Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Araştırılması*

Investigation of the Virulence Factors of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates

Bayrı ERAÇ¹, Fethiye Ferda YILMAZ¹, Mine HOŞGÖR LİMONCU¹, İsmail ÖZTÜRK¹, Şöhret AYDEMİR²

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Ege University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Izmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

* Bu çalışma, Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Fonu (No: 11/ECZ/013) tarafından desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 17.07.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 04.01.2014

ÖZET

Acinetobacter baumannii, ventilatörle ilişkili pnömoni, bakteriyemi, menenjit, üriner sistem ve yara enfeksiyonları gibi insan sağlığını tehdit eden önemli nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir. Çok ilaca dirençli (ÇİD) *A.baumannii* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır. Günümüze kadar *A.baumannii* izolatlarıyla yapılan çalışmaların çoğu antibiyotik direnci, tedavi protokolleri ve epidemiyolojik veriler üzerine odaklanmasına karşın, bu bakterinin virülans faktörleriyle ilgili çalışmaların sayısı azdır. Biyofilm oluşturma, serum direnci, hareket, efluks pompası ve demir kazanımı gibi özellikler, bakterinin olumsuz ortam koşullarında hayatta kalmasını ve enfeksiyon oluşturmalarını kolaylaştırmaktadır. Bu çalışmada, klinik önemi gittikçe artan ÇİD *A.baumannii* izolatlarının virülansı ile ilişkili temel özelliklerin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Aralık 2011-Mart 2012 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen, siprofloksasin-imipenem-trimetoprim/sülfametoksazole dirençli 65 *A.baumannii* suşu alınmıştır. İzolatların klonal yakınlıkları, "Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)" dizilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak PCR ile incelenmiştir. Her klondan bir temsilci seçilerek, bu suşlarda biyofilm oluşturma, siderofor üretimi, serum direnci, "twitching (seğirme)" ve "swarming (yayılma)" hareketleri ile efluks pompası varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya alınan ÇİD *A.baumannii* suşlarının yedi ana grup altında toplandığı, bu klonlardan en büyüğünün incelenen izolatların %86'sını kapsadığı belirlenmiştir. Alt gruplar da dahil olacak şekilde tüm klonlardan temsili birer suş alınarak, toplam 16 bakteride virülansla ilişkili özellikler araştırılmıştır. Biyofilm oluşturma kapasitesi incelenen bu suşlardan 12'sinin güçlü, üçünün orta, birinin ise zayıf biyofilm üreticisi olduğu belirlenirken, hiçbir suşta siderofor üretimi saptanamamış-

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Bayrı Eraç, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 311 4083, **E-posta (E-mail):** erac@yahoo.com

