

Çok İlaça Dirençli İnvaziv *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Biyofilm ve Biyofilm İlişkili Virülans Genlerinin Varlığı

Existence of Biofilm and Biofilm-Associated Virulence Genes in Multi-Drug Resistant Invasive *Acinetobacter baumannii* Isolates

Özge ALTINOK^{1,2}(ID), Barış BORAL³(ID), Alper ERGİN⁴(ID),
Özgen KÖSEOĞLU ESER¹(ID)

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Istanbul Aydın University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

³ Adana Şehir Hastanesi, İmmünoloji Bölümü, Adana.

³ Adana City Hospital, Department of Immunology, Adana, Turkey.

⁴ Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Ankara.

⁴ Hacettepe University School of Health Services, Medical Laboratory Programme, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: THD-2015-7672).

** Bu çalışma, birinci yazarın Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans tez çalışmasıdır.

Makale Atfı: Altınok Ö, Boral B, Ergin A, Köseoğlu Eser Ö. Çok ilaca dirençli invaziv *Acinetobacter baumannii* izolatlarında biyofilm ve biyofilm ilişkili virülans genlerinin varlığı. Mikrobiyol Bul 2020;54(1):40-49.

ÖZ

Acinetobacter baumannii, hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan çok ilaca dirençli (ÇİD) gram-negatif bir patojendir. *A.baumannii*'ye bağlı gelişen hastane kaynaklı enfeksiyonlar özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda ortaya çıkmaktadır. Bu etkene bağlı önemli enfeksiyonlar pnömoni, bakteriyemi, endokardit, deri ve yumuşak doku, idrar yolu enfeksiyonları ve menenjitlerdir. İnsanlara bulaş genellikle hastane ortamı veya sağlık personeli aracılığıyla olmaktadır. *A.baumannii*'de virülans, bakterinin antibiyotiklere çoklu direnç göstermesinin yanı sıra biyofilm oluşturma yeteneğiyle de artış göstermektedir. *A.baumannii* izolatlarının biyofilm oluşturmada farklı proteinleri kodlayan genlerin [kıvrık lif proteini "curli fiber" geni (*csaA*), "chaperon-ushe" fimbriya geni (*csuE*) ve dış membran protein geni (*ompA*)] önem taşıdığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, ÇİD invaziv *A.baumannii* izolatlarında biyofilm yapımı ve virülans genlerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, ÇİD oldukları ve benzerlik durumları PFGE yöntemiyle daha önceden belirlenmiş invaziv *A.baumannii* izolatları (n= 156) dahil edilmiştir. Biyofilm yapımı, kantitatif mikropalak biyofilm yöntemiyle belirlenmiştir. Virülans genleri olan *csaA*, *csuE*, *fimH*, *ompA* ve *bla*_{PER-1} varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Tüm izolatların %60.3 (94/156)'ünün biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Bu 94 izolatın 17'si zayıf, 33'ü orta, 44'ü kuvvetli biyofilm oluşturma yeteneğinde bulunmuştur. İzolatların ortalama biyokütle oluşturma kapasitesinin 2.23 ± 0.0033 olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatlar arasında (n= 156) *csaA*, *csuE*, *ompA*, *fimH*

İletişim (Correspondence): Öğr. Gör. Özge Altınok, İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. Tel (Phone): 444 1428/52752, E-posta (E-mail): ozgealtinok@aydin.edu.tr

