



Alt Solunum Yolu Örneklerinden İzole Edilmiş *Acinetobacter baumannii* Örneklerinde Biyofilm varlığının Araştırılması

Investigation of Biofilm In *Acinetobacter baumannii* Isolated From Lower Respiratory Tract Isolates

Nagihan İçek, Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Asuman Birinci

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

ORCID ID: Nagihan İçek: <https://orcid.org/0009-0008-2239-0229>, Yeliz Tanrıverdi Çaycı: <https://orcid.org/0000-0002-9251-1953>, Asuman Birinci: <https://orcid.org/0000-0002-8653-4710>

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Yeliz Tanrıverdi Çaycı, e-posta / e-mail: yeliztanriverdi@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 26-02-2025

Kabul Tarihi / Accepted: 21-03-2025

Yayın Tarihi / Online Published: 30-04-2025

İçek N., Tanrıverdi Çaycı Y., Birinci A. Alt Solunum Yolu Örneklerinden İzole Edilmiş *Acinetobacter baumannii* Örneklerinde Biyofilm varlığının Araştırılması, J Biotechnol and Strategic Health Res. 2025;9(1):19-24

Öz

Amaç	Alt solunum yolu örneklerinden izole edilen <i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarında biyofilm oluşumu ile amikasin, gentamisin, imipenem ve meropenem direnci arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.
Gereç ve Yöntem	Biyofilm 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plak yöntemiyle çalışıldı. Dalga boyu 540 nm olan filtre ile optik ELISA okuyucuda (ELISA reader, Organon Teknika 530, version 1.21) plaklar okutuldu. Antibiyotik dirençleri Vitek 2 Compact tam otomatize sistem ile belirlendi.
Bulgular	Toplam 84 A. <i>baumannii</i> örneği çalışmaya dahil edildi. 29 negatif biyofilm, 6 güçlü biyofilm ve 49 orta derece biyofilm oluşturan izolat saptandı. Güçlü biyofilm oluşturan izolatların antibiyotik dirençleri sırasıyla amikasin %75, gentamisin %100, imipenem %100, meropenem %100; orta derece biyofilm oluşturan izolatlarda antibiyotik dirençleri sırasıyla amikasin %72,3, gentamisin %93,6, imipenem %100, meropenem %100 ve negatif biyofilmdeki izolatların antibiyotik dirençleri ise amikasin %53,6, gentamisin %92,9, imipenem %100, meropenem %100 olarak saptanmıştır.
Sonuç	Sonuç olarak 84 A. <i>baumannii</i> izolatı değerlendirildiğinde biyofilm oluşumunun antibiyotik direncini arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda biyofilm oluşturan izolatlar arasında güçlü biyofilm oluşturan izolatlardaki antibiyotik direncinin orta derece biyofilm oluşturanlardan daha fazla olduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşumlarına göre antibiyotik dirençleri incelendiğinde biyofilm oluşumunun amikasin ve gentamisinde direnç artışına neden olduğu gözlemlenmiştir. Biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki enfeksiyonların tedavisi ve patogenezini anlamada önem arz etmektedir.
Anahtar kelimeler	<i>Acinetobacter baumannii</i> , alt solunum yolu, biyofilm

Abstract

Aim	It was aimed at evaluating the relationship between biofilm and amikacin, gentamicin, imipenem, and meropenem antibiotic resistance in <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates isolated from the lower respiratory tract.
Materials and Methods	Biofilm was studied using the 96-well microtitration plate method. The plates were read in an optical ELISA reader (ELISA reader, Organon Teknika 530, version 1.21) with a wavelength filter of 540 nm. Antibiotic resistances were determined with the Vitek 2 Compact fully automated system.
Results	A total of 84 A. <i>baumannii</i> samples were included in the study. 29 negative biofilm, 6 strong biofilm, and 49 moderate biofilm-forming isolates were detected. The antibiotic resistances of isolates forming strong biofilms were, respectively, amikacin 75%, gentamicin 100%, imipenem 100%, meropenem 100%; the antibiotic resistances of isolates forming moderate biofilms were determined as amikacin 72.3%, gentamicin 93.6%, imipenem 100%, meropenem 100%, respectively; and the antibiotic resistances of isolates in negative biofilms were amikacin 53.6%, gentamicin 92.9%, imipenem 100%, meropenem 100%, respectively.
Conclusions	As a result, when 84 A. <i>baumannii</i> isolates were evaluated, it was observed that biofilm formation increased antibiotic resistance. At the same time, it was determined that among the biofilm-forming isolates, antibiotic resistance in strong biofilm-forming isolates was higher than in moderate biofilm-forming isolates. When antibiotic resistances were examined according to biofilm formation, it was observed that biofilm formation caused an increase in resistance to amikacin and gentamicin. The relationship between biofilm formation and antibiotic resistance is important in understanding the treatment and pathogenesis of infections.
Keywords	<i>Acinetobacter baumannii</i> , lower respiratory tract, biofilm