tır. On altı suştan ikisinin, serumun bakterisidal etkisine dirençli, birinin orta duyarlı, 13'ünün ise duyarlı olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda, sadece bir suшта "twitching", yedi suшта ise "swarming" hareketi gözlenmiştir. "Twitching" görülen izolatta aynı zamanda "swarming" de saptanmıştır. Siprofloksasin ile efluks pompası varlığı araştırılan 16 suştan hiçbirinde bu yönde bir bulguya rastlanmazken, doksisisikline dirençli beş suştan ikisinde efluks pompası tespit edilmiştir. İncelenen suşlarda, biyofilm oluşturma en yaygın gözlenen özellik olduğu, bunun yanı sıra serum direnci, "swarming" hareketi ve spektrumunda tetrasiklinleri içeren bir efluks pompasının da virülanla ilişkili özellikler arasında yer aldığı belirlenmiştir. Biyofilm oluşumuna tüm klonlarda, serum direncine ise sadece en baskın klonun temsilcilerinde rastlanmıştır. Hareket ve efluks pompası varlığı ise belirli bir klona özgü değildir. Hastanemizde olduğu gibi tüm dünyada nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olan ÇİD *A.baumannii* izolatlarının patojenitesinde rol oynayan özelliklerin ortaya konması, gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasında yol gösterici olacaktır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*; çoklu ilaç direnci; virülan faktörü.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an opportunistic human pathogen which causes life-threatening nosocomial infections such as ventilator-associated pneumonia, bacteremia, meningitis, urinary tract and wound infections. Treatment options are very limited for infections caused by multi-drug resistant (MDR) *A.baumannii* strains. Until recently, the majority of studies related to *A.baumannii* have focused on antibiotic resistance, treatment protocols and epidemiological data, however, there have been few studies addressing the virulence factors of this organism. The features such as biofilm formation, serum resistance, motility, efflux pumps and iron acquisition mechanisms help the bacterium to survive in adverse environmental conditions and facilitate the development of an infection. The aim of the present study was to investigate the basic characteristics that contribute to the virulence of clinically important MDR *A.baumannii* isolates. Sixty-five ciprofloxacin-imipenem-trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant *A.baumannii* strains isolated from various clinical specimens between December 2011 and March 2012 at Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology were included in the study. The clonal relationship of the isolates was analyzed by PCR using Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-2 primer. Biofilm formation, serum resistance, twitching and swarming motility, efflux pump and siderophore production were sought in representatives of each clone. Investigated MDR *A.baumannii* isolates were classified into seven main clusters, and the largest cluster included 86% of the strains. The virulence-associated features were investigated in 16 representative strains, including sub-groups. Twelve, three and one of the examined strains were determined to be strong, intermediate and weak biofilm producers, respectively. Siderophore production was not encountered in any of the isolates. Of the sixteen strains, two, one and thirteen isolates were found to be resistant, moderately susceptible and susceptible to bactericidal effect of serum, respectively. In our study, swarming motility was observed in seven strains while twitching motility was observed in only one strain. Swarming was simultaneously detected with twitching in one isolate. The presence of an efflux pump was investigated with ciprofloxacin in 16 representative strains but none of them were positive. However, efflux pump was determined in two of the five doxycycline resistant strains. Biofilm production was the most commonly observed characteristic among the examined strains. In addition, serum resistance, swarming and an efflux pump which has a spectrum including tetracyclines, were also determined among features associated with virulence. While the biofilm production was encountered at the members of all clones, serum resistance was found only in the representatives of the most dominant clone. Motility and the presence of an efflux pump were not associated with a particular clone. MDR *A.baumannii* strains are among the most important agents of nosocomial infections in our hospital and all over the world. Revealing the characteristics that play a role in the pathogenesis of these isolates, will contribute to infection control measures and to the investigation of new treatment options.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; multidrug-resistance; virulence factors.

GİRİŞ

Acinetobacter türleri, su, toprak, hayvan dokuları gibi çeşitli ortamlarda bulunmakta; nadiren de insan deri mikroflorasında yer alabilmektedir¹. *Acinetobacter baumannii* kompleks adı altında toplanan *A.baumannii*, *A.nosocomialis* ve *A.pitti* gibi yakın türler, genellikle tıbbi cihazlar, sağlık çalışanları ve hastalardan izole edilmekte olup, ventilatörle ilişkili pnömoni, bakteriyemi, menenjit, üriner sistem ve yara enfeksiyonları gibi insan sağlığını tehdit eden önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır^{1,2}. Bu nedenle *A.baumannii*, özellikle yoğun bakım ünitelerinde gelişen nozokomiyal enfeksiyonların önemli etkenlerinden biridir ve hem Türkiye’de hem dünyada önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir^{3,4}. Birçok ilaca doğal olarak dirençli olması ve kolaylıkla yeni direnç mekanizmaları kazanabilmesi, neden olduğu enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir¹. Çok ilaca dirençli (ÇİD) *A.baumannii* izolatlarının tedavisinde genellikle karbapenemler, amikasin, tigesiklin ve polimiksinler kullanılmakla birlikte, tüm bu ajanlara dirençli suşlar da görülebilmektedir^{5,6}.

Günümüze kadar *A.baumannii* izolatlarıyla yapılan çalışmaların çoğu antibiyotik direnci, tedavi protokolleri ve epidemiyolojik veriler üzerine odaklanmasına karşın, bu bakterinin virülans faktörleriyle ilgili çalışmalar kısıtlıdır^{1,7}. Şu ana kadar önemi kanıtlanmış moleküler virülans faktörleri arasında; dış membran proteini A (OmpA), lipopolisakkarit, polisakkarit kapsül, penisilin bağlayan protein-7/8, lipolitik enzimler, tip-I pili, asinetobaktin ve dış membran kesecikleri sayılabilmektedir^{1,8}. Tüm bu moleküler virülans faktörleri, biyofilm oluşturma, serum direnci, hareket ve demir kazanımı gibi patojenite açısından önemli süreçlerde rol alıp, bakterinin olumsuz ortam koşullarında hayatta kalmasını ve enfeksiyon oluşturmalarını kolaylaştırmaktadır^{1,2}. Bu çalışmada, klinik önemi gittikçe artan *A.baumannii* izolatlarının virülansı ile ilişkili temel özelliklerin araştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatları ve Klonal İlişki

