

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEME DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINDA SINIF 1 İNTEGRON TAŞIYICILIĞININ ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF PRESENCE OF CLASS 1 INTEGRONS IN CLINICAL ISOLATES OF CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Iştar DOLAPÇI¹, Zeynep Ceren KARAHAN¹, İpek MUMCUOĞLU², Ebru US¹,
Derya ÇÖLOĞLU¹, Mehtap ULUSOY², Alper TEKELİ¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (dolapci@medicine.ankara.edu.tr)

² SB Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

ÖZET

Acinetobacter türleri, özellikle *Acinetobacter baumannii*, çeşitli hastane enfeksiyonlarından da sorumlu olan, önemli fırsatçı patojenlerdir. Sıklıkla geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler ve kinolonları da içeren birçok antibiyotiğe direnç geliştirme eğilimindedirler. Bu çalışmada hastane enfeksiyonu etkeni olan *A.baumannii* izolatlarında sınıf 1 integron taşıyıcılığı sıklığının saptanması amaçlanmıştır. Bunun için SB Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Eylül 2006-Ağustos 2007 tarihleri arasında kapsayan bir yıllık dönemde farklı klinik örneklerden hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen karbapeneme dirençli toplam 89 adet *A.baumannii* suşu değerlendirilmiştir. İzolatların sınıf 1 integron taşıyıcılıkları 5'CS ve 3'CS primerleri kullanılarak, korunmuş bölgelerle sınırlanmış değişken bölgeleri içeren kromozomal DNA bölümü amplifiye edilerek araştırılmıştır. Bunun sonucunda suşların %93.3 (83/89)'ünün sınıf 1 integron yapısı taşıdıkları ortaya konulmuştur. Araya giren gen kasetlerinin boyutlarının 100-3000 baz çifti arasında değiştiği izlenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Acinetobacter* türlerinde sınıf 1 integron yapısının yaygın olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da %93.3 oranı ile sınıf 1 integron pozitifliği yüksek olarak bulunmuştur. İzolatların "pulsed-field" jel elektroforezi (PFGE) yöntemi ile tiplendirilmeleri sonucunda 13 farklı gruba ayındıkları ve iki grupta yoğunlaşma olduğu izlenmiştir (grup A: 29; grup C: 21 izolat). Sınıf 1 integron yapısını taşımayan toplam 6 izolatın (6/89; %6.7) 5'inin aynı PFGE paternini (grup C) gösterdikleri saptanmıştır. İntegronlar antibiyotik direnç genlerinin dağılımında ve suşların nozokomiyal yayılımında önemli rol oynamaktadır. İntegronların polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılması, *A.baumannii* izolatlarının epidemik potansiyelini ortaya koymada hızlı ve basit bir teknik olarak görünmektedir.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, sınıf 1 integron, PFGE.

* Bu çalışma, 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (24-28 Haziran 2008, Ankara)'nde poster olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

Acinetobacter species, particularly *Acinetobacter baumannii*, are important opportunistic pathogens responsible for nosocomial infections. They are often resistant to a wide range of antibiotics, including broad-spectrum beta-lactams, aminoglycosides and quinolones. This study was aimed to investigate the presence of class 1 integrons in nosocomial *A.baumannii* isolates. Eighty-nine carbapenem resistant nosocomial *A.baumannii* strains recovered from various clinical samples at Ankara Numune Teaching and Research Hospital during September 2006-August 2007, were included in the study. To determine the presence of integrons in *Acinetobacter* isolates, a chromosomal DNA region that consists of internal variable gene sequences restricted to two conserved regions, was amplified by using 5'CS and 3'CS primers. Class 1 integrons were demonstrated in 93.3% (83/89) of the strains. The range of inserted gene cassette sizes detected varied from 100 to 3000 base pairs. Recent studies have shown that the majority of integrons belong to class 1 among *Acinetobacter* species. This study also indicated that class I integrons were present in 93.3% of the *A.baumannii* isolates. The isolates were genotyped by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and found to be distributed into 13 different groups, two of the groups predominated the isolates (group A: 29, group C: 21 isolates). Five of 6 isolates that did not have the class 1 integron (6/89; 6.7%) exhibited the same PFGE pattern (group C). Since integrons are important for the dissemination of antibiotic-resistance genes among nosocomial *Acinetobacter* species, the investigation of integrons by polymerase chain reaction method seems to be a rapid and simple technique for revealing the epidemic potential of *A.baumannii* isolates.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, class 1 integron, PFGE.

