın rolü olduğunu saptanmıřlardır⁷⁸.

Sharon Goh ve arkadaşlarının 2013 yılında 24 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatında *bap* geninin salgılanması ve fonksiyonunu araştırmışlardır. PZR ile yapılan çalışmada *bap* genin 22 izolatta bulunduğu tespit edilmiştir.

Yapılan analizde 3 tane Bap-pozitif izolatta Bap'ın hücre yüzeyinden salgılandığı ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu saptanmıştır ¹.

Son yapılan çalışmalarda, *A. baumannii*'nin biyofilm oluşumu üzerine etkisi olan faktörler bulunmaya çalışılmış. Ancak klinik izolatlardaki biyofilm oluşumuna katkı sağlayan genlerin araştırılması ile ilgili veriler kısıtlıdır. Bu nedenle, çalışmamızda 60 tane *A. baumannii* klinik izolatlarında biyofilm oluşumundan sorumlu tutulan *bfmR*, *csuE* ve *bap* genlerini PZR yöntemi ile inceledik. Bu genler ile biyofilm yapım şiddeti arasında ilişki olup olmadığını araştırdık.

Çalışmamızda; 57 (%95) izolatta *bfmR* geni, 45 (%75) izolatta *csuE* geni, 52 (%86,6) izolatta da *bap* geni saptandı. Her 3 genin de izolatlarda yüksek oranda pozitif bulunması biyofilm yapımı ile ilişkili bu genlerin yaygınlığını göstermektedir. %95 izolatta *bfmR* geninin varlığı dikkat çekici bir sonuçtur. *bfmR* geninin pozitif olduğu 12 tane izolatta, *csuE* geni saptanamaması, *csuE* geninin salınımında başka faktörlerin de etkisi olabileceği ya da *bfmR*'nin varlığının *csuE* geninden bağımsız olduğunu düşündürmektedir. 3 tane izolatta da *bfmR* genin ve *csuE* genin bulunmaması, şaperon sisteminin oluşmasında *bfmR* gen bölgesinin rolü olduğunu desteklemektedir.

Bir tane izolatta *bfmR* ve *csuE* geni saptanamamasına rağmen *bap* geninin varlığının saptanması ve çalışmaya dahil edilen izolatlardan birinde 3 genin de bulunmamasına rağmen orta kuvvetli biyofilm oluşturabilmesi, *A. baumannii*'de biyofilm oluşumunun, genetik faktörler dışında multifaktöriyel bir durum olduğunu desteklemektedir.

Zayıf, orta kuvvetli ve kuvvetli biyofilm yapan suşlarda genlerin dağılımı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamadı. Ancak kuvvetli ve orta kuvvetli biyofilm oluşturan izolatlardaki *bap* ve *bfmR* gen oranlarının yüksekliği bu genlerin biyofilm oluşumuna katkısının yüksek olduğunu düşündürmektedir. Zayıf biyofilm oluşturan izolatlarda gen kaybı olmaması, değişik çevre koşullarında biyofilm yapımının değişebileceğini ve izolatlarda biyofilm yapımında rol oynayan gen olsa bile, genin ifadenemeyebileceğini düşündürmektedir.

Kateter dışından elde edilen örneklerin hepsinde *bfmR* geninin varlığı saptanırken, KİE etkenlerinden 3 izolatta *bfmR* geni saptanmadı. *bap* ve *bfmR* gen oranlarına bakıldığında kateter dışından elde edilen örnekler ile KİE etkeni olan örnekler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir. *csuE* geninin kateter dışındaki örneklerde daha yüksek oranda bulunmuştur.

A. baumannii'nin biyofilm oluşumu üzerine etkisi olan faktörlerin saptanabilmesi için daha fazla sayıda çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

ABD'de her yıl yaklaşık 80.000 SVK ilişkili enfeksiyon YBÜ'lerinde meydana gelmektedir ⁹⁵. Bu KİE'lar, kateter yüzeyinde mikrobiyal biyofilm ile ilişkili olarak hastalarda yüksek morbiditeye neden olmaktadır. Ek olarak, hastanede yatış süresinin uzaması, yüksek maliyet ve kateterin erken çıkarılmasını gerektirmektedir ⁹⁶. KİE'larda özellikle hasta sepsis ya da septik şokta ise, kateterin çıkarılması en etkili tedavi yöntemidir. Ancak, stabil hastalarda kateterin çıkarılmasını önlemek amacıyla antibiyotik kilit tedavisi (AKT) uygulanabilir ^{95,97}. *S.aureus* ve mantarlar KİE'a neden olduklarında şiddetli konservatif tedavi

ile önlenmesi tavsiye edilir. Ancak gram-negatif enfeksiyonlar konusu tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda bu gibi durumlarda konservatif tedavi ile yüksek başarı gösterilmiş olmasına rağmen, özellikle biyofilm üreten gram-negatif basiller için, mevcut kurallar kateterin çıkarılmasını önermektedir⁹⁸⁻¹⁰⁰.

A. baumannii izolatlarında, in vitro antibiyotik kilit tedavi modelinin uygulandığı kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur¹⁰¹⁻¹⁰³. Çalışmamızda bu kısıtlı sayıdaki literatüre katkı sağlamak amacıyla biyofilm oluşturan *A. baumannii* izolatlarında, kolistin, tigesiklin ve rifampisin ile antibiyotik kilit tedavi modelini uyguladık.

