

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Beta-Laktamaz Kaynaklı Direncin Moleküler Karakterizasyonu*

Molecular Characterization of Beta-Lactamase-Associated Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Clinical Samples

Hakan KESKİN¹, Alper TEKELİ², İştar DOLAPÇI², Duygu ÖCAL²

¹ Sinop Atatürk Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sinop.

¹ Sinop Ataturk State Hospital, Microbiology Laboratory, Sinop, Turkey.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliř Tarihi (Received): 12.12.2013 • Kabul Ediliř Tarihi (Accepted): 01.06.2014

* Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 12B3330006 proje numarasıyla desteklenmiş ve 2. Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (9-13 Kasım 2013, Belek, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

ÖZET

Acinetobacter baumannii hastanelerde, özellikle yoğun bakım ünitelerinde mortalite ve morbiditeyi artıran, hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Bu çalışmanın amacı, klinik örneklerden izole edilen *A.baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını, direnç genlerini ve izolatların birbirleriyle olan klonal ilişkilerini değerlendirip, hastanemizdeki bu bakteriye ilişkin direnç mekanizmalarını ortaya koymaktır. Çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarına Nisan 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında gönderilen 160 yatan hastaya ait 201 klinik örnekten izole edilen (trakeal aspirat %35.3, kan %27.3, apse %18.4, diğer %19) *Acinetobacter* suşu alınmuştır. *A.baumannii* izolatlarının tanımlanması ve amikasin, siprofloksasin, tetrasiklin, sulbaktam/ampisilin, trimetoprim/sülfametoksazol (TMP-SMZ), seftazidim, gentamisin, imipenem, levofloksasin, meropenem, piperasilin/tazobaktam, sefoperazon/sulbaktam, sefepim ve kolistine karşı duyarlılıklarının değerlendirilmesi otomatize sistemler [Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) ve BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD)] ile yapılmıştır. Beta-laktam direncine neden olan enzimatik mekanizmalar ve integron taşıyıcılığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılmıştır. Türkiye'de sık görölmesi nedeniyle *bla*_{PER-1}

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Hakan Keskin, Sinop Atatürk Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Osmaniye Köyü Mevki, Sinop, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 368 271 5570-1145, **E-posta (E-mail):** hknkskn81@yahoo.com

taşıyıcılığına bakılmıştır. Çalışmamızda, *A.baumannii* suşlarında çoklu ilaç direnç oranı %94.5 (190/201) olarak saptanmış; en etkili antibiyotiğin kolistin olduğu tespit edilmiş (189/201; %94); onu %32'lik duyarlılık oranı ile amikasin ve TMP-SMZ izlemiştir. Kolistine dirençli 12 izolat E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle tekrar değerlendirildiğinde tümü kolistine dirençli bulunmuştur. Metallo-beta-laktamaz üretimine neden olan genlere ait sonuçlar negatif bulunurken, bla_{OXA} genlerinin değişik oranlarda (OXA-51 %100; OXA-23 %91.5; OXA-58 %7; OXA-24 %2) pozitif olduğu görülmüştür. Suşların 42 (%21)'si bla_{PER-1} pozitif olarak saptanmış olup, hepsi seftazidime dirençlidir. İzolatlar arası klonal ilişkinin araştırılmasında "pulsed-field" jel elektroforezi (PFGE) yöntemi kullanılmış; dört farklı ana klonda kümeleşme (genotip A'da 29, genotip B'de 23, genotip C'de 18, genotip D'de 7 izolat) görülmüş, ancak ortak bir salgın izolatı saptanamamıştır. İzolatlar arasında direnç genlerinin geçişinde rol alan sınıf 1 integron varlığı araştırıldığında, 112 (%55.7) izolatta pozitiflik bulunmuştur. Sınıf 1 integron içeren izolatların genotiplere göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Çoklu ilaç direnci gösteren izolatlarda, integron taşıyıcılığı ile tetrasiklin, TMP-SMZ, imipenem, meropenem, sefoperazon/sulbaktam ve sefepim direnci arasındaki ilişki ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu çalışma ile *A.baumannii* karbapenem direncinde bla_{OXA-51} ile birlikte bulunan bla_{OXA} genlerinin önemli bir rol oynadığı, çoklu antibiyotik direncinin bu bakteri ile olan enfeksiyonlarda hala önemli bir problem olduğu ve dirence neden olan genlerin transferinde integronların aracılık edebileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak, çok ilaca dirençli *A.baumannii* izolatlarının hastanemizde oldukça yaygın olduğu görülmüş, elde edilen epidemiyolojik verilerin hastanemizde ileriye yönelik araştırmalar ve tedavi yöntemleri açısından yararlı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*; karbapenemaz; direnç genleri; sınıf 1 integron.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an important cause of nosocomial infections that particularly increase the mortality and the morbidity at the intensive care units of the hospitals. The aims of this study were to evaluate the resistance genes, antibiotic susceptibility and the clonal relations among *Acinetobacter* strains isolated from clinical samples and to determine the resistance mechanisms related to these bacteria in our hospital. A total of 201 *A.baumannii* strains isolated from different clinical samples (35.3% from tracheal aspirate, 27.3% from blood, 18.4% from abscess material, 19% from other samples) of 160 inpatients evaluated at the İbni Sina Hospital Central Bacteriology Laboratory, Ankara University School of Medicine, Turkey from April 2010 to December 2011, were included in the study. Identification of the isolates and their susceptibility testing against amikacin, ciprofloxacin, tetracycline, sulbactam/ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), ceftazidime, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem, piperacillin/tazobactam, cefoperazone/sulbactam, cefepime and colistin were performed by the automated systems, namely Vitek 2 (bioMérieux, France) and BD Phoenix (Becton Dickinson, USA). The molecular mechanisms of beta-lactamase resistance and the presence of integrons were analyzed by polymerase chain reaction (PCR). Moreover, since bla_{PER-1} gene is of high frequency in Turkey, it was also investigated in the isolates. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed to examine the clonal relations between isolates. Our results indicated that multidrug resistance rate of *A.baumannii* was 94.5% (190/201), while 94% (189/201) of the isolates were susceptible to colistin thus making it the most potent antimicrobial agent, followed by amikacin and SXT with a susceptibility rate of 32%. Twelve colistin-resistant isolates were further investigated with the E-test method (AB Biodisk, Sweden) and found to be colistin-resistant. While the results were negative for the genes responsible from metallo-beta-lactamase production, positive results were obtained for bla_{OXA} genes at various rates (OXA-51 100%; OXA-23 91.5%; OXA-58 7%; OXA-24 2%). PFGE results revealed four different main clones (29 isolates in genotype A, 23 in genotype B, 18 in genotype C and 7 in genotype D) in the study population. No common epidemic isolate was detected. Class 1 integrons which take part in the transfer of resistance genes were detected in 112 (55.7%) isolates. There was no statistically significant difference between the genotype distributions of class 1 integron positive strains ($p > 0.05$). The relationship between

