

Acinetobacter baumannii İzolatlarında Fenilalanin-arjinin-beta-naftilamidin Siprofloksasinin Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerleri ve Dışa Atım Pompası Genlerinin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Effect of Phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide to Ciprofloxacin Minimum Inhibitory Concentration Values and Expression of Efflux Pump System Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates

Fatma KAYNAK ONURDAĞ¹(ID), Uğur KAYIŞ²(ID), Suzan ÖKTEN¹(ID)

¹ Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

¹ Trakya University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Edirne, Turkey.

² Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Pazaryeri Meslek Yüksekokulu Eczane Hizmetleri Programı, Bilecik.

² Bilecik Şey Edebali University, Pazaryeri Vocational School, Program of Pharmacy Services, Bilecik, Turkey.

Makale Atfı: Kaynak Onurdağ F, Kayış U, Ökten S. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında fenilalanin-arjinin-beta-naftilamidin siprofloksasinin mik değerleri ve dışa atım pompası genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi. Mikrobiyol Bul 2021;55(3):285-299.

ÖZ

Son yıllarda, dirençli bakteri enfeksiyonlarının tedavisi için en gerçekçi yaklaşımın yeni antimikrobiyal bileşiklerin sentezlenmesinden ziyade, direncin inhibe edilmesine yönelik araştırmalar olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda, *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarında, i) fenilalanin-arjinin-beta-naftilamid (PAβN)'in, siprofloksasin (CIP)'in minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) üzerine etkisinin saptanması, ii) CIP direncini ortadan kaldıran CIP+PAβN konsantrasyonunun hesaplanması, iii) bu konsantrasyonlarda gerçekleşen inhibisyonun PAβN'in çoklu ilaç dışa atım pompası (DAP) sistemi genlerinin ekspresyonu üzerine etkisinden kaynaklandığının gösterilmesi amaçlanmıştır. Trakya Üniversitesi Hastanesinden temin edilerek CIP'e dirençli olduğu tespit edilen *A.baumannii* izolatları (n= 67)'nda CIP duyarlılığı PAβN varlığında yeniden araştırılmıştır. CIP'in MİK değerinde dört kat ve daha fazla azalma tespit edilen izolatlar dama tahtası testi ve kantitatif gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qrRT-PCR) ile incelenmiştir. Dama tahtası sonuçlarına göre, CIP direncini ortadan kaldıran PAβN konsantrasyonları ile fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) indeksleri hesaplanmıştır. CIP+PAβN kombinasyonunda, inhibisyonun gerçekleştiği konsantrasyonların DAP sistemi genlerinin (*adeA*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeL*) ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi qrRT-PCR ile araştırılmıştır. Dama tahtası testi sonucunda, 11 izolatta PAβN ve CIP arasında sinerjik etki tespit edilirken diğer izolatlarda aditif etki gözlenmiştir. Siprofloksasine dirençli bazı izolatlarda, CIP + PAβN kombinasyonunun izolatın direncini inhibe ettiği ve CIP'e duyarlılığın arttığı gösterilmiştir. 25mg/L ve 100mg/L PAβN varlığında CIP'e dirençli 67 izolatın sırasıyla, 22 (%32.83)'si ve 27 (%40.3)'si CIP'e duyarlı hale gelmiştir. Ayrıca yedi izolatta CIP MİK değerini 1 µg/ml konsantrasyona indiren yani CIP direncini ortadan kaldıran PAβN konsantrasyonu 12.5 µg/ml olarak saptanmış olup, bir izolatta ise CIP MİK değerinin 25 µg/ml PAβN

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Fatma Kaynak Onurdağ, Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye. Tel (Phone): +90 (284) 2350180/2192, E-posta (E-mail): fatmakaynak@trakya.edu.tr

varlığında 0.5 µg/ml'ye, 1.5625 µg/ml PAβN varlığında ise 1 µg/ml'ye düştüğü belirlenmiştir. Tasarlanan PCR yönteminde *adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeL*, *adeR* ve *adeS* genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde CIP içeren besiyerlerine PAβN eklenmesi ile çoklu ilaç DAP sistemi genlerinin ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir ($p < 0.05$). Çalışmamızda elde edilen sonuçlarla amaca ulaşılmıştır. Bu sonuçlar, direncin inhibe edilmesine yönelik araştırmaların önemini vurgulamaktadır. İnhibitör maddelerle antibiyotiklerin kombine kullanımı alternatif bir tedavi yöntemi olarak düşünülmelidir. Böylece var olan antibiyotiklerin tekrar tedaviye dahil edilebilmesi, zaman ve maliyet açısından da tasarruf sağlanabilmesi olası olacaktır. Bu bulguların, aşırı ifade seviyelerinin gösterildiği izolatlarda regülatör gen bölgelerindeki mutasyonlar da araştırılarak yeni inhibitör aday bileşiklerin etki mekanizmasının aydınlatılması ve DAP genlerinin ekspresyonu ile ilişkilendirilmesi konusunda yapılacak olan ileri çalışmalarda da kullanılması mümkün olabilecektir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*; fenilalanin-arginin-beta-naftilamid; siprofloksasin; direnç; dışa atım pompası; gen ekspresyonu.