Rijnders ve arkadaşlarının 2005 yılında KİE’u olan 44 hastanın dahil edildiği çalışmada kilit tedavisi ile birlikte sistemik antibiyotik verilen hastalarla sadece sistemik antibiyotik verilen hastalar karşılaştırılmıştır. Etiyolojide, 10 hastada etken olarak gram-negatif basil saptanmış, bunlarda 2 tanesi *Acinetobacter* olarak tespit edilmiştir. Kilit tedavisi ile sistemik antibiyotiğin birlikte verildiği 21 hastanın 7 tanesinde tedavi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Antibiyotiğin tek başına kullanıldığı 23 hastanın 13 tanesinde kateter çıkarılmıştır¹⁰⁴.

2006 yılında Fernandez-Hidalgo ve arkadaşları, 98 kateter ilişkili bakteriyemisi olan hastayı çalışmaya dahil etmişlerdir. Etiyolojide gram-pozitif ve gram-negatif etkenlerin rol oynadığı bu çalışmada, kateter ilişkili bakteriyemisi olan 2 hasta *A. baumannii* ile enfektedir. Sistemik tedavi ve AKT aynı anda başlanan hastaların %82’sinde tedavi başarılı olmuştur. Siprofloksasine dirençli olan bir *A. baumannii* ile enfekte hasta amikasin ile tedavi edilmiştir⁹⁹.

Beigi ve arkadaşları tarafından 67 kronik hemodiyaliz kateterli hasta üzerinde yapılan çalışmada, hastalar iki gruba ayrılmıştır. 28 hastalık grupta hastalara vankomisin ve seftriakson antibiyotikleri ile kilit tedavisi uygulanmış, 39 hastanın bulunduğu grup ise kontrol grubu olarak kabul edilmiştir ve bu gruba sadece intravenöz vankomisin verilmiştir. İlk gruptaki 5 hastaya yapılan kültür sonucunda; *S.aureus*, alfa hemolitik streptokok, *Klebsiella* spp., koagülaz negatif stafilokok ve *Acinetobacter* spp. bakterileri üremiştir. Çalışma sonunda AKT uygulanan hastaların sadece bir tanesinde, kontrol grubundaki hastaların ise 22 tanesinde kateter çıkarılmak durumunda kalmıştır ¹⁰⁵.

Aslam ve arkadaşları, KİE etkeni olan metisilin dirençli *S. aureus*, metisilin duyarlı *S. aureus*, metisilin dirençli *S. epidermidis*, vankomisin dirençli enterokok, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* mikroorganizmalarını içeren 6 tane klinik izolat ile yaptıkları çalışmada N-asetilsistein, tigesiklin ve NAC-tigesiklin kombinasyonları in vitro olarak bakterilerle kolonize olmuş kateter parçalarına uygulamıştır. 12. saatte NAC'ın tek başına MRSA,MRSE ve *K. pneumoniae* izolatlarında bağımsız antimikrobiyal etkisi olduğu, ancak diğer mikroorganizmalarda etkisiz olduğu bildirilmiştir. Tigesiklin tek başına VRE haricindeki organizmalarda etkili olurken, NAC-tigesiklin kombinasyonunun biyofilm-ilişkili canlı bakterileri azalttığını bulunmuştur. Sonuçta, *A. baumannii* izolatında 12.saatin sonunda kombine solüsyonun diğer ajanlara göre daha etkili olduğu gösterilmiştir ¹⁰³.

Özbek ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışmada *A. baumannii* AB-1 ve ATCC 19606 izolatlarında kolistin, tigesiklin, levofloksasin ve bunların

heparin ve klaritromisin ile kombinasyonları, in vitro olarak kateter-biyofilm modeli üzerine uygulanmıştır. Antibiyotikler tek başına uygulandığında, sadece kolistin içeren kilit solüsyonu kateter modelindeki bakteriyi ortadan kaldıran en başarılı ajan olarak saptanmıştır. Klaritromisinin antibiyotikler ile kombine kullanıldığı durumlarda ise biyofilmdeki kolonize olan ya da yaşayan bakterilerin daha etkili ve daha hızlı azaldığı belirtilmiştir. Kolistin/klaritromisin kombinasyonu uygulanan her iki izolattaki biyofilmin 2.günde ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Tigesiklin/klaritromisin kombinasyonu uygulandığında ise, antibiyotik direnci olmasına rağmen, AB-1'in 2. günde steril olduğu, levofloksasinli kombinasyonlarda da etkinliğin daha düşük olduğu gösterilmiştir¹⁰².

Farrag ve arkadaşları 2014 yılında *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* ve *C. tropicalis*'i içine alan 4 dirençli klinik izolatta, levofloksasin (bakteri için) ve flukanazol (mantar için) antimikrobiyalleri AKT'ndeki etkinliğini göstermek amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca, gama radyasyonu yardımıyla eklenmiş gentamisin içeren poliüretan kateter ve geliştirilmiş polimerik malzeme antimikrobiyal ve anti-adherans özellikleri açısından test edilmiştir. *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* izolatları için levofloksasinin 1024 mg/L konsantrasyonu 3. günde, 64 mg/L konsantrasyonu 10. günde biyofilmi ortadan kaldırdığı bulunmakla birlikte, modifiye polimerik malzemenin de antimikrobiyal ve anti-aderans özellikleri olduğu tespit edilmiştir¹⁰¹.

Çalışmamızda 30 tane KIE etkeni olan örnekler arasından kolistin ve tigesikline CLSI'nin kriterlerine göre duyarlı olarak saptanan, fenotipik olarak

kuvvetli biyofilm oluşturan ve genotipik olarak *bfmR*, *csuE* ve *bap* genlerine sahip olan izolatlardan 2 tanesi seçildi. Bu kriterlere uygun olan K3 ve K7 izolatlarına in vitro antibiyotik kilit tedavi modeli uygulandı.