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarında Aralık 2011-Mart 2012 tarihleri arasında izole edilen *Acinetobacter* türlerinin tanımlanmasında ve siprofloksasin, imipenem, meropenem, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT), sefepim, netilmisin, ampisilin-sulbaktam, sefaperazon-sulbaktam, tigesiklin ve kolistin duyarlılıklarının belirlenmesinde Vitek-2 (bio-Merieux, Fransa) sistemi kullanıldı. Çalışmaya, siprofloksasin, imipenem ve TMP-SXT’ye dirençli 65 *A.baumannii* suşu dahil edildi.

A.baumannii izolatlarının klonal yakınlıkları, “Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)” dizilerine özgü ERIC-2 primeri kullanılarak PCR ile araştırıldı⁹. Suşlar arasındaki ilişkiyi değerlendirebilmek amacıyla, bant paternlerinden yararlanılarak “Jaccard” katsayıları (S_j) hesaplandı¹⁰. Bu katsayılar kullanılarak, MEGA 4.0 yazılımıyla¹¹ “Unweighted Pair Group Match Average (UPGMA)” metoduna göre dendrogram oluş-

turuldu. $S_j < 0.8$ ise, iki suş klonal olarak farklı, $0.8 \leq S_j < 1.0$ ise klonal ilişkili, $S_j = 1.0$ ise aynı suş olarak kabul edildi. Daha sonra her klondan bir temsilci seçilerek, bu suşlarda aşağıda belirtilen virülans ile ilişkili faktörlerinin varlığı araştırıldı.

Biyofilm Oluşturma

Suşların biyofilm oluşturma kapasiteleri, Stepanovic ve arkadaşlarının¹² spektrofotometrik mikropalak yöntemi modifiye edilerek araştırıldı. Buna göre, 180 µl %0.25 glikoz eklenmiş triptik soy buyyon (TSB, Oxoid) besiyeri düz tabanlı mikropalaklar içerisine dağıtıldı; üzerine 20 µl 0.5 McFarland standardına göre ayarlanmış bakteri süspansiyonu eklenip, 18-20 saat 35°C’de inkübe edildi. Süre sonunda mikropalak steril fosfat tamponu ile yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklar üzerine, biyofilmin fiksasyonunu sağlamak amacıyla metanol ilave edildi, 20 dk sonra boşaltılıp ters çevrilerek oda sıcaklığında kurutuldu. Son olarak %0.1’lik kristal viyole çözeltisi ile 15 dk bekletilerek, oluşan biyofilmin boyanması sağlandı. Süre sonunda kuyucuklar musluk suyu ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Spektrofotometrede (VersaMax, Molecular Devices) ölçüm yapılmadan 30 dk önce kuyucuklara %95’lik etanol ilave edildi ve 570 nm’de okunan optik dansite değerlerine göre biyofilm oluşumu negatif, zayıf, orta ve güçlü olarak yorumlandı. Pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu kullanıldı.

Siderofor Üretimi

Düşük demir varlığında siderofor üretimi, Schwyn ve Neiland’ın¹³ kullandığı yöntem esas alınarak, Chrome Azurol-S (CAS) agarda fenotipik olarak araştırıldı. Besiyerinin mavi renginin turuncuya dönüşmesi, siderofor üretiminin göstergesi olarak değerlendirildi. Besiyerinin kalite kontrolü amacıyla doymuş 8-hidroksikinolin çözeltisi kullanıldı.

Serum Direnci

Suşların serum direnci, kobay serumu (Sigma, Almanya) kullanılarak, Bengé yöntemi¹⁴ ile belirlendi. Kontrol ekimleri ile karşılaştırıldığında üreme oranı %1’in altına düşen izolatlar seruma duyarlı, %90’ın üzerinde üreme gösterenler seruma dirençli, bu iki oran arasında üreme gösterenler ise seruma orta duyarlı olarak değerlendirildi.