ve *bla*_{PER-1} genleri sırasıyla %71.2, %32.1, %21.8, %7.1 ve %3.2'sinde saptanmıştır. Biyofilm yapımı gösteren izolatlar arasında *csgA*, *ompA*, *csuE*, *fimH* virülans genlerinin sıklığı ise sırasıyla; %41.5, %24.5, %20.2 ve %5.3 olarak tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan izolatların PFGE pulsotiplerine göre en sık olarak pulsotip II %19.1 (18/94), pulsotip IX %17.0 (16/94) ve pulsotip VI %12.8 (12/94) içerisinde yer aldıkları saptanmıştır. Bu çalışmada, zayıf, orta ve güçlü biyofilm yapan izolatlarda virülans genlerinin dağılımı karşılaştırıldığında, çalışılan bütün genlerin güçlü ve orta pozitif biyofilm varlığı olan izolatlarda daha fazla sayıda olduğu saptanmıştır. Bu durum, sırasıyla *csgA*, *csuE* ve *ompA* gen varlıklarının izolatlardaki biyofilm oluşumunda katkılarının olduğunu, *fimH* geninin ise biyofilm yapımıyla ilişkili olmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*; biyofilm; virülans genleri; polimeraz zincir reaksiyonu.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a multi-drug resistant (MDR) gram-negative pathogen leading to nosocomial infections. Hospital-acquired infections due to *A.baumannii* occur especially in patients hospitalized in intensive care units. Important infections related to this bacterium are pneumonia, bacteremia, endocarditis, skin and soft tissue, urinary tract infections and meningitis. Human transmission is usually through the hospital environment or through medical personnel. *A.baumannii* isolates increases their virulence not only being multiple resistance to antibiotics but as well as the ability to form biofilm. The biofilm formation of *A.baumannii* isolates were mostly related with genes encoding curli fiber (*csgA*), the chaperone-usher fimbria (*csuE*) and the outer membrane (*ompA*). The aim of this study was to demonstrate biofilm production and virulence genes in MDR invasive *A.baumannii* isolates. MDR and similarity status previously known invasive *A.baumannii* (n= 156) isolates were included in the study. Biofilm production was determined by quantitative microplate biofilm method. Virulence genes *csgA*, *csuE*, *fimH*, *ompA* and *bla*_{PER-1} were investigated by polymerase chain reaction (PCR). It was determined that 60.3% (94/156) of all the isolates formed biofilm. Of these 94 isolates, 17 were weak, 33 were medium and 44 were strong. The mean biomass forming capacity of the isolates was found to be 2.23 ± 0.0033. Among the isolates included in the study (n= 156) the frequency of *csgA*, *csuE*, *ompA*, *fimH* and *bla*_{PER-1} genes were 71.2%, 32.1%, 21.8%, 7.1% and 3.2% respectively. The frequency of *csgA*, *ompA*, *bap*, *csuE*, *fimH* virulence genes were found to be 41.5%, 24.5%, 20.2% and 5.3% among biofilm positive isolates respectively. Biofilm-forming isolates were most commonly found in pulsotype II 19.1% (18/94), pulsotype IX 17.0% (16/94) and pulsotype VI 12.8% (12/94). In this study, when the distribution of virulence genes were compared with the isolates that have weak, medium and strong biofilm, all of the studied genes were found to be more abundant in isolates with strong and medium positive biofilm production. This has shown that excluding *imH* gene, *csgA*, *csuE* and *ompA* genes have contributed to the biofilm formation in invasive *A.baumannii* isolates, respectively.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; biofilm; virulence genes; polymerase chain reaction.

GİRİŞ

Acinetobacter baumannii, çok ilaca dirençli (ÇİD) olması nedeniyle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda tedavide önemli sorunlara yol açan ve sık izole edilen patojenler arasında yer almaktadır. *A.baumannii*, pnömoni, bakteriyemi, endokardit, deri ve yumuşak doku, idrar yolu ve menenjit gibi enfeksiyonlara yol açmaktadır. İnsanlara bulaş genellikle hastane ortamı veya sağlık personeli aracılığıyla olmaktadır¹⁻³.

Hastane kaynaklı pnömoni *A.baumannii* enfeksiyonlarının en önemli klinik tablosudur. Enfeksiyon, sıklıkla mekanik ventilasyon uygulanan yoğun bakım hastalarında ortaya çıkmaktadır. Yoğun bakım hastalarında sık görülen başka bir enfeksiyon ise, *A.baumannii*'ye bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır. Bu enfeksiyonların gelişmesinde rol oynayan risk

faktörleri arasında; immünsupresyon, solunum yetmezliğine bağlı ventilatör kullanımı, uzun süreli antibiyotik kullanımı, *A.baumannii* ile kolonizasyon ve invaziv girişimler bulunmaktadır²⁻⁵.