GİRİŞ

Acinetobacter baumannii'nin tarihçesi oldukça geniş bir aralığı kapsar. İlk olarak 1911 yılında Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck tarafından *Micrococcus caolcoateicus* olarak isimlendirilmiştir. Geçen süreçte çeşitli farklı isimlendirilmeler ardından 1954 yılında Brisou ve Prevot bakterinin morfolojik özelliğinden yola çıkarak, Yunanca hareketsiz anlamına gelen "Akinetos" sözcüğünden esinlenerek "*Acinetobacter*" adını vermişlerdir.¹

A.baumannii diğer *Acinetobacter* türleri arasındaki en virülan tür olarak bilinmektedir. Bu bakteriler insan vücudunun daha nemli bölgelerinde koltuk altı, kasık, oral kavite ve deride yaşarlar. *A. baumannii*; farklı ısı ve pH düzeyinde, kuru ve cansız yüzeylerde uzun süre canlılığını koruyabilen fırsatçı bir patojendir.²

Acinetobacter türleri, yüzeylere bağlanarak ve bir araya gelerek biyofilm adı verilen çok hücreli yapılar oluşturabilir. Biyofilm oluşumu, bakterilerin bağışıklık sisteminden kaçmasına ve antibiyotiklere direnç geliştirmesine katkıda bulunabilir.³

İlk olarak 17. Yüzyılda Leeuwenhoek tarafından keşfedilen biyofilmin önemi 20. Yüzyılın sonlarına kadar anlaşılmamıştır. 1978 yılında Costerton ve arkadaşları tarafından mikroorganizmaların canlı ve cansız yüzeylere tutunarak ekolojik yarar sağladıkları açıklanmıştır. Uzun yıllar endüstriyel bir sorun olarak ele alınan biyofilm oluşumu günümüzde nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir.⁴

Biyofilm değişen çevre koşullarına karşı mikroorganizmaların hayatta kalabilmek için ürettikleri ekzopolisakkarit yapıdan oluşmaktadır. Bu yapı bakterinin kolonizasyonunu kolaylaştırarak enfeksiyon riskini arttırmakla beraber antimikrobiyallerin etkisini azaltarak direnç gelişimine neden olmaktadır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların planktonik formlarına kıyasla antibiyotiklere 100-1000 kat daha dirençli olabildikleri yapılan çalışmalarla ortaya

konmuştur.²

Antimikrobiyal direnç ve biyofilm arasındaki ilişki, enfeksiyonların tedavisini zorlaştırabilir ve enfeksiyonların tekrarlamasına neden olabilir. Bu nedenle, biyofilm oluşumunun önlenmesi ve kontrol altına alınması, antimikrobiyal dirençle mücadelede önemli bir adımdır. Antibiyotik tedavilerinin biyofilm oluşumu üzerinde etkili olması için, biyofilm içine penetre olabilen ve etkili konsantrasyonlarda bulunabilen antimikrobiyal ajanlar kullanılması gerekmektedir. Ayrıca, biyofilm oluşumunun engellenmesi ve biyofilm içindeki mikroorganizmaların etkin bir şekilde hedef alınabilmesi için yeni tedavi stratejileri ve ilaç geliştirme çalışmaları da önemlidir.⁵

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2020 ve Aralık 2022 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen alt solunum yolu örneklerinden izole edilen 84 *A. baumannii* izolatı çalışmaya dahil edildi.