en the presence of integron in multidrug resistant isolates and resistance to tetracyclin, SXT, imipenem, meropenem, cefoperazone/sulbactam and cefepime were found to be statistically significant ($p < 0.05$). Of the isolates 42 (21%) were positive for bla_{PER-1} gene and all were resistant to ceftazidime. This study indicated that bla_{OXA} genes found together with bla_{OXA-51} genes play an important role in carbapenem resistance of *A.baumannii* strains. Moreover, multidrug resistance is still an important problem in infections caused by *A.baumannii* and integrons play a role in the transfer of the resistance genes. In conclusion, multidrug resistant *A.baumannii* strains were common in our hospital and our epidemiologic data would be helpful for further investigations and in therapeutic approaches.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; carbapenemase; resistance genes; class 1 integron.

GİRİŞ

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanımının bir sonucu olarak, günümüzde kullanılan antibiyotiklerin çoğuna dirençli ve hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden biri olan *Acinetobacter* spp. enfeksiyonlarının tedavisinin gelecekte çok zor olacağı düşünülmektedir¹. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında en sık görülen beta-laktam direnci, beta-laktamaz varlığına bağlıdır². Beta-laktamazlar içinde en önemlisi, serin oksasilinazlar (Ambler sınıf D: OXA tipleri) ve metallo-beta-laktamazları da (Ambler sınıf B: IMP, VIM, SIM, NDM metallo-beta-laktamazlar) içeren karbapenemazlardır². Metallo-beta-laktamazlar (MBL), sınıf B beta-laktamazlar olup aztreonam dışında karbapenemler de dahil tüm beta-laktamları hidrolize edici kapasiteye sahiptir. *A.baumannii* izolatlarında tanımlanan MBL'ler OXA tipi karbapenemazlardan daha az görülmesine karşın karbapenemleri hidrolize edici etkileri 100-1000 kat daha güçlüdür². PER-1 içeren *A.baumannii* izolatları ise penisilinlere ve geniş spektrumlu sefalosporinlere yüksek derecede dirençlidir ve Türkiye'de oldukça yaygındır³. Karbapenem direnci, *Acinetobacter* enfeksiyonlarında tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamış ve tedavide son seçenek olarak kabul edilen polimiksinler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

Son yıllarda, dirence neden olan genlerin özel bir "bölgeye özgül" rekombinasyon mekanizması ile bakteri genomuna entegre olabilen ve bakteriden bakteriye direnç genlerinin geçişinde rol oynayan hareketli DNA elemanlarının varlığı saptanmıştır⁴. Integron adı verilen bu hareketli DNA elemanları plazmidler veya transpozonlar üzerinde bulunabilmektedir. Antibiyotiklere karşı olan direncin, izolatlar arasındaki epidemiyolojik yayılma potansiyelinin integronlar aracılığıyla olduğu düşünülmüştür⁵. Integronların yapısında bulunan integrin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle saptanabilmesi *A.baumannii* izolatlarının epidemik potansiyelini ortaya koymada hızlı ve basit bir teknik olarak görünmektedir⁵.