Çalışmamızda, tüm antibiyotik konsantrasyonları ve kombinasyonları her iki izolattaki *A.baumannii* biyofilminin ortadan kaldırılmasında etkili bulundu. K3 izolatında tigesiklinin tüm konsantrasyonlarında, K7 izolatında tigesiklin 1 ve 5 mg/ml konsantrasyonlarında 5. günde *A. baumannii* biyofilmi ortadan kaldırılırken; K7 izolatında tigesiklin 10 mg/ml konsantrasyonunda 3. günde kateter sterilizasyonu sağlanmıştır. Bununla birlikte, tigesiklin grubunda her iki izolatta da 1. ve 3. günde kontrolle kıyaslandığında K3 izolatu için 2 - 3 log azalma, K7 izolatında 4 - 5 log azalma saptanmıştır. Tüm konsantrasyonlarda 5.günde sterilizasyonun sağlanması 1 mg/ml konsantrasyonda bile tigesiklinin etki edebileceğini göstermektedir.

K3 izolatında kolistin 1 ve 5 mg/ml konsantrasyonlarında 5. günde, 1 mg/ml konsantrasyondaki 3. günde *A. baumannii* biyofilmi ortadan kaldırılırken, K7 izolatında tüm konsantrasyonlarında kateterlerde 5. günde sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm konsantrasyonlarda, K3 izolatında kolistin grubunda 1. ve 3. günde yaklaşık olarak 2 - 3 log azalma, K7 izolatında ise yaklaşık olarak 5 log azalma tespit edilmiştir. Tüm konsantrasyonlarda 5.günde sterilizasyonun sağlanması 1 mg/ml konsantrasyonda bile kolistin etki edebileceğini göstermektedir.

Daha önceki çalışma sonuçları kolistin *A.baumannii* biyofilminin ortadan kaldırılmasında tigesiklinden daha etkili olduğunu göstermiştir¹⁰². Ancak

bizim çalışmamızda konsantrasyon farklılıklarında bile kolistin ve tigesiklin arasında etkinlik aynı olarak değerlendirilmiş, 3. - 5. günde AKT modelinde her iki izolatta da başarı sağlanmıştır. Bu durum, tigesiklinin de en az kolistin kadar etkili olduğunu düşündürmektedir.

IDSA (Infectious Diseases Society of America) rehberi, kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarında santral kateterleri kurtarma tedavisi olarak antibiyotik kilit tedavisini önermektedir ⁹⁵. Antibiyotik tercihlerinin laboratuvarda bakteri süspansiyonları ile yapılan duyarlılık testlerine göre seçilmesi gerekmektedir. Duyarlı olan bir bakteri biyofilm tabakası içerisinde dirençli hale gelebilmektedir. Birçok çalışma 10 - 14 günlük ampirik tedavi dönemlerinin yeterli olduğunu göstermektedir ¹⁴. Bu çalışma, gram-negatif organizmanın etken olduğu KİE'da, in vitro duyarlılık testlerine göre antibiyotik uygulandığında 1mg/ml'lik konsantrasyonlarda bile 3 - 5 günlük süre içerisinde tedavi edilebileceğini desteklemektedir. Ancak bu bulgular in vitro çalışmalara göre değişebileceği için, belirleyici değildir. Bu nedenle, ileriye yönelik klinik araştırmalarda AKT'sinin klinik uygulamalarda etkinliği için kolistin ve tigesiklin antibiyotikleri 5 gün ve 1 - 5 mg/ml konsantrasyonlarında verilmesi önerilmektedir.

AKT'nde rifampisin, biyofilmin ortadan kaldırılması ve dirençli organizmaların önlenmesi amacıyla diğer antibiyotiklerle sinerjistik olarak kullanılır. Ancak onaylanmış stabilite verilerinde eksiklikler mevcuttur ¹⁰⁶. Rifampisin, AKT etkinliğini artırmak için siprofloksasin, daptomisin, linezolid ve tigesiklin içeren solüsyonlarla birlikte kullanılabilir. Rifampisin ile

yapılmış çalışmalar *Staphylococcus*, *Pseudomonas* ya da *Candida* mikroorganizmalarını içermektedir^{81,107,108}.

Çalışmamızda, rifampisin 5mg/ml, kolistin 5mg/ml ve tigesiklin 5mg/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde ayrı ayrı kombine edilerek kullanıldı. Sadece K7 izolatında uygulanan kombine kilit solüsyonlarındaki etkinlik, antibiyotiklerin tek başına uygulandığındaki etkinlikten daha yüksek bulundu. Tigesiklin ile rifampisin kombine olarak kullanıldığı kilit solüsyonlarda, kontroldeki bakteri sayısı 8 log iken, 1. günde kateterlerin tamamen steril oldukları tespit edildi.

Daha önceki yapılmış olan kateter-biyofilm modelindeki çalışmalarda kullanılan kombine kilit solüsyonlarında kolistin, heparin ve klaritromisin ile kombine edilmiştir¹⁰². Biz çalışmamızda farklı olarak kolistin rifampisin ve tigesiklin ile kombinasyonlarını kullandık. Kolistin rifampisin ile kombine kullanıldığı solüsyonda 1. günde 1 loga kadar düşüş gözlemlenirken, 3. günde ise *A. baumannii*'deki biyofilmin tamamen ortadan kalktığı gözlemlendi. Tigesiklin ile kolistin kombine kullanıldığı solüsyonda ise *A. baumannii*'deki biyofilmin 1. günde tamamen ortadan kalktığı tespit edildi. Bu durum, kolistin tigesiklinli kombinasyonunun tedavi başarısının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Bizim çalışmamız, kombine tedavilerin *A. baumannii*'deki biyofilm üzerine etkinliğinin tek başına kullanılan antibiyotiklerden daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Tigesiklinin kombinasyona dahil olduğu kombine kilit solüsyonlarında biyofilmdeki bakterilerin daha hızlı ve daha etkili bir şekilde ortadan kalktığı tespit edilmiştir.