Laboratuvara gelen örnekler rutin olarak %5 koyun kanlı agar ve Eozin Metilen Blue (EMB) agara ekildikten sonra 35°C'de, 24 saatlik inkübasyondan sonra üreyen koloniler değerlendirildi. Tür düzeyinde tanımlanma için suşlar Vitek MS (Biomeriux, Fransa) otomatize sisteminde çalışıldı. Çalışmaya dahil edilen suşların antibiyotik direnci Vitek2 Compact (Biomeriux, Fransa) otomatize sisteminde belirlendi.⁶

Antibiyotik duyarlılığı AST N90 kartları kullanarak üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. İzolatlar %5 koyun kanlı agarda üredikten sonra 0,5 McFarland standart bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra kartlar ve süspansiyonlar cihaza yerleştirildi. Süspansiyonların kartlara inoküle edilmesi, okuma, değerlendirme ve raporlama otomatik olarak yapılmaktadır.⁶

Biyofilm oluşumunu saptamada 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plak yöntemi kullanıldı. Kanlı agara pasajlan-

miş *A. baumannii* izolatlarının taze kültürlerinden steril öze yardımıyla alınan birkaç koloni %0,25 glukoz içeren triptiksoy buyyon (TSB) içeren tüplere alınarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Kültürler 1/20 dilüe edilerek 200 µl'si 96 kuyucuklu düz tabanlı polistren mikrotitrasyon plağına aktararak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvı besiyeri döküldü kuyucuklar distile su ile 3 kez yıkandı ve kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara %1'lik kristal viyole solüsyonundan 100 µl dağıtıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon ardından kuyucuklar 3 kez distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara 200 µl etanol/aseton (80:20) ilave edildikten sonra 10 dakika bekletilip boya çözündürüldü. Dalga boyu 540 nm olan filtre ile optik ELISA okuyucuda (ELISA reader, Organon Teknika 530, version 1.21) plaklar okutuldu.⁶

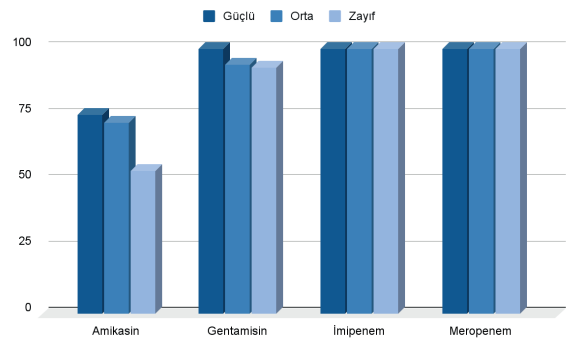
Aynı izolat 3 farklı kuyucukta çalışıldı. Biyofilm oluşturan *A. baumannii* ATCC 19606'dan elde edilen absorbans değerleriyle; biyofilm oluşturmayan *E. coli* ATCC 25922'den elde edilen absorbans değerleri karşılaştırılarak yorumlandı. *A. baumannii* ATCC 19606'ya eşit ve üzerinde absorbans değeri verenler güçlü, biyofilm oluşturmayan *E. coli* ATCC 25922'ye eşit ve altında absorbans değeri verenler negatif biyofilm ve absorbans değeri her iki kontrol arasında kalanlar ise orta derece biyofilm oluşturan suşlar olarak değerlendirildi.⁶

BULGULAR

Laboratuvara gelen örneklerin antibiyotik dirençleri incelendiğinde amikasin %65, gentamisin %93,9, imipenem %100 ve meropeneme %100 dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda 29 negatif biyofilm, 6 güçlü biyofilm ve 49 orta derece biyofilm oluşturan izolat saptandı. Güçlü biyofilm oluşturan izolatların antibiyotik dirençleri sırasıyla amikasin %75, gentamisin %100, imipenem %100, meropenem %100; orta derece biyofilm oluşturan izolatlarda antibiyotik dirençleri sırasıyla amikasin %72,3, gentamisin %93,6, imipenem %100, meropenem %100 ve negatif biyofilmdeki izolatların antibiyotik dirençleri ise amikasin

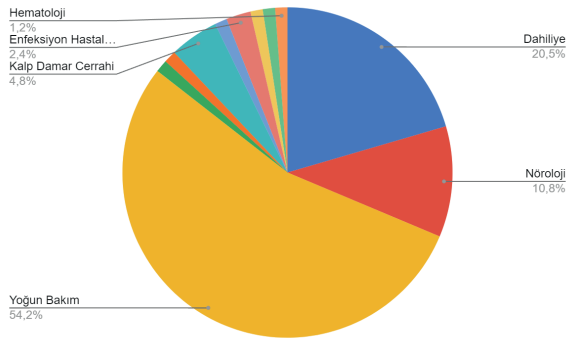
%53,6, gentamisin %92,9, imipenem %100, meropenem %100 olarak saptanmıştır (Grafik 1).