GİRİŞ

Acinetobacter baumannii ciddi hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu, önemli bir fırsatçı patojendir. Enfeksiyonlarının çoğu epidemik kaynaklıdır ve suşların çoğunun geniş spektrumlu beta-laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi antibiyotiklerin pek çoğuna artan oranda direnç geliştirmesi nedeniyle tedavileri gittikçe güçleşmektedir. *A.baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda, dirençten sorumlu genlerin taşınabilir plazmidler ve transpozonlar üzerinde yer aldığı gösterilmiştir^{1,2}. Son yıllarda integronlar üzerinde yerleşen genlere bağlı yeni bir direnç mekanizması ortaya konulmuştur. Integronlar, antibiyotik direncini kodlayan gen kasetlerini içeren, hareketli, transpozon benzeri genetik elementlerdir. Integronların yeni bir bakteriye transferi ya da direnç genlerini kodlayan gen kasetlerinin insersiyonu, çoklu antibiyotik dirençli suşların ortaya çıkmasına yol açmaktadır Bu gen kasetlerinin insersiyon ya da delesyonu, integraz ailesine bağlı bölgeye özel rekombinazlar aracılığıyla olmaktadır. Integraz gen dizilerine bakılarak bugüne kadar 6 tip integron tanımlanmış olmakla beraber, *Acinetobacter* de dahil olmak üzere gram-negatif bakterilerin klinik izolatlarında sıklıkla sınıf 1 integronlara rastlanılmaktadır¹⁻⁴.

Bu çalışmada hastane enfeksiyonu etkeni olan *A.baumannii* izolatlarında sınıf 1 integron taşıyıcılığı sıklığının saptanması amaçlanmıştır. İzolatlar aynı zamanda epidemiyolojik yakınlıklarının araştırılması amacıyla "pulsed-field" jel elektroforezi (PFGE) yöntemi ile tiplendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, SB Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Eylül 2006-Ağustos 2007 tarihleri arasında kapsayan bir yıllık dönemde, farklı klinik örneklerden hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen karbapeneme dirençli toplam 89 adet *A.baumannii* suşu değerlendirildi. Bu amaçla, kanlı ve eozin metilen blue (EMB) agarda üremiş, oksidaz negatif, gram-negatif diplokok morfolojisindeki izolatlar VITEK2 sistemi ile GN kolorimetrik kartları (bioMérieux, Fransa) kullanılarak tanımlandı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları, VITEK2 sistemi ile AST-NO22 kartları (bioMérieux, Fransa) kullanılarak saptandı ve imipeneme dirençli izolatların duyarlılık testleri, E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile tekrarlandı. Elde edilen minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin yorumları "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre yapıldı⁵.

İzolatların sınıf 1 integron taşıyıcılıkları 5'CS (5' GGC ATC CAA GCA GCA AG 3') ve 3'CS (5' AAG CAG ACT TGA CCT GA 3') primerleri⁶ kullanılarak, korunmuş bölgelerle sınırlandırılmış değişken bölgeleri içeren kromozomal DNA bölümü çoğaltılarak araştırıldı. DNA ekstraksiyonu, hazır kit (Genomic DNA from Tissue, Nucleospin Tissue / Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 25 µl son hacimde, 2.5 U Taq DNA polimeraz, 50 pmol primer, 200 µM dNTP karışımı ve 1.5 mM MgCl₂'den oluşacak şekilde ayarlandı. Üzerine 1.5 µl ekstrakte edilmiş DNA eklenerek, "hot start" PCR döngüleri ile çalışıldı. Bunun için 94°C'de 12 dakikalık denatürasyon sonrasında Taq polimeraz enzimi konuldu; döngüler, 94°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 2 dakikadan oluşan 30 döngüyü takiben 72°C'de 7 dakika son uzama şeklinde gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde, 100V'da 2 saat yürütüldükten sonra etidyum bromür ile boyanarak UV altında görüntüldü.

