Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2016; 50(4): 511-521*

doi: 10.5578/mb.29176

Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Toplanan Klinik *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Beta-Laktamaz Gen Sıklığı ve Dağılımının Araştırılması: Çok Merkezli Bir Çalışma*

Investigation of the Frequency and Distribution of Beta-Lactamase Genes in the Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Collected From Different Regions of Turkey: A Multicenter Study

Fatih Şaban BERİŞ[1], Emine Esra BUDAK[1], Duygu GÜLEK[1], Aytül UZUN[1], Zeynep ÇİZMECİ[2], Fırat Zafer MENGELOĞLU[3], Şahin DİREKEL[4], Yeliz ÇETİNKOL[5], Yasemin AY ALTINTOP[6], Meryem IRAZ[7], Tuba DAL[8], Safiye Umut SAY COŞKUN[9], Pervin Özlem BALCI[10], Tuba KAYMAN[11], Ahmet ÇALIŞKAN[12], Yelda YAZICI[13], İsmail TOSUN[14], Ayşe ERTÜRK[15], Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK[16]

[1] Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize.
[1] Recep Tayyip Erdoğan University Faculty of Arts & Sciences, Department of Biology, Rize, Turkey.

[2] Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.
[2] Bakırköy Dr. Sadi Konuk Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Istanbul, Turkey.

[3] Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bolu.
[3] Abant İzzet Baysal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bolu, Turkey.

[4] Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Giresun.
[4] Giresun University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Giresun, Turkey.

[5] Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
[5] Ordu University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ordu, Turkey.

[6] Niğde Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kayseri.
[6] Niğde State Hospital, Microbiology Laboratory, Kayseri, Turkey.

[7] Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
[7] Bezmialem Vakif University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

[8] Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.
[8] Dicle University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Diyarbakır, Turkey.

[9] Tokat Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tokat.
[9] Tokat State Hospital, Microbiology Laboratory, Tokat, Turkey.

[10] Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tokat.
[10] Gaziosmanpaşa University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Tokat, Turkey.

[11] Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kayseri.
[11] Kayseri Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Kayseri, Turkey.

İletişim (Correspondence): *Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban Beriş, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 53100, Rize, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 464 223 6126,* ***E-posta (E-mail):*** *fatihberis@gmail.com*

[12] Kahramanmaraş Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.
[12] Kahramanmaraş State Hospital, Microbiology Laboratory, Kahramanmaraş, Turkey.

[13] Trabzon Ahi Evren Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Trabzon.
[13] Trabzon Ahi Evren Thoracic and Cardiovascular Surgery Training and Research Hospital, Medical Microbiology Department, Trabzon, Turkey.

[14] Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kırıkkale.
[14] Kirikkale High Specialization Hospital, Microbiology Laboratory, Kirikkale, Turkey.

[15] Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize.
[15] Recep Tayyip Erdoğan University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Rize, Turkey.

[16] Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize.
[16] Recep Tayyip Erdoğan University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Rize, Turkey.

** Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2013.102.03.12; 2013.102.03.13 ve 2013.102.03.4 nolu projeler ile desteklenmiştir.*

Geliş Tarihi (Received): 13.11.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 27.09.2016