A.baumannii'ye bağlı enfeksiyonların artışı ile ortaya çıkan klinik önemine rağmen, bakterinin patogeneğinde rol oynayan faktörler hakkında çok az bilgi bulunmaktadır⁵. *A.baumannii* hastane ortamında bulunan yüzeylerde, tıbbi cihazlar üzerinde uzun süre canlı kalabilme potansiyeline sahiptir. *A.baumannii*'nin özellikle kateter ve solunum cihazlarına kontaminasyonu sonucu hastane ortamında uzun süre hayatta kalabilme yeteneği göstermesi biyofilm yapımına ve çoklu ilaç direncine bağlıdır³.

A.baumannii'nin cansız yüzeylerde biyofilm oluşturması ile antibiyotiklere dirençli fenotiplerde biyofilm ilişkili genlerin sıklığı arasındaki bağlantı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. *A.baumannii* ATCC 19606 suşunda pilus yapımına neden olan *CsuA/BABCDE* operonunun yüzeye tutunma ve biyofilm yapımı için gerekli olduğu gösterilmiştir. Başka bir operon olan poli N-asetil glukozamin (*pgaABC*)'in de biyofilm yapımında rolü olduğu saptanmıştır⁶. *A.baumannii*'nin canlı yüzeylere tutunması ve biyofilm oluşturmasıyla ilgili bilgiler sınırlı sayıdadır. Bakteri, insan epitel hücrelerine ve *Candida albicans* filamentlerine dış membran protein A (*ompA*)'nın yardımıyla tutunmaktadır⁷.

A.baumannii'nin yüzeye tutunma ve biyofilm oluşturma mekanizması çok geniş hücrel ve çevresel etkenlere bağlıdır. Biyofilm ile ilişkili protein (*bap*), dış zar proteini A (*ompA*), *bla*_{PER-1}, *CsuA/BABCDE* chaperone-usher pili montaj sistemi ve demir alma mekanizmalarının, *A.baumannii* izolatlarında biyofilm oluşumu ile bağlantılı olduğu ve ayrıca *ompA* ve *bla*_{PER-1}'in bakterilerin epitelyal hücrelere ve abiyotik yüzeylere bağlanmasından da sorumlu olduğu gösterilmiştir³.

Bu çalışmada, ÇİD invaziv *A.baumannii* izolatlarında biyofilm yapımının ortaya konulması, bakterinin virülans genleri ile biyofilm yapımı arasındaki ilişkinin gösterilmesi ve antibiyotiklere direnç gelişimi ile biyofilm yapımı arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatları

Bu çalışmaya, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde yer alan toplam 10 merkezden elde edilen ÇİD oldukları ve benzerlik durumları PFGE yöntemiyle daha önceden belirlenmiş invaziv *A.baumannii* izolatları (n= 156) dahil edildi⁸. Bu izolatlar kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve özellikle cerrahi yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon tanısı ile tedavi edilen hastaların invaziv örneklerinden elde edildi. Çalışmaya dahil edilen izolatlar daha önce konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış ve *bla*_{OXA-51} gen varlığı yönünden incelenerek tür düzeyinde tanımlamaları doğrulanmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları daha önce "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" rehberinin önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon ve antibiyotik gradiyent test yöntemleriyle belirlenmiştir.

Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Biyofilm oluşumunu değerlendirmek amacıyla Badave ve Dhananjay tarafından geliştirilen mikropalak yöntemi kullanıldı⁹. Bu amaçla; 180 µl triptik soy buyyon (TSB), steril 96 kuyucuklu polistiren mikropalalara dağıtıldı. Üzerlerine 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 20 µl ilave edildi ve 18-20 saat 35°C'de inkübe edildi. Kuyucuklar, 24 saatlik inkübasyon sonunda 200 µl fosfat tampon çözeltisi (PBS) eklenerek üç kez yıkandı, takiben plaklar ters çevrilerek kurutuldu. Kuruyan plaklardaki kuyucuklara 200 µl metanol ilave edildi. Metanol, plaklar oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 20 µl %1 kristal viyole eklenerek 15 dakika boyandı. Kuyucuklar, musluk suyunda durulandı ve 15 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Son olarak, kuyucuklara 100 µl %95'lik etanol ilave edildi. Mikropalaklar spektrofotometrede 15 dakika içinde okutulurak 620 nm'de optik dansite (OD) belirlendi. Her deney üç kez tekrarlandı ve ortalama OD tespit edildi. *A.baumannii* ATCC 19606 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Biyofilm oluşumu aşağıdaki formüle göre zayıf, orta ve güçlü olarak sınıflandırıldı. Biyofilm oluşumu negatif; OD (izolat) ≤ OD (negatif kontrol), zayıf biyofilm oluşumu; OD (negatif kontrol) < OD (izolat) < 2 x OD (negatif kontrol), orta biyofilm oluşumu; 2 x OD (negatif kontrol) < OD (izolat) < 4 x OD (negatif kontrol) ve güçlü biyofilm oluşumu; OD (izolat) > 4 x OD (negatif kontrol) olarak kabul edildi.