PFGE yöntemi için, izolatların agaroz "plug"lar içerisinde hazırlanan DNA'larının kesiminde *Apal* enzimi (Fermentas, Lituanya) kullanıldı. DNA paternleri; %1.2'lik agaroz jelde, CHEF DR II PFGE cihazında (Bio-Rad Hercules, ABD) 5V/cm akım, 14°C sıcaklık ve 0.5X TBE içerisinde başlangıç ve final atım zamanları 5 ve 20 saniye olacak şekilde 24 saat yürütülerek gösterildi. PFGE sonrasında oluşan DNA paternleri hem gözle hem de Gene Directory programı (Syngene, İngiltere) kullanılarak değerlendirildi. Benzerlik indeksi, Dice katsayısı kullanılarak %1 tolerans değerinde oluşturuldu. İzolatlar arası kümelenme ilişkisi UPGMA (Unweighted pair group method of arithmetic averages) yöntemi kullanılarak gösterildi. İzolatlar arası genotipik ilişkinin göz ile değerlendirilmesinde Tenover ve arkadaşları⁷ tarafından gösterilen ilkeler benimsendi.

BULGULAR

Değerlendirilen suşların 43 (%48.3)'ü trakeal aspirat materyalinden, 20 (%22.5)'si dolaşım sistemi örneklerinden (kan ve kateter), 11 (%12.3)'i yaradan, 7 (%7.9)'si idrardan, 5 (%5.6%)'i steril vücut sıvılarından (beyin omurilik sıvısı, plevra mayi, periton mayi) ve 3 (%3.4)'ü abse materyalinden izole edilmiştir. Suşların izole edildikleri yerler ve hastaların yattığı kliniklerle suşların sınıf 1 integron ve PFGE paternleri arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır.

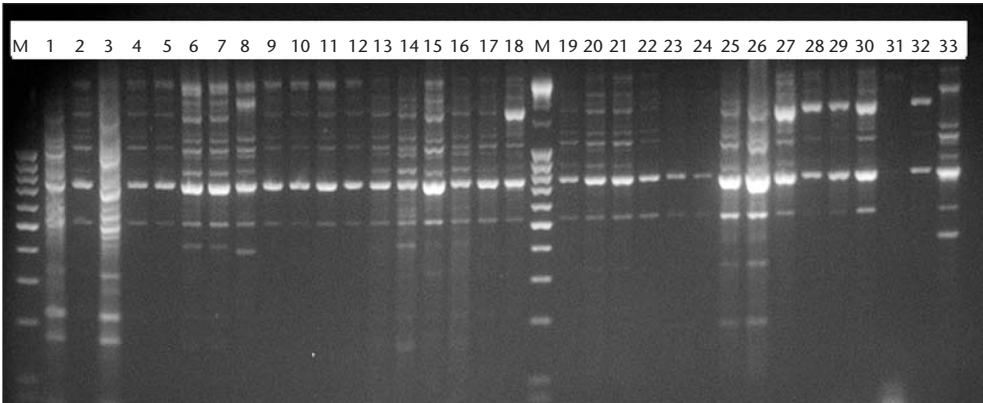
Suşların %93.3 (83/89)'ünün sınıf 1 integron yapısı taşıdıkları ortaya konulmuştur. Araya giren gen kasetlerinin boyutlarının 100-3000 baz çift (bç) arasında değiştiği izlenmiştir (Resim 1).

İzolatların PFGE yöntemi ile tiplendirilmeleri sonucunda 13 farklı gruba ayrıldıkları ve iki grupta yoğunlaştıkları görülmüştür (grup A: 29; grup C: 21 izolat). Sınıf 1 integron paternleri ile PFGE paternleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, sınıf 1 integron yapısını taşımayan toplam 6 (6/89; %6.7) izolatın 5'inin aynı PFGE paternini (grup: C) gösterdikleri saptanmıştır (Resim 2). Aynı PFGE paternini gösteren bu 5 suşun hepsi trakeal aspirat örneklerinden izole edilmiş olup, 2'si reanimasyon kliniğinden 2 gün ara ile gönderilen, farklı hastalara ait izolatlardır. Diğer 3 izolat farklı kliniklerde yatan farklı hastalara ait olup, farklı tarihlerde mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiştir. PFGE grup C içerisinde bu 5 izolattan başka, farklı sınıf 1 integron paternleri oluşturan 16 izolat daha bulunmaktadır. PFGE paterni diğerlerinden ayrı olan ve sınıf 1 integron taşımayan tek izolat, kan izolatı olup, PFGE grup D içerisinde, farklı paternlerde sınıf 1 integron taşıyan 10 ayrı izolatla birlikte yer almaktadır.