Çalışmamız sonucunda, *A. baumannii*'nin etken olduğu KİE'larda AKT'nde 1 mg/ml konsantrasyonlarında tigesiklin ve kolistin antibiyotiklerinin tek başına 5 gün kullanılabileceği ortaya koyulmuştur. Kombine tedavilerde ise 1 - 3 günlük tedavi süresinin yeterli olabileceği gösterilmiştir. Buna rağmen, bu öneri bütünüyle in vitro çalışmaya bağlı olduğu için belirleyici değildir. Bizim yaptığımız in vitro modelin, klinik araştırmalardaki KİE'ların tedavisinde ve önlenmesinde yol gösterici olması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Klinik olarak kullanılabilmesi için, bu konuda yapılacak çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, *A. baumannii*'nin biyofilm oluşumu multifaktöriyel bir süreçtir. Bu süreçte rol oynayan faktörlerin iyi saptanması özellikle cihaz ilişkili enfeksiyonların tedavisinin ve önlenmesinin planlanması açısından son derece önemli olacağı kanısındayız. *A. baumannii*'nin kateter gibi abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunun saptanması ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen genlerin belirlenmesi tedavi stratejisini ve başarısını olumlu yönde etkileyeceğini düşünmekteyiz.

KİE'larda antimikrobiyal duyarlılık testleri göz önünde bulundurularak, antibiyotik seçimi yapılmalıdır. *A. baumannii*'nin etken olduğu KİE'ların tedavisinde ve önlenmesinde biyofilm tabakasına etkili olacak antibiyotik kilit tedavi yaklaşımlarının tedavi stratejilerinde önem kazanacağı kanısındayız.

6. SONUÇLAR

1. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2012 - 2014 tarihleri arasında yatan hastaların kateter ve kateter dışı örneklerinden izole edilen 60 adet *A. baumannii* izolatu çalışmaya alındı. Bu izolatların 30 tanesi kateter ilişkili enfeksiyonlardan izole edilmiştir.

2. Mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılarak 60 izolatu biyofilm oluşumu değerlendirildi. Bu izolatlardan 10 tanesinde (%16,6) zayıf biyofilm, 19 tanesinde (%31,6) orta kuvvetli biyofilm, 31 tanesinde de (%51,6) kuvvetli biyofilm oluştuğu saptandı.

Biyofilm oluşumu açısından kateter ilişkili ve kateter dışı enfeksiyon oluşturan izolatlar karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız bulundu ($p=0.958$).

3. Çalışmaya alınan 60 izolatu biyofilm oluşumuna katkısı olduğu düşünülen *bap* (biyofilm-iliskili protein), *bfmR* (iki bileşenli düzenleyici sistem) ve *csuE* (şaperon-usher sistemi) genleri PZR yöntemi ile araştırıldı. Biyofilm oluşum şiddeti ile genler arasındaki ilişki incelendiğinde kuvvetli ve orta kuvvetli biyofilm yapan suşların 45 tanesinde (%90) *bap* geni varlığı, 48 tanesinde (%96) *bfmR* geni varlığı, 40 tanesinde (%80) *csuE* geni varlığı saptandı.

Çalışmamızda zayıf biyofilm, orta kuvvetli biyofilm ve kuvvetli biyofilm yapan izolatların arasında *bap*, *bfmR* ve *csuE* genlerinin varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

4. Kateter ilişkili ve kateter dışı enfeksiyon oluşturan izolatlar *bfmR* ve *bap* geninin varlığı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p=0,237$). Ancak, kateter ilişkili ve kateter dışı enfeksiyon oluşturan izolatlar *csuE* geninin varlığı açısından karşılaştırıldığında kateter dışı enfeksiyonlarda gen varlığı daha yüksek bulunmuştur ($p=0,002$).
5. PZR sonuçları, biyofilm oluşumunun multifaktöriyel bir süreç olduğunu desteklemektedir.
6. Çalışmamızda 30 tane KİE etkeni olan örnekler arasından kolistin ve tigesikline CLSI'nin kriterlerine göre duyarlı olarak saptanan, fenotipik olarak kuvvetli biyofilm oluşturan ve genotipik olarak *bfmR*, *csuE* ve *bap* genlerine sahip olan K3 ve K7 izolatlarına in vitro antibiyotik kilit tedavi modeli uygulandı.
7. In vitro modelde, tüm antibiyotik konsantrasyonları ve kombinasyonları her iki izolattaki *A. baumannii* biyofilminin ortadan kaldırılmasında etkili bulundu.
8. K3 izolatında tigesiklinin tüm konsantrasyonlarında (1,5,10 mg/ml), K7 izolatında tigesiklin 1 ve 5 mg/ml konsantrasyonlarında 5. günde *A. baumannii* biyofilmi ortadan kaldırılırken; K7 izolatında tigesiklin 10 mg/ml konsantrasyonunda 3. günde kateter sterilizasyonu sağlanmıştır.
9. K3 izolatında kolistin 1 ve 5 mg/ml konsantrasyonlarında 5. günde, 1 mg/ml konsantrasyondaki 3. günde *A. baumannii* biyofilmi ortadan

kaldırılırken, K7 izolatında tüm konsantrasyonlarında kateterlerde 5. günde sterilizasyon sağlanmıştır.

