

# TİGESİKLİNİN *ACINETOBACTER BAUMANNII* PLANKTONİK VE BİYOFİLM HÜCRELERİNE ETKİSİ\*

## ACTIVITY OF TIGECYCLINE ON PLANKTONIC AND SESSILE CELLS OF *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Fusun CAN<sup>1</sup>, Melek KAYA<sup>1</sup>, Fulya BAYINDIR BİLMAN<sup>1</sup>, Hikmet UNCU<sup>2</sup>,  
Müge DEMİRBİLEK<sup>1</sup>, A. Canan YAZICI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (fcan@baskent.edu.tr)

<sup>2</sup> Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

<sup>3</sup> Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

### ÖZET

*Acinetobacter baumannii*, hastane ortamında çeşitli yüzeylerde uzun süre canlılığını koruyabilen ve hastane enfeksiyonlarına neden olan bir bakteridir. Tigesiklin ise, son yıllarda özellikle dirençli bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlarda kullanılan bir antimikrobiyal ajandır. Bu çalışmanın amacı, tigesiklinin *A.baumannii* suşlarına karşı aktivitesinin planktonik hücreler ve biyofilm ortamındaki sesil hücrelerde belirlenmesi ve etkinliğin biyofilm sentezi ile karşılaştırılmasıdır. Çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen 59 *A.baumannii* suşunda tigesiklin aktivitesi agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmış; biyofilm oluşumu %0.25 glukozlu beyin kalp infüzyon buyyonunda polistren yüzeylere yapışma ile değerlendirilmiştir. Biyofilm pozitif ve negatif suşların planktonik hücreleri üzerinde tigesiklinin doz ve zamana bağımlı aktivitesinin ölçümünde, zamana karşı öldürme (time-kill) yöntemi kullanılmıştır. Bunu için logaritmik üreme fazındaki hücreler minimum inhibitör konsantrasyonu (MLK) değerlerinin 0.5, 1, 2, 4, ve 8 katı oranlarında tigesiklin ile karıştırılmış ve 0., 2., 4., 6., 24. ve 48. saatlerde yapılan pasajlarla koloni sayıları değerlendirilmiştir. Tigesiklinin biyofilm ortamındaki sesil hücrelere etkinliği plastik boncuklarda oluşturulmuş biyofilmler üzerinde çalışılmıştır. Planktonik hücrelerin %89.8'i tigesikline duyarlı bulunmuş;  $MLK_{50}$  ve  $MLK_{90}$  değerleri sırasıyla 1 ve 2 µg/ml olarak tespit edilmiştir. İzolatların %52.5 oranında biyofilm oluşturduğu ve biyofilm oluşumu ile MLK değerleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ). Tigesiklinin planktonik hücreler üzerinde güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği ve aktivitenin doz ve zamana göre değişiminin suşların biyofilm oluşturma özelliğinden bağımsız gerçekleştiği gözlenmiştir. Biyofilm üreten suşlarda sesil hücrelerin biyofilm inhibitör konsantrasyonlarında belirgin artış tespit edilmiştir. Sonuç olarak; tigesiklinin planktonik *A.baumannii* suşları üzerinde güçlü etkinliğinin olduğu, ancak biyofilimdeki sesil hücrelere etkisinin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, bu bakteriye bağlı enfeksiyonların tigesiklin ile tedavisinde in vitro duyarlılık testlerinin yanı sıra, biyofilm ortamındaki hücrelerin duyarlılıklarının azalması olasılığının da dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Acinetobacter baumannii*, biyofilm, biyofilm inhibitör konsantrasyon, tigesiklin.

\* Bu çalışma Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından KA09/44 proje no ile desteklenmiştir.