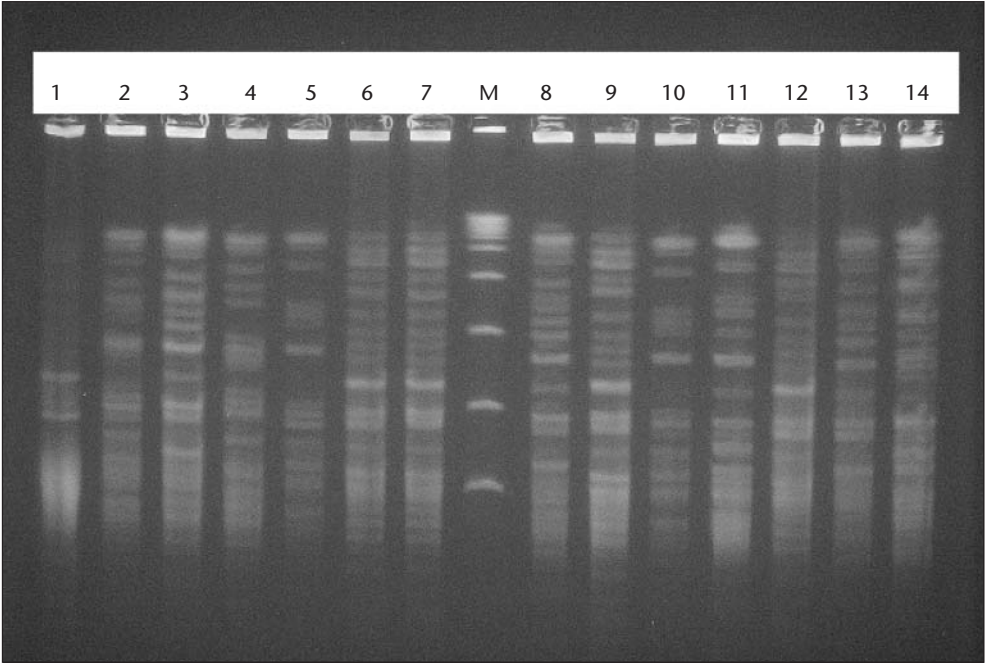
TARTIŞMA

Acinetobacter türleri tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de özellikle hastane enfeksiyonlarında baskın patojenler haline gelmiştir⁸. Hastane kaynaklı *Acinetobacter* izolatlarında antimikrobiyal direnç ve integron taşıyıcılığı arasındaki bağlantının araştırılması, direnç mekanizmalarına açıklık getirilmesi ve epidemiyolojik verilerin ortaya konulması açısından yararlı görülmektedir^{6,9}.

Araştırmamızın esas amacı hastane enfeksiyonu etkeni olan *A.baumannii* izolatlarının sınıf 1 integron taşıyıcılığı sıklığının saptanması ve PFGE ile tiplendirilmesidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Acinetobacter* türlerinde sınıf 1 integron yapısının yaygın (%35-100) olduğu bildirilmiştir^{1,2,4,6}. Bizim çalışmamızda da %93.3 oranı ile sınıf 1 integron pozitifliği yüksek olarak bulunmuştur. Integron yapısı taşımayan toplam 6 izolatın 5 (%83.3)'inin aynı profili taşıması, bu suşların aynı kökenden geldiğini düşündürmüştür.



Resim 1. *A.baumannii* suşlarının CS bölgesine özgül primerler ile yapılan amplifikasyonları sonrasında izlenen farklı bant görünüşleri.



Resim 2. *A.baumannii* suşlarının *Apal* enzimi ile yapılan PFGE'de elde edilen bant modelleri.