10. K7 izolatında uygulanan kombine kilit solüsyonlarındaki (kolistin 5mg/ml-tigesiklin 5mg/ml, kolistin 5 mg/ml-rifampisin 5mg/ml, tigesiklin 5mg/ml-rifampisin 5mg/ml) etkinlik, antibiyotiklerin tek başına uygulandığındaki etkinlikten daha yüksek bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. Sharon Goh HM, Beatson SA, Totsika M, et al. Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(August):6535-6543. doi:10.1128/AEM.01402-13.
2. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(2):148-165.
3. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):538-582. doi:10.1128/CMR.00058-07.
4. Runnegar N, Sidjabat H, Goh HMS, Nimmo GR, Schembri MA, Paterson DL. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4051-4056. doi:10.1128/JCM.01208-10.
5. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95-108. doi:10.1038/nrmicro821.
6. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):34-40. doi:10.1016/j.tim.2004.11.010.
7. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2009;77(8):3150-3160. doi:10.1128/IAI.00096-09.

8. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation Jennifer. *Futur Microbiol.* 2009;4:273-278. doi:10.2217/fmb.09.5.Regulation.
9. Choi AHK, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly- β -1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol.* 2009;191(19):5953-5963. doi:10.1128/JB.00647-09.
10. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol.* 2008;190(3):1036-1044. doi:10.1128/JB.01416-07.
11. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis L a. 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. doi:10.1099/mic.0.26541-0.
12. Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol.* 2010;36(July):349-360. doi:10.3109/1040841X.2010.512269.
13. M'hamedi I, Hassaine H, Bellifa S, Lachachi M, Terki IK. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* isolated from medical devices at the intensive care unit of the University Hospital of Tlemcen (Algeria). *African J Microbiol Res.* 2014;8(3):270-276. doi:10.5897/AJMR2013.6288.
14. Bouza E, Burillo A, Muñoz P. Catheter-related infections: Diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:265-274. doi:10.1046/j.1469-0691.2002.00385.x.
15. Hanna H, Afif C, Alakech B, et al. Central venous catheter-related bacteremia due to gram-negative bacilli: significance of catheter removal in

- preventing relapse. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25(8):646-649. doi:10.1086/502455.
16. CDC - 2011 Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections - HICPAC. <http://www.cdc.gov/hicpac/BSI/BSI-guidelines-2011.html>. Accessed January 20, 2015.
 17. Band JD. Treatment of intravascular catheter-related infections. 2014. <http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-intravascular-catheter-related-infections>.
 18. Dal T, Dal MS, Ağır İ. *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri : Literatürün Gözden Geçirilmesi. *Van Tıp Derg.* 2012;19(3):137-148.
 19. Lee SY, Shin JH, Park KH, et al. Colistin-Resistant Bloodstream Isolates of *Acinetobacter* Genomic Species 13BJ/14TU in a University Hospital: Identification, Genotypic Relation and Clinical Features. *J Clin Microbiol.* 2014;52(3):931-939. doi:10.1128/JCM.02868-13.
 20. Bahar H, Esen N. *Acinetobacter* türleri ve diğer gram negatif nonfermentatif basiller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.*; 2008:2195-2201.
 21. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* a. *Int J Syst Bacteriol.* 1986;36(2):228-240. doi:10.1099/00207713-36-2-228.
 22. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 138(5):569-578. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3440090>. Accessed January 26, 2015.

23. Lim YM, Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):902-905. doi:10.1128/JCM.01573-06.
24. Horrevorts A, Bergman K, Kollée L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1567-1572. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=228217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 13, 2015.
25. Goel V, Kapil A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane Proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiol.* 2001;1(1):16. doi:10.1186/1471-2180-1-16.
26. García-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, et al. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin Infect Dis.* 2001;33(7):939-946. doi:10.1086/322584.
27. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2819-2825. <http://jcm.asm.org/content/35/11/2819.short>. Accessed January 17, 2015.
28. Erişkinlerde Hastane Kökenli Pnömoni Tanı ve Tedavi Uzlaşı Rehberi. *Türk Toraks Derg.* 2009;10(6).
29. Aksaray N, Özlem Ö. *Acinetobacter* Infections and Treatment. *J Pediatr Inf.* 2013;7:000-000. doi:10.5152/ced.2013.38.

30. Cisneros JM, Rodríguez-Banño J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(11):687-693.
31. Chen S-F, Chang W-N, Lu C-H, et al. Adult *Acinetobacter meningitis* and its comparison with non-*Acinetobacter* gram-negative bacterial meningitis. *Acta Neurol Taiwan.* 2005;14(3):131-137. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16252615>. Accessed February 13, 2015.
32. Chen H-P, Lai C-H, Chan Y-J, et al. Clinical significance of *Acinetobacter* species isolated from cerebrospinal fluid. *Scand J Infect Dis.* 2005;37(9):669-675. doi:10.1080/00365540510044076.
33. Petersen K, Cannegieter SC, van der Reijden TJ, et al. Diversity and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection at a military medical center. *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):159-166. doi:10.1128/JCM.00766-10.
34. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(1):197-199. doi:10.1093/jac/dkm181.
35. Kempf M, Rolain J-M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(2):105-114. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004.
36. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care.* 2006;10(2):R48. doi:10.1186/cc4869.

37. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect.* 2009;73(4):355-363. doi:10.1016/j.jhin.2009.03.032.
38. Williams JD. Beta-Lactamase Inhibition and In Vitro Activity of Sulbactam and Sulbactam/Cefoperazone. *Clin Infect Dis.* 1997;24(3):494-497. doi:10.1093/clinids/24.3.494.
39. Kurtoglu MG, Opus A, Kaya M, Kesli R, Guzelant A, Yuksekkaya S. Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Clinical Samples in an Education and Research Hospital (2008-2010). *ANKEM Derg.* 2011;25(1):35-41. doi:10.5222/ankem.2011.35.
40. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005;40(9):1333-1341. doi:10.1086/429323.
41. Öncü O. Kolistin : Endikasyon Ve Klinik Kullanımı. *Ankem Derg.* 2012;26(Ek 2):12-18.
42. Korten V, Söyletir G, Yalçın AN, et al. Karbapenemlerin Gram-Negatif Patojenlere Karşı In Vitro Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Değerlendirmesi : COMPACT Çalışması Türkiye Verisi * Comparative Evaluation of In Vitro Activities of Carbapenemes Against Gram-Negative Pathogens : Turkish Data of CO. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(2):197-209.
43. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, et al. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs.* 2007;67(7):1027-1052.
44. Shah PM. Parenteral carbapenems. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:175-180. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01868.x.
45. Erdil Z, Uyanik MH, Keleş DV, Hancı H, Gültekin E. E-Test Yöntemiyle Metallo-Beta-Laktamaz Varlığı Saptanan *Acinetobacter baumannii*

- Suşlarında Aminoglikozid Direncinin Araştırılması. *Ankem Derg.* 2014;28(1):20-25. doi:10.5222/ankem.2014.020.
46. Ermertcan S, Hoşgör M, Tünger O, Coşar G. Investigation of synergism of meropenem and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* strains isolated from intensive care unit infections. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(6):818-821. doi:10.1080/00365540110027222.
47. Stein GE, Craig WA. Tigecycline: a critical analysis. *Clin Infect Dis.* 2006;43(4):518-524. doi:10.1086/505494.
48. Taşova Y. Tetrasiçiklienden Tiçgesiçikliçne. *Ankem Derg.* 2010;24(Ek 2):36-44.
49. MacGowan AP. Tigecycline pharmacokinetic/pharmacodynamic update. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62 Suppl 1:11-16. doi:10.1093/jac/dkn242.
50. Vila J, Pachón J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13(16):2319-2336. doi:10.1517/14656566.2012.729820.
51. Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, et al. Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1165-1172. doi:10.1128/AAC.00367-09.
52. Bassetti M, Repetto E, Righi E, et al. Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(2):417-420. doi:10.1093/jac/dkm509.
53. Durante-Mangoni E, Signoriello G, Andini R, et al. Colistin and rifampicin compared with colistin alone for the treatment of serious infections due to extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a multicenter,

- randomized clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2013;57(3):349-358. doi:10.1093/cid/cit253.
54. Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis.* 2006;43 Suppl 2(Supplement_2):S95-S99. doi:10.1086/504486.
55. Tünay H, Demirdal T, Demirtürk N. Acinetobacter Enfeksiyonlarında Dirençle İlgili Değişen Tanımlamalar ve Dirençte Güncel Durum. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Derg.* 2012;42(4):123-126. doi:10.5222/TMCD.2012.123.
56. Öztürk ŞB, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul MB. Biyofilmler ve Yabancı Cisim İnfeksiyonları. *Klinik Derg.* 2008;21(3):79-86.
57. Gün İ, Ekinci FY. Biyofilmler, Yüzeydeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda.* 2009;34:165-173.
58. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules.* 2009;14:2535-2554. doi:10.3390/molecules14072535.
59. Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling.* 2003;19(2):139-150. doi:10.1080/0892701031000072190.
60. Padera RF. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(5):264-270. doi:10.1016/j.carpath.2006.04.008.
61. Altun HU, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg.* 2008;39:82-88.
62. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* 2014;37:119-127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858639>.

63. Rao RS, Karthika RU, Singh SP, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol.* 26(4):333-337. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18974485>. Accessed February 4, 2015.
64. De Breij A, Gaddy J, van der Meer J, et al. *CsuA/BABCDE*-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol.* 2009;160(3):213-218. doi:10.1016/j.resmic.2009.01.002.
65. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy J a., Actis L a. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology.* 2008;154:3398-3409. doi:10.1099/mic.0.2008/019471-0.
66. Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. The sensor kinase *BfmS* mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014;47:275-281. doi:10.1016/j.jmii.2012.12.004.
67. Öztürk R. Damar içi kataterlere bağlı enfeksiyonlar ve korunma. In: Doğanay M, Ünal S, eds. *Hastane Enfeksiyonları*. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara; 2003:489-517.
68. Öcal D, Dolapçı İ. Santral Venöz Kateter ile İlişkili Enfeksiyonlar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg.* 2012;42(1):1-9. doi:10.5222/TMCD.2012.001.
69. Hastane İnfeksiyonları ve Kontrolü Derneği. Damar İçi Kateter Enfeksiyonlarının Önlenme Kılavuzu. *Hastan Enfeksiyonları Derg.* 2005;9(Ek1):E3-E32.
70. Eggimann P, Pittet D. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(5):295-309. doi:10.1046/j.1469-0691.2002.00467.x.