Çalışmamızda, *A.baumannii*'nin sahip olduğu direnç mekanizmalarına yönelik saptanabilecek verilerin hastanemizde ileriye yönelik araştırmalar ve tedavi yöntemleri açısından yararlı olabileceğinden yola çıkılarak; laboratuvarımızda farklı klinik örneklerden elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının ve beta-laktam direncine neden olan mekanizmaların moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve izolatlar arasındaki ilişkinin "pulsed-field" jel elektroforezi (PFGE) ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar, Tanımlama ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Merkez Bakterioloji Laboratuvarına Nisan 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında, çeşitli servislerde (reanimasyon, acil servis, nöroşirürji, genel cerrahi, nöroloji, postoperatif cerrahi, üroloji, nefroloji, dermatoloji, fizik tedavi ve rehabilitasyon, gastroenteroloji, göğüs cerrahi, kardiyoloji, ortopedi, transplantasyon) yatan hastalardan gönderilen örneklerden izole edilen 201 *A.baumannii* suşu dahil edildi. Klinik örnekler %5 kanlı agar ve EMB (Eosin Methylene Blue) agara ekilerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Kültürde üreyen mikroorganizmaların cins ve tür düzeyinde tayinleri Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) ve Phoenix BD (Becton Dickinson, ABD) cihazlarıyla üreticilerin talimatlarına göre yapıldı. Gönderilen 56 örnek Vitek 2 (Nisan-Ekim 2010), 145 örnek Phoenix (Kasım 2010-Aralık 2011) sistemiyle tanımlandı.

İzolatların amikasin, siprofloksasin, tetrasiklin, sulbaktam/ampisilin, trimetoprim/sülfametoksazol (TMP-SMZ), seftazidim, gentamisin, imipenem, levofloksasin, meropenem, piperasilin/tazobaktam, sefoperazon/sulbaktam, sefepim ve kolistine karşı duyarlılıklarının saptanması yine Vitek 2 ve Phoenix BD cihazları ile üreticilerin talimatlarına uygun olarak yapıldı. Kolistine dirençli izolatların duyarlılık testleri, E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile tekrarlandı. Elde edilen minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin yorumları CLSI kriterlerine göre ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$ duyarlı, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ dirençli) yapıldı⁶. *A.baumannii* olarak tanımlanan suşların *bla*_{OXA-51} genleri PCR ile araştırılarak doğrulanması yapıldı⁷.

Direnç Genleri ve İntegron Varlığının Gösterilmesi

PCR ile *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-58} genlerinin saptanması, önceden tanımlandığı şekilde yapıldı⁸. MBL genlerinin varlığı, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM} ve *bla*_{NDM-1} için özgül primerler kullanılarak araştırıldı^{9,10}. İntegron varlığı 5'CS ve 3'CS primerleri kullanılarak tespit edildi¹¹. *bla*_{PER-1} PCR, özgül primerlerle önceden tanımlandığı şekilde uygulandı¹².

Moleküler Tiplendirme

PFGE analizi *Apal* enzimi kullanılarak önceden tarif edildiği şekilde yapıldı¹³. Bant profilleri Gene Directory (Syngene, İngiltere) programı kullanılarak analiz edildi. UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) yöntemi ve Dice benzerlik katsayısı ile %1 tolerans değeri kullanılarak dendrogram oluşturuldu ve kümelenme analizi yapıldı. Analizde %90-100 uyum gösteren izolatlar aynı; %80-90 arası uyum gösterenler yakın ilişkili; %70-80 arası uyum gösterenler muhtemel ilişkili ve %70'in altında uyum gösterenler ise ilişkisiz olarak değerlendirildi¹⁴.

İstatistiksel Analiz

Çok ilaca dirençli izolatlarda sınıf 1 integronlar ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki, integron ve PER-1 içeren izolatların genotiplere dağılımı SPSS programı kullanılarak ki-kare testi ile araştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 201 *Acinetobacter* suşu 160 hastadan (104 erkek, 56 kadın) izole edilmiş olup, 128'i *A.baumannii*, 73'ü *A.baumannii-A.calcoaceticus* kompleks olarak tanımlanmıştır. İzolatlar en çok trakeal aspirat (%35.3), kan (%27.3) ve apse (%18.4) örneklerinden elde edilmiştir. *A.baumannii* suşlarının en sık izole edildiği servisler reanimasyon (108/201; %53.7) ve acil servis (29/201; %14.4) olmuş, bunları nöroşirürji (25/201;%12.4) ve genel cerrahi klinikleri (13/201; %6.7) izlemiştir.

Tüm izolatlar karşı en etkili antibiyotiğin %94 duyarlılık oranı ile kolistin olduğu tespit edilmiş; kolistine dirençli izolatlar E-test yöntemiyle tekrar değerlendirildiğinde tümü (n=12) dirençli bulunmuştur (9'unda MİK > 32 µg/ml, 3'ünde MİK > 16 µg/ml). On bir izolat dışında *Acinetobacter* suşlarının antibiyotiklere çoklu ilaç direnci gösterdiği saptanmıştır. İzolatların, test edilen antibiyotiklere karşı duyarlılık oranları Tablo I'de görülmektedir.