Beklenildiği üzere biyofilm oluşumu amikasin ve gentamisinde antibiyotik direncini arttırmış, duyarlılığı azaltmıştır. Biyofilm oluşturan izolatlar incelendiğinde ise güçlü biyofilm oluşturan izolatların antibiyotik direncinde orta derece biyofilm oluşturan izolatlarınkine kıyasla artış saptanmıştır.



Şekil 1. Biyofilm Oluşumuna Göre Antibiyotik Dirençleri

Örneklerin gönderildiği bölümler incelendiğinde en fazla yoğun bakım %54,2, sonrasında dahiliye %20,5 ve nöroloji servisi %10,8 olarak hesaplanmıştır (Grafik 2). Cinsiyet dağılımına bakıldığında gönderilen örneklerin %54,2'si erkek; %45,8'i kadındır. Hastaların yaş ortalaması 62'dir.



Şekil 2. Örneklerin Gönderildiği Bölümler

TARTIŞMA

A. baumannii; Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2018 yılında yayınlanan, acilen 'yeni antibiyotik keşfi gerektiren dirençli bakteriler' listesinin ilk sırasında yer almaktadır.² Çalışmamızda tespit edilen sonuçlara göre örneklerin en fazla izole edildiği klinik YBÜ, dahiliye ve nöroloji servisleridir. Acinetobacter enfeksiyonları sıklıkla hastanede kullanılan ekipmanların kontaminasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Kontamine tıbbi ekipman, ventilatör tüpü ve solunum cihazları kontaminasyon kaynaklarından bazılarıdır bunlara ek olarak yastıklar, televizyon ve perdeler gibi çeşitli çevresel kaynakların da rezervuar görevi gördüğü bildirilmiştir.⁷

Çetin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 129 *A. baumannii* izolatının sıklıkla yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiş olan trakeal aspirat örnekleri ve kan kültürlerinden izole edildiği görülmüştür.⁸ Çalışma grubumuz bu yönüyle değerlendirmeye alındığında diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* izolatlarında biyofilm oluşumu incelendiğinde Can ve ark. %52,9, Sanchez ve ark. %55, Sebit ve ark. %74, Çalı ve arkadaşları örneklerin %100'ünde biyofilm oluşumu gözlemlemiştir.⁹ Literatüre baktığımızda geçmiş çalışmalarda benzer ve farklı sonuçlar bildirilmiştir. Değerlendirme yöntemindeki farklılıklar, antimikrobiyal direnç durumları ve çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olmaları bu farkların sebeplerinden bazılarıdır.

Çoklu ilaç direnci (ÇİD); tedavide kullanılan en az üç farklı antibiyotik sınıfından birer ilaca direnç görülmesi durumunda tanımlanmaktadır. Farklı ülkelerde yürütülen çok sayıda araştırma gösteriyor ki *A. baumannii*'de çoklu ilaç direnci artmakta ve bu suşlarda biyofilm üretim kapasitesinde hızla arttığı görülmektedir.¹⁰ *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde imipenem+amikasin kombinasyonu ilk tercihtir²

Gülfem ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada alt solunum yolu örneklerinden izole edilen *A. baumannii* izolatlarında direnç oranları amikasin %47,2, gentamisin %57,9 ve imipenem %56,7 olarak saptanmıştır.¹¹ Çeşitli bakterilerde farklı antibiyotiklerin biyofilm üzerine etkileri araştırıldığında biyofilm oluşumunun antibiyotik duyarlılığı anlamlı şekilde azalttığı görülmektedir. Biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerin antimikrobiyallerle tedavide zorluklar oluşturduğu eşitli çalışmalarla gösterilmiştir.⁶

Babapour ve arkadaşlarının çalışmasında *A. baumannii* izolatlarında biyofilm varlığı araştırılmış ve mikropalak yöntemiyle izolatların %66,6'sının biyofilm ürettiği tespit edilmiştir ve bu izolatların %92'sinin ÇİD sahip izolatlar olduğu bildirilmiştir.¹²