Hareket

Suşların hareket özellikleri, Eijkelkamp ve arkadaşlarının¹⁵ kullandığı yöntemin modifiye edilmesiyle araştırıldı. Bu yöntemde “twitching (seğirme)” ve “swarming (yayılma)” hareketi için kullanılan Mueller-Hinton (Oxoid) ve Luria Bertani (Difco) besiyerlerine %1’lik trifeniltetrazolyum klorid (TTC) çözeltisi eklenerek, bakteri üremesinin olduğu bölgelerin daha kolay görülmesi sağlandı. Zon çapı > 10 mm olan izolatlar için “twitching”, zon çapı > 20 mm olan izolatlar için ise “swarming” hareketi pozitif olarak yorumlandı.

Efluks Pompası

Efluks pompası varlığı, seçilen suşlardan siprofloksasin ve/veya doksisikline dirençli bulunanlarda fenotipik olarak araştırıldı¹⁶. 25 µg/ml konsantrasyondaki 1-(1-naftilmetil)

piperazin (NMP) varlığında, siprofloksasin ve doksisisiklin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerindeki değişim incelendi. MİK değerlerinde en az dört katlık azalma gözlenmesi, efluks pompasının göstergesi olarak yorumlandı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan ÇİD *A.baumannii* suşlarının izole edildiği klinikler ve örnekler ile antibiyotik direnç paternleri Tablo I'de görülmektedir. Suşların çoğunluğunun, göğüs hastalıkları ve anestezi yoğun bakım ünitelerinden gelen trakeal aspirat ve kan örneklerinden izole edildiği saptanmıştır. Siprofloksasin, imipenem, TMP-SXT, sefepim ve ampisilin-sulbaktamın yanı sıra meropenem ve sefaperazon-sulbaktam da -bire izolat dışında- tüm suşların dirençli olduğu gözlenmiştir. İncelenen antibiyotikler arasında en etkilisinin kolistin olduğu, bunu netilmisin ve tigesiklinin izlediği belirlenmiştir. ERIC-PCR ile elde edilen bant paternlerine göre, incelenen suşların yedi ana grup altında toplandığı (Şekil 1), bunlardan en büyüğünün, 56 izolatı içeren ve dokuz alt gruba ayrılan bir klon (I) olduğu saptanmıştır. Diğer klonlar; bir, iki ya da üç üyesi bulunan küçük gruplardır (II-VII). Alt gruplar da dahil olacak şekilde tüm ana gruplardan birer suş alınarak, toplam 16 bakteride virülansla ilişkili özellikler araştırılmıştır.

Klonal grupları temsil eden *A.baumannii* suşlarında virülans ile ilişkili faktörlerinin dağılımı Tablo II'de görülmektedir. Biyofilm oluşturma kapasitesi incelenen 16 suştan 12'sinin "güçlü", üçünün "orta" ve birinin ise "zayıf" biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. En büyük klonu temsil eden 9 suştan 8'inin "güçlü" biyofilm üreticisi olduğu gözlenmiştir. Bakterilerin demir iyonu kazanımında önemli rol oynayan siderofor üretimi, incelenen

Tablo I. ÇİD *A.baumannii* Suşlarının İzole Edildiği Klinik ve Örnekler ile Antibiyotik Direnç Profilleri (n= 65)

Klinik (İzolat sayısı)	Örnek (İzolat sayısı)	Antibiyotik (Dirençli izolat sayısı)*
Göğüs Hastalıkları (18)	Trakeal aspirat (25)	CIP (65)
Anestezi Yoğun Bakım (13)	Kan (14)	COL (2)
Genel Cerrahi (8)	İdrar (8)	FEP (65)
Nöroloji (8)	Balgam (9)	IPM (65)
Kalp Damar Cerrahisi (5)	BAL (2)	MEM (64)
Fizik Tedavi (3)	Yara (2)	NET (24)
Çocuk Hastalıkları (3)	Doku (2)	SAM (65)
Onkoloji (3)	Kateter (2)	SZN/SUL (64)
Üroloji (1)	Plevra sıvısı (1)	TMP-SXT (65)
Plastik Cerrahi (1)		TGC (36)
İç Hastalıkları (1)		
Nöroşirurji (1)		

* Orta duyarlı izolatlar da dirençli olarak değerlendirilmiştir.