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is an important pathogen, capable of survival for very long periods on various surfaces in the hospital environment. Tigecycline is a commonly used antimicrobial agent especially for the treatment of resistant infections. The aim of this study was to investigate the activity of tigecycline on both planktonic and sessile biofilm cells of *A.baumannii* strains isolated from blood cultures and to compare the efficiency in terms of biofilm synthesis. Tigecycline activity on 59 *A.baumannii* strains was examined by agar dilution technique. The ability of strains to form biofilm was evaluated by adherence on polystyrene surfaces in brain heart infusion broth supplemented with 0.25% glucose. Time-kill technique was used for determination of the time and concentration dependent activity of tigecycline on biofilm positive and negative strains. The planktonic cells in logarithmic growth phase were exposed to tigecycline at 0.5, 1, 2, 4, ve 8 x minimum inhibitory concentration (MIC) concentrations and colony counts were evaluated after 0, 2, 4, 6, 24 and 48 hours. The effect of tigecycline on sessile cells was studied on biofilm matrix composed around plastic beads. Tigecycline susceptibility rate of planktonic cells was 89.8% and MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were 1 and 2 µg/ml, respectively. Biofilm formation was detected in 52.5% of isolates and no significant correlation was found between MIC values and biofilm production of the strains ( $p > 0.05$ ). Tigecycline showed a potent antibacterial activity against planktonic cells regardless of biofilm forming capability of strains. Biofilm inhibitory concentrations of sessile cells were elevated significantly. As a result, tigecycline showed a potent activity on planktonic *A.baumannii* cells however, the effect was decreased significantly on sessile cells in biofilm environment. The results suggest that, the possibility of decreased sensitivity of cells in biofilm environment should be considered as well as antibiotic sensitivity test results during the treatment of infections caused by *A.baumannii*.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, biofilm, biofilm inhibitory concentration, tigecycline.

## GİRİŞ

Gram-negatif, non fermentatif, sporsuz kokobasil yapısında bir bakteri olan *Acinetobacter baumannii*, neden olduğu ağır enfeksiyonlar ve antimikrobiyal direnci nedeniyle son yıllarda önem kazanmıştır. Bakteri, sağlıklı kişilerin boğaz, deri ve diğer vücut bölgelerinden izole edilmektedir. Bunun yanı sıra hastane ortamında hasta yatakları, nemlendiriciler ve ventilatör gibi cihazlarda uzun süre canlılığını koruduğu gösterilmiştir<sup>1</sup>. *A.baumannii*, hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden olup, kateter ile ilişkili enfeksiyonlarda yüksek oranda saptanmaktadır<sup>2</sup>. Ancak çok ilaca dirençli veya panrezistan suşlar nedeniyle enfeksiyonların tedavisi güçleşmektedir. *A.baumannii* kaynaklı hastane enfeksiyonlarında %34 olarak bildirilen mortalite oranı, yoğun bakım hastalarında %43'le re çıkmaktadır<sup>3</sup>.

Tigesiklin, minosiklinin sentetik türevi olan bir antimikrobiyal ajandır. Ribozomlarda 30S alt birime bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etkisini gösterir<sup>4</sup>. *A.baumannii* üzerinde güçlü bakteriyostatik aktivitesi olduğu gösterilmiştir<sup>5-7</sup>. Bu antibiyotik, komplike cilt enfeksiyonları ve intraabdominal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır<sup>4</sup>.

Biyofilm oluşumu, bakterilerin hastane ortamında daha uzun süre canlılığını koruması ve enfeksiyonlarda antimikrobiyal tedaviye direnç nedeniyle önemli bir patojenite faktörüdür. *A.baumannii* suşlarının yüksek oranlarda biyofilm oluşturduğu bilinmektedir; ancak bu suşların antimikrobiyal dirençleri ile biyofilm ilişkisi hakkında çok az çalışma vardır<sup>8,9</sup>.

Bu çalışmada hastane enfeksiyonu etkeni olan *A.baumannii* suşlarında, tigesiklinin planktonik hücrelere olan in vitro aktivitesinin belirlenmesi ve daha sonra oluşturulan biyofilm ortamında tigesiklin aktivitesindeki değişikliklerin, suşların biyofilm oluşturma özellikleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara ve Adana Eğitim ve Araştırma Hastanelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen ve BBL Phoenix tanımlama sistemi (Beckton Dickinson, İngiltere) ile tiplendirilen 59 *A.baumannii* suşu çalışmaya alındı. Tüm suşlar çalışmaya kadar -80°C'de saklandı.