ABSTRACT

The most realistic approach in recent years is researching the resistance inhibition rather than synthesizing new compounds. In this study, we aimed to determine *i*) the effect of phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide (PAβN), on minimum inhibition concentrations (MICs) of ciprofloxacin (CIP), *ii*) to obtain the CIP+PAβN concentration that inhibits CIP resistance and *iii*) to show that this inhibition is caused by the effect of PAβN on the expression of efflux pump (EF) system genes. *Acinetobacter baumannii* isolates were collected from Trakya University Hospital. In 67 isolates determined to be resistant to CIP, CIP susceptibility was investigated in presence of PAβN once again. Isolates determined to have four or more fold decrease in ciprofloxacin MIC values were included in checkerboard assay and quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). Fractional inhibition concentrations (FICs) were calculated through the PAβN concentrations that inhibit ciprofloxacin resistance, by the checkerboard assay results. With the combination of CIP+PAβN, the effect of the concentrations at which inhibition occurs, to the expression levels of EF system genes (*adeA*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeL*) was investigated by qRT-PCR. By the checker board assay, a synergistic effect was determined between PAβN and CIP in 11 isolates, while in other isolates the effect was determined to be additive. In some isolates resistant to CIP, CIP + PAβN combination inhibited the resistance and increased CIP susceptibility. In the presence of 25 mg/L and 100 mg/L PAβN, 22 (32.83%) and 27 (40.3%) of 67 isolates became sensitive to CIP, respectively. In seven isolates, 12.5 µg/ml PAβN concentration eliminated CIP resistance by decreasing CIP MIC value to 1 µg/ml. Also, in one isolate the MIC value was 0.5 µg/ml in the presence of 25 µg/ml PAβN and 1 µg/ml in the presence of 1.5625 µg/ml PAβN. After analyzing the expression levels of EF genes (*adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeL*, *adeR* and *adeS*) by the qRt-PCR method, it was determined that with the addition of PAβN to media containing CIP, the expression levels of the genes decreased ($p < 0.05$). The aim of the study has been achieved with the results obtained. These results highlighted the importance of research on the inhibition of resistance, as well as the synthesis of new antimicrobial compounds. Combined use of inhibitors and antibiotics should be considered as an alternative treatment method. Thus, existing antibiotics can be included in the treatment again, saving time and money. It will be possible to use these findings in further studies to elucidate the mechanism of action of new inhibitor candidate compounds and associate them with the expression of DAP genes, also by investigating mutations in the regulatory gene regions in isolates with over-expression levels.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide; ciprofloxacin; resistance; efflux pump; gene expression.

GİRİŞ

Acinetobacter türleri nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenlerdir ve *A.baumannii*'nin çok ilaca dirençli (MDR) suşları önemli bir problem haline gelmiştir¹⁻³. *A.baumannii*, kromozomal ve plazmit aracılı farklı mekanizmalar ile antibiyotiklere di-

renç geliştirebilmektedir. Dışa atım pompası (DAP) sistemleri ile gelişen direncin klinikteki önemi son yıllarda daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. DAP proteinleri, yapısal düzeyde sentezlendiklerinde bakterinin doğal direncine katkıda bulunurken, yüksek düzeyde sentezleri birçok antimikrobiyal maddeye karşı çoklu ilaç direncine neden olmaktadır⁴.

DAP proteinleri, aminoasit dizisindeki homoloji baz alınarak beş süper protein ailesinde toplanır. Bunlardan "Resistance-nodulation-cell-division (RND)" süper ailesinin, etki mekanizmaları birbirinden farklı birçok ilacın dışa atımında görev aldığı ve gram-negatif bakterilerdeki çoklu ilaç direncinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir⁴⁻⁸.

A.baumannii kromozomu, yedi farklı RND DAP proteinini kodlar⁷ ve bunlardan "*Acinetobacter* drug efflux ABC (AdeABC)", *A.baumannii*'de çok ilaca direnç gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır⁵. AdeABC operonu *Acinetobacter* türlerinin yaklaşık %80'inde gizlidir ve yüksek düzeyde ekspresyonu birçok antibiyotiğe duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır³. AdeABC operonu üzerinde *adeA*, *adeB*, *adeC* yapısal genleri ve *adeS*, *adeR* düzenleyici genleri bulunur⁶. *adeA*, *adeB*, *adeR* ve *adeS*'nin *Acinetobacter* suşlarının %80'inde, *adeC*'nin ise %40'ında bulunduğu bildirilmiştir^{6,9}. AdeABC yapısındaki genlerin DNA dizilerindeki mutasyonlar, bu pompa sistemlerinin ekspresyon seviyelerini artırabilmektedir⁵.

İlacın hücre içinde kalabilmesi için DAP proteinlerinin etkisinin ortadan kaldırılması gerekir. Bu amaç doğrultusunda da çeşitli DAP inhibitörleri araştırılmaktadır. Fenilalanin-arginin-beta-naftilamid (PAβN), üzerinde en çok çalışılmış DAP inhibitörüdür¹⁰⁻¹⁴. PAβN'nin tek başına uygulandığında antibakteriyel etkisi yoktur ancak antibiyotik ile birlikte kullanıldığında bakterideki DAP sistemini durdurarak antibiyotiğin hücre içerisinde kalma süresini artırdığından belirli konsantrasyonlarda antibakteriyel etkisi vardır. Böylece DAP kaynaklı antibiyotik direncinin önünü keserek bakterileri antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirmekte ve tedavinin etkinliğini artırmaktadır¹⁰.

Çalışmamızda, *A.baumannii* klinik izolatlarında, *i*) PAβN'nin, siprofloksasin (CIP)'in minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) üzerine etkisinin saptanması, *ii*) CIP direncini ortadan kaldıran CIP + PAβN konsantrasyonunun hesaplanması, *iii*) bu konsantrasyonlarda gerçekleşen inhibisyonun PAβN'nin DAP sistemi genlerinin ekspresyonu üzerine etkisinden kaynaklandığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirildi (Karar No: 08/10 ve Tarih: 29.04.2015).