BAL: Bronkoalveoler lavaj; ÇİD: Çok ilaca dirençli; CIP: Siprofloksasin; COL: Kolistin; FEP: Sefepim; IPM: İmipenem; MEM: Meropenem; NET: Netilmisin; SAM: Ampisilin-sulbaktam; SZN/SUL: Sefaperazon-sulbaktam; TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; TGC: Tigesiklin.

Şekil 1. Çok ilaca dirençli *A. baumannii* izolatının klonal yakınlıklarını gösteren dendogram (n= 65).

Tablo II. ÇİD *A.baumannii* İzolatlarında Klonal Gruplara Göre Virülans ile İlişkili Faktörlerinin Dağılımı

Klonal grup (n)	Alt grup (n)	Virülans faktörü						
		Biyofilm oluşturma	Siderofor üretimi	Serum direnci	Hareket		Efluks pompası	
					Tw	Sw	CIP	DOK
I (56)	A (18)	Güçlü	-	R	-	-	-	B
	B (1)	Güçlü	-	S	+	+	-	B
	C (1)	Zayıf	-	S	-	-	-	B
	D (2)	Güçlü	-	R	-	-	-	B
	E (3)	Güçlü	-	S	-	+	-	-
	F (18)	Güçlü	-	S	-	+	-	B
	G (1)	Güçlü	-	I	-	-	-	-
	H (1)	Güçlü	-	S	-	-	-	+
	I (11)	Güçlü	-	S	-	+	-	B
II (1)	-	Orta	-	S	-	+	-	B
III (2)	-	Güçlü	-	S	-	-	-	-
IV (1)	-	Güçlü	-	S	-	+	-	B
V (1)	-	Güçlü	-	S	-	+	-	+
VI (1)	-	Orta	-	S	-	-	-	B
VII (3)	X (1)	Orta	-	S	-	-	-	B
	Y (2)	Güçlü	-	S	-	-	-	B

ÇİD: Çok ilaca dirençli; CIP: Siprofloksasin; DOK: Doksisinil; R: Dirençli; S: Duyarlı; I: Orta duyarlı; B: Belirlenmedi; Tw: "Twitching"; Sw: "Swarming".

hiçbir suşta saptanamamıştır. On altı suştan ikisinin, serumun bakterisidal etkisine dirençli, birinin orta duyarlı, 13'ünün ise duyarlı olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda "twitching" ve "swarming" olmak üzere iki değişik hareket formu, sırasıyla, petri kabıyla agarın temas ettiği yüzeyde ve agar yüzeyinde araştırılmış, sadece bir suşta "twitching", 7 suşta ise "swarming" gözlenmiştir. "Twitching" görülen suşta aynı zamanda "swarming" de saptanmıştır (Resim 1). Efluks pompası varlığı araştırılan 16 suştan hiçbirinde, NMP varlığında siprofloksasin MİK değerlerinde anlamlı bir azalma saptanamamıştır. Doksisikline dirençli 5 suştan 2'sinin MİK değerlerinde ise, efluks pompası varlığına işaret eden anlamlı düşüşler gözlenmiştir.

TARTIŞMA

A.baumannii tüm dünyada, özellikle yoğun bakım ünitelerinde gelişen nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir ve günümüzde, kullanımdaki tüm ajanlara dirençli suşların varlığı bilinmektedir. Çok ilaca dirençli (ÇİD) *A.baumannii* izolatlarının konak içinde ve dışında hayatta kalmasında ve enfeksiyon oluşturmada biyofilm oluşturma, serum direnci, hareket, demir kazanımı ve efluks pompası gibi faktörler rol oynamaktadır.

Resim 1. A) “Twitching (Seğirme)” ve B) “Swarming (Yayılma)” hareketi gözlenen bir suş.

Çalışmamız kapsamında incelenen 65 ÇİD *A.baumannii* izolatının klonal yakınlıkları ERIC-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen bant paternleri analiz edildiğinde, dokuz alt gruba ayrılan 56 üyeli bir klonun (I), çalışmamızda incelenen ÇİD *A.baumannii* suşlarının %86’sını kapsadığı belirlenmiştir. Bu veri, hastanemiz kliniklerinde saptanan dirençli *A.baumannii* suşlarının büyük bölümünün aynı klondan türediğine işaret etmektedir. Türkiye’de iki büyük merkezden izole edilen karbapeneme dirençli *A.baumannii* suşlarında OXA-tipi karbapenemaz varlığı ile klonal ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, direncin her iki merkezde de büyük ölçüde klonal yayılım gösteren suşlara bağlı olduğu bildirilmiştir¹⁷. Aynı çalışmada, incelenen suşlarda en etkili antibiyotikler olarak polimiksin-B ve tigesiklinin saptanması da bizim bulgularımızla uyumludur. Yapılan uluslararası bir değerlendirmede, belli bazı klonların ÇİD *A.baumannii* izolatlarının dünya genelinde yaygınlaşmasında rol oynadığı rapor edilmiştir⁴. Yedi yıllık bir süreçte, ÇİD *A.baumannii* izolatlarında “repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (rep-PCR)” yöntemiyle moleküler yakınlıkların ve karbapenemaz aktivitesindeki oksasilinazların araştırıldığı bir çalışmada, incelenen 100 suştan 62’sinin, 13 ana paternden birine dahil olduğu belirtilmiştir¹⁸. En çok üyesi olan klonlarda 9-10 suşun bulunduğu bu çalışmada, ÇİD *A.baumannii* sorununun uzun süreden beri varlığını sürdüren birkaç farklı klondan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır¹⁸.

A.baumannii birçok biyotik ve abiyotik yüzeyde biyofilm oluşturabilmektedir. Hastane ortamındaki çeşitli yüzeylerde kolonize olmasını, antibiyotik direncini ve konak immün sisteminden kaçmasını kolaylaştıran biyofilm yapısı, önemli bir virülans faktörüdür¹⁹. ÇİD *A.baumannii* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesinin yüksek olduğunu gösteren veriler vardır^{8,20}. Bizim çalışmamızda biyofilm oluşumu incelenen 16 suştan 12’sinin güçlü, üçünün orta derecede biyofilm üreticisi olması, ÇİD *A.baumannii* ile biyofilm oluşturma arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Klinik *A.baumannii* izolatlarında çeşitli virülans faktörlerinin incelendiği bir çalışmada²¹, 86 suştan 64’ünde biyofilm oluşumu

gözlenmiş, bunlardan 10 tanesinin güçlü, 27 tanesinin orta ve yine 27 tanesinin zayıf biyofilm ürettiği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise incelenen tüm temsilci suşlarda biyofilm oluşumu görülmüştür.

Bakterilerin demir iyonu kazanımında; (a) siderofor adı verilen endojen demir-III şelatörlerinin üretimi, (b) "hem" gibi dış kaynaklı şelatörleri almaları veya (c) demir-II iyonlarını doğrudan almaları şeklinde üç temel yol izledikleri belirtilmektedir²². Antunes ve arkadaşları²², demir kazanımında rol oynayan 16 genin varlığını, genotipik olarak farklı 50 klinik *A.baumannii* suşunda araştırmış ve tüm suşlarda iki farklı sisteme (asinetobaktin ve hidroksamat tipi) ait genlerin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu suşlardaki demir şelatörlerinin miktarı ve aktivitesine bakıldığında, arada büyük farklar olduğu da rapor edilmiştir²². Çalışmamızda incelenen hiçbir suшта siderofor saptanamamış olmasının, kullanılan yöntemin analitik duyarlılığının düşük olmasından, veya pH, sıcaklık gibi fiziko-kimyasal koşullardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca, sideroforların in vivo olarak, enfeksiyon sürecinde eksprese edildiği yönünde bulgular da vardır¹⁹.

İncelenen temsilci suşlardan çoğunun serumun bakterisidal etkisine duyarlı olduğu, iki alt grup temsilcisinin ise dirençli olduğu gözlenmiştir. Suşların temsil ettikleri grupların sayıları dikkate alındığında, çalışmamızdaki seruma dirençli bakterilerin oranı %30.7'dir. Cevahir ve arkadaşları²³, klinik örneklerden izole edilmiş 48 *A.baumannii* suşunda insan serumunun etkisini inceledikleri çalışmada, seruma dirençli bakterilerin oranını %81.2 olarak saptamışlardır. Çeşitli su kaynaklarından izole edilen *Acinetobacter* türlerinde virülans faktörlerinin incelendiği bir çalışmada da, seruma dirençli suşların oranları, kaynağa göre, %64 ile %30 arasında değişmektedir²⁴. Seruma direnç oranlarındaki bu çeşitliliğin, suşların izole edildiği kaynaklardan ve yöntemlerdeki farklılıklardan ileri geldiği düşünülmektedir.