Duyarlılık oranları yıllara göre değerlendirildiğinde; kolistin ve amikasinin 2010 yılında çalışılan 32 izolatın tümüne etkili olduğu izlenirken, 2011 yılında kolistin 125, TMP-SMZ'nin 58 izolata etkili olduğu belirlenmiş; 6 izolat kolistin dahil bütün antibiyotiklere dirençli bulunmuştur. BD Phoenix sistemi ile tanımlanan bu 6 izolatın 3'ü Haziran, 2'si Ekim, 1'i ise Kasım ayında gönderilen örneklerden elde edilmiştir.

Direnç genlerinin analizinde; bütün izolatların (%100) *bla*_{OXA-51} geni taşıdığı görülmüş; 184 (%91.5)'ünün *bla*_{OXA-23}, 7 (%3.5)'sinin *bla*_{OXA-58} ve 2 (%1)'sinin *bla*_{OXA-24} genine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Örneklerin hiçbirinde *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}

Tablo I. *Acinetobacter* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları (n= 201)

Antibiyotik	Duyarlı Sayı (%)	Orta Duyarlı Sayı (%)	Dirençli Sayı (%)
Amikasin	63 (32)	7(3)	131 (65)
Siprofloksasin	6 (3)	0	195 (97)
Tetrasiklin	24 (12)	15 (7.5)	162 (80.5)
Sulbaktam/Ampisilin	9 (4.5)	16 (8)	176 (87.5)
Trimetoprim/Sülfametoksazol	64 (32)	1 (0.5)	136 (67.5)
Seftazidim	3 (1.5)	8 (4)	190 (94.5)
Gentamisin	15 (7.5)	20 (10)	166 (82.5)
İmipenem	16 (8)	1 (0.5)	184 (91.5)
Levofloksasin	5 (2.5)	4 (2)	192 (95.5)
Meropenem	13 (6.5)	3 (1.5)	185 (92)
Piperasilin/Tazobaktam	2 (1)	6 (3)	193 (96)
Sefoperazon/Sulbaktam	20 (10)	2 (1)	179 (89)
Sefepim	12 (6)	9 (4.5)	180 (89.5)
Kolistin	189 (94)	0	12 (6)

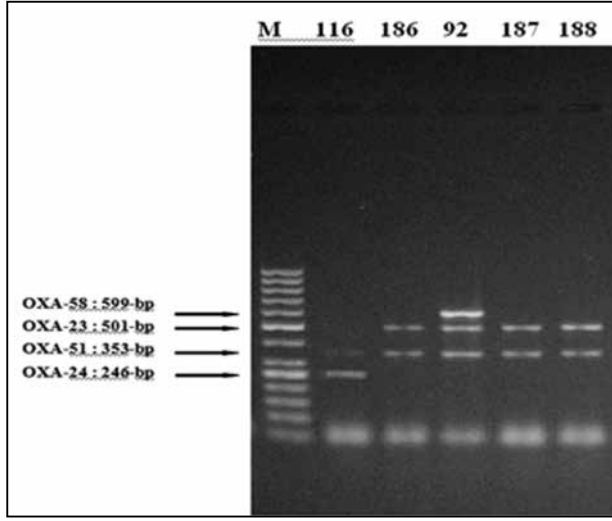
*bla*_{NDM} genleri saptanamamıştır. Tek başına *bla*_{OXA-51} içeren (diğer OXA genlerini içermeyen) 12 izolat bulunmuş; bu izolatların hiçbirinin fenotipik olarak imipenem veya meropenem dirençli olmadığı gözlenmiştir. İmipenem ve meropenem dirençli izolatlar bakıldığında, *bla*_{OXA-51}'in yanında mutlaka oksasilineazları kodlayan diğer genlerden bir veya birkaçının olduğu görülmüştür. İzolatların 112 (%55.7)'si gen kasetleriyle birlikte sınıf 1 integron içermektedir. Çoklu ilaç direnci gösteren izolatlarda, integron taşıyıcılığı ve antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin istatistiksel değerlendirmesinde; tetrasiklin, TMP-SMZ, imipenem, meropenem, sefoperazon/sulbaktam ve sefepim direnci ile integron taşıyıcılığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (Tablo II). Suşların 42 (%21)'si *bla*_{PER-1} pozitif olarak saptanmış olup, hepsi seftazidime dirençlidir.