Bakteri İzolatları

Çalışmamızda kalite kontrol suşları olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Acinetobacter baumannii* NCTC 1342 ve Trakya Üniversitesi Hastanesine gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 67 adet *A.baumannii* izolatu kullanıldı. *A.baumannii* izolatları, kolay üreyen non-enterik gram-negatif bakteriler için izolasyon kiti API®-20-

NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kullanılarak tanımlandı. CIP MİK değerlerinde 25mg/L PAβN (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) varlığında dört kat ve daha fazla azalma tespit edilen 29 izolat çalışmaya dahil edildi (Tablo I). İzolatlar boncuklu kriyovialerde stoklanarak -80°C'de saklandı.

Tablo I. İzolatların Örnek Tipi ve Hasta Servislerine Göre Dağılımı

İzolat numarası	Servis	Örnek
1	Cerrahi yoğun bakım	Kan
2	Cerrahi yoğun bakım	Kan
3	Dahili yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
6	Nöroloji servisi	Balgam
7	Kalp damar cerrahi servisi	Kan
8	Koroner yoğun bakım	Kan
11	Kalp damar cerrahi servisi	Kan
13	Genel cerrahi servisi	Kan
14	Koroner yoğun bakım	Kan
18	Cerrahi yoğun bakım	Kan
19	Cerrahi yoğun bakım	Kateter
20	Dahili yoğun bakım	Kan
22	Cerrahi yoğun bakım servisi	Kan
24	Cerrahi yoğun bakım servisi	Kan
30	Dahili yoğun bakım	Kan
32	Cerrahi yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
33	Hematoloji servisi	Balgam
35	Cerrahi yoğun bakım	Kan
37	Cerrahi yoğun bakım	Kateter
39	Medikal onkoloji	Balgam
40	Dahili yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
41	Ortopedi	Doku biyopsi
42	Cerrahi yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
44	Reanimasyon	Endotrakeal aspirat
45	Reanimasyon	Endotrakeal aspirat
46	Reanimasyon	Endotrakeal aspirat
47	Hematoloji	Balgam
55	Dahili yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
56	Dahili yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
75	Dahili yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
81	Dahili yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
87	Koroner yoğun bakım	Endotrakeal aspirat

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

PAβN'nin stok çözeltisi dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck & Co., Darmstadt, Almanya) içerisinde, CIP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ise distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. Çalışmada Mueller Hinton agar (MHA) (Merck & Co., Darmstadt, Almanya) ve katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon (KA-MHB) (Merck & Co., Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Sıvı mikrodilüsyon testi; "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" M100-S25 önerileri doğrultusunda yapıldı¹⁵.

MİK değeri, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu olarak değerlendirildi ve izolatların CIP'e olan duyarlılıkları ve MİK değerleri saptandı. Tüm çalışmalar üç kez tekrarlanarak çalışıldı. MİK değerlerinin belirlenen konsantrasyon aralığı dışında kaldığı durumlarda stok solüsyonların konsantrasyon aralıkları değiştirilerek MİK değerleri saptanana kadar işlemler tekrarlandı.

MİK Değerleri Üzerine PAβN'in Etkisinin Araştırılması

PAβN'nin CIP'in MİK değeri üzerine etkisinin araştırılması için 200 mg ve 800 mg PAβN içeren KA-MHB hazırlandı ve çözücünün antimikrobiyal etkisini elimine etmek amacıyla besiyeri ile dört kat seyreltilerek 5 mg ve 100 mg içeren KA-MHB besiyerleri kullanıldı. Hazırlanan inhibitörlü besiyeri ile sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak tekrar CIP duyarlılığı araştırıldı¹⁵. İki MİK değeri arasında dört kattan fazla azalma saptandığında elde edilen sonuçlar anlamlı kabul edildi¹¹.

Dama Tahtası Yöntemi

MİK değerleri arasında dört kattan fazla azalmanın saptandığı 29 izolat ile CIP + PAβN kullanılarak dama tahtası testi yapıldı^{16,17}. Doksan altı kuyucuklu mikropalakların soldan sağa ilk 10 kuyucuğunda CIP seri sulandırılmaları, bir başka mikropalağın yukarıdan aşağı ilk sekiz kuyucuğuna ise PAβN'nin seri sulandırılmaları yapıldı ve bu iki plağın içeriği birleştirildi. FİK değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı¹⁸⁻²⁰:

$$FİK_{CIP} = MİK_{CIP-kombinasyon} / MİK_{CIP}$$

$$FİK_{PA\beta N} = MİK_{PA\beta N-kombinasyon} / MİK_{PA\beta N}$$

RND DAP Proteinleri ve Regülatör Genlerinin Ekspresyonunun Belirlenmesi

PAβN'nin; *adeA*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeL* DAP genlerinin aşırı ekspresyonu üzerine etkisi i) PAβN ve CIP içermeyen besiyerinde üretilen kültür ortamı, ii) CIP içeren besiyerinde üretilen kültür ortamı, iii) PAβN + CIP içeren besiyerinde üretilen kültür ortamından alınan örneklerde gerçek zamanlı revers transkriptaz PCR (rRT-PCR) yöntemi kullanılarak araştırıldı.

Katı besiyerinde üretilmiş *A.baumannii* kültürlerinden bekletilmeden RNA izolasyon aşamasına geçildi. RNA izolasyonu için Chomczynski ve Sacchi²¹ tarafından tanımlanan

asidik guanidin tiyosiyanat fenol kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. RNA çökeltisi, 50 µl RNAaz içermeyen deiyonize suda çözüldü ve -80°C'de saklandı.