Geleneksel olarak hareketsiz olarak bilinen *Acinetobacter* cinsinden bazı izolatların hareket edebildikleri ve bunun fimbria varlığıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir¹⁵. Antunes ve arkadaşları⁷, tüm genom dizisi belirlenmiş dört *A.baumannii* suşunun hareket özelliklerini üç farklı besiyerinde araştırmışlar, bunlardan sadece birinde hem "twitching" hem de "swarming" gözlemlerken, birinde de yalnızca "swarming" hareketi belirlenmişlerdir. Avustralya'da gerçekleştirilen bir çalışmada¹⁵, 50 klinik *A.baumannii* izolatu hareket açısından değerlendirilmiş, 16 tanesinde "twitching", ikisinde ise "swarming" hareketi saptanmıştır. "Swarming" gözlenen iki suшта aynı zamanda "twitching" de görülmüş ve bu iki hareket şeklinin birbiri ile bağlantılı olmayıp, ayrı fenotipik özellikler olduğu belirtilmiştir¹⁵. Aynı çalışmada güçlü biyofilm üreten suşlarda, "twitching" hareketine daha sık rastlandığı da vurgulanmıştır¹⁵. Bizim çalışmamızda ise, incelenen 16 izolatu yedisinde "swarming" hareketi belirlenmiş, bunlardan birinin orta, diğerlerinin ise güçlü biyofilm üreten suşlar olduğu gözlenmiştir.

Efluks pompaları *A.baumannii*'nin birçok antibiyotiğe direnç geliştirmesinde önemli rol oynamaktadır. Pannek ve arkadaşlarının²⁵ yaptığı bir çalışmada, *A.baumannii* izolatlarında, efluks pompası inhibitörleri olan Phe-arg- β -naphthylamide (PABN) ve NMP'nin

etkileri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada PABN'nin sadece klaritromisin, rifampisin ve linezolid MİK değerlerinde azalmaya yol açtığı, buna karşın NMP'nin özellikle kloramfenikol, tetrasiklin ve florokinolon grubu antibiyotiklerin etkinliğini artırdığı saptanmıştır²⁵. Bu bulgular ışığında, efluks pompası varlığının fenotipik olarak araştırılmasında NMP tercih edilmiştir. Bir diğer çalışmada, NMP'nin 100 µg/ml konsantrasyonda, antibiyotik içermeyen kontrol kuyucuklarında *A.baumannii* izolatlarının üremesini inhibe ettiği belirtilmiştir²⁶. Bu nedenle 25 µg/ml konsantrasyonda NMP kullanılan çalışmamızda, siprofloksasin ile efluks pompasına dair bir ipucu saptanmazken, doksisisikline dirençli beş suştan ikisinde efluks pompası varlığı fenotipik olarak gösterilmiştir. Çoban ve arkadaşları²⁶, siprofloksasine orta duyarlı *A.baumannii* suşlarında NMP'nin zon çaplarını duyarlılık sınırına çektiğini, dirençli suşlardan ise sadece ikisinde bunu başardığını bildirmişlerdir. Bu çalışma, NMP'nin siprofloksasine dirençli izolatlar üzerindeki etkisinin sınırlı olduğunu ortaya koymaktadır²⁶. Sun ve arkadaşları²⁷, tigesikline dirençli klinik *A.baumannii* suşlarında NMP'nin tigesiklin MİK değerlerini 2-8 kat düşürdüğünü ve dirençte AdeABC efluks pompasının aşırı ekspresyonunun rol oynadığını saptamışlardır. AdeABC efluks pompası, *A.baumannii* izolatlarında ilk bulunan "resistance-nodulation-cell division (RND)" sistemi olup, beta-laktamlar, aminoglikozidler, florokinolonlar, tetrasiklinler, makrolidler, kloramfenikol ve tigesiklini hücre dışına atabilmektedir. Ayrıca, *Acinetobacter* türlerinde tetrasiklin direncinden sorumlu tet (A-E) efluks pompalarının olduğu da bilinmektedir²⁸.