71. Raad II, Luna M, Khalil SA, Costerton JW, Lam C, Bodey GP. The relationship between the thrombotic and infectious complications of central venous catheters. *JAMA*. 1994;271(13):1014-1016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8139059>. Accessed January 20, 2015.
72. Rosado V, Romanelli RMDC, Camargos PAM. Risk factors and preventive measures for catheter-related bloodstream infections. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(6):469-477. doi:10.2223/JPED.2134.
73. Girand HL. Antibiotic lock therapy for treatment of catheter-related bloodstream infections. 2014. <http://www.uptodate.com/contents/antibiotic-lock-therapy-for-treatment-of-catheter-related-bloodstream-infections>.
74. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. İzmir: Barış Yayınları; 2009.
75. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement.*; 2013.
76. Pantanella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T, Coltella L, Berlutti F. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods*. 2008;75(3):478-484. doi:10.1016/j.mimet.2008.07.027.
77. McQueary CN, Actis LA. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol*. 2011;49(2):243-250. doi:10.1007/s12275-011-0343-7.
78. Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun*. 2012;80:228-233. doi:10.1128/IAI.05913-11.
79. Estes R, Theusch J, Beck A, Pitrak D, Mullane KM. Activity of daptomycin with or without 25 percent ethanol compared to combinations of

- minocycline, EDTA, and 25 percent ethanol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1998-2000. doi:10.1128/AAC.01129-12.
80. Lee MY, Ko KS, Song JH, Peck KR. In vitro effectiveness of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections by *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(August):782-787. doi:10.1093/jac/dkm295.
81. Lee JY, Peck KR, Oh WS, Song JH. In vitro evaluation of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections caused by *Staphylococci*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(March):1110-1115. doi:10.1093/jac/dkl098.
82. Costa GFDM, Tognim MCB, Cardoso CL, Carrara-Marrone FE, Garcia LB. Preliminary evaluation of adherence on abiotic and cellular surfaces of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from catheter tips. *Braz J Infect Dis.* 2006;10:346-351. doi:10.1590/S1413-86702006000500009.
83. Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Zamin FR, Zinjarde SS, Chopade BA. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;62:328-338. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00818.x.
84. Dheepa M. Comparison of biofilm production and multiple drug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in South India. *Int J Pharm Biomed Sci.* 2011;2(4):103-107.
85. Hendiani S, Abdi-ali A, Mohammadi P. Comparison of two methods for quantification of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Biol J Microorg.* 2014;2(8):51-57.
86. Abdi-Ali A, Hendiani S, Mohammadi P, Gharavi S. Assessment of biofilm formation and resistance to imipenem and ciprofloxacin among clinical

- isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(1):1-5. doi:10.5812/jjm.8606.
87. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:276-278. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x.
 88. Prashanth K, Rao Rs, Karthika Ru, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26(4):333. doi:10.4103/0255-0857.43566.
 89. Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B, Bhattacharyya P. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian J Crit Care Med.* 2013;17(4):214-218. doi:10.4103/0972-5229.118416.
 90. 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(1):44-51. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x.
 91. Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, et al. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* 2014;13:460-476. doi:10.1021/pr400603f.
 92. Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, et al. Whole Transcriptome Analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. *PLoS One.* 2013;8(8):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0072968.
 93. Olson AL, Thompson RJ, Melander C, Cavanagh J. Chemical shift assignments and secondary structure prediction of the C-terminal domain of

the response regulator *BfmR* from *Acinetobacter baumannii*. *Biomol NMR Assign.* 2014;8:67-70. doi:10.1007/s12104-012-9454-2.

94. Beier D, Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(2):143-152. doi:10.1016/j.mib.2006.01.005.
95. Mermel LA, Allon M, Bouza E, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1-45. doi:10.1086/599376.
96. Poole C V, Carlton D, Bimbo L, Allon M. Treatment of catheter-related bacteraemia with an antibiotic lock protocol : effect of bacterial pathogen. *Nephrol Dial Transpl.* 2004;19(5):1237-1244. doi:10.1093/ndt/gfh041.
97. Donlan RM. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:133-161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453275>. Accessed February 9, 2015.
98. Funalleras G, Fernández-Hidalgo N, Borrego A, et al. Effectiveness of antibiotic-lock therapy for long-term catheter-related bacteremia due to gram-negative bacilli: A prospective observational study. *Clin Infect Dis.* 2011;53:129-132. doi:10.1093/cid/cir551.
99. Fernandez-Hidalgo N, Almirante B, Calleja R, et al. Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(6):1172-1180. doi:10.1093/jac/dkl103.
100. Souza Dias MB, Habert AB, Borrasca V, et al. Salvage of long-term central venous catheters during an outbreak of *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia* infections associated with contaminated

heparin catheter-lock solution. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(2):125-130. doi:10.1086/526440.

101. Farrag HA, Hosny AEMS, El A, Ali H, Hagra SAA. Elimination and Prevention of Microbial Colonization of Central Venous Catheters Using Antibiotic Lock Technique and Non- Leachable Form of Catheter Surface Incorporated Antibiotic by Gamma Radiation. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2014;9(1):28-37.
102. Ozbek B, Mataraci E. In vitro effectiveness of colistin, tigecycline and levofloxacin alone and combined with clarithromycin and/or heparin as lock solutions against embedded *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(November 2012):827-830. doi:10.1093/jac/dks472.
103. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1556-1558. doi:10.1128/AAC.00893-06.
104. Rijnders BJ, Van Wijngaerden E, Vandecasteele SJ, Stas M, Peetermans WE. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic lock: Randomized, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(1):90-94. doi:10.1093/jac/dkh488.
105. Beigi AA, Khansoltani S, Masoudpour H, Atapour AA. Influence of Intraluminal and Antibiotic-lock of Vancomycin on the Rate of Catheter Removal in the Patients with Permanent Hemodialysis Catheters. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 2010;21(1):54-58.
106. Bookstaver PB, Rokas KEE, Norris LB, Edwards JM, Sherertz RJ. Stability and compatibility of antimicrobial lock solutions. *Am J Health Syst Pharm.* 2013;70:2185-2198. doi:10.2146/ajhp120119.

