

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU*

BIOFILM FORMATION BY *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS ISOLATED IN HEMOCULTURES

Fusun CAN¹ Özlem KURT-AZAP² Müge DEMİRBİLEK¹ Gülten KARABAY³
Funda ERGİN² Hande ARSLAN¹

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

³ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, biyofilm, ultrastrüktür

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, biofilm, ultrastructure

Geliş: 07 Nisan 2006

Kabul: 28 Haziran 2006

* Bu çalışma Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu tarafından KA04/169 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

Acinetobacter baumannii hastane ortamında çeşitli yüzeylerde bulunabilen ve hastane infeksiyonlarına neden olan bir bakteridir. Biyofilm oluşumu bakterinin virülans faktörleri arasındadır. Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen 17 *A. baumannii* suşunda polistren yüzeylerde biyofilm oluşumu araştırılmış ve biyofilm oluşturan bakterilerde hücre duvarı özellikleri transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ile incelenmiştir. Kökenlerin polistren plaklarda biyofilm oluşturmada besiyeri olarak %0.25 glukozlu beyin kalp infüzyon buyyonu kullanılmıştır. Ayrıca bakterilerde flajella, pili ve amorf materyal oluşumu transmisyon elektron mikroskopunda incelenmiştir. Suşların dokuzunda (%52.9) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Ultrastrüktürel analizlerde biyofilm oluşturan bakterilerin etrafında amorf görünümde ekzopolisakkarit materyal birikimi gözlenmiş, flajella veya pili saptanmamıştır. Sonuçlar *A. baumannii* de biyofilm oluşumundan hücre etrafında oluşan ekzopolisakkaritlerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

SUMMARY

Acinetobacter baumannii is an important nosocomial pathogen, usually found on various surfaces in the hospital environment. Biofilm formation is a virulence factor for *A. baumannii*. In this study, 17 blood isolates of *A. baumannii* were studied for the ability to form biofilm on the surface of polystyrene, and ultrastructural cell wall properties of biofilm-formatted strains were evaluated. The ability of *Acinetobacter* strains to form biofilm was determined on polystyrene microtiter plates using brain heart infusion broth supplemented with 0.25% glucose as the growth medium. Additionally, transmission electron microscopy of strains was performed for the presence of flagella, pili, and an amorphous material covering the cell described for some other bacteria. Biofilm formation was detected in 9 (52.9%) of *A. baumannii* strains. Ultrastructural analysis showed that an amorphous exopolysaccharide was observed around the biofilm-positive strains while flagella or pili were not detected in any of them. The results suggest that exopolysaccharides are the structures that may play the major role in the biofilm formation of *A. baumannii*.

GİRİŞ

Acinetobacter baumannii Gram-negatif, oksidaz negatif, nonfermentatif kokobasil yapısında bir bakteridir. Özellikle çoklu antibiyotik direnci bulunan *A. baumannii* suşlarının, stafilokok ve *Pseudomonas* türlerinin yanı sıra giderek artan oranlarda hastane infeksiyonu etkeni olduğu bildirilmektedir (1).

Santral venöz kateter kaynaklı infeksiyonlar, hastane infeksiyonları arasında önemli bir yer tutmaktadır. *Acinetobacter baumannii*'nin biyofilm oluşturması, hastane ortamında ve aygıtların yüzeyinde uzun süre canlı kalabilmesi nedeniyle, özellikle kateter kaynaklı infeksiyonlarda önemli bir virülans faktörüdür (2). Biyofilm oluşturma özelliği hastane ortamında uzun süre canlı kalmasını sağlamasının yanısıra, bakteriyi bazı antimikrobiyal ajanlara karşı da korumaktadır (3). Diğer bakterilerde tutunma özelliğini inceleyen çalışmalarda, bakteri ve yüzey arasında gelişen bağlantılardan bakteride oluşan ekzopolimerik yapıların oluşturulması, pili ve flajella gibi uzantıların sorumlu olduğu gösterilmiştir (4-6). *Acinetobacter baumannii*'de yüzeylere tutunma özelliklerini ve biyofilm oluşumuna neden olan etkenleri açıklayan az sayıda çalışma vardır.

Bu çalışmada Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 17 *A. baumannii* suşunda biyofilm oluşumu araştırılması ve biyofilm oluşturan ve oluşturmeyen suşlarda hücre duvarı yapılarının transmisyon elektron mikroskobu ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan hastalardan alınan kan kültürlerinde üreyen ve BBL (Beckton Dickinson, İngiltere) identifikasyon sistemi ile tiplendirilen 17 *A. baumannii* kökeni çalışmaya alınmıştır.

Acinetobacter baumannii suşlarında biyofilm oluşumu kantitatif yöntemle incelenmiştir (7). *Acinetobacter baumannii* suşları %0.25 glukoz içeren beyin kalp infüzyon buyonu içinde bir gece 37° C'de inkübe edilmiştir. Taze olarak hazırlanmış ve önceden ısıtılmış %0.25 glukozlu beyin-kalp infüzyon buyonu ile 1:20 oranında sulandırılmıştır. Bu süspansiyondan 200 µl alınarak steril 96 kuyucuklu polistren plaklara aktarılmış, 37° C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklar fosfat tamponlu su (PBS) ile yıkanmış, ters çevrilerek kurutulmuş ve %1'lik kristal viyole ile 15 dakika boyanmıştır. Plaklar PBS ile tekrar yıkandıktan sonra her kuyucuğa 200 µl etanol-aseton (80:20 vol/vol) aktarılmıştır. Plaklar 590 nm'de okutulularak optik yoğunlukları (OD) bulunmuştur.

Optik yoğunluklarına göre suşlarda biyofilm oluşumu:

- OD < 1 Biyofilm negatif
- 1 < OD < 2 Zayıf pozitif (+)
- 2 < OD < 3 Orta pozitif (++)
- 3 < OD Güçlü pozitif (+++) olarak değerlendirilmiştir.

Deneyler iki kez tekrar edilmiştir. Kalite kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmıştır.

Elektron mikroskopik inceleme

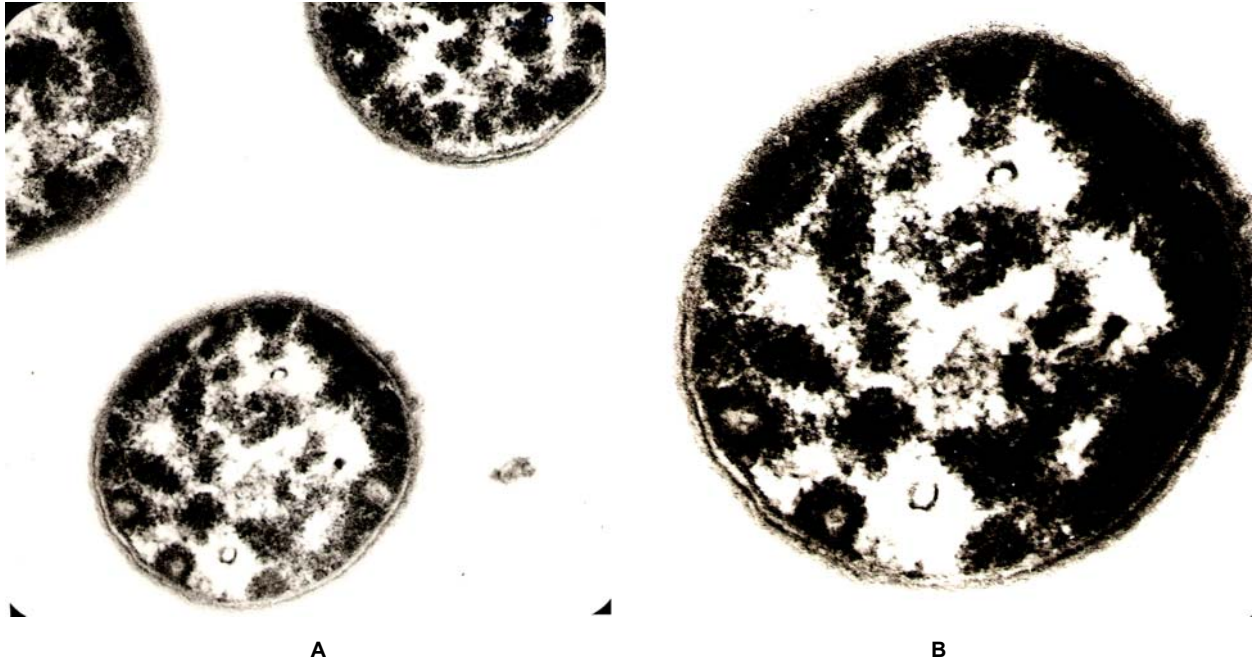
Elektron mikroskopik inceleme için biyofilm oluşturan üç ve oluşturmeyen bir köken seçilmiştir. Bu kökenler ile işlemler aynı şekilde tekrarlanmış, kuyucuklardaki bakteriler kristal viyole ile boyanmadan önce toplanarak %2.5'lik glüteraldehit içeren PBS ile tespit edilmiştir. Sonrasında çöktürülen bakteriler, %2'lik agar içerisine gömülmüştür. Bakteri içeren agar donduktan sonra 1 mm³'lük parçalara ayrılmıştır. Yüzde birlik osmium tetroksit (OsO₄) ile tekrar fikse edilen örnekler, farklı derecelerde alkol solüsyonları (50, 60, 70, 80, 90, 96 ve %100 etanol) ile dehidrate edilmiştir. Propilen oksitten geçirildikten sonra, örnekler Araldyte CY 212, DDSA (2-dodesenil süksinik anhidrit), BDMA (benzildimetil amin) ve dibutilfitalat içine gömülmüştür. Yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskobunda incelenmiştir. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile negatif boyandıktan sonra LEO 906E transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir.

BULGULAR

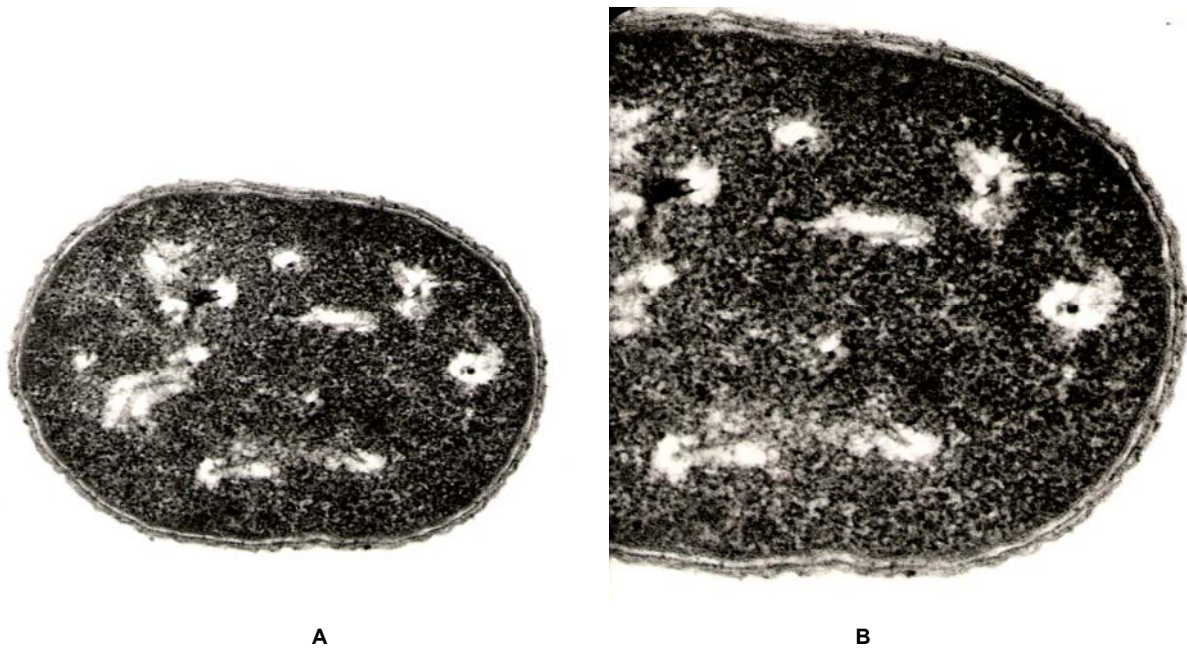
Polistren plakların PBS ile yıkanmasından sonra biyofilm oluşturan suşlar makroskopik olarak kuyucukların duvarı ve tabanında yapışmış olarak gözlenmiştir. Alkol-aseton uygulamasından sonra da bu kuyucuklarda OD₅₉₀ >1 olarak bulunmuştur. Buna göre, test edilen 17 *A. baumannii* izolatının birinde güçlü pozitif, beşinde orta düzeyde pozitif ve ikisinde zayıf pozitif olmak üzere toplam dokuzunda biyofilm oluşumu gösterilmiştir.

Transmisyon elektron mikroskobisi bulguları: Biyofilm oluşumu zayıf, orta ve güçlü pozitif olan üç ve biyofilm oluşturmeyen bir kökenden hazırlanan ince kesitlerin transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucunda, biyofilm oluşturan suşların hücre duvarının etrafında amorf görünümü ve ekzopolisakkarit tanımına uyan yapıların varlığı gözlenmiştir (Şekil 1). Bu amorf materyalin yoğunluğu ile biyofilm oluşturma derecesi arasında ilişki bulunmamıştır. İncelenen üç kökenden de pili veya başka hücresel uzantıların varlığı gösterilememiştir.

Biyofilm oluşturmeyen *A. baumannii* kökeninde ise farklı büyüme ile yapılan incelemelerde hücre duvarı etrafında amorf materyal ve pili benzeri yapılar görülmemiştir (Şekil 2).



Şekil 1. Biyofilm oluşturan *A.baumannii* izolatında hücre duvarı çevresinde amorf yapıların transmisyon elektron mikroskobik görünümü (A x60 000, B x100 000 büyütme).



Şekil 2. Biyofilm oluşturmeyan *A. baumannii* izolatının transmisyon elektron mikroskobundaki görünümü (A x60000, B x100000 büyütme).

TARTIŞMA

Çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii*'ye bağlı hastane infeksiyonlarındaki artış nedeniyle özellikle son yıllarda bu bakterinin virülans faktörlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. *Acinetobacter baumannii*'nin yüzeylere tutunması ve biyofilm oluşumu ile ilgili çalışma sayısı azdır. İlk kez 1996 yılında Vidal ve ark. (8) *A. baumannii* klinik kökeninin cam yüzeylere tutunma özelliğini göstermişlerdir. Bergogne-Berezin ve Towner (1) *A. baumannii*'nin hastane ortamında yatak ve mobilyalar gibi eşyalarda ve aygıtlarda uzun süre canlı kalabildiğini ve özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda infeksiyona yol açtığını bildirmişlerdir. Türkiye'de farklı hastanelerden izole edilen 20 *A. baumannii* suşunun 16'sında biyofilm oluşumu gösterilmiştir (9). Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen 17 suşun dokuzunda biyofilm oluşumu izlenmiştir.

Acinetobacter baumannii'de biyofilm oluşumunun bu bakterinin antibakteriyel direnci ve dış ortamda uzun süre canlı kalabilmesinde rolü olduğu bilinmektedir. Biyofilm oluşturan bakteriler morfolojik, metabolik ve fizyolojik olarak farklılıklar gösterdiği Stoodley ve ark. (10) tarafından 2002 yılında ortaya konmuştur. Biyofilm oluşturan bakterilerde sulbaktam karşı direncin daha yüksek olduğu, imipenemin etkisinin değişmediği Vidal ve ark. (11) tarafından bildirilmiştir. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada bakterinin PER-1 beta laktamaz üretimi ile biyofilm oluşturmada arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (9). Bu çalışmada araştırılan *A. baumannii* köken sayısı az olduğu için antimikrobiyal direnç profilleri ile ilgili bir karşılaştırma yapılmamıştır.

Pseudomonas türleri, *Staphylococcus epidermidis*, kandidalar başta olmak üzere mikro-organizmaların biyolojik ve diğer yüzeylere tutunmasının farklı mekanizmalar ile gerçekleştiği bilinmektedir (12, 13). Bakterilerin yüzeylere tutunmasında hücre motilitesi, bakteriyel ekzopolisakkarit sentezi, flajella ve pili rol oynamaktadır (12). *Acinetobacter baumannii*'nin yüzeylere tutunma mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Eritrositlere bağlanmanın ince ve uzun fimbriyalar aracılığı ile olduğu Gospadarek ve ark. (14) tarafından bildirilmiştir. Ancak trakeal epitele tutunmada fimbriyaların rol al-

madığı aynı yıl yapılan bir başka çalışmada gösterilmiştir (15). Vidal ve ark. (8) biyofilm oluşumunu araştırdıkları çalışmalarında hücrelerin etrafında amorf görünümde ekzopolisakkarit birikimini ve biyofilm oluşumundan bu yapıların sorumlu olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada transmisyon elektron mikroskopunda hücrelerin etrafında amorf yapıda ekzopolisakkarit birikimi gösterilmiş ve pili ve benzer yapıda tutunmada rol oynayabilecek hücresel uzantılar bulunmamıştır.

Acinetobacter baumannii'nin plastik ve cam yüzeylerde biyofilm oluşturmada ekzopolisakkaritlerin rol aldığı gösterildiği bir başka çalışmada, bakterilerde flajella veya pili bulunmamasına rağmen, diğer bakteri türlerinde pili oluşumundan sorumlu olan *csu C* ve *csu E* gen lokusları ile büyük oranda benzerlik gösteren dizilimlerin varlığı ortaya konulmuştur (3).

2004 yılında yapılan bir çalışmada alan emisyon scanning elektron mikroskobu (FE-SEM) ile tolueni parçalayan bir *Acinetobacter* suşunda poliüretan yüzeylere bağlanmada rol oynayan peritriş fibril ve ince hücresel uzantılar gösterilmiştir (16). Bakterinin hücresel uzantıları ve ekzopolisakkaritleri TEM veya scanning elektron mikroskobu (SEM) ile gösterilebilmektedir. Transmisyon elektron mikroskobu pek çok hücre yapısını net şekilde gösterebildiği ve örnek hazırlanması sırasındaki koşullardan etkilenmediği için pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (16). Ancak bakteri ve bağlandığı yüzeyin üç boyutlu yapısının incelenmesinde yetersiz kalmaktadır. Diğer taraftan, SEM ile yapılan çalışmalarda hücrelerden pili ve ekzopolisakkaritten oluşan uzantıların tamamen tesadüfi olarak farklı yönlerde oluştuğu bildirilmektedir (5). Bu çalışmada da olası pili veya flajella tipi benzeri uzantıların gösterilmemiş olması bu kökenlerin SEM ile üç boyutlu taranmasının gerekliliğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; hastane infeksiyonu etkeni olan *A. baumannii* suşlarında biyofilm oluşumu ve bu oluşumda yer alan yapılar morfolojik olarak TEM ile incelenmiştir. Biyofilm oluşumunda hücrelerin etrafında amorf ekzopolisakkarit yapılar gösterilmiş, flajella ve pili yapısında oluşumlar bulunmamıştır.

KAYNAKLAR

1. **Bergogne-Berezin E, Towner KJ.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* **1996**; 9: 148-65.
2. **Peters G, Locci R, Pulverer G.** Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl Bacteriol Mikrobiol Hyg (B)* **1981**; 173: 293-9.
3. **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: 3473-84.
4. **DeFlaun MF, Tanzer AS, McAteer AL, et al.** Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* **1990**; 56: 112-9.
5. **Franson TR, Sheth NK, Rose HD, Sohnle PG.** Scanning electron microscopy of bacteria adherent to vascular catheters. *J Clin Microbiol* **1984**; 20: 500-5.
6. **Kolari M, Schmidt U, Kuismanen E, Salkinoja-Salonen MS.** Firm but slippery attachment of *Deinococcus geothermalis*. *J Bacteriol* **2002**; 184: 2473-80.
7. **Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al.** The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **2001**; 67: 4538-45.
8. **Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, et al.** Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios* **1996**; 86: 49-58.
9. **Sechi L, Karadenizli A, Deriu A, et al.** PER-1 beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. *Med Sci Monit* **2004**; 10: 180-4.
10. **Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **2002**; 56: 187-209.
11. **Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, et al.** Effect of imipenem and sulbactam on sessile cells of *Acinetobacter baumannii* growing in biofilm. *Microbios* **1997**; 91: 79-87.
12. **Hola v, Ruzicka F, Votava M.** Impact of surface coating on the adherence of slime producing and nonproducing *Staphylococcus epidermidis*. *New Microbiol* **2004**; 27: 305-8.
13. **Antonio DD, Parruti G, Pontieri E, et al.** Slime production by clinical isolates of *Blastoschizomyces capitatus* from patients with hematological malignancies and catheter-related fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2004**; 23:787-96.
14. **Gospodarek E, Grzanka A, Dudziak Z, Domaniewski J.** Electron-microscopic observation of adherence of *Acinetobacter baumannii* to red blood cells. *Acta Microbiol Pol* **1998**; 47: 213-7.
15. **Ruiz M, Bello H, Sepulveda M, et al.** Adherence of *Acinetobacter baumannii* to tracheal rat tissue. *Rev Med Chil* **1998**; 126: 1183-8.
16. **Ishii S, Koki J, Unno H, Hori K.** Two morphological types of cell appendages on a strongly adhesive bacterium, *Acinetobacter* sp. *Strain Tol* **5. App Envir Microbiol** **2004**; 70: 5026-9.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Füsün CAN
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
ANKARA
e-posta: fcan@baskent.edu.tr