Çalışmamızda ÇİD *A.baumannii* izolatlarında biyofilm oluşumu, siderofor sentezi, serum direnci, hareket ve efluks pompası gibi bakterinin virülansında rol oynayan özellikler araştırılmıştır. Klonal grup temsilcilerinin tümünde biyofilm oluşumu gözlenirken, hiçbirinde siderofor üretimi saptanamamıştır. Serum direncine sadece en baskın klon (I) temsilcilerinde rastlanırken, hareket ve efluks pompası varlığı ise belirli bir klona özgü değildir. İncelenen suşlarda, biyofilm oluşturmanın en yaygın gözlenen özellik olduğu, bunun yanı sıra serum direnci, "swarming" hareketi ve spektrumunda tetrasiklinlerin de bulunduğu bir efluks pompasının patojeniteyle ilişkili özellikler arasında yer aldığı belirlenmiştir. Hastanemizde olduğu gibi tüm dünyada nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olan ÇİD *A.baumannii* izolatlarının virülansında rol oynayan özelliklerinin bilinmesi, gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasında yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 2013; 37(2): 130-55.
2. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. Virulence 2012; 3(3): 243-50.
3. Taşbakan MS, Pullukçu H, Korkmaz Ekren P, et al. Colistin use in ventilator-associated pneumonia due to panresistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Mikrobiyol Bul 2009; 43(1): 61-70.

4. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. Drug Resist Updat 2012; 15(4): 237-47.
5. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother 2012; 67(7): 1607-15.
6. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents 2012; 39 (2): 105-14.
7. Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS One 2011; 6(8): e22674.
8. Aşık G. Current approaches to explain the virulence of *Acinetobacter baumannii*. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 371-80.
9. Luzzaro F, Mantengoli E, Perili M, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase. J Clin Microbiol 2001; 39(5): 1865-70.
10. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 332-70.
11. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24(8): 1596-9.
12. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 2000; 40(2): 175-9.
13. Loudon BC, Haarmann D, Lynne AM. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. J Microbiol Biol Educ 2011; 12(1): 51-3.
14. Benge GR. Bactericidal activity of human serum against strains of *Klebsiella* from different sources. J Med Microbiol 1988; 27(1): 11-5.
15. Eijkelkamp BA, Stroehrer 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.
16. Yedekçi S, Eraz B, Hoşgör-Limoncu M. Detection of the efflux pump-mediated quinolone resistance in ESBL positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates by phe-arg-beta-naphthylamide. Turk J Pharm Sci 2012; 9(1): 67-74.
17. Gur D, Korten V, Unal S, Deshpande LM, Castanheira M. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)- producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY program sites. J Med Microbiol 2008; 57(12): 1529-32.
18. Ergin A, Hascelik G, Eser OK. Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. Scand J Infect Dis 2013; 45(1): 26-31.
19. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(3): 219-26.
20. Lee HW, Koh YM, Kim J, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1): 49-54.
21. Cevahir N, Demir M, Kaleli İ, Gürbüz M, Tikveşli S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41(6):513-8.
22. Antunes LC, Imperi F, Towner KJ, Visca P. Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. Res Microbiol 2011; 162(3): 279-84.
23. Cevahir N, Kaleli İ, Demir M, Yıldırım U, Çevik E, Gürbüz M. Investigation of serum resistance for *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains. Mikrobiyol Bul 2006; 40(3): 251-5.
24. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. Virulence, resistance genes, and transformation amongst environmental isolates of *Escherichia coli* and *Acinetobacter* spp. J Microbiol Biotechnol 2012; 22(1): 25-33.

25. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. J Antimicrob Chemother 2006; 57(5): 970-4.
26. Coban AY, Guney AK, Tanriverdi Cayci Y, Durupinar B. Effect of 1-(1-Naphtylmethyl)-piperazine, an efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibilities of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. Curr Microbiol 2011; 62(2): 508-11.
27. Sun JR, Perng CL, Chan MC, et al. A truncated AdeS kinase protein generated by ISAba1 insertion correlates with tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 2012; 7(11): e49534.
28. Akin FE, Bayram A, Balci I. Comparison of disc diffusion, E-test, and broth microdilution methods for the determination of resistance to colistin, polymyxin B, and tigecycline in multi-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Mikrobiyol Bul 2010; 44(2): 203-10.