Moleküler tiplendirme sonuçları incelendiğinde, PFGE ile izolatların dört genotip altında kümelendiği görülmüş; genotip A'da 29 (%14.4), genotip B'de 23 (%11.4), genotip C'de 18 (%8.9) ve genotip D'de 7 (%3.4) izolat yer almıştır. Bu gruplara ait izolatların birbirleriyle olan benzerliği %70'in altında bulunmuş, baskın izolata rastlanmamış ve salgın izolatı olarak değerlendirilmemişlerdir (Şekil 2). Yirmi izolat genotip A ile 1-3 (A1), 6 izolat ise 4-6 bant farklı bulunurken (A2); 21 izolat genotip B ile 1-3 (B1), 4 izolat ise 4-6 bant farklıdır (B2). Dört izolat genotip C ile 1-3 (C1), 3 izolat ise 4-6 bant farklı bulunurken (C2); dört izolat genotip D ile 1-3 (D1) bant farklı olarak bulunmuştur. Yirmi beş izolat bahsedilen hiçbir grup ile benzer bant içermemektedir. 2010 yılındaki izolatlar içerisinde genotip A'ya rastlanmamıştır.

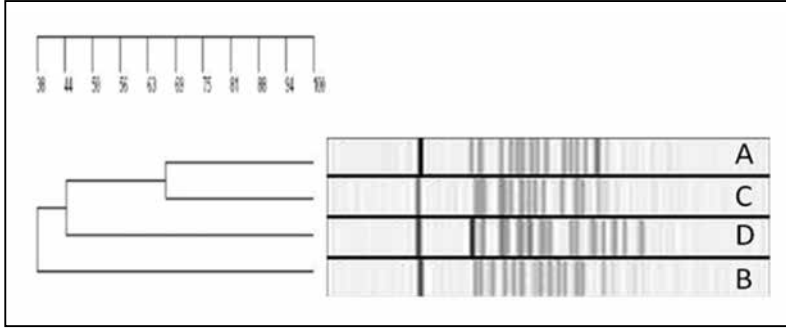
Tablo II. Çok İlaça Dirençli Suşlarda Sınıf 1 İntegronlar ve Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki

Antibiyotik	Dirençli izolat sayısı (%)	Sınıf 1 integron pozitif izolat sayısı	p değeri*
Amikasin	131 (65)	72	0.394
Siprofloksasin	195 (97)	106	0.418
Tetrasiklin	162 (80.5)	62	< 0.001
Sulbaktam/Ampisilin	176 (87.5)	102	0.116
Trimetoprim/Sülfametoksazol	136 (67.5)	81	0.028
Seftazidim	190 (94.5)	105	0.188
Gentamisin	166 (82.5)	94	0.159
İmipenem	184 (91.5)	79	0.004
Levofloksasin	192 (95.5)	86	0.151
Meropenem	185 (92)	105	0.003
Piperasilin/Tazobaktam	193 (96)	107	0.053
Sefoperazon/Sulbaktam	179 (89)	103	0.007
Sefepim	180 (89.5)	101	0.029
Kolistin	12 (6)	8	0.354

* p< 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 1. OXA-karbapenemaz kodlayan genlerin multipleks PCR ile saptanması [Hat 1: OXA-51, OXA-24; Hat 2, 4 ve 5: OXA-23, OXA-51; Hat 3: OXA-58, OXA-23 ve OXA-51 pozitif örnekler (M: Moleküler büyüklük belirteci, 50 bp DNA Ladder)].



Şekil 2. Dört genotipe ait PFGE dendogramı.

Kolistine dirençli izolatların genotipik özellikleri değerlendirildiğinde, %83'ünün genotip A ve A1'e ve hepsinin 2011 yılına ait olduğu görülmüştür. Genotip A'daki kolistine dirençli 4 suş, dört farklı hastadan, 25 Ekim-17 Kasım 2011 tarihleri arasında, acil ve reanimasyon servislerinden gönderilen kan ve trakeal aspirat kültürlerinden izole edilmiştir. Genotip A1'deki 6 suştan 4'ünün 22 Mayıs-29 Haziran arasında reanimasyon servisinden gönderilen kan ve trakeal aspirat kültürlerinden; 2'sinin 14 Ekim-22 Ekim arasında acil ve postoperatif cerrahi servisinden gönderilen kan ve apse kültürlerinden izole edildiği belirlenmiştir. Kolistine dirençli diğer iki suş, nisan ayında aynı hastadan gönderilen iki farklı BOS örneğinden izole edilmiş olup herhangi bir genotip grubuna ait bulunmamıştır.

Sınıf 1 integron gen kasetleri ile PFGE paternleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, genotip A'da 15, genotip B'de 19, genotip C'de 9, genotip D'de 3, identik banda sahip

olmayan grupta ise 10 izolatın gen kaseti içerdiği saptanmıştır. Sınıf 1 integron içeren izolatların genotiplere göre dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.068$).

TARTIŞMA

Yoğun bakım üniteleri hastane enfeksiyonlarının en sık görüldüğü birimlerdir ve buna paralel olarak *Acinetobacter* enfeksiyonları da en sık yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Yapılan çok merkezli bir çalışmada Çiftci ve arkadaşları¹⁵ *Acinetobacter* suşlarının en fazla (%90.3) yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edildiğini bildirmişlerdir. Enfeksiyonlar sıklıkla kontamine nemlendiriciler ve ventilatör aksamından kaynaklanmakta olup, *Acinetobacter* spp. kan kültürleri ve trakeal aspirat örneklerinden izole edilmektedir¹⁶. Çalışmamızda da anesteziyoloji ve reanimasyon yoğun bakım ünitesi %53.7 oranı ile *A.baumannii*'nin en sık izole edildiği servis olmuş; 71 izolat (%35.3) trakeal aspirat, 55 izolat (%27.3) kan ve 37 izolat da (%18.4) apse/yara örneklerinden izole edilmiştir.

A.baumannii'nin antimikrobiyal duyarlılık oranları farklılıklar göstermekte, sıklıkla beta-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler ve florokinolonlara direnç görülmektedir¹⁷. Çalışmamızda en fazla florokinolon (siprofloksasine %97, levofloksasine %95.5) ve piperasilin/tazobaktam (%96) direnci görülmüştür. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda, *A.baumannii* için direnç oranları imipenem için %63, siprofloksasin için %32-87, amikasin için %41-70, sefepim için %46-93.3, ofloksasin için %58, gentamisin için %62-87, TMP-SMZ için %63-75, piperasilin/tazobaktam için %44.1-100, seftriakson için %77-85, piperasilin için %77.5-100, ampisilin/sulbaktam için %65-92.5 olarak bildirilmiştir¹⁸⁻²⁰. Çalışmamızda seftazidim, sefepim, ampisilin/sulbaktam ve piperasilin/tazobaktam için direnç oranları sırasıyla; %94.5, %89.5, %87.5 ve %96 olarak bulunmuştur. Üçüncü kuşak sefalosporinlere bu kadar yüksek düzeyde direnç olması, bu antibiyotiklerin toplumda ve hastanede çok yaygın kullanımlarına bağlı olabilir. Bu sonuçlara göre elde edilen direnç oranları, ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalardaki üst yüzdelere daha yakın görünmektedir¹⁸⁻²⁰.

Çalışmamızda, izolatların %91.5'inin *bla*_{OXA-23}, %3.5'inin *bla*_{OXA-58} ve %1'inin *bla*_{OXA-24} geni taşıdığı belirlenmiştir. Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-58} farklı oranlarda saptanmıştır. Gür ve arkadaşları²¹, Ergin ve arkadaşları²² ile Çiftci ve arkadaşları¹⁵ *bla*_{OXA-23} genini baskın olarak saptamışken, Külah ve arkadaşları²³ *bla*_{OXA-58} genini baskın olarak bulmuş, *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-24} saptayamamıştır. Ayrıca bu çalışmalarda farklı merkezlerin farklı oranlar bildirdiği ve *bla*_{OXA-23} görülme oranının son yıllarda arttığı belirtilmektedir. Çalışmamızla da uyumlu olan bu bulgu, *bla*_{OXA-23} geninin yaygınlaştığının bir göstergesi olabilir. *A.baumannii* *bla*_{OXA-51} benzeri genlerin sıklıkla kazanılmış *bla*_{OXA} tipi genlerle birlikte bulunduğu ve uygun koşullarda karbapenem direncinde, en azından sinerjik rolü olabileceği öne sürülmüştür⁸. Çalışmamızda da benzer şekilde tek başına *bla*_{OXA-51} bulunan (diğer OXA genleri bulunmayan) izolatların tamamı ($n=12$) imipenem ve meropeneme duyarlı veya orta duyarlı bulunmuştur. Bu izolatlar, beraberinde OXA genlerinden bir veya birkaçını bulundurduğunda imipenem ve meropeneme dirençli hale gelmişlerdir.

PCR analizi ile MBL varlığını saptamak güvenilir bir yöntem olmasına rağmen, her zaman geni saptayamadığına dair yayınlara da rastlamak mümkündür²⁴. Aktaş ve arkadaşları²⁵, 28 *P.aeruginosa* ve 11 *A.baumannii* klinik izolatında değişik fenotipik yöntemlerle %0-100 arasında değişen oranlarda MBL pozitifliği saptarken, *bla*_{VIM/IMP} varlığını hiçbir izolatta gösterememişlerdir. Eser ve arkadaşları²⁶, fenotipik olarak MBL pozitif olan 64 izolatta *bla*_{IMP-1} ve *bla*_{VIM-2} gen varlığını PCR ile araştırmış ve tüm isolatları negatif bulmuşlardır. Ankara'da yapılan başka bir çalışmada, imipeneme dirençli 79 *Acinetobacter* izolatının E-test ile %51.9'unun, kombine disk sinerji testi ile %58.2'sinin, çift disk sinerji testi ile %55.7'sinin, modifiye Hodge testi ile %69.6'sının MBL ürettiği saptanmış, PCR yöntemiyle *bla*_{IMP-1} geni araştırılmış, ancak pozitiflik bulunamamıştır²⁷. Bizim çalışmamızda da, araştırılan 201 izolatta *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SIM} ve *bla*_{VIM} genleri saptanamamıştır. Fenotipik ve genotipik testler arasındaki bu tutarsızlık, karbapenem direncine neden olan başka genlerin veya araştırılan mekanizmaların dışında farklı bir enzimatik yolun bulunması nedeniyle olabilir. Yapılan çalışmalarda PCR için kullanılan farklı primer dizilimleri de sonuçları etkilemiş olabilir. MBL üretiminin gösterilmesi için genotipik testlerin yapılması daha güvenilir olacaktır.