### Tigesiklin Minimal İnhibitör Konsantrasyonları (MİK)'nın Belirlenmesi

Tigesiklin duyarlılığı agar dilüsyon tekniği ile çalışıldı. Bunun için Mueller Hinton agar-da 16-0.6 µg/ml tigesiklin dilüsyonları günlük olarak hazırlandı. Suşların bir gecelik taze pasajlarından Mueller Hinton buyyonu içinde McFarland 0.5 yoğunluğunda süspansiyonları yapılarak besiyerine 5 µl damlatıldı ve plaklar 37°C'de bir gece inkübe edildi. Tüm örnekler çift çalışıldı. MİK değeri  $\leq 2$  µg/ml olan suşlar tigesikline duyarlı kabul edildi<sup>4</sup>. Kalite kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı.

### Biyofilm Oluşumu

Biyofilm testleri kantitatif yöntemle uygulandı<sup>8</sup>. Tüm izolatlar taze olarak hazırlanan %0.25 glukozlu beyin kalp infüzyon buyyonu (G-BKİB) içinde bir gece 37°C'de inkübe edildi ve yine taze olarak hazırlanan G-BKİB ile 1/20 oranında sulandırıldı. Bu süspansiyondan 200 µl alınarak steril 96 kuyucuklu polistren plaklara aktarıldı. 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra, kuyucuklar fosfat tamponlu su (PBS) ile yıkandı; ters çevrilerek kurutuldu ve %1'lik kristal viyole ile 15 dakika boyandı. Plaklar PBS ile tekrar yıkandıktan sonra her kuyucuğa 200 µl etanol-aseton (80/20 vol/vol) aktarıldı ve 590 nm'de okutulularak optik yoğunlukları (OD) saptandı. OD değerlerine göre suşlarda biyofilm oluşumu; OD < 1 ise negatif, 1 < OD < 2 ise zayıf pozitif (+), 2 < OD < 3 ise orta pozitif (++) ve 3 < OD ise güçlü pozitif (+++) olarak değerlendirildi. Deneyler iki kez tekrar edildi. Kalite kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu kullanıldı.

### Zamana Karşı Öldürme (Time Kill) Çalışması

Planktonik hücrelerde yapılan zamana karşı öldürme deneylerinde suşlar öncelikle 250 ml Mueller Hinton buyyon (MHB) içinde bir gece inkübe edilerek hücrelerin logaritmik fazda üremeleri sağlandı. Ertesi gün kültürde üreyen bakteri yoğunluğu McFarland 0.5 olacak şekilde ayarlandı ve 50 ml'lik 6 ayrı steril şişeye (flask) 36'şar ml bölündü. İlk 5 şişeye günlük MHB ile hazırlanan ve konsantrasyonları ayarlanan tigesiklin çözeltileri, seçilen suşların tigesiklin MİK değerlerinin 0.5, 1, 2, 4, ve 8 kat konsantrasyonları olacak şekilde 4 ml ilave edildi. Antibiyotik eklenmeyen son şişe ise üreme kontrolü olarak kullanıldı. Deneylerin 0., 2., 4., 6., 24. ve 48. saatlerinde alınan örnekler 1-10<sup>-6</sup> oranlarında sulandırılarak kanlı agara ekim yapıldı ve koloni sayısı hesaplandı.

### Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonları (BİK)'nın Belirlenmesi

Bu amaçla Tre-Hardy ve arkadaşlarının<sup>10</sup> yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Tüm izolatlar öncelikle biyofilm oluşumu için taze olarak hazırlanan G-BKİB içinde bir gece 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün taze hazırlanan G-BKİB ile 1/20 oranında sulandırılarak 200'er µl 96 kuyucuklu mikrolaplara dağıtıldı. Plaklardaki her bir kuyucuğun içine steril plastik boncuklar yerleştirilerek 37°C'de bir gece inkübe edildi. Başka bir mikrolapta taze hazırlanan MHB içinde tigesiklinin seri dilüsyonları yapıldı. Biyofilm oluşturulan plastik boncuklar antibiyotik dilüsyonu yapılan mikrolapların her kuyucuğuna yerleştirildikten sonra bir gece 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün kuyucuklardaki boncuklar 200 µl MHB besiyeri içeren ependorf tüplerine transfer edildi ve biyofilm tabakasının ayrılması için hızlı devirde 5 dakika vorteksledi. Bu işlemten sonra tüplerdeki süpernatandan 100 µl alındı ve yeni bir mikrolapta içinde 100'er µl MHB bulunan kuyucuklara aktarıldı. 37°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon BİK olarak değerlendirildi.

### İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizlerde Mann-Whitney U testi ve Spearman's rho korelasyon katsayısı kullanıldı. Veri setinin analizinde SPSS 13.0 (Chicago IL, ABD) istatistik paket programı kullanıldı.  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Çalışmaya alınan suşlarda tigesiklin MİK değerleri 0.25-4 µg/ml arasında bulunmuş ve suşların %89.8'inin tigesikline duyarlı olduğu belirlenmiştir. MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri ise sırasıyla 1 ve 2 µg/ml'dir.

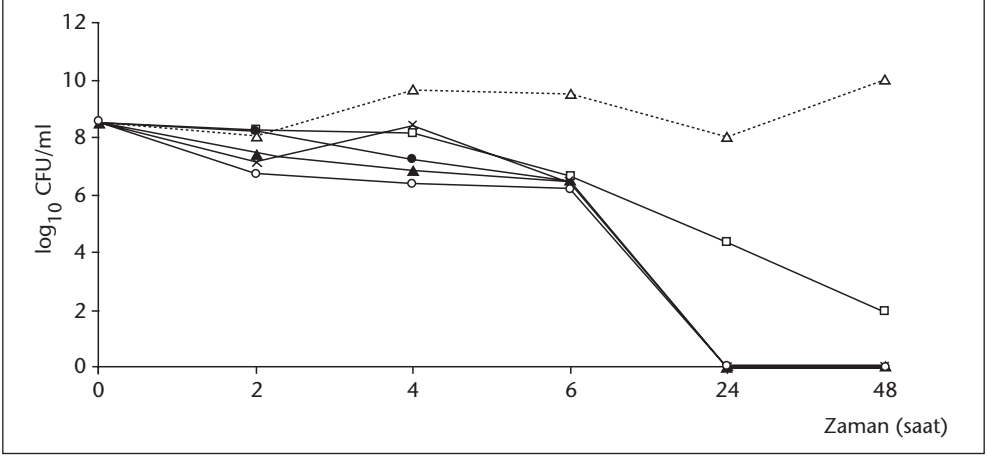
Biyofilm deneylerinde, kuyucukların yüzeyinde makroskobik olarak yapışmış gözlenen suşlarda OD > 1 olarak bulunmuştur. Biyofilm oluşumu 16'sı güçlü, 10'u orta, 5'i zayıf pozitif olmak üzere suşların 31 (%52.5)'inde gözlenmiştir. *A.baumannii* suşlarının tigesiklin MİK değerleri ve biyofilm oluşturma oranlarına göre dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, planktonik hücrelerin biyofilm oluşturma yeteneği ve biyofilm pozitiflik oranları ile MİK değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p > 0.5$ ).

**Tablo I.** Planktonik *Acinetobacter baumannii* Hücrelerinde Tigesiklin MİK Değerleri ve Biyofilm Oluşturma Durumları

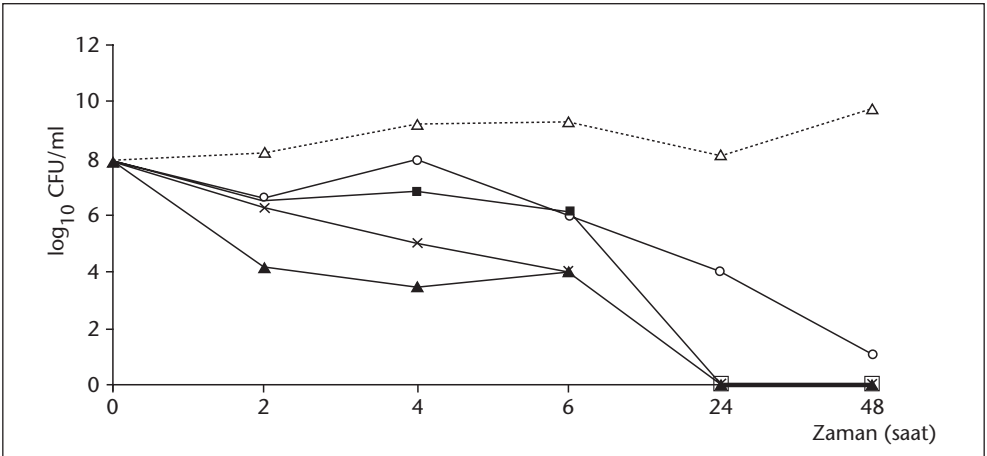
| Biyofilm oluşumu | MİK (µg/ml) |     |    |    |   | Toplam |
|------------------|-------------|-----|----|----|---|--------|
|                  | 0.25        | 0.5 | 1  | 2  | 4 |        |
| Güçlü            | 0           | 4   | 3  | 8  | 1 | 16     |
| Orta             | 0           | 0   | 6  | 2  | 2 | 10     |
| Zayıf            | 2           | 0   | 1  | 2  | 0 | 5      |
| Negatif          | 0           | 0   | 12 | 13 | 3 | 28     |
| Toplam           | 2           | 4   | 22 | 25 | 6 | 59     |

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

Biyofilm pozitif ve negatif iki suş seçilerek doz ve zaman bağımlı tigesiklin aktivitesi, zamana karşı öldürme yöntemiyle araştırılmıştır. Her iki suшта elde edilen sonuçlar Şekil 1 ve Şekil 2’de gösterilmiştir. Tigesiklin, biyofilm oluşturan ve oluşturmayan her iki suşun planktonik hücreleri üzerinde doz ve zamana bağımlı olarak benzer antibakteriyel aktivite göstermiştir. Her iki suшта da tigesiklinin etkisi 2. saatte başlamıştır. MİK ve üzerindeki konsantrasyonlarda bakteriyostatik aktivite 4. saatte belirginleşmiş ve 24. saatte üreme tamamen inhibe olmuştur.



Şekil 1. Biyofilm negatif *A.baumannii* suşunda tigesiklinin doz ve zamana bağımlı aktivitesi. Δ: Antibiyotiksiz kontrol, tigesiklin □: 0.5 µg/ml, ●: 1 µg/ml, x: 2 µg/ml, ▲: 4 µg/ml, o: 8 µg/ml konsantrasyonları.



Şekil 2. Biyofilm pozitif *A.baumannii* suşunda tigesiklinin doz ve zamana bağımlı aktivitesi. Δ: Antibiyotiksiz kontrol, tigesiklin o: 2 µg/ml, ■: 4 µg/ml, □: 8 µg/ml, x: 16 µg/ml, ▲: 32 µg/ml konsantrasyonları.

**Tablo II.** *Acinetobacter baumannii* Sesil Hücrelerinin Tigesiklin Duyarlılıklarının Biyofilm Oluşturma Oranları ile Karşılaştırılması

| Biyofilm oluşumu | BİK (µg/ml) |      |        |          |           | Toplam (n= 59) |
|------------------|-------------|------|--------|----------|-----------|----------------|
|                  | 0.25-2      | 4-16 | 32-128 | 256-1024 | 2048-4096 |                |
| Güçlü            | -           | 3    | 8      | 2        | 4         | 17             |
| Orta             | 2           | 3    | 5      | -        | 3         | 13             |
| Zayıf            | 2           | -    | 3      | -        | -         | 5              |
| Negatif          | 15          | 2    | 6      | 1        | -         | 24             |
| Toplam           | 19          | 8    | 22     | 3        | 7         | 59             |

BLK: Biyofilm inhibitör konsantrasyonu.

Biyofilm duyarlılık testleri sonucunda suşların BİK değerleri 0.5-4096 µg/ml aralığında bulunmuştur. Tüm suşlarda sesil hücrelere karşı tigesiklin inhibitör konsantrasyonları 1-> 4096 kat artış göstermiştir. BİK değerleri ve biyofilm oluşturma oranları Tablo II’de gösterilmiştir. Biyofilm oluşturma özelliğine göre sesil hücrelerin tigesiklin inhibitör konsantrasyonlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ( $p < 0.001$ ), ancak biyofilm pozitiflik oranları ve BİK değerleri arasında bir korelasyon gözlenmemiştir.