Virülans Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi

DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemiyle yapıldı. Kanlı ağara tek koloni ekim yöntemiyle ekilen bakterilerin 18-24 saatlik inkübasyonu sonunda, bakteri kültüründen tek koloni alındı. Mueller Hinton Buyyonda inkübe edilen bakteri ardından, 15 dakika 3000 xg'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı döküldü. Çökelti üzerine 1 ml Tris/EDTA (TE) çözeltisi eklenerek vortekslenildi ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. En son yıkamadan sonra çökelti üzerine 100 µl TE tamponu eklendi ve tüpler ısı bloğuna konarak 15 dakika 100°C'de bekletildi. Mikrosantrifüjde 12.000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi. Üst sıvı, çökeltiye dokunmadan yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne alındı ve elde edilen DNA moleküler testlerin uygulanması aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

Patojenite genlerinin varlığının araştırılmasında, virülans genlerine ait primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir. PCR karışımı 25 µl hacimde; Taq DNA tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP karışım, 30 pmol (her biri) primer ve 1 U Taq polimeraz 2 µl DNA olacak şekilde hazırlandı. DNA amplifikasyonu ısı döngü cihazı (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon, ilk denatürasyon 94°C'de 10 dakika gerçekleştirildikten sonra; 35 döngü denatürasyon 94°C'de 30 saniye, primer birleşmesi *bla*_{Omp-A} için 52°C'de, *bla*_{CSUE} için 63°C'de, *bla*_{CSGAM} için 48°C'de, *bla*_{FimH} için 48°C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika olacak şekilde uygulandı. Amplifikasyonun sonunda 72°C'de 10 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırıldı. PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Moleküler ağırlık belirteci olarak 100 bp DNA ladder kullanıldı.

Tablo I. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri

| Gen | Primer dizisi | Baz çifti (bp) | Kaynak |
|----------------------------|--|----------------|--------|
| <i>csgA</i> | F-5'-ACT CTG ACT TGA CTA TTA CC-3' R-5'-AGA TGC AGT CTG GTC AAC-3' | 200 | 10 |
| <i>csuE</i> | F-5'-ATG CAT GTT CTC TGG ACT GAT GTT GAC-3' R-5'-CGA CTT GTA CCG TGA CCG TAT CTT GAT AAG-3' | 976 | 11 |
| <i>fimH</i> | F-5'-TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG-3' R-5'-GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA-3' | 508 | 12 |
| <i>ompA</i> | F-5'-CAA TTG TTA TCT CTG GAC-3' R-5'-ACC TTG AGT AGA CAA ACG A-3' | 966 | 13 |
| <i>bla_{PER-1}</i> | F-5'-ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC-3' R-5'-AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA-3' | 925 | 14 |

BULGULAR

Tüm izolatların %60.3 (94/156)'ünün biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşturan 94 izolatın 17'sinin zayıf, 33'ünün orta, 44'ünün güçlü biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu bulunmuştur. *A.baumannii* izolatlarında biyofilm yapım düzeyine göre dağılım Tablo II'de gösterilmiştir.