Her ne kadar *A.baumannii*'de en sık görülen beta-laktam direnci beta-laktamaz varlığına bağlı olsa da, çalışmamızdaki örneklerin sahip olduğu, karbapenemleri de içeren yüksek düzeyde beta-laktam direncini sadece enzimatik mekanizmalar ile açıklamak mümkün olmamıştır. Bu organizmanın karmaşık doğasına uygun olarak, aynı fenotipi oluşturmak üzere birçok mekanizmanın bir arada çalışabileceği bildirilmektedir²⁸. Hujer ve arkadaşlarının²⁹ yaptığı çalışmada, IMP, VIM ve GIM MBL'lere bakılmış ancak yüksek düzeyde karbapenem direncine ait bir kanıt bulunamamış ve çalışmaya dış membran proteinlerine yönelik olarak devam edilmesi önerilmiştir. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da karbapenemleri de içeren beta-laktam direncinden enzimatik mekanizmalarla beraber dış membran proteinleri ve atım pompa sistemlerinin sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz.

PER-1 taşıyan *A.baumannii* isolatları penisilinlere ve geniş spektrumlu sefalosporinlere yüksek düzeyde dirençlidir. Çalışmamızda 201 örneğin %21'inde *bla*_{PER-1} pozitif olarak saptanmıştır. Bu oran, ülkemizdeki sonuçlara yakın görülmektedir³. PER-1 taşıyan isolatların hepsi (n= 42) seftazidime dirençlidir. Genotip dağılımına bakıldığında, genotip C'de istatistiksel olarak anlamlı kümeleşme görülmüştür (p= 0.001). Genotip C'ye ait (n= 18) 13 suş, Nisan-Eylül 2010 tarihleri arasında izole edilmiştir. Seftazidime dirençli isolatlarda PER-1 taşıyıcılığının da araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, klonal ilişkili isolatların seftazidim direncinde rolü olabileceği ve PER-1 taşıyan isolatların yüksek mortalite ile ilişkili olduğu belirtilmektedir^{30,31}. Saptadığımız seftazidim direncinden genotip C'deki isolatlar sorumlu olabilir; ancak bu isolatların mortaliteye olan katkısına bakmak için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Acinetobacter türlerinde sınıf 1 integron varlığı oldukça yaygındır. Çalışmamızda sınıf 1 integron pozitifliği %55.7 oranında bulunmuştur. Yüksek integron taşıyıcılığı, hastanemizdeki klinik örneklerden elde edilen çok ilaca dirençli *A.baumannii* isolatlarının yayılım potansiyelini göstermesi açısından önemlidir. *Acinetobacter*'deki integron varlığı

ğının beta-laktam, aminoglikozid, kloramfenikol, trimetoprim ve rifampisin direncinde rol oynayabileceği ifade edilmiştir⁵. TMP-SMZ direncine neden olan genlerin (*dhfr*) integronlar üzerinde taşındığı bilinmektedir³². Çalışmamızda bütün izolatlar içinde TMP-SMZ'ye duyarlı izolat sayısı 64 (%31) iken, integron içeren izolatlarda duyarlı izolat sayısı 28 (%25)'dir. TMP-SMZ direnci ile sınıf 1 integron taşıyıcılığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.028$).

A.baumannii salgınlarının araştırılmasında kullanılan PFGE yöntemi, günümüzde epidemiyolojik tiplendirme için "altın standart" olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamızda 2010 yılında genotip C ve D'ye ait izolatlar baskın durumda iken, 2011 yılında genotip A ve B baskın hale geçmiştir. 2011 yılında görülen SXT duyarlılığından büyük ölçüde genotip A ve B'deki izolatlar sorumludur. Genotip A izolatlarının %62.1'i, genotip B izolatlarının ise %43.5'i TMP-SMZ'ye duyarlıdır.