İntegronlar, bölgeye özgül rekombinasyon mekanizması ile antibiyotik direnç genlerinin insersiyonuna izin veren doğal ekspresyon vektörleridir. İntegron yapısı taşıyan izolatlara günümüzde artan oranda rastlanılması, antibiyotik direnç oranlarındaki artışı da açıklar görünmektedir. İntegron bölgesine birden fazla direnç geninin girmesi, çoklu dirençli suşların görülmesine de yol açmaktadır. Günümüzde moleküler yöntemler ile integron bölgesinin haritasının çıkarılmasının, bu gibi izolatlar için uygun bir epidemiyolojik araç olduğu yönünde görüşler bulunmaktadır^{2,4,6,10}. Yapılan çeşitli çalışmalarda, aynı genotipi taşıyan izolatların farklı integronlar taşıyabildikleri gibi, farklı genotiplerdeki ilişkisiz izolatların aynı integrone sahip olabildikleri de ortaya konulmuştur^{4,11}. Yine aynı çalışmalarda, genotip ve integron tipinin birlikte değerlendirilmesinin epidemiyolojik çalışmalar için daha faydalı olabileceği görüşü savunulmaktadır^{4,11}.

Bizim çalışmamıza alınan 89 izolatın hepsinin, karbapeneme dirençli suşlar olarak seçilmiş olması, saptanan yüksek integron taşıyıcılığı ile uyumludur. İntegron yapısı taşıyan 83 izolatın 13 farklı PFGE paternine dağıldığı izlenmiştir. Ancak integron yapısı taşımayan 6 izolatın 5'i aynı PFGE grubu içinde yer almıştır (grup C; bu grupta yer alan toplam izolat sayısı: 21). Diğer bir izolat ise farklı bir PFGE grubunda bulunmaktadır (grup D; bu grupta yer alan toplam izolat sayısı: 11). İzolatların farklı PFGE paternleri içinde yer alması, farklı kliniklerden farklı tarihlerde izole edildikleri ve salgın izolatları olmadıkları için olasıdır. Buna karşılık PFGE sonuçları, integron yapısı taşımayan 6 izolatın 5'inin aynı kökenden geldiğini düşündürmüştür. Bu beş izolatın hepsinin trakeal aspirat materya-

linden izole edilmiş olması dikkat çekmiş, ikisinin reanimasyon kliniğinden iki gün ara ile gönderilen ancak farklı hastalara ait izolatlar oldukları gözlenmiştir. Diğer üç izolat ise farklı kliniklerde yatan farklı hastalardan izole edilen suşlardır. Aynı PFGE paternini taşıyan ve integron yapısı göstermeyen bu suşların kökeninin aynı olabileceği düşünülmekle birlikte, sayılarının azlığı nedeniyle daha ileri yorum yapılamamıştır.

Integronlar, antibiyotik direnç genlerinin yayılımı ve *Acinetobacter* türlerinin hastane içinde dağılımı açısından önem taşımaktadırlar. Sınıf 1 integron taşıyan izolatlar beta-laktam antibiyotiklere, aminoglikozidlere, florokinolonlara ve sülfametoksazole direnç göstermektedirler¹. Bu gibi suşların hastane içinde yayılması, tedavisi güç enfeksiyonların sayısının artmasına yol açacaktır. Ayrıca, bu suşların taşıdığı epidemik potansiyeli ortaya koymak açısından da integronların araştırılması faydalı görünmektedir. Pek çok moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında klinik *A.baumannii* izolatlarının integron taşıyıcılığının saptanması, PCR ile hızlı, basit ve kolay bir şekilde mümkündür.

KAYNAKLAR

1. Oh JY, Kim KS, Jeong YW, et al. Epidemiological typing and prevalence of integrons in multiresistant *Acinetobacter* strains. APMIS 2002; 110: 247-52.
2. Gaur A, Prakash P, Anupurba S, et al. Possible role of integrase gene polymerase chain reaction as an epidemiological marker: study of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from nosocomial infections. Int J Antimicrob Agents 2007; 29: 446-50.
3. Gallego L, Towner KJ. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. J Med Microbiol 2001; 50: 71-7.
4. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, et al. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. J Clin Microbiol 2005; 43: 3074-82.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth Informational Supplement, M100 S16. 2006. CLSI, Wayne, PA.
6. Koeleman JG, Stoof J, Van der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. J Clin Microbiol 2001; 39: 8-13.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-9.
8. Vahapoglu H, Budak F, Kasap M, et al. High prevalence of OXA-51-type class D β -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 537-42.
9. Liu SY, Lin JY, Chu C, Su LH, Lin TY, Chiu CH. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 81-4.
10. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 185-91.
11. Ruiz J, Navia MM, Casals C, Sierra JM, Jiménez De Anta MT, Vila J. Integron-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 907-11.