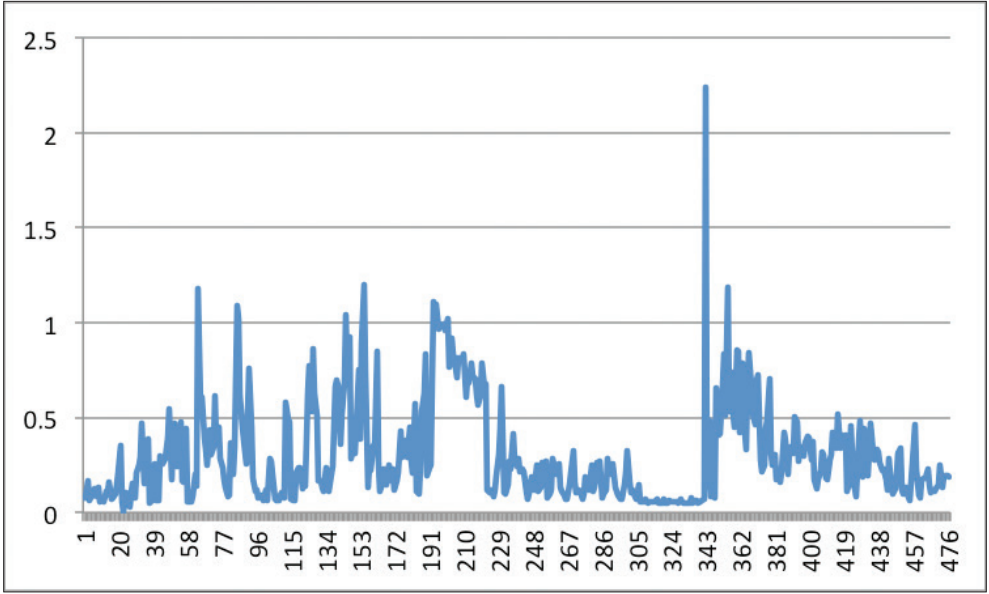
Yapılan test işlemleri sırasında elde edilen negatif/pozitif kontrollerin ve izolatların üç kez okuma sonrası elde edilen OD sonuçlarının ortalamalarına göre, ortalama biyofilm biyokütle oluşturma kapasitesinin 2.23 ± 0.0033 olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).

Çalışmaya dahil edilen izolatlar arasında (n= 156) *csgA*, *csuE*, *ompA*, *fimH* ve *bla_{PER-1}* genleri sırasıyla %71.2 (n= 111), %32.1 (n= 50), %21.8 (n= 34), %7.1 (n= 11) ve %3.2 (n= 5)'sinde saptanmıştır.

Biyofilm varlığı saptanan 94 izolatın 79 (%84.0)'unda virülans geni varlığı saptanmıştır. Biyofilm yapımı gösteren izolatlar arasında *csgA*, *ompA*, *csuE*, *fimH* virülans genlerinin sıklığı ise sırasıyla; %41.5 (n= 39), %24.5 (n= 23), %20.2 (n= 19) ve %5.3 (n= 5) olarak tespit edilmiştir. *A.baumannii* izolatlarındaki virülans genleri ile biyofilm yapım düzeyi arasındaki ilişki Tablo III'te gösterilmiştir.

Tablo II. *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Biyofilm Yapım Düzeyine Göre Dağılım

| Biyofilm yapım düzeyi | Sayı |
|-----------------------|------|
| Güçlü pozitif | 44 |
| Orta pozitif | 33 |
| Zayıf pozitif | 17 |
| Negatif | 62 |
| Toplam | 156 |



Şekil 1. OD620'de biyofilm biyokütle dağılımı (2.23 ± 0.0033).

Tablo III. *Acinetobacter baumannii* İzolatlarındaki Virülans Genleri ile Biyofilm Yapım Düzeyi Arasındaki İlişki

| Gen tipi | Biyofilm güçlü (+) | Biyofilm orta (+) | Biyofilm zayıf (+) | Toplam (n) |
|-------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------|
| <i>csgA</i> | 16 | 15 | 8 | 39 |
| <i>ompA</i> | 8 | 5 | 10 | 23 |
| <i>csuE</i> | 14 | 4 | 1 | 19 |
| <i>fimH</i> | 3 | 2 | - | 5 |