İzole edilen RNA örneklerinden 12 µl (20 ng/µl) ve 4 µl (10µM) rastgele hegzamer primerler karıştırılarak, 10 dakika 70°C'de ve daha sonra beş dakika buzda inkübe edildi. 8 µl 5x reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ ve 50 mM DTT) 2 µl dNTP karışımı (40 mM), 2 µl ters transkriptaz (200 U/µl) ve 28 µl steril deiyonize su eklenip, 60 dakika 37°C'de ve daha sonra 10 dakika 60°C inkübe edildi. Elde edilen cDNA, qRT-PCR deneylerinde kullanılabildiği kadar -20°C'de saklandı.

Gen ekspresyon analizlerinde referans gen olarak 16S rRNA geni kullanıldı. Bu amaçla ilk olarak hedef gen bölgelerinin amplifikasyonu için primer çiftleri tasarlandı (Tablo II).

Reaksiyon, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP karışımı, 1x reaksiyonTaq polimeraz tamponu, 0.1U proof reading Hot-Start Taq DNA polimeraz, 1x SybrGreen-I, 5 ng/µl kalıp cDNA ve 0.5 µM her bir primerden içererecek şekilde gerçekleştirildi. Amplifikasyon koşulları 95°C 10 dakika başlangıç denatürasyonu takiben, 45 döngü; 95°C'de 20 saniye denatürasyon, 55°C'de 20 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 25 saniye uzama basamakları şeklinde gerçekleştirildi. qRT-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 55°C-95°C arasında erime eğrisi analizi yapıldı. *adeA* için 83.5-84.0°C; *adeB* için 82.5-83.0°C; *adeC* için 82.5-83.0°C; *adeF* için 84.5-85.0°C; *adeG* için 85.5-86.0°C; *adeH* için 84.0°C; *adeL* için 84.0-84.5°C; *adeS* için 81.0°C; *adeR* için 81.0-81.5°C ve rRNA için 85.0-86.0°C aralığında erime sıcaklığı (T_m) elde edilen qRT-PCR'lar analizlerde kullanıldı. Ekspresyon seviyelerinin karşılaştırmasında C_t değerleri kullanıldı. Reaksiyon verimi 1.9-2.0 aralığında ve korelasyon faktörü (r²) 0.9'un üzerinde olan sonuçlar karşılaştırıldı. 2^{-ΔΔC_t} yöntemi ile hedef genlerin rRNA genine göre rölatif ifade seviyesi hesaplandı²².

Elde edilen ampikonların dizi analizleri Sanger yöntemiyle belirlendi ve böylelikle tasarlanan primerlerin özgüllüğü doğrulandı. Her bir örnek için elde edilen diziler Chromas programıyla analiz edildi. Elde edilen dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlendi. Blast analizi sonucunda elde edilen DNA dizilerinin GenBank'te yer alan hedef dizilere %100 benzediği ve primerlerin hedefleri özgül bir şekilde çoğalttığı sonucuna varıldı (Tablo II)²³.

İstatistiksel Analiz

Farklı deney koşullarında elde edilen rölatif gen ekspresyon seviyeleri arasındaki farkın istatistiksel önem analizi tek-kuyruklu t-testleri Minitab 17 (Minitab Ltd, İngiltere) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık p ≤ 0.05 olarak alındı.

BULGULAR

A.baumannii izolatlarının CIP'e dirençli oldukları tespit edilmiş ve deney koşulları *P.aeruginosa* ATCC 27853 kalite kontrol suşunun sonuçları ile doğrulanmıştır. İzolatlarda,

Tablo II. Primer Dizileri, Hedefleri ve Kaynakları		Benzerlik yüzdesi; İzolat 1 amplikonlarının GenBank'te en çok benzediği gen ulaşım no
Primer hedef/isim	5'-3' DNA dizisi	Kaynak
AdeA-461F	CTG AGC CAC CAC CGG CTA AA	Bu çalışma
AdeA-461R	TTG CCC AAT ACG CCC AGA AA	Bu çalışma
AdeB-351F	TCA TGG GTT CAA GCG GTC AA	Bu çalışma
AdeB-351R	CGA GTG GCA CAA CCA GCA TC	Bu çalışma
AdeC-171F	AAA TGC AGT GCG GCA GGT TAG	Bu çalışma
AdeC-171R	ACA GCC TCT TTC GCG CTT TG	Bu çalışma
AdeR-377F	GGT GAA GCC TTT TAA CCC AAA TGA A	Bu çalışma
AdeR-377R	TAT ATC CCA CGC CAC GCA CA	Bu çalışma
AdeS-120F	GTC ACG GCG ACC TCT CTG CT	Bu çalışma
AdeS-120R	CGC CAT TTT TGA CCG AAA CCT	Bu çalışma
AdeL-346F	CAA TCA ACC GCT TCT CCA ACC	Bu çalışma
AdeL-346R	TGG GTT TAC CCG GTG CTT CT	Bu çalışma
AdeF-422F	GGT AAC GGC GCA CAG GTT TT	Bu çalışma
AdeF-422R	TCT TGT TGG GCA CCG AGT TTT	Bu çalışma
AdeG-143F	TAT CGC GGT TTT CCC ACC AC	Bu çalışma
AdeG-143R	GGG CT GAT TG TG CCG CCT TC	Bu çalışma
AdeH-369F	TCT CCG GCT TCA CTC GGT TT	Bu çalışma
AdeH-369R	GGC AGT GGT TTG TGC GGT AG	Bu çalışma
rRNA-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Lane 1991 ²³
rRNA-R	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	Lane 1991 ²³

Daha önce validasyonu yapılmış primer çifti

PAβN varlığında dört kat ve daha fazla azalma tespit edilen CIP MİK değerleri ise Tablo III'te verilmiştir.