107. Raad I, Hanna H, Jiang Y, et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(5):1656-1660. doi:10.1128/AAC.00350-06.
108. Sherertz RJ, Boger MS, Collins CA, Mason L, Raad II. Comparative in vitro efficacies of various catheter lock solutions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1865-1868. doi:10.1128/AAC.50.5.1865-1868.2006.

8. ÖZET

Acinetobacter baumannii, hastane salgınlara yol açan önemli bir nozokomiyal patojendir. Bu patojenlerin biyofilm oluşturması önemli bir virülans faktörüdür. Bu çalışmada, *A. baumannii* izolatlarında biyofilm oluşumu ve şiddeti ile ilgili genlerinin varlığı ile kateter ilişkili enfeksiyona sebep olan izolatlara in vitro olarak uygulanan antibiyotik kilit tedavi modellerinde etkin antibiyotiğin dozunun ve süresinin bulunması hedeflenmiştir. Bakteriyel izolatlar, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2012 - 2014 tarihleri arasında yatan hastaların kateter içi ve kateter dışı örneklerinden izole edildi. Mikrotitrasyon-plak yöntemi kullanılarak yapılan absorbans ölçümlerinde izolatların %16,6'sında zayıf biyofilm, %31,6'sında orta kuvvetli biyofilm, %51,6'sında kuvvetli biyofilm oluşumu saptandı. Biyofilm oluşumuna katkısı olduğu düşünülen *bap*, *bfmR* ve *csuE* genleri PZR yöntemi ile araştırıldı. Biyofilm oluşum şiddeti ile genler arasındaki ilişki incelendiğinde kuvvetli ve orta kuvvetli biyofilm yapan suşların 45 tanesinde (%90) *bap* geni varlığı, 48 tanesinde (%96) *bfmR* geni varlığı, 40 tanesinde (%80) *csuE* geni varlığı saptandı. Kateter ilişkili enfeksiyona neden olan iki izolatta uygulanan in vitro antibiyotik kilit tedavi modelinde kolistin ve tigesiklin tek başına ve bir izolatta da rifampisin ile kombine olarak kullanıldı. Çalışmadaki, tüm antibiyotik konsantrasyonlarında *A. baumannii* biyofilminin 3-5. günde ortadan kaldırıldığı, uygulanan kombinasyonlarda (kolistin-tigesiklin, kolistin-rifampisin, tigesiklin-rifampisin) ise kateterlerin 1-3. günde steril oldukları gösterildi. Kombinasyonlar, *A. baumannii* kolonizasyonun giderilmesinde antibiyotiklerin tek başına kullanıldığı konsantrasyonlardan daha etkili olarak saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, biyofilm, biyofilm ilişkili genler, kateter ilişkili enfeksiyon, antibiyotik kilit tedavi modeli, kolistin, rifampisin, tigesiklin

9. SUMMARY

Acinetobacter baumannii is a nosocomial pathogen which causes major hospital outbreaks. Biofilm production of these pathogens is an important virulence factor. This study aimed to determine the presence of genes related to biofilm formation and its severity in *A. baumannii* isolates and to investigate efficient antimicrobial agents, the optimal concentration and treatment duration for the antibiotic lock technique in catheter-related infections. Bacterial strains were isolated from the catheter-related and catheter-non related samples of the patients that were submitted to the Clinical Microbiology Laboratory of Gazi University Medical Faculty Hospital between 2012 and 2014. According to the absorbance measurements related to microtitration plate technique, 16,6% strains were weak, 31,6% were moderate and 51,6% were strong in terms of biofilm production. *bap*, *bfmR* and *csuE* genes that contribute to biofilm formation were analyzed by PCR method. When the relationship between the biofilm formation severity and genes were examined, strong and moderate biofilm forming strains of the 45 (90%) out of 60 isolates were found to have *bap* gene, 48 of them (96%) were *bfmR* gene, 40 of them (80%) were *csuE* gene. Colistin and tigecycline and combination of these antibiotics with ripampin were used in vitro antibiotic lock therapy model that applied to strains causing catheter-related infection in two isolates. In this study, all of the antibiotic treatments effectively removed *A. baumannii* biofilm within 3-5 days, though combinations (colistin-rifampin, colistin-tigecycline, tigecycline-rifampin) eradicated the biofilm 1-3 days. The combinations were significantly more effective in eliminating *A. baumannii* colonization in biofilms than each of the single antibiotics.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, biofilms, biofilm associated genes, catheter-related infection, antibiotic lock therapy model, colistin, rifampin, tigecycline

10. ÖZGEÇMİŞ

- Adı** : Sinem
- Soyadı** : Solmaz
- Doğum yeri ve Tarihi** : Kayseri 09.01.1983
- Eğitimi** : 2009-2015 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
2001-2007 Erciyes Tıp Fakültesi, Kayseri
1994-2001 Küçükçalık Anadolu Lisesi,
Kayseri
1989-1994 Ahmet Paşa İlkokulu, Kayseri
- Yabancı Dil** : İngilizce
- Üye olduğu Bilimsel Kuruluşlar** : Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği