İnvaziv ve İnvaziv Olmayan *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Biyofilm Yapımı ve Virülans Genlerinin Varlığı

Biofilm Production and Presence of Virulence Genes in Invasive and Non-invasive *Acinetobacter baumannii* Isolates

Öznur GÜRPINAR¹ (iD), Alper ERGİN² (iD), Pınar ZARAKOLU³ (iD), Özgen KÖSEOĞLU ESER¹ (iD)

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

² Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara, Türkiye

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Makale atfı: Gürpınar Ö, Ergin A, Zarakolu P, Köseoğlu Eser Ö. İnvaziv ve invaziv olmayan *Acinetobacter baumannii* izolatlarında biyofilm yapımı ve virülans genlerinin varlığı. FLORA 2021;26(4):720-6.

ÖZ

Giriş: *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik direncinin gelişmesinde biyofilm yapımının yanı sıra birçok virülans geni de etkin role sahiptir. Bu çalışmada, enfeksiyon tanısı almış hastalardan elde edilen çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarında biyofilm yapımı ve biyofilm yapımında rol oynadığı düşünülen virülans genlerinin (*csuE* ve *ompA*) varlığını araştırmak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde yatan, invaziv/invaziv olmayan enfeksiyon tanısı almış hastalardan elde edilen çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarında yapılmıştır. Tür tanımlaması konvansiyonel yöntemler ve MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. Biyofilm yapımı, kantitatif mikropalak biyofilm yöntemi ile saptanmış ve virülans genleri olan *csuE* ve *ompA* varlığı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen toplam 100 izolat arasında yer alan invaziv *A. baumannii* klinik izolatları ($n=17$); kateter ($n=6$), kan ($n=5$), doku ($n=2$), nefrostomi ile alınan idrar ($n=1$), plevral sıvı ($n=1$), eklem sıvısı ($n=1$) ve safra ($n=1$) örneklerinden elde edilmiştir. İnvaziv olmayan izolatlar ($n=83$); derin trakeal aspirat (%53), püri (%16), balgam (%13) ve idrar (%1) örneklerinden elde edilmiştir. İzolatların 99'unda biyofilm varlığı gösterilmiştir. İzolatların 52'sinin güçlü, 31'inin orta ve 16'sının zayıf pozitif biyofilm üretimine sahip olduğu saptanmıştır. İncelenen virülans genlerinden *csuE*, izolatların 88'inde [invaziv olmayan ($n=73$), invaziv ($n=15$)], *ompA* geni ise 91'inde [invaziv olmayan ($n=76$), invaziv ($n=15$)] pozitif olarak tespit edilmiştir. Güçlü biyofilm yapımı gösteren 52 izolatın [invaziv olmayan ($n=40$), invaziv ($n=12$)] 47'sinde, orta biyofilm yapımı gösteren 31 izolatın [invaziv olmayan ($n=26$), invaziv ($n=5$)] 25'inde *csuE* ve *ompA* virülans gen varlığı saptanmıştır.

Sonuç: Biyofilm yapımı, invaziv *A. baumannii* izolatlarında olduğu gibi invaziv olmayan izolatlarda da yüksek oranda tespit edilmiştir. Biyofilm yapımı görülen izolatlarda, biyofilm yapımı ile pili oluşum sisteminin bir parçası olan *csuE* geni ve *ompA* dış membran porin proteinini kodlayan *ompA* geni arasında yüksek oranda ilişki saptanmıştır. *A. baumannii*, çok ilaca dirençli invaziv olmayan izolatlarda da yüksek biyofilm yapımı ve virülans genlerinin varlığı ile nozokomiyal enfeksiyonlarda tehdit oluşturmaya devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*; Biyofilm; Virülans genleri

ABSTRACT

Biofilm Production and Presence of Virulence Genes in Invasive and Non-invasive *Acinetobacter baumannii* IsolatesÖznur GÜRPINAR¹, Alper ERGİN², Pınar ZARAKOLU³, Özgen KÖSEOĞLU ESER¹¹Department of Medical Microbiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey² Hacettepe University Vocational School of Health Services, Ankara, Turkey³ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

Introduction: Biofilm production and as well as many virulence genes play an active role in the development of antibiotic resistance in *A. baumannii*. In this study, it was aimed to investigate biofilm production in multidrug-resistant *A. baumannii* isolates obtained from patients diagnosed with infection and the presence of the virulence genes (*csuE* and *ompA*) thought to play a role in biofilm production.

Materials and Methods: This study was conducted on multi-drug resistant *A. baumannii* isolates obtained from patients hospitalized in Hacettepe University Hospital and diagnosed as having invasive/non-invasive infection. The identification of the species was carried out by conventional methods and MALDI-TOF MS. Biofilm production was determined by quantitative microplate biofilm method and the presence of the virulence genes *csuE* and *ompA* was determined using polymerase chain reaction method.

Results: Among the 100 isolates included in this study, invasive *A. baumannii* clinical isolates ($n=17$) were determined from catheter ($n=6$), blood ($n=5$), tissue ($n=2$), nephrostomy urine specimen ($n=1$), pleural fluid ($n=1$), joint fluid ($n=1$) and bile ($n=1$) samples. Non-invasive isolates ($n=83$) were obtained from deep tracheal aspirate (53%), pus (16%), sputum (13%) and urine (1%) samples. The presence of biofilm was determined in 99 of the isolates. It was determined that 52 of the isolates had strong, 31 had medium and 16 had weak positive biofilm production. Of the virulence genes examined, *csuE* was positive in 88 [non-invasive ($n=73$), invasive ($n=15$)] and the *ompA* gene was positive in 91 [non-invasive ($n=76$), invasive ($n=15$)] of the isolates. The presence of *csuE* and *ompA* virulence genes were detected in 47 of 52 isolates [non-invasive ($n=40$), invasive ($n=12$)] with strong biofilm production and in 25 of 31 isolates with medium biofilm production [non-invasive ($n=26$), invasive ($n=5$)].

Conclusion: Biofilm production has been detected at a high rate in non-invasive isolates as well as in invasive *A. baumannii* isolates. In isolates with biofilm production, a high correlation was found between biofilm production and *csuE* gene which is a part of the pili formation system and *ompA* gene which encodes the *ompA* outer membrane porin protein. *A. baumannii* continues to pose a threat in nosocomial infections with high biofilm production and the presence of virulence genes in multidrug-resistant non-invasive isolates.

Key Words: *Acinetobacter baumannii*; Biofilm; Virulence genes

GİRİŞ

Acinetobacter baumannii, çok ilaca dirençli (MDR) hastane infeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biridir. *A. baumannii*'ye bağlı infeksiyonların artışına ve etkenin artan klinik önemi-ne rağmen patogenezinde rol oynayan faktörler hakkında az bilgi bulunmaktadır. *A. baumannii* hastane ortamında yaşamını sürdürebilme potansiyeline sahiptir ve hastane ortamında kullanılan eşyalar ve tıbbi aletler üzerinde yaşayabilmektedir. Bunlar arasında yer alan solunum cihazları ve kateterler, adezyon ve kolonize olma yeteneği nedeniyle, *A. baumannii*'ye bağlı ventilatör ilişkili pnömoni ve kan yolu infeksiyonlarının gelişiminde önemli bir role sahiptir^[1]. Mikrobiyal biyofilm, mikroorganizmanın canlı veya cansız bir yüzeye yapışması ve sonrasında bakterinin ürettiği hücre dışı polisakkarit matriks içerisinde üremesi sonucu

gelişen uzaklaştırılması zor mikroorganizma kümesidir. *A. baumannii*'nin tıbbi aletler üzerinde yaşayabilmesi ve antibiyotiklere dirençli olmasının başlıca nedeni, katı yüzeylerde biyofilm oluşturma kabiliyetidir^[2].

Çok ilaca dirençli *A. baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde biyofilm yapısının engellenmesi ve virülans faktörlerinin inhibisyonuna yönelik geliştirilen peptitler, yeni terapötik stratejiler arasında önemli unsurlar olarak yer almaktadır. Biyofilm yapabilen *A. baumannii* izolatları konağın bağışıklık mekanizmalarından kaçabilmekte, patojenin yaşam süresinin uzamasına bağlı olarak klinik ortamlarda bulaşıcılığın uzamasına neden olmaktadır. *A. baumannii*'nin cansız yüzeylerde biyofilm oluşturmaya neden olan bazı genetik yapılar bulunmaktadır. *A. baumannii* ATCC 19606 suşunda pilus yapımına yol açan *csuA/BABCDE* operonu, bakterinin yüze-

ye tutunması ve biyofilm yapımı için gerekli olduğu ve klinik izolatlarda çok yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. *csuE* geni *A. baumannii*'nin biyofilm oluşturmada görev alan önemli yapılardan birisidir. *csuE* geninin inaktivasyonu ile pili oluşumu ve biyofilm yapımı engellenmektedir. *A. baumannii*'nin konak hücreye tutunması, epitel hücre ölümü, erken apoptozis oluşumu, dendritik hücrelerde gecikmiş nekroz oluşumu ve dokulara invazyon gibi önemli role sahip olan *ompA* ise, *A. baumannii*'ye bağlı gelişen bakteriyemi ve nozokomiyal pnömonide mortaliteye etki eden en önemli virülans faktörüdür. Bu gen *A. baumannii*'nin biyofilm oluşturmada sağlamaktadır. Mutant *A. baumannii* izolatlarının biyofilm oluşturmada, *ompA* allelinin yeniden eklenmesiyle biyofilm oluşumunun tekrar başladığı gösterilmiştir^[3-5].

Bu çalışmada, invaziv ve invaziv olmayan enfeksiyonu olan hastalardan elde edilen çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarında biyofilm yapımı ve biyofilm yapımında rol oynadığı düşünülen virülans genlerinin (*csuE* ve *ompA*) varlığını araştırmak amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Hastalar ve Bakteri İzolatları

Ocak-Aralık 2016 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde yatan hastalardan elde edilen, otomatize yöntemle (MALDITOF-MS, Bruker Daltonics, Almanya) *A. baumannii* olarak tanımlanan ve konvansiyonel yöntemlerle (Gram boyama, oksidaz, TSI besiyeri) doğrulanan izolatlar (n= 100) çalışmaya alınmıştır. Antibiyotik duyarlılık mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmış ve The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirilmiştir^[6]. Amikasin, azitromisin, gentamisin, imipenem, meropenem, netilmisin, piperasilin, piperasilin+ta-zobaktam, sefepim, seftazidim, siprofloksasin, tigesiklin ve tobramisin duyarlılık sonucuna göre en az üç antibiyotik grubuna dirençli bulunan izolatlar çok ilaca dirençli olarak sınıflandırılmıştır^[7].

Biyofilm Yapımının Kantitatif Mikroplak Yöntemi ile Belirlenmesi

Biyofilm yapımının saptanması amacıyla kantitatif mikroplak biyofilm yöntemi uygulanmıştır^[8]. *A. baumannii* izolatları %0.25 glikoz içeren triptik soy buyyon içinde steril mikroplak kuyucuklarda

18-24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Serbest hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla mikroplak kuyucukları üç kez steril fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Metanol ile fiksasyon işlemi sonrasında metanolün uzaklaştırılması amacıyla mikroplaklar oda sıcaklığında 15 dakika ters çevrilerek bekletilmiştir. Takiben kuyucuklar, %1'lik kristal viyole ile oda sıcaklığında 20 dakika boyanmıştır. Mikroplakların yıkanmasının ardından kristal viyolenin çözünmesi için kuyucuklar %95'lik etanolde 20 dakika bekletilmiştir. Mikroplaklar 15 dakika içinde 620 nm'de kantitatif sonucun doğrulanması amacıyla üç kez okutularak optik dansite (OD) belirlenmiştir. Çalışmada, *A. baumannii* ATCC 19606 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Optik dansite sınır değeri (ODc), aşağıdaki formülde gösterildiği gibi, negatif kontrolün OD değeri ortalamasının üzerinde üç standart sapma (SD) olarak belirlenmiştir: ODc= negatif kontrolün ortalama OD'si + (3 x SD negatif kontrol). Sonuçlar optik dansitelerine göre; güçlü biyofilm oluşumu (4 x ODc <OD), orta düzeyde biyofilm oluşumu (2 x ODc <OD≤4 x ODc); zayıf biyofilm oluşumu (ODc <OD≤2 x ODc); ve biyofilm olmayan (OD≤ODc) olarak yorumlanmıştır.

Virülans Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi

İzolatların DNA ekstraksiyonu sonrasında *csuE* (976 bp) ve *ompA* (966 bp) virülans genlerinin varlığı referans primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile tespit edilmiştir^[9,10]. PZR 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 hazırlanmıştır. DNA amplifikasyonu ısı döngü cihazı (Global Genomics Partner, MyGenie96, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. İlk denatürasyon 94°C'de 10 dakika gerçekleştirildikten sonra amplifikasyon; 35 döngü denatürasyon 94°C'de 30 saniye, primer birleşmesi *csuE* için 63°C'de ve *ompA* için 52°C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. Amplifikasyonun sonunda 72°C'de 10 dakika son uzamanın ardından reaksiyon sonlandırılmıştır. PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Moleküler ağırlık belirteci olarak 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, ABD) kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics sürüm 23.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Nitel verilerde tanımlayıcı istatistikler olarak sayı ve yüzde değerleri kullanılmıştır. Nitel değişkenler arasındaki ilişkileri incelemek için Pearson ki-kare ya da tabloda beklenen frekansı 5'ten küçük göz olması durumunda Fisher'in kesin testi kullanılmıştır. P değeri 0.05'ten küçük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmaya, 62'si yoğun bakım, 38'i serviste yatan hastalardan enfeksiyon etkeni olarak saptanan *A. baumannii* izolatları (n= 100) dahil edilmiştir. İnvasiv *A. baumannii* klinik izolatları (n= 17); kateter (n= 6), kan (n= 5), doku (n= 2), nefrostomi ile alınan idrar (n= 1), plevral sıvı (n= 1), eklem sıvısı (n= 1) ve safra (n= 1) örneklerinden elde edilmiştir. İnvasiv olmayan izolatlar (n= 83); derin trakeal aspirat (%53), pü (16%), balgam (%13), idrar (%1) örneklerinden elde edilmiştir.

İnvasiv izolatların (n= 17) yarısından fazlasının 12 antibiyotiğe dirençli olduğu saptanmıştır. İnvasiv olmayan izolatların (n= 83) yarısından fazlasının 10 antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir. İnvasiv ve invaziv olmayan izolatlarda farklı antibiyotiklere karşı dirençli izolat sayısı Tablo 1'de gösterilmiştir.

İnvasiv ve invaziv olmayan izolatlar arasında antibiyotik direnç açısından istatistiksel olarak

AZT, NET ve TOB'da anlamlı farklılık bulunmuş ($p < 0.05$) ve bu antibiyotiklere direnç invaziv izolatlarda istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır.

İzolatların biyofilm yapımı açısından yapılan değerlendirmesinde, negatif kontrole göre yapılan ölçümde izolatların 99'unda biyofilm oluşumu kantitatif olarak gösterilmiştir. İzolatların 52'sinin güçlü pozitif, 31'inin orta pozitif ve 16'sının zayıf pozitif biyofilm oluşturduğu saptanmıştır.

İncelenen virülans genlerinden *csuE*, izolatların 88'inde [invaziv olmayan, s= 73 ve invaziv, s= 15], *ompA* geni ise 91'inde [invaziv olmayan, s= 76 ve invaziv, s= 15] pozitif olarak tespit edilmiştir. İnvasiv ve invaziv olmayan izolatlarda her iki gen açısından istatistiksel fark Fischer kesin testine göre anlamlı olarak saptanmamıştır.

Güçlü biyofilm yapımı gösteren 52 izolatın [invaziv olmayan, s= 40 ve invaziv s= 12] 47'sinde, orta biyofilm yapımı gösteren 31 izolatın [invaziv olmayan s= 26, invaziv s= 5] 25'inde *csuE* ve *ompA* virülans gen varlığı saptanmıştır. Biyofilm derecesine göre; güçlü biyofilm yapımı olan invaziv olmayan izolatlarda *csuE* gen varlığı daha fazla iken, zayıf biyofilm yapımı olan invaziv olmayan izolatlarda *ompA* gen varlığı daha fazla saptanmıştır. Biyofilm derecesine göre invaziv ve invaziv olmayan izolatlarda her iki gen açısından Fischer kesin testine göre istatistiksel fark anlamlı olarak saptanmamıştır. Biyofilm yapımı ile virülans genlerinin görülme sıklığı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. İnvasiv ve invaziv olmayan izolatlarda 13 farklı antibiyotiğe karşı dirençli izolat sayısı

İzolatlar (100)	AN	AZT	GEN	IMP	MER	NET	PIP	PIP+TAZ	FEP	CAZ	CIP	TIG	TOB
İnvasiv (n= 17)	8	17	13	15	16	16	17	16	16	16	16	1	13
İnvasiv Olmayan (n= 83)	39	66	58	67	63	60	76	70	72	72	73	5	36

AN: Amikasin, AZT: Azitromisin, GEN: Gentamisin, IMP: İmipenem, MER: Meropenem, NET: Netilmisin, PIP: Piperasilin, TAZ: Tazobaktam, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, TIG: Tigesiklin, TOB: Tobramisin.

Tablo 2. Biyofilm oluşumunun kantitatif dağılımı ile virülans gen ilişkisi

Virülans genleri	Güçlü Biyofilm Oluşumu (n= 52)		Orta Biyofilm Oluşumu (n= 31)		Zayıf Biyofilm Oluşumu (n= 16)	
	İnvasiv (n= 12)	İnvasiv olmayan (n= 40)	İnvasiv (n= 5)	İnvasiv olmayan (n= 26)	İnvasiv (n= 1)	İnvasiv olmayan (n= 15)
<i>csuE</i>	11	39	3	25	1	8
<i>ompA</i>	12	36	2	25	1	14

TARTIŞMA

Çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarının hastane ortamında yaşaması ve direnç kazanması, önemli bir nozokomiyal infeksiyon etkeni olmasını sağlamıştır. Bakterinin hastane ortamında infeksiyon etkeni olarak yüksek oranlarda ortaya çıkması, en önemli virülans faktörlerinden biri olan biyofilm yapımına bağlıdır.^[5] Dünya'da yapılan birçok çalışmada *A. baumannii* izolatlarında yüksek seviyede biyofilm yapımı tespit edilmiştir. Rosales-Reyes R ve arkadaşları^[11] nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak elde edilen *A. baumannii* izolatlarının %96.4'ünde (108/112) biyofilm varlığı göstermiştir. Amin M ve arkadaşları^[12], invaziv ve invaziv olmayan toplam 64 *A. baumannii* izolatının 55'inde biyofilm varlığını tespit etmiştir. Çalışmamızda, hastanede yatan hastalardan infeksiyon etkeni olarak elde edilen hem invaziv ve hem de invaziv olmayan *A. baumannii* izolatlarında biyofilm yapımının yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamındaki 100 izolatın 99'unda kantitatif mikropalak tekniği ile biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

Çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarında yeni tedavi seçenekleri azalmaktadır. Bu çalışma kapsamında yer alan invaziv ve invaziv olmayan izolatların her iki grupta yarısından fazlasının 10'dan fazla farklı antibiyotiğe dirençli olduğu saptanmıştır. Daha sıklıkla yoğun bakımda tedavi gören hastalardan elde edilen izolatlarda (%62) ise, biyofilm yapımı ile birlikte iki virülans geninin varlığı yüksek düzeyde saptanmıştır. Yoğun bakım ünitesi gibi invaziv girişimlerin arttığı ortamlarda hastalık etkeni olan *A. baumannii* izolatlarının biyofilm üretimi ile birlikte yüksek antibiyotik direnci de gösterdiği görülmektedir. Biyofilm üretimini baskılamaları açısından günümüzde birçok peptid versiyonu üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle insan katelisinlerinden LL-37'den geliştirilen peptit 148, sığır katelisinlerinden indolisidin ve Afrika peçeli kurbağasından elde edilen magainin-2 peptitlerinin, çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarının oluşturduğu biyofilm yapısını durdurma, parçalama sonucu antibiyofilm etki gösterdiği ve etkene bağlı infeksiyonların tedavisinde umut olabileceği gösterilmiştir^[13-15].

Zeighami H ve arkadaşlarının yoğun bakımda en az 48 saat kalmış ve semptomatik klinik infeksiyonu

olan hastalardan elde edilmiş kan, balgam, yara, idrar örneklerinde üremiş 100 adet *A. baumannii* ile yapmış oldukları çalışmada, izolatların %91'inin yaygın ilac dirençli olduğu, bütün izolatların örnek tipi fark etmeksizin biyofilm oluşturduğu (güçlü= 58, orta= 42) ve bütün izolatların en azından bir biyofilm ile ilişkili gen içerdiği (*csuE*= %100, *ompA*= %81) saptanmıştır^[16]. Boone RL ve arkadaşlarının *A. baumannii* izolatlarında virülans fenotiplerini irdeledikleri çalışmasında kandan elde edilen *A. baumannii* izolatlarının, balgam, yara, vb. örneklerden elde edilen izolatlardan daha fazla biyofilm oluşturdıkları gösterilmiştir^[17].

Dünyada yapılan birçok çalışmada, biyofilm yapımı ile bakteri virülansı arasında doğru bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bakterinin virülansında önemli rol oynayan *bap*, *csuE*, *ompA*, *pgaA*, *abai* gibi birçok genin varlığı, *A. baumannii*'nin biyofilm oluşturma kapasitesini artırmaktadır. Virülans genlerinin bazıları biyofilm oluşturmayan izolatlarda da gözlenmesine rağmen, söz konusu genlerin görülme sıklığı ve ekspresyonu biyofilm oluşturan izolatlarda daha yüksek tespit edilmiştir^[2,12]. Çalışmamızda *csuE* geni pili yapımı ve infeksiyon oluşturma basamağında önemli bir role sahip olması, *ompA* geni ise bakterideki biyofilm yapımını arttırması ve ilaç hedefi olması nedeniyle seçilmiştir. Çalışmamızda izolatların biyofilm düzeylerine göre *csuE* ve *ompA* gen varlıklarının invaziv ve invaziv olmayan izolatlarda sayısal açıdan çok farklılık göstermediği sadece invaziv olmayan zayıf pozitif biyofilm varlığı gösteren izolatlarda *ompA* gen varlığının *csuE*den belirgin olarak fazla olduğu izlenmiştir (Tablo 2). Çalışma izolatlarında genel olarak *ompA* gen varlığının daha yüksek oranda olduğu görülmüştür. Virülans genlerinin varlığı ile biyofilm yapımının ilişkisi incelendiği Shenkutie AM ve arkadaşlarının çalışmasında ise, incelenen *A. baumannii* izolatlarının yaklaşık %50'sinde biyofilm üretimi gözlenmemiş olmasına rağmen, bu izolatların hepsinde *csuE*, *adeFGH*, *ompA* ve *abai* gen varlıklarının olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, biyofilm ile ilişkili bu genlerin biyofilm oluşturan ve oluşturmayan izolatlarda ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması gerektiği belirtilmiştir^[18]. *OmpA*, konak epiteline adezyon, hücre çekirdeğine translokasyon sonucu hücrede sitotoksik etki ile hücre ölümüne ve serum

direncine neden olmaktadır^[19-21]. *OmpA*'nın bu özelliği dışında antimikrobiyal dirençle de ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda yer alan çok ilaca dirençli olan izolatlarda biyofilm yapımı ile birlikte *ompA*'nın yüksek düzeyde tespit edilmesi bu ilişkiyi destekler niteliktedir. *A. baumannii*'de *ompA*'nın aşırı yapımının özellikle nozokomiyal pnömoni ve bakteriyemilerde tek başına bağımsız risk faktörü olduğu bilinmektedir^[22]. *OmpA* ekspresyonunun kantitatif moleküler yöntemlerle hızlı tespiti, özellikle risk grubu yüksek hastalarda çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatlarının erken tanısı açısından kullanılmaya adaydır^[23]. Çalışmamızda yer alan izolatlarda biyofilm yapımıyla ilgili diğer genlerin ve varlıklarını gösterdiğimiz *csuE* ve *ompA* genlerinin ekspresyon mekanizmalarının çalışılmamış ve izolatlar arasındaki benzerlik analizinin yapılamamış olması çalışmadaki önemli kısıtlılıklar olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, biyofilm yapımı invaziv *A. baumannii* izolatlarında olduğu gibi invaziv olmayan izolatlarda da yüksek oranda tespit edilmiştir. Biyofilm yapımı görülen izolatlarda, biyofilm yapımı ile pili oluşum sisteminin bir parçası olan *csuE* geni ve *ompA* dış membran porin proteinini kodlayan *ompA* geni arasında yüksek oranda ilişki saptanmıştır. *A. baumannii*, çok ilaca dirençli invaziv olmayan izolatlarda da yüksek biyofilm yapımı ve virülans gen ekspresyonu ile nozokomiyal enfeksiyonlarda tehdit oluşturmaya devam ederken özellikle *ompA*, *A. baumannii* enfeksiyonlarında yeni bir terapötik hedef olarak çalışılmaya değer görünmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın istatistik analizleri için Prof. Dr. Erdem Karabulut'a teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş, 22.09.2020 tarih ve 16969557-1310 sayılı karar ile araştırma alanının etik kurullar kapsamı dışında kaldığı belirtilmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