PAβN'nin etkisinin araştırılması sonucu elde edilen iki MİK değeri arasında dört kattan fazla azalmanın saptandığı izolatlar için CIP + PAβN kullanılarak tüm izolatlarla dama

Tablo III. PAβN Varlığında 4 Kat ve Daha Fazla Azalma Tespit Edilen Siprofloksasin MİK Değerleri

İzolat	MİK (µg/ml)		
	Siprofloksasin (S)	PAβN (25 mg/L)+S	PAβN (100 mg/L)+S
1, 2, 3, 7, 8, 18, 19, 87	8	<0.03125	<0.03125
41, 75	8	0.0625	0.0625
11, 39, 45	16	<0.03125	<0.03125
44, 46	16	2	<0.03125
47	16	16	<0.03125
55	16	0.5	0.5
6, 22	32	2	2
13	32	1	1
14	32	2	2
20, 30, 33, 37, 42, 56, 81	32	<0.03125	<0.03125
24	32	16	1
32, 35	32	4	2
40	32	16	<0.03125
<i>A.baumannii</i> NCTC 1342	32	16	16

tahtası testi yapılmış ve dama tahtası testi sonuçlarına göre CIP-PAβN kombinasyonu konsantrasyonları, FİK değerleri ve etkileşim türü sonuçları Tablo IV'te verilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 67 *A.baumannii* izolatının 29 (%43.28)'unun CIP MİK değerlerinde 25 mg/L PAβN varlığında dört kat ve daha fazla azalma tespit edilmiştir (Tablo III). Bu 29 izolatın yedi tanesinde ise azalma olmasına rağmen MİK değeri hala direnç sınır değerinin üzerindedir. 25 mg/L PAβN varlığında CIP'e dirençli 67 izolatın 22 (%32.83)'si CIP'e duyarlı hale gelmiştir. 100 mg/L PAβN varlığında ise, 67 izolatın 32 (%47.76)'sinin CIP MİK değerlerinde dört kat ve daha fazla azalma tespit edilmiş ve bu 32 izolatın üç tanesinde azalma olmasına rağmen MİK değeri hala direnç sınır değerinin altına düşmemiştir. 100mg/L PAβN varlığında CIP'e dirençli 67 izolatın 29 (%43.28)'u CIP'e duyarlı hale gelmiştir (Tablo III).

Yedi izolatta (2, 18, 32, 41, 75, 81, 87) CIP MİK değerini ≤ 1 µg/ml konsantrasyona indiren yani CIP direncini ortadan kaldıran PAβN konsantrasyonu 12.5 µg/ml olarak saptanmış olup ayrıca 56 numaralı izolatta CIP MİK değerinin 25 µg/ml PAβN varlığında 0.5 µg/ml'ye, 1.5625 µg/ml PAβN varlığında ise 1 µg/ml'ye düştüğü belirlenmiştir (Tablo IV). Sonuçta 11 izolatta PAβN ve CIP arasında sinerjik etki tespit edilirken diğer izolatlarda aditif etki gözlenmiştir.

Bütün deneysel koşullarda elde edilen qRT-PCR kullanılarak rRNA genine rölatif ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır. Bu değerler kullanılarak hesaplanan gen ekspresyon seviyelerinin *A.baumannii* suşları arasındaki farklardan kaynaklanabilecek salınımlar göz ardı edilerek ortalama standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Standart sapma değer-

Tablo IV. Dama Tahtası Testi Sonuçlarına Göre CIP-PAβN Kombinasyonu Konsantrasyonları, FİK Değerleri ve Etkileşim Türü Sonuçları

İzolat	CIP MİK (µg/ml)	PAβN MİK (µg/ml)	CIP-PAβN kombinasyonu konsantrasyonları (µg/m)	FİK Değeri	Etkileşim türü
1	8	25	4-25	1.5	Aditif
			8-3.125	1.125	Aditif
2*	8	25	1-12.5	0.625	Aditif
			4-6.25	0.75	Aditif
			8-1.5625	1.0625	Aditif
3	8	25	16-1.5625	2.0625	Aditif
6	32	25	4-1.5625	0.1875	Sinerjik
7	8	50	2-12.5	0.5	Sinerjik
			8-1.5625	1.03125	Aditif
8	8	12.5	2-6.25	0.75	Aditif
			4-3.125	0.75	Aditif
			8-1.5625	1.125	Aditif
11	16	25	2-12.5	0.625	Aditif
			4-6.25	0.5	Sinerjik
			8-1.5625	0.5625	Aditif
13	32	25	2-12.5	0.5625	Aditif
			4-1.5625	0.1875	Sinerjik
14	32	25	16-12.5	1	Aditif
18*	8	25	1-12.5	0.625	Aditif
			4-6.25	0.75	Aditif
			8-1.5625	1.0625	Aditif
19	8	25	4-12.5	1	Aditif
			8-6.25	1.25	Aditif
			16-1.5625	2.0625	Aditif
20	32	25	2-12.5	0.5625	Aditif
			4-1.5625	0.1875	Sinerjik
22	32	25	8-12.5	0.75	Aditif
24	32	25	2-12.5	0.5625	Aditif
			4-1.5625	0.1875	Sinerjik
30	32	50	4-12.5	0.375	Sinerjik
32*	32	25	1-12.5	0.53125	Aditif
			4-6.25	0.375	Sinerjik
			8-1.5625	0.3125	Sinerjik
33	8	25	4-25	1.5	Aditif
			8-3.125	1.125	Aditif
35	32	25	4-1.5625	0.1875	Sinerjik

Tablo IV. Dama Tahtası Testi Sonuçlarına Göre CIP-PAβN Kombinasyonu Konsantrasyonları, FİK Değerleri ve Etkileşim Türü Sonuçları (devamı)

İzolat	CIP MİK (µg/ml)	PAβN MİK (µg/ml)	CIP-PAβN kombinasyonu konsantrasyonları (µg/m)	FİK Değeri	Etkileşim türü
37	32	25	8-12.5	0.75	Aditif
			16-1.5625	0.5625	Aditif
39	16	25	4-12.5	0.75	Aditif
			8-1.5625	0.5625	Aditif
40	32	25	4-12.5	0.625	Aditif
			16-1.5625	0.5625	Aditif
41*	8	25	1-12.5	0.625	Aditif
			4-1.5625	0.5625	Aditif
42	32	25	4-12.5	0.625	Aditif
			16-1.5625	0.5625	Aditif
44	16	25	4-12.5	0.75	Aditif
			8-1.5625	0.5625	Aditif
45	16	25	2-12.5	0.625	Aditif
			4-12.5	0.75	Aditif
46	16	25	8-6.25	0.75	Aditif
			16-1.5625	1.0625	Aditif
47	16	25	4-12.5	0.75	Aditif
			16-1.5625	1.0625	Aditif
55	16	25	4-12.5	0.75	Aditif
			8-6.25	0.75	Aditif
56*	32	50	0.5-25	0.515025	Aditif
			1-1.5625	0.0625	Sinerjik
75*	8	25	1-12.5	0.625	Aditif
			4-1.5625	0.5625	Aditif
81*	32	25	1-12.5	0.53125	Aditif
			4-6.25	0.375	Sinerjik
87*	8	100	2-12.5	0.5625	Aditif
			8-1.5625	0.3125	Sinerjik
87*	8	100	0.5-12.5	0.75	Aditif
			2-6.25	0.3125	Sinerjik
			8-1.5625	1.015625	Aditif

*CIP MİK değerlerini direnc sınırının altına düşüren kombinasyon değerleri.

Tablo V. Deney Koşul No 1 ve 3'te Elde Edilen Rölatif Gen İfadesi Seviyelerinin Deney Koşul No 2'de Elde Edilen Rölatif Gen İfadesi Seviyelerine Oranının <1 Olduğunun İstatistiksel Önem Analizi

Sonuç	adeA	adeB	adeC	adeF	adeG	adeH	adeL	adeR	adeS
	t değerleri								
DeneySEL koşul-1 gen ifade seviyeleri, deneySEL koşul-3 gen ifade seviyelerinden farklıdır (df= 62; p< 0.05; t-tek çift kuyruk> 2.0)	2.4	-1.2	0.6	0.5	-0.6	0.0	-0.1	1.2	-1.3
DeneySEL koşul-2 gen ekspresyonu seviyeleri, deneySEL koşul-1 gen ekspresyonu seviyelerinden yüksektir (df= 62; p< 0.05; t-tek kuyruk> 1.7)	41.3	12.3	18.3	22.0	26.3	21.6	21.0	16.5	16.2
DeneySEL koşul-3 gen ekspresyonu seviyeleri, deneySEL koşul-2 gen ekspresyonu seviyelerinden düşüktür (df= 62; p< 0.05; t-tek kuyruk> 1.7)	13.5	14.5	13.9	19.8	34.0	11.5	21.4	11.7	28.4

İstatistiksel olarak önemli t değerleri kalın metin ile işaretlenmiştir (df: Serbestlik derecesi; t: t-test sonucu). Deney koşulu no 1: İnhibitör ve antibiyotik içermeyen besiyerinde üretilen; Deney koşulu no 2 (CIP): Siprofloksasin içeren besiyerinde üretilen; Deney koşulu no 3 (F): PAβN ve antibiyotik içeren besiyerinde üretilen.

lerini suşlara özgül değerlerle normalize etmek amacıyla her suş için, deney koşulu no 1 ve 3'te elde edilen rölatif gen ifadesi seviyelerinin deney koşulu no 2'de elde edilen rölatif gen ifadesi seviyelerine oranı hesaplanmış ve bu değerler kullanılarak istatistiksel önem analizi yapılmıştır (Tablo V). Diğer bir ifadeyle deney koşulu no 1 ve 3'te elde edilen rölatif gen ifadesi seviyelerinin deney koşulu no 2'de elde edilen rölatif gen ifadesi seviyelerine oranının birden küçük olması beklenmektedir.

Tasarlanan PCR yönteminde; *adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeL*, *adeR* ve *adeS* genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde CIP içeren besiyerlerine PAβN eklenmesi ile çoklu ilaç DAP sistemi genlerinin ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir (p< 0.05) (Tablo V).

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalar, direnç sorununu ele alırken yeni antimikrobiyal bileşiklerin sentezlenmesi üzerinde durmaktadır. Bununla birlikte, yeni antimikrobiyal bileşiklerin sentezlenmesinin yanı sıra, direncin inhibe edilmesine yönelik araştırmalar da önem kazanmaktadır. İnhibitör maddelerle antibiyotiklerin kombine kullanımı alternatif bir tedavi yöntemi olarak düşünülebilir. Bu düşünceden yola çıkılarak, PAβN'nin, CIP'in MİK değeri üzerine etkisinin saptanmasının, CIP direncini ortadan kaldıran CIP + PAβN konsantrasyonunun hesaplanmasının ve bu konsantrasyonlarda gerçekleşen inhibisyonun PAβN'nin DAP sistemi genlerinin ekspresyonu üzerine etkisinden kaynaklandığının gösterilmesinin amaçlandığı çalışmamızda, CIP + PAβN kombinasyonunun DAP sistemi genlerinin ekspresyonunu azaltarak CIP duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir.

PAβN ve 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP) gibi DAP inhibitörü bileşiklerin, dirençli gram-negatif bakterilerdeki CIP MİK değerlerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada PAβN'nin *A.baumannii* klinik izolatlarında MİK değerlerinde belirgin azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir²⁴. PAβN'nin CIP ile kombinasyonlarının *P.aeruginosa* CIP direncini azalttığını bildiren araştırmalar da vardır^{11,25}.

Çetinkaya ve arkadaşları¹¹, 58 *A.baumannii* izolatının %15.5'inde 25 mg/L PAβN varlığında CIP MİK değerlerinde dört kat ve daha fazla azalma tespit etmiş ve 100 mg/L PAβN varlığında bu oranın %39.6'ya çıktığını bildirmiştir. Bu çalışmada çalışmaya alınan tüm izolatlar CIP'e dirençli değildir ve dokuz izolatın CIP'e dirençliyken duyarlı hale geldiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise CIP'e dirençli izolatlar kullanılmış ve izolatların %43.28'inin 25 mg/L PAβN varlığında, %47.76'sının ise 100 mg/ml PAβN varlığında, CIP MİK değerlerinde dört kat ve daha fazla azalma tespit edilmiştir. Tespit edilen yüzdelerin daha yüksek olmasının nedeni, çalışmamızda yalnızca dirençli izolatların kullanılması ve PAβN'nin bu direnç mekanizması üzerine etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızda, DAP genlerinin aşırı ifade seviyelerinin PAβN varlığında azalması qRT-PCR ile de gösterilerek bu durum teyit edilmiştir (Tablo V).

Tasarladığımız PCR yönteminde; *adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeL*, *adeR* ve *adeS* genlerinin ekspresyon seviyeleri rRNA'ya rölatif olarak araştırılmıştır. *A.baumannii* izolatlarında PCR analizleri ile yapılan çalışmalarda *adeA*, *adeB* ve *adeC* genlerinin ifade seviyeleri arasında farklılıklar bildirilmiştir²⁶⁻²⁹. Wieczorek ve arkadaşları²⁶ ile Lin ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda²⁷, klinik izolatların tamamında *adeB* gen ifade seviyelerini yüksek bulurken, bunun aksine Modarassi ve arkadaşları ile Jia ve arkadaşları^{28,29} ise *adeA* geni ifade seviyelerini daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda da, standart besiyerinde üretilmiş olan izolatlarda (deneysel koşul-1) sadece *adeA* geni ifade seviyeleri daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Tüm bulgular değerlendirildiğinde ise standart besiyerlerine CIP eklenmesinin çoklu ilaç DAP sistemi genlerinin ifade seviyesini arttırdığı gösterilmiştir ($p < 0.05$). Siprofloksasin içeren besiyerlerine PAβN eklenmesi ise çoklu ilaç DAP sistemi genlerinin aşırı ifadesini baskılamaktadır ($p < 0.05$). *adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeL*, *adeR* ve *adeS* genlerinin ekspresyonu açısından deneysel koşul-2 ve deneysel koşul-3 arasında da anlamlı fark vardır ($p < 0.05$) (Tablo V). Dama tahtası testi sonuçları da bu bulgu ile uyumludur.

Tüm *A.baumannii* izolatları *adeRS* geni taşımamakla birlikte³⁰ bu regülatör genlerin (*adeS*, *adeR*) varlığında RND tipi DAP genlerindeki ifade seviyelerinin düzenlendiği bilinmektedir⁶. PAβN varlığında bu regülatör genlerde meydana gelen mutasyonlar⁵, tespit edilen aşırı ifade seviyelerindeki azalmanın sebebi olabilir. Bu nedenle antibiyotiklere dirençli ve duyarlı izolatlar kullanılarak, farklı bölgelerdeki mutasyonların araştırılması ve böylece direncin kaynağının ve nasıl inhibe edilebileceğinin saptanması da mümkün olabilir³¹. Yılmaz ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada³¹ *A.baumannii* izolatlarındaki kolistin direncinin *AdeRS* regülatör proteinlerindeki değişikliklere bağlı olarak *adeAB* DAP genlerinde meydana gelen aşırı ifadeden kaynaklandığını göstermiştir. Çalışmamızdan farklı

olarak aşırı ifadenin gösterilmesinin yanı sıra, bu ifade değişikliğine sebep olan mutasyonlar da tespit edilmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak farklı antibiyotik ve inhibitörlerle çalışılan ancak inhibisyonun *adeABC* genlerindeki ekspresyon seviyeleri ile ilişkilendirildiği çalışmalar da mevcuttur³²⁻³⁴. *A.baumannii* izolatlarında CIP direncinin PAβN varlığında inhibe edildiğini farklı yöntemlerle gösteren çalışmalar olmakla birlikte dama tahtası yöntemi ile aynı zamanda gen ekspresyon seviyelerinin de gösterildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır^{11,24,25,35}.

Çalışmamızın amacı, farklı deney koşullarındaki gen ifade seviyelerinin tespit edilmesi ve hesaplanan CIP + PAβN konsantrasyonlarını içeren deney koşulunda gerçekleşen inhibisyonun PAβN'in DAP sistemi genlerinin ekspresyonu üzerine etkisinden kaynaklandığının gösterilmesidir; bu amaca ulaşılmıştır. Bu bulguların aşırı ifade seviyelerinin gösterildiği izolatlarda, regülatör gen bölgelerindeki mutasyonlar da araştırılarak, yeni inhibitör adayları bileşiklerin etki mekanizmasının aydınlatılması ve DAP genlerinin ekspresyonu ile ilişkilendirilmesi konusunda yapılacak olan ileri çalışmalarda da kullanılması mümkün olabilecektir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirildi (Karar No: 08/10 ve Tarih: 29.04.2015).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat 2006; 9(3): 142-56.
2. Higgins PG, Stubbings W, Wisplinghoff H, Seifert H. Activity of the investigational fluoroquinolone finafloxacin against ciprofloxacin-sensitive and resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(4): 1613-15.
3. Gülbudak H, Aslan G, Tezcan S, Ersöz G, Ülger M, Otağ F, et al. Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Acinetobacter baumannii* izolatları arasındaki klonal ilişkinin Rep-PCR ile araştırılması. Mikrobiyol Bul 2014; 48(2): 316-24.
4. Coyne S, Courvalin P, Pe'richon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. antimicrob agents. Chemother 2011; 55(3): 947-53.
5. Dal T, Dal MS, Ağır İ. *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik direnci ve AdeABC aktif pompa sistemleri: literatürün gözden geçirilmesi. Van Tıp Derg 2012; 19(3): 137-48.
6. Xing L, Barnie PA, Su Z, Xu H. Development of efflux pumps and inhibitors (EPIs) in *A.baumannii*. Clin Microbiol: Open Access 2014; 3(1): 1000135.
7. Kor SB, Tou BSY, Chieng CKL, Hiew MSY, Chew CH. Distribution of the multidrug efflux pump genes AdeA, AdeJ, AdeI, AdeY and integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Malaysian Hospitals. Biomed Res 2014; 25(2): 143-8.
8. Lopes BS, Amyes SGB. Insertion sequence distribution of AdeR and ciprofloxacin resistance caused by efflux pumps and *gyrA* and *parC* mutations in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 2013; 41(2): 117-121.

9. Nemeç A, Maixnerova M, van der Raijden TJ, van den Broek PJ, Dijkshoorn L. Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Agents Chemother* 2007; 60(3): 483-9.
10. Yılmaz S, Altınkanat-Gelmez G, Bolelli K, Guneser-Merdan D, Over-Hasdemir MU, Yıldız İ, et al. Pharmacophore generation of 2-substituted benzothiazoles as AdeABC efflux pump inhibitors in *A.baumannii*. *SAR QSAR Environ Res* 2014; 25(7): 551-63.
11. Çetinkaya E, Çoban AY, Durupınar B. Investigation of the effect of efflux pump inhibitors to MIC values of ciprofloxacin in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4): 553-61.
12. Cortez-Cordova J, Kumar A. Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine-naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37(5): 420-4.
13. Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PABN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PLOS ONE* 2013; 8(3): e60666.
14. Ospina Barrero MA, Pietralonga PAG, Schwarz DGG, Silva Junior A, Paula SO. Effect of the inhibitors phenylalanine arginyl β -naphthylamide (PABN) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) on expression of genes in multidrug efflux systems of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Res Vet Sci* 2014; 97(2): 176-81.
15. Institute CaLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 25th Informational Supplement CLSI M100-S25. 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.
16. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Micr Infect Dis* 2002; 44(4): 363-6.
17. Özseven AG, Sesli Çetin E, Özseven L. Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu? *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 410-20.
18. Pendland SL, Messickb CR, Jung R. In vitro synergy testing of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin in combination with aztreonam, ceftazidime, or piperacillin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Micr Infect Dis* 2002; 42(1): 75-8.
19. Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, D'Amato G, Silvestri C, Licci A, et al. In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for bloodstream infections in neutropenic patients. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26(3): 235-40.
20. Chana BCL, Ipb M, Laua CBS, Luia SL, Jolivalt C, Ganem-Elbaze C, et al. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Journal of Ethnopharmacol* 2011; 137(1): 767-73.
21. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-9.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
23. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing, pp: 205-48. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. 1991. Wiley, Chichester.
24. Coban AY, Ekinç B, Durupınar B. A multidrug efflux pump inhibitor reduces fluoroquinolones resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Chemother* 2004; 50(1): 22-6.
25. Abbasi F, Yusefi S, Yavari SA. Minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of the efflux inhibitor phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide. *IMMINV* 2018; 3(4): 23-7.
26. Wiczorek P, Sacha P, Czaban S, Hauschild T, Ojdana D, Kowalczyk O, et al. Distribution of AdeABC efflux system genes in genotypically diverse strains of clinical *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(2): 106-9.

27. Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(1): 27-32.
28. Modarresi F, Azizi O, Shakibaie MR, Motamedifar M, Valibeigi B, Mansouri S. Effect of iron on expression of efflux pump (*adeABC*) and quorum sensing (*luxI*, *luxR*) genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *APMIS* 2015; 123(11): 959-68.
29. Jia W, Li C, Zhang H, Li G, Liu X, Wei J. Prevalence of genes of OXA-23 carbapenemase and AdeABC efflux pump associated with multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates in the ICU of a comprehensive hospital of Northwestern China. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12(8): 10079-92.
30. Montaña S, Vilacoba E, Traglia GM, Almuzara M, Pennini M, Fernández A, et al. Genetic variability of AdeRS two-component system associated with tigecycline resistance in XDR-*Acinetobacter baumannii* Isolates. *Curr Microbiol* 2015; 71(1): 76-82.
31. Yılmaz Ş, Hasdemir U, Aksu B, Altınkanat Gelmez G, Söyletir G. Alterations in AdeS and AdeR regulatory proteins in 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine responsive colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*. *J Chemother* 2020; 32(6): 286-93.
32. Yang YS, Chen HY, Hsu WJ, Chou YC, Perng CL, Shang HS, et al. Overexpression of AdeABC efflux pump associated with tigecycline resistance in clinical *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25(4): 512.e1-512.e6.
33. Ardehali SH, Azimi T, Fallah F, Owrang M, Aghamohammadi N, Azimi L. Role of efflux pumps in reduced susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes New Infect* 2019, 30: 100547
34. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, 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.
35. Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(4): 697-8.