Kolistin direnciyle ilgili mekanizmalar ve direncin bakteriler arasında genetik olarak geçiş yolları tam olarak aydınlatılmış değildir. Çalışmamızda otomatize sistemler ile dirençli bulunan izolatlar E-test yöntemiyle tekrar değerlendirilmiş ve tüm izolatlar dirençli saptanmıştır. Bu izolatların %83'ü genotip A ve A1'e, ayrıca bütün kolistine dirençli izolatlar da 2011 yılına aittir. Çetin ve arkadaşlarının³³ yaptıkları çalışmada da, bizim çalışmamızdakine benzer şekilde yüksek düzeyde kolistin direnci (%12.1) saptanmıştır. 2011 yılında kolistin direncindeki artışın nedeni, kliniklerde sıklıkla kullanılmaya başlanması olabilir. Antibiyotik duyarlılıklarındaki bu değişikliğin, kliniklerde belirlenmiş antibiyotik tedavi protokolleriyle olan ilişkisini saptamak ve kolistin direncini tam olarak aydınlatmak için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamız, hastanemizde *A.baumannii* izolatlarının moleküler özelliklerinin ortaya konması açısından bir başlangıç olma niteliğindedir. Bundan sonra bu bakteri ile yapılacak ileri düzey çalışmalar ile; epidemiyolojik veriler, dirence neden olan mekanizmalar ve risk faktörleri daha iyi ortaya konabilecek ve böylece özellikle yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon kontrolünün ve tedavi protokollerinin daha etkin ve verimli olarak gerçekleştirilebilmesine olanak sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Hanlon GW. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. Lett Appl Microbiol 2005; 41(5): 375-8.
2. Poirer L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12(9): 826-6.
3. Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, Sanic A, Vahaboglu H; Study Group. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. FEMS Microbiol Lett 2005; 249(2): 241-5.
4. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(1): 185-91.
5. Gaur A, Prakash P, Anupurba S. 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(4): 446-50.

6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement, M100-S23, 2013. CLSI, Wayne, PA.
7. Turton JF, Woodford N, Glover J, et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51}-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol 2006; 44(8): 2974-6.
8. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(4): 351-3.
9. Mostachio AK, Van der Heidjen I, Rossi F, Levin AS, Costa SF. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. J Med Microbiol 2009; 58(Pt 11): 1522-4.
10. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA. How to detect NDM-1 producers. J Clin Microbiol 2011; 49(2): 718-21.
11. Koeleman JG, Stoof J, Van der Bijl MW, et al. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(1): 8-13.
12. Naas, T, Bogaerts P, Bauraing C, et al. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. J Antimicrob Chemother 2006; 58(1): 178-82.
13. Dolapci I, Karahan ZC, Mumcuoglu I, et al. Investigation of presence of class 1 integrons in clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Mikrobiyol Bul 2010; 44(4): 547-52.
14. Tenover F, 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(9): 2233-9.
15. Çiftci İH, Aşık G, Karakeçe E, et al. Distribution of *bla*OXA genes in *Acinetobacter baumannii* strains: a multi-center study. Mikrobiyol Bul 2013; 47(4): 592-602.
16. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21(3): 538-82.
17. Weinbren MJ, Johnson AP, Kaufmann ME, Livermore D. *Acinetobacter* spp. isolates with reduced susceptibilities to carbapenems in a UK burns unit. J Antimicrob Chemother 1998; 41(5): 574-6.
18. Arda B, Yamazhan T, Ulusoy S, Özinel MA. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen non-fermentatif gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılığındaki 4 yıllık değişim (1995-1999). Ankem Derg 2000; 14(2): 153.
19. Tatman Otkun M, Gürcan Ş, Özer B, Türe M. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde 1994'den 2000'e yıllık antibiyotik direnç değişimi. ANKEM 2003; 17(1): 1-6.
20. Yaylı G, Aksoy S. Hastane infeksiyonlarından izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33(1): 61-3.
21. Gür D, Korten V, Ünal S, et al. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. J Med Microbiol 2008; 57(12): 1529-32.
22. Ergin A, Haşcelik G, Eser OK. Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. Scand J Infect Dis 2013; 45(1): 26-31.
23. Kulah E, Mooij MJ, Comert F, et al. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. Int J Antimicrob Agents 2010; 36(2): 114-8.
24. Gibb A, Tribudharat C, Moore R, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(1): 255-8.
25. Aktaş Z, Kayacan CB. Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test disk synergy and PCR. Scand J Infect Dis 2008; 40(4): 320-5.
26. Eser ÖK, Ergin A, Haşcelik G. Erişkin hastalardan izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç ve metallo-beta-laktamaz varlığı. Mikrobiyol Bul 2009; 43(3): 383-90.
27. Ulusoy Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N ve ark. İmipenem dirençli *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2011; 41(1): 29-36.

28. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, et al. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2003; 51(3): 565-74.
29. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(12): 4114-23.
30. Vahaboğlu H, Coşkun F, Tansel O, et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type) producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Clin Microbiol 2001; 50(7): 642-5.
31. Erač B, Hoşgör-Limoncu M, Ermertcan Ş, et al. Prevalence of *bla*_{PER-1} and integrons in ceftazidime-resistant gram-negative bacteria at a university hospital in Turkey. Jpn J Infect Dis 2013; 66(2): 146-8.
32. Gu B, Tong M, Zhao W, et al. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. J Clin Microbiol 2007; 45(1): 241-3.
33. Sesli Cetin E, Durmaz R, Tetik T, Otlu B, Kaya S, Çalışkan A. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. Am J Infect Control 2009; 37(1): 56-64.