Klinik ve çevreden izole edilen *A. baumannii* izolatlarının biyofilm üretimlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen izolatlarda biyofilm oluşumunun daha fazla olduğu saptanmıştır (%58.7/ %32.1).¹³

SONUÇ

Sonuç olarak 84 *A. baumannii* izolatı değerlendirildiğinde biyofilm oluşumunun antibiyotik direncini arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda biyofilm oluşturan izolatlar arasında güçlü biyofilm oluşturan izolatlardaki antibiyotik direncinin orta derece biyofilm oluşturanlardan daha fazla olduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşumlarına göre antibiyotik dirençleri incelendiğinde biyofilm oluşumunun amikasin ve gentamisinde direnç artışına neden olduğu gözlemlenmiştir. Biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki enfeksiyonların tedavisi ve patogenezi anlamada önem arz etmektedir.

Etik Onay

Bu çalışma Yüksek lisans tezinden türetilmiş olup; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (519-301 numaralı ve 14.06.2023 tarihinde) onaylanmıştır.

Yazar Katkıları

Konsept: N.İ., Y.T.Ç., A.B. Dizayn: N.İ., Y.T.Ç., A.B. Veri
Toplama ve İşleme: N.İ., Y.T.Ç., A.B. Analiz ve Yorumla-
ma: N.İ., Y.T.Ç., A.B. Literatür Tarama: N.İ., Y.T.Ç., A.B.
Makale Yazımı: N.İ., Y.T.Ç., A.B.

Çıkar Çatışması

Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek

Beyan edilecek mali destek yoktur.

Kaynaklar

1. Deniz İ. Klinik kaynaklı acinetobacter baumannii izolatlarında patotip-rezistotip-genotip kümelmesi varlığının araştırılması. 2018; Yüksek Lisans Tezi.
2. Temel A, Erač B. Küresel bir tehdit: Acinetobacter baumannii enfeksiyonları, antimikrobiyal dirençe güncel durum ve alternatif tedavi yaklaşımları. Türk Hij Deney Biy. 2020; 77(3).
3. Erač B, Yılmaz FF, Hoşgör Limoncu M., et al. Investigation of the virulence factors of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates. Mikrobiyol Bul. 2014; 48(1), 70-81.
4. Altınok Ö, Gürpınar Ö, Eser Ö. Bakteriye biyofilmler. Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi. 2018; 1(2), 45-51.
5. Turhan E Ü, Erginkaya Z. Bakteriye biyofilmlerdeki antimikrobiyel direnç mekanizması. Akademik Gıda. 2019; 17(1), 131-139.
6. Sezgin FM. Acinetobacter baumannii izolatlarında biyofilm üretimi ve kolistin duyarlılıklarının biyofilm formasyonunda araştırılması. 2012; Tıpta Uzmanlık Tezi.
7. Jawad A, Seifert H, Snelling A, et al. Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. J Clin Microb. 1998; 36(7), 1938-1941.
8. Çetin ES, Kaya S, Tetik T, et al. Klinik örneklerden izole edilen Acinetobacter baumannii suşlarının örneklerle göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. Ankem Dergisi. 2006; 20(4), 202-205.
9. Çalı A, Çelik C, Tutar U, ve ark. Hastanede yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmaların biyofilm formasyon aktiviteleri. Kocaeli Tıp Dergisi. 2018; 7(3), 82-88.
10. Eze EC, Chenia HY, et al. Acinetobacter baumannii biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. Inf Drug Res, 2018; 2277- 2299.
11. Ece G, Ece C, Aslan D. Yoğun bakım hastaları alt solunum yolu örneklerinden izole edilen Acinetobacter baumannii ve Pseudomonas aeruginosa suşlarının antimikrobiyal direnç profilinin ve risk faktörlerinin incelenmesi. Balıkesir Med J. 2020; 4(3), 46-54.
12. Babapour E, Haddadi A, Mirnejad R, Angaji SA, Amirmozafari N. Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial Acinetobacter baumannii and its relationship with multidrug resistance. Asian Pac J Trop Biomed, 2016; 6(6): 528-533.
13. Bardbari AM, Arabestani MR, Karami M, et al. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental Acinetobacter baumannii isolates. Microb Pathogen, 2017; 108: 122e128.