A.baumannii izolatlarının elde edildiği on farklı merkeze göre değerlendirme yapıldığında, biyofilm oluşumu gözlenen izolatların %22.3 (21/94)'ünün tek bir merkezden olduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşturan izolatların PFGE pulsotiplerine göre en sık pulsotip II %19.1 (18/94), pulsotip IX %17.0 (16/94) ve pulsotip VI %12.8 (12/94)'de yer aldığı saptanmıştır. Pulsotip II içinde güçlü biyofilm üreten (n= 11) ve kandan elde edilen (n= 12) izolatlar daha fazla bulunmuştur. Pulsotip IX içinde yer alan 16 izolatın büyük çoğunluğu kan izolatu (n= 13) olarak belirlenirken bunların büyük çoğunluğunun (n= 9) orta düzeyde biyofilm yapımı gösterdiği saptanmıştır. Pulsotip VI içinde yer alan 12 izolatın çoğunluğunun (n= 7) yine orta düzey biyofilm ürettiği ve hepsinin kan izolatu (n= 12) olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

A.baumannii'nin idrar kateteri, santral venöz kateter, endotrakeal tüp gibi tıbbi aletlerin yüzeyinde kolonizasyonuna bağlı olarak, bakterinin abiyotik yüzeylerde üremesi sonucu

nozokomiyal enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir¹⁵. Bakterilerin biyofilm oluşturma kapasitelerinin gösterildiği çalışmalar, genellikle kateter ilişkili enfeksiyonlara neden olan izolatlar üzerinde yapılmıştır. Çalışmamızda farklı bir bakış açısıyla, ÇİD oldukları kanıtlanmış, 10 ayrı sağlık kuruluşundan elde edilerek PFGE ile klonal ilişkileri belirlenmiş invaziv *A.baumannii* izolatlarında biyofilm varlığı araştırılmıştır. *A.baumannii*'nin biyofilm yapımının araştırıldığı çalışmalarda mikrotitrasyon plak yöntemi, polistren tüp yöntemi gibi biyofilm tabakasının absorpsiyon ölçümü temeline dayanan farklı yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda kristal viyole ile boyama yapılan mikroplak yöntemi kullanılarak biyofilm varlığı izolatların yarısından fazlasında (%60.3; 94/156) tespit edilmiştir. Pozitif kontrol ve izolatların, üç kez tekrarlanan yöntem sonucu elde edilen OD ortalamalarına göre, ortalama biyofilm biyokütle oluşturma kapasitesinin 2.23 ± 0.0033 olduğu belirlenmiş ve standart izolata göre yapılan kıyaslamada invaziv izolatların standarda göre daha yüksek seviyede biyofilm oluşturdukları kanıtlanmıştır.

A.baumannii'nin 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*) gibi birçok sayıda araştırılması gereken gen bölgeleridir. Son yapılan çalışmalarda, *A.baumannii*'nin biyofilm oluşumu üzerine etkisi olan faktörler araştırılmıştır ancak klinik izolatlardaki biyofilm oluşumuna katkı sağlayan genlerin araştırılmasıyla ilgili veriler kısıtlıdır^{16,17}. Bu nedenle, çalışmamızda 156 adet *A.baumannii* klinik izolatında biyofilm oluşumuyla ilişkisini aradığımız *ompA*, *csuE*, *fimH* ve *csgA* genleri PCR yöntemiyle incelenmiştir. *A.baumannii*'de biyofilm varlığının antibakteriyel direnç ve dış ortamda uzun süre canlı kalabilmesinde rolü olduğu bilinmektedir. Biyofilm oluşturan bakterilerin morfolojik, metabolik ve fizyolojik olarak farklılıklar gösterdiği çeşitli araştırmalarda ortaya konmuştur. *Pseudomonas* türleri, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida* türleri başta olmak üzere mikroorganizmaların biyolojik ve diğer yüzeylere tutunmasının farklı mekanizmalarla gerçekleştiği bilinmektedir. Bakterilerin yüzeylere tutunmasında hücre motilitesi, bakteriyel ekzopolisakkarit sentezi, flajella ve pililer rol oynamaktadır. *A.baumannii*'nin yüzeylere tutunma mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır¹⁸. *A.baumannii*'nin plastik ve cam yüzeylerde biyofilm oluşturmada ekzopolisakkaritlerin rol aldığı gösterildiği bir araştırmada, bakterilerde flajella veya pili bulunmamasına rağmen, diğer bakteri türlerinde pili oluşumundan sorumlu olan *csuC* ve *csuE* gen lokusları ile büyük oranda benzerlik gösteren dizilimlerin varlığı ortaya konulmuştur¹⁸. *A.baumannii*'nin biyofilm oluşturmada 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, farklı pili-benzeri yapılar aracılığıyla biyotik ve abiyotik yüzeylerde yapışmayı gösterebilir¹⁸. Tomaras ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada¹⁹ *A.baumannii* ATCC 19606 izolatının, *CsuA/BABCDE* şaperon sistemi aracılığıyla üretilen pilusun abiyotik yüzeylere bakterinin tutunması için gerekli olduğu saptanmıştır. Çalışmada *CsuA/BABCDE* şaperon sisteminin bir parçası olan *csuE*'nin inaktive edilmesinin biyofilm olu-

şumunun yanı sıra pili üretiminin kaldırılmasına da neden olduğu sonucuna varılmıştır. Azizi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada²⁰ ise, biyofilm varlığı kanıtlanmış 65 ÇİD *A.baumannii* izolatının hepsinde *ompA* ve *csuE* genlerinin, 43 (%66)'ünde ise *bap* gen varlığının olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda biyofilm oluşumu saptanan izolatlarda *ompA* ve *csuE* gen bölgelerinin varlığı sırasıyla, %24.5 ve %20.2 olarak tespit edilmiştir.

Türkiye'de *A.baumannii* virülans faktörleriyle ilgili az sayıda yapılan çalışmada kullanılan yöntem farklılıkları nedeniyle karşılaştırma yapılması güç olmaktadır. Eraç ve arkadaşlarının ÇİD'li 65 *A.baumannii* izolatında virülans faktörlerini araştırdıkları çalışmada²¹, biyofilm oluşturma, siderofor üretimi, serum direnci, "twitching (seğirme)" ve "swarming (yayılma)" hareketleri ile efluks *pompA*sı varlığı fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır. İzolatların klonal yakınlıkları, ERIC-2 primeri kullanılarak PCR ile incelenmiş ve tespit edilen tüm klonlardan temsili birer izolat alınarak, toplam 16 bakteride virülansla ilişkili özellikler araştırılmıştır. Biyofilm oluşturma kapasitesi incelenen bu izolatlardan 12'sinin güçlü biyofilm üreticisi olduğu belirlenirken, siderofor üretimi saptanmamıştır. On altı izolatın ikisinin, serumun bakteriyel etkisine dirençli, birinin orta duyarlı, 13'ünün ise duyarlı olduğu bulunmuş, bir izolatta "twitching (seyirme)", yedi izolatta ise "swarming (yayılma)" hareketi gözlenmiştir. Çalışmamızda sözkonusu çalışmadan farklı olarak izolatların klonal yakınlıkları daha önceden PFGE yöntemiyle belirlenen izolatlar kullanılmış ve virülans genleri moleküler yöntemle gösterilmiştir. Pulsotiplere göre yapılan değerlendirmede biyofilm üreten 94 izolatın yarısının üç farklı pulstotip içinde yer alması dikkat çekicidir. Biyofilm oluşturan izolatlar en sık pulstotip II %19.1 (18/94) içinde yer almış olup bunlar Mersin, İstanbul ve Erzurum olmak üzere üç farklı merkeze ait kan (n= 11), bronkoalveoler lavaj (n= 4), plevral sıvı (n= 1) ve doku (n= 1) örneklerinden oluşmaktaydı. Pulstotip II içinde güçlü biyofilm üreten kan izolatları daha fazla bulunurken, pulstotip IX ve pulstotip VI içinde yer alan izolatların büyük çoğunluğunun orta düzey biyofilm üreten kan izolatu olduğu belirlenmiştir. Pulstotip VI, Ankara ve Kayseri'deki merkezlere ait izolatlar içerirken, pulstotip IX'un Ankara ve Mersin'deki merkezlere ait izolatları içerdiği görülmüştür.