## TARTIŞMA

Tigesiklinin, gram-pozitif ve gram-negatif aerobik ve anaerobik bakterileri içine alan geniş bir antimikrobiyal etki spektrumu vardır. Son yıllarda yapılan süveyans çalışmalarında *A.baumannii*’nin tigesikline yüksek oranda duyarlı olduğu gösterilmiştir<sup>11-13</sup>. Draghi ve arkadaşları<sup>14</sup> 2008 yılında yayınlanan çalışmalarında, çok ilaca dirençli 60 *A.baumannii* suşunda  $MIK_{50}$  ve  $MIK_{90}$  değerlerinin sırasıyla 1 ve 2 mg/l olduğunu ve suşların %91.7’sinin tigesikline duyarlı olduğunu bildirmiştir. İtalya’da yapılan bir çalışmada karbapeneme dirençli *A.baumannii* suşlarının tigesikline %93 oranında duyarlı olduğu gösterilmiştir<sup>15</sup>. Ülkemizde tigesiklin ile ilgili yapılan çalışmalarda, hastane enfeksiyonu kaynaklı *A.baumannii* suşlarında Akan ve arkadaşları<sup>16</sup> 100 panrezistan izolatın %93’ünde, Akıncı ve arkadaşları<sup>17</sup> ise 98 izolatın %80.6’sında  $MIK$  değerinin  $< 2$  µg/ml olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda *A.baumannii* planktonik hücrelerinin tigesikline %89.8 oranında duyarlı olması,  $MIK_{50}$  ve  $MIK_{90}$  değerlerinin sırasıyla 1 ve 2 µg/ml bulunması sonuçlarımızın diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermektedir.

Çok ilaca dirençli *A.baumannii* suşlarına bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde tigesiklin kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar gittikçe artmaktadır. Özellikle bakteriyemi, ventilatör ile ilişkili pnömoni ve kateter kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde başarılı sonuçlar alındığı bilinmektedir<sup>4,18</sup>. Ancak bazı olgularda tedaviye yanıtızsızlık olduğu da bildirilmiştir<sup>19</sup>.

Biyofilm, bir ekstraselüler matriks ile çevrelenmiş hücreler topluluğu olarak adlandırılır. Biyofilm ortamındaki sesil hücrelerin antimikrobiyal ajanlara daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Biyofilm içine antibiyotiklerin penetrasyonunun azalması, bakterilerin üreme hızının yavaşlaması, matriksteki metabolik faktörler gibi çeşitli etkenler biyofilm di-

rencinden sorumlu tutulmaktadır<sup>20</sup>. Mah ve O'Toole<sup>21</sup>, organizmada oluşan enfeksiyonların %65'inin biyofilm komponenti olduğunu bildirmiştir. Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde yüksek dozda antimikrobiyal ajan kullanılması ile ilgili klinik çalışmalarda sınırlı başarı elde edilmiştir<sup>22</sup>. Bu nedenle antimikrobiyal ajanların aktivitesinin değerlendirilmesinde biyofilmdeki hücrelerin de dikkate alınması önem kazanmaktadır. Bu çalışmada 59 *A.baumannii* izolatının 31 (%52.5)'inin biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Bu sonuç daha önce 17 *A.baumannii* izolatında yaptığımız çalışmada<sup>8</sup> elde edilen %52.9, Rao ve arkadaşlarının<sup>9</sup> elde ettikleri %62'lik biyofilm pozitifliği ile uyumludur. Rao ve arkadaşları<sup>9</sup> biyofilm pozitifliği ile çok ilaca direnç profili arasında korelasyon olduğunu ve *bla*<sub>PER-1</sub> varlığının bakterilerin adezyonunda önemli rolü olabileceğini belirtmiştir. Ancak çalışmamızda planktonik hücrelerin tigesiklin MİK değerleri ile biyofilm oluşturma oranları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Smith ve arkadaşları<sup>23</sup> tigesiklinin metisiline dirençli stafilocoklar (MRSA) üzerinde etkisini inceledikleri çalışmalarında, MİK ve üzeri konsantrasyonlarda aktivitenin 4. saatte başladığını ve 24. saatte bakteri sayısının  $> 4 \log_{10}$  düştüğünü göstermiştir. Yine aynı çalışmada, biyofilm ortamında üreyen MRSA izolatlarına karşı antimikrobiyal ajanların MİK<sub>90</sub> değerlerinin 4-1067 katına kadar çıktığı ve tigesiklinin biyofilmdeki hücrelerin %57'sini öldürdüğü gösterilmiştir<sup>23</sup>. Çalışmamızda biyofilm pozitif ve negatif suşlarda ayrı ayrı yaptığımız zamana karşı öldürme deneylerinde, tigesiklinin *A.baumannii* planktonik hücreleri üzerindeki etkisinin 4. saatte başladığı ve MİK, üzerindeki konsantrasyonlarda 24. saatte üremenin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir. Her iki suşta da benzer aktivite profilinin elde edilmiş olması, tigesiklinin planktonik hücreler üzerindeki doz ve zamana bağımlı etkisinde biyofilm oluşturma özelliğinin bir farklılığa yol açmadığını göstermiştir.

Vidal ve arkadaşları<sup>24</sup>, biyofilm oluşturan *A.baumannii* suşlarında sulbaktama karşı direncin daha yüksek olduğunu, imipenemin etkisinin ise değişmediğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da sulbaktamın etkisine benzer şekilde, biyofilm üretimi pozitif bulunan *A.baumannii* suşlarının sesil hücrelerinde, tigesiklin inhibitör konsantrasyonlarında belirgin bir artış izlenmiştir.

Tigesiklinin, farklı bakterilerin oluşturduğu biyofilm ortamındaki etkinliği ile ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur. Raad ve arkadaşları<sup>25</sup>, silikon disklerde oluşturdukları MRSA biyofilm ortamında tigesiklinin güçlü aktivitesinin olduğunu ve her 4 saatte bir yeniledikleri tigesiklin solüsyonları içinde üçüncü günde biyofilmdeki bakterilerin üremesinin tamamen inhibe olduğunu göstermiştir. Tigesiklinin aderen *Staphylococcus epidermidis* hücreleri üzerinde planktonik hücrelere göre daha iyi aktivite gösterdiği bulunmuş ve kateter ile ilişkili enfeksiyonlarda kullanılabileceği bildirilmiştir<sup>26</sup>. MRSA ve *S.epidermidis*'e bağlı biyofilmde tigesiklinin antibiyofilm bir ajan olan N-asetilsistein ile kombinasyonunda sinerjik etki elde edildiği gösterilmiş ve bu kombinasyonun kateter koruyucu solüsyon olarak kullanılabileceği belirtilmiştir<sup>27</sup>. Endokarditli hastalardan izole edilen *Streptococcus viridans* izolatları ile oluşturulan biyofilm ortamında, tigesiklinin biyofilm kalınlığını azalttığı ancak MİK değerlerinin 128 katına kadar olan konsantrasyonlar-

da bakterisidal etki göstermediği saptanmıştır<sup>28</sup>. Buna karşın Rose ve arkadaşları<sup>29</sup>, kan kültürlerinden izole edilen MRSA suşlarında biyofilm ortamında oluşturdukları zamana karşı öldürme modelinde tigesiklinin aktivitesinin azaldığını ancak  $MIC_{90}$  değerlerinde değişme olmadığını gözlemlemiştir. Yine aynı çalışmada, suşların biyofilm pozitiflik oranları ile tigesiklin inhibitör konsantrasyonları arasında bir korelasyon olmadığı bildirilmiştir<sup>29</sup>. Çalışmamızda da benzer olarak *A.baumannii* sesil hücrelerinin biyofilm pozitiflik oranları ile tigesiklin inhibitör konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Sonuç olarak; bu çalışma tigesiklinin *A.baumannii* planktonik hücreleri üzerinde güçlü aktivitesinin olduğunu ve bu etkinin bakterinin biyofilm oluşturma özelliğinden bağımsız gerçekleştiğini, ancak biyofilm ortamındaki sesil hücrelerde tigesiklin aktivitesinin belirgin olarak azaldığını göstermiştir. *A.baumannii*'nin yüksek oranda biyofilm oluşturma özelliği göz önüne alınacak olursa, bu bakteriye bağlı enfeksiyonların tigesiklin ile tedavisi planlanırken aktivitenin farklı olabileceği dikkate alınmalıdır. Sonuçların klinik yorumu ancak bu konuda yapılacak klinik çalışmalar ile mümkün olacaktır.

#### 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. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother 2004; 38: 1449-59.
3. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Lancet Infect Dis 2008; 8: 751-62.
4. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 45-55.
5. Song JY, Kee SY, Hwang IS, et al. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 317-22.
6. Park YK, Choi JY, Song JH, Ko KS. In vitro activity of tigecycline against colistin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from Korea. Int J Antimicrob Agents 2009; 33: 289-90.
7. Seiffert H, Stefanik D, Wisplinghoff H. Comparative in vitro activities of tigecycline and 11 other antimicrobial agents against 215 epidemiologically defined multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 1099-100.
8. Can F, Kurt-Azap O, Demirbilek M, et al. Kan kültürlerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında biyofilm oluşumu. Enfeksiyon Derg 2006; 20: 159-63.
9. Rao RS, Karthika RU, Singh SP, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Indian J Med Microbiol 2008; 26: 333-7.
10. Tré-Hardy M, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 329-36.
11. Reinert RR, Low DE, Rossi F, et al. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 1018-29.
12. Hoban DJ, Bouchillon SK, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase producers and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* throughout the United States and comparative in vitro activity of tigecycline, a new glycolcycline antimicrobial. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 423-8.

13. Curcio D, Fernandez F. *Acinetobacter* spp. susceptibility to tigecycline: a worldwide perspective. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 449-50.
14. Draghi DC, Tench S, Dowzicky MJ, et al. Baseline in vitro activity of tigecycline among key bacterial pathogens exhibiting multidrug resistance. Chemotherapy 2008; 54: 91-100.
15. Mezzatesta ML, Trovato G, Gona F, et al. In vitro activity of tigecycline and comparators against carbapenem-susceptible and resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2008; 7: 4.
16. Arıkan Akan O, Uysal S. In vitro activity of tigecycline against multiple resistant *Acinetobacter baumannii* and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. Mikrobiyol Bul 2008; 42: 209-15.
17. Akıncı E, Mumcuoglu P, Öngörü P, et al. In vitro activity of tigecycline against *Acinetobacter baumannii* strains isolated from nosocomial infections. Turk J Med Sci 2008; 38: 583-6.
18. Schafer JJ, Goff DA, Stevenson KB, Mangino JE. Early experience with tigecycline for ventilator-associated pneumoniae and bacteremia caused by multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. Pharmacotherapy 2007; 27: 980-7.
19. Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. Clin Infect Dis 2008; 46: 567-70.
20. Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms. Am J Infect Control 2008; 36: S175.e9-11.
21. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001; 9: 34-9.
22. Rijnders BJ, Wijngaerden EV, Vandecasteele SJ, Stas M, Peetermans WE. Treatment of long term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic lock: randomized, placebo-controlled trial. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 90-4.
23. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. Int J Antimicrob Agents 2009; 33: 374-8.
24. 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.
25. Raad I, Hanna H, Jiang Y, et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1656-60.
26. Labthavikul P, Petersen PJ, Bradford PA. In vitro activity of tigecycline against *Staphylococcus epidermidis* growing in an adherent-cell biofilm model. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3967-9.
27. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1556-8.
28. Presterl E, Lassnigg A, Eder M, Reichmann S, Hirschl AM, Graninger W. Effects of tigecycline, linezolid and vancomycin on biofilms of viridans streptococci isolates from patients with endocarditis. Int J Artif Organs 2007; 30: 798-804.
29. Rose WE, Poppens PT. Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 485-8.