YAZAR KATKISI

Anafikir/Planlama: ÖKE, ÖG

Analiz/Yorum: ÖKE, AE, ÖG

Veri sağlama: ÖKE, AE, ÖE, PZ

Yazım: AE, ÖE

Gözden Geçirme ve Düzeltme: ÖKE, AE, PZ

Onaylama: ÖKE, AE, PZ, ÖG

KAYNAKLAR

1. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:91-102.
2. Wang YC, Huang TW, Yang YS, Kuo SC, Chen CT, Liu CP, et al. Biofilm formation is not associated with worse outcome in *Acinetobacter baumannii* bacteraemic pneumonia. *Sci Rep* 2018;8:7289.
3. Yang CH, Su PW, Moi SH, Chuang LY. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype-phenotype correlation. *Molecules* 2019;24:1849.
4. Nie D, Hu Y, Chen Z, Li M, Hou Z, Luo X, et al. Outer membrane protein A (*OmpA*) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *J Biomed Sci* 2020;27:26.
5. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 2014;37:119-27.
6. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0, 2019.
7. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.
8. 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.
9. 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;13:807-15.
10. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneros JM, Pachón J, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:276-8.
11. Rosales-Reyes R, Gayosso-Vazquez C, Fernandez-Vazquez JL, Jarillo-Quijada MD, Rivera-Benítez C, Santos-Preciado JJ, et al. Virulence profiles and innate immune responses against highly lethal, multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in Mexico. *PLoS ONE* 2017;12:e0182899.

12. Amin M, Navidifar T, Shoostari FS, Rashno M, Savari M, Jahangirmehr F, et al. Association between biofilm formation, structure, and the expression levels of genes related to biofilm formation and biofilm-specific resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burn infection in Ahvaz, Iran. *Infect Drug Resist* 2019;12:3867-81.
13. de Breij A, Riool M, Cordfunke RA, Malanaovic N, de Boer L, Koning RI, et al. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. *Sci Transl Med* 2018;10:eaan4044.
14. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as tool for research and education. *Nucleic Acids Res* 2015;44:D1087-93.
15. Kim MK, Kang N, Ko SJ, Park J, Park E, Shin DW, et al. Antibacterial antibiofilm activity and mode of action of magainin 2 against drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Mol Sci* 2018;19:3041.
16. Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, Samedi E, Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis* 2019;19:629.
17. Boone RL, Whitehead B, Avery TM, Lu J, Francis JD, Guevara MA et al. Analysis of virulence phenotypes and antibiotic resistance in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated in Nashville, Tennessee. *BMC Microbiol* 2021;21.
18. Shenkutie AM, Yao MZ, Siu GK, Wong BKC, Leung PH. Biofilm-induced antibiotic resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Antibiotics (Basel)* 2020;9:817.
19. Sugawara E, Nikaido H. OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 2012;194:4089-96.
20. 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;77:3150-60.
21. Kim SW, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, Kim JM, et al. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* 2009;301:224-31.
22. Sanchez-Encinales V, Alvarez-Marin R, Pachon-Ibanez ME, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Garnacho-Montero J, et al. Overproduction of outer membrane protein a by *Acinetobacter baumannii* as a risk factor for nosocomial pneumonia, bacteremia, and mortality rate increase. *J Infect Dis* 2017;215:966-74.
23. Martin-Pena R, Dominguez-Herrera J, Pachon J, McConnell MJ. Rapid detection of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* using quantitative real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1572-5.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Özgen KÖSEOĞLU ESER
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Ankara-Türkiye
E-posta: eser.ozgen@gmail.com