Çalışmamızda, zayıf, orta ve güçlü biyofilm yapan izolatlarda virülans genlerinin dağılımı karşılaştırıldığında, çalışılan bütün genlerin güçlü ve orta pozitif biyofilm varlığı olan izolatlarda daha fazla sayıda olduğu saptanmıştır (Tablo II). Bu durum özellikle *csgA* ve *csuE* gen varlıklarının izolatlardaki biyofilm oluşumunda katkılarının olduğunu düşündürmektedir. İzolatların patojenite gen varlığına bağlı biyofilm oluşturma mekanizmaları daha ayrıntılı çalışmalarla mümkün olabilecektir.

Sonuç olarak, bu çalışmada ÇİD invaziv *A.baumannii* biyofilm yapan izolatlarda yüksek oranda virülans gen varlığının saptanması, bu izolatlarda virülans ile biyofilm yapımının ilişkili olabileceğini sırasıyla *csgA*, *ompA* ve *csuE* gen varlıklarının izolatlardaki biyofilm oluşumunda katkılarının olduğunu, *fimH* geninin ise biyofilm yapımıyla ilişkili olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızda ÇİD invaziv *A.baumannii* izolatlarında sıklıkla güçlü biyofilm yapımının olması ve beraberinde virülans gen varlığının yarıdan fazla izolatta saptanması bakterilerde

biyofilm yapımının antibiyotiklere dirençli hale gelmelerinde etkili olduğunu göstermektedir. Öte yandan, antibiyotiklere duyarlı noninvaziv izolatlarda *A.baumannii*'nin biyofilm yapımını ve virülans genlerinin varlığını tespit edecek ileri çalışmalar, bakterinin epidemik yayılımı için antibiyotiklere dirençli suşlarda biyofilm yapımına ve virülans genlerine ne derece gereksinim duyduğunu daha iyi açıklayacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Peleg AY, Seifert H, Peterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21(3):538-82.
2. Nemeç A, Krizova L, Maixnerova M, Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol 2011;162(4):393-404.
3. Bardbari AM, Arabestani MR, Karami M, Keramat F, Alikhani MY, Bagheri KP. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. Microb Pathog 2017;108:122-8.
4. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B. Factors influencing survival in patients with multi-drug-resistant *Acinetobacter* bacteraemia. Eur J Intern Med 2009;20(5):540-4.
5. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. J Infect Dev Ctries 2009;3(5):335-41.
6. Wright MS, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. Transcriptome remodelling of *Acinetobacter baumannii* during infection and treatment. MBio 2017;8(2):e02193-16.
7. Mohajeri P, Rezaei Z, Sharbati S, Rasi H, Rostami Z, Farahani A, et al. Frequency of adhesive virulence factors in carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples in west of Iran. Asian J Biol Sci 2014;7(4):158-64.
8. Boral B, Unaldi Ö, Ergin A, Durmaz R, Eser ÖK; Acinetobacter Study Group. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2019;18(1):19.
9. Badave GK, Dhananjay K. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: An emerging challenge. J Clin Diagn Res. 2015; 9(1):DC08-DC10.
10. Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004;99(8):839-44.
11. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2007;13(8):807-15.
12. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(4):999-1007.
13. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneron JM, Pachon J, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. Clin Microbiol Infect 2008;14(3):276-8.
14. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(8):2385-92.

15. Longo F, Verotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 2014;37:119-27.
16. Wright MS, Iovleva A, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. Genome dynamics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* during infection and treatment. *Genome Med* 2016;8(1):26.
17. Eze EC, Chenia HY, El Zowalaty ME. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect Drug Resist* 2018;11:2277-99.
18. Liu H, Wu YQ, Chen LP, Gao X, Huang HN, Qiu FL, et al. Biofilm-related genes: Analyses in multi-antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from mainland China. *Med Sci Monit* 2016; 22:1801-7.
19. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 2003;149(Pt 12):3473-84.
20. Azizi O, Shahcheraghi F, Salimizand H, Modarresi F, Shakibaie MR, Mansouri SH, et al. Molecular analysis and expression of *bap* gene in biofilm-forming multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Rep Biochem Mol Biol* 2016;5(1):62-72.
21. Eraç B, Yılmaz FF, Hoşgör Limoncu M, Öztürk İ, Aydemir Ş. Çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında virülans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014;48(1):70-81.