ÖZ

Geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) tiplerinden olan TEM, SHV ve CTX-M genlerinin dağılımı ve çeşitliliğinin bilinmesi, enfeksiyonların kontrolü ve tedavisinde önem taşımaktadır. Klinik izolatlardan, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA dizi analizi ile GSBL genlerinin tanımlanması, moleküler epidemiyolojileri ve risklerine ait verilerin elde edilmesinde oldukça yararlıdır. Bu çalışmada, ülkemizin farklı bölgelerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında beta-laktamaz gen sıklığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2011-2012 yılları arasında, Türkiye'nin 12 farklı ilindeki hastanelerden [Bolu (n= 67), Tokat (n= 47), Trabzon (n= 25), Ordu (n= 27), Diyarbakır (n= 47), Niğde (n= 31), Kayseri (n= 36), Ankara (n= 41), Kırıkkale (n= 26), Kahramanmaraş (n= 25), Mersin (n= 40), İstanbul (n= 107)] toplanan 519 *A.baumannii* suşu dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanması, konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra VITEK2 Compact (BioMerieux, Fransa) ve API 32GN (BioMerieux, Fransa) otomatize sistemleri ile yapılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış ve CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. İzolatların tigesiklin ve kolistine duyarlılıkları ise BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) kriterlerine göre yorumlanmıştır. Suşlarda, beta-laktamaz genleri olan bla_{oxa-51}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M1}, bla_{CTX-M2}, bla_{GES} ve bla_{VIM} varlığı PCR ile araştırılmıştır. Çalışmaya alınan 519 *A.baumannii* suşunun, kolistin, tigesiklin, sülbaktam/ampisilin, amoksasilin/klavulanik asit, sefoperazon/sulbaktam, tobramisin, seftriakson, piperasilin-tazobaktam, gentamisin, ampisilin, tetrasiklin, sefepim, piperasilin, amikasin, trimetoprim-sülfametoksazol, meropenem, levofloksasin, siprofloksasin, imipenem ve seftazidime direnç oranları sırasıyla; %0.6, %2.7, %11.9, %15.2, %21, %22.9, %23.9, %48.6, %59.5, %61.8, %66.3, %67.8, %69.2, %71.1, %77.5, %78.6, %81.1, %82.9, %87.5 ve %89.4 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda tüm suşlarda (%100) OXA-51 pozitif olarak bulunmuş; 443 (%85.4) suşun ise, araştırılan diğer beta-laktamaz genlerini taşıdığı tespit edilmiştir. Genlerin dağılımına bakıldığında; bla_{TEM-1} %55.7 (289/519) oranıyla baskın beta-laktamaz geni olarak saptanmış, bunu %12.1 (63/519) ile bla_{CTX-M2}, %8.1 (42/519) ile bla_{CTX-M1}, %7.7 (40/519) ile bla_{SHV}, %1.5 (8/519) ile bla_{GES} ve %0.2 (1/519) ile bla_{VIM} izlemiştir. Bu suşların %16.3'ünde (72/443) GSBL gen birlikteliği mevcuttur. En sık birlikte bulunan genlerin TEM+CTX-M2 (20/72, %27.8), TEM+SHV (11/72, %15.3) ve TEM+CTX-M1 (10/72, %13.9) olduğu görülmüştür. Çalışmada ayrıca, GSBL genlerinin izolatlardaki dağılımının illere göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Buna göre; Bolu, Niğde, Mersin ve Kahramanmaraş illerine ait izolatlarda $bla_{CTX-M1/M2}$; Bolu, Kahramanmaraş ve Diyarbakır illerine ait izolatlarda ise bla_{SHV} genine hiç rastlanmamıştır. bla_{TEM} geninin bütün illerden izole edilen suşlarda bulunduğu; en yüksek oranın Niğde (28/31, %90.3) ve en düşük oranın Trabzon (1/25, %4) izolatlarında saptadığı belirlenmiştir. GES-11 tip GSBL varlığı ise sadece Niğde izolatlarında (8/31; %25.8) tespit edilmiştir. Metallo-beta-laktamaz VIM taramasında, sadece Niğde'den izole edilen bir suşta bu gene rastlanmış (1/31; %3.2) ve DNA dizi analizi

ile VIM-5 tipi olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma, Türkiye'de *A. baumannii* suşlarında GSBL'nin moleküler yöntemlerle karakterize edildiği ulusal kapsamlı ilk araştırma olup, ülkemizin farklı bölgelerinden izole edilen klinik *A.baumannii* suşları arasında en baskın GSBL tipinin TEM olduğunu (289/519, %55.7) ortaya koymaktadır. Çalışmamızın bulguları, ülkemizde daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii; GSBL; TEM; SHV; CTX-M; GES; VIM; beta-laktamaz, Türkiye.*

ABSTRACT

The diversity and distribution of TEM, SHV and CTX-M type of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are important for the treatment and control of infections. Determination of ESBL genes in clinical isolates by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing can obtain useful data for their molecular epidemiology and risk. The aim of this study was to investigate the frequency of beta-lactamase genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from different regions of Turkey. A total of 519 *A.baumannii* strains collected from hospitals located at 12 different provinces of Turkey (Bolu (n= 67), Tokat (n= 47), Trabzon (n= 25), Ordu (n= 27), Diyarbakır (n= 47), Niğde (n=31), Kayseri (n= 36), Ankara (n= 41), Kirikkale (n= 26), Kahramanmaraş (n= 25), Mersin (n= 40), Istanbul (n= 107)] between 2011-2012 period were included in the study. Identification of the isolates were performed by both conventional methods and automated systems, VITEK2 Compact (BioMerieux, France) and API 32GN (BioMerieux, France). Disc diffusion method was used for the detection of antibiotic susceptibilities of the isolates and the results were evaluated according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) criteria. Tigecycline and colistin sensitivities of the isolates were evaluated according to BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) criteria. The presence of beta-lactamase genes, namely $bla_{\text{oxa-51}}$, bla_{TEM}, bla_{SHV}, $bla_{\text{CTX-M1}}$, $bla_{\text{CTX-M2}}$, bla_{GES} and bla_{VIM} were detected by PCR. In our study, the resistance rates against colistin, tigecycline, ampicillin-sulbactam, amoxicillin-clavulanic acid, cefoperazone/sulbactam, tobramycin, ceftriaxone, piperacillin-tazobactam, gentamicin, ampicillin, tetracycline, cefepime, piperacillin, amikacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, meropenem, levofloxacin, ciprofloxacin, imipenem and ceftazidime were detected as; 0.6%, 2.7%, 11.9%, 15.2%, 21%, 22.9%, 23.9%, 48.6%, 59.5%, 61.8%, 66.3%, 67.8%, 69.2%, 71.1%, 77.5%, 78.6%, 81.1%, 82.9%, 87.5% and 89.4%, respectively. All of the isolates (100%) were OXA-51 positive, while 443 (85.4%) out of 519 strains harbored other beta-lactamase genes searched in the study. When the distribution of the genes were evaluated, $bla_{\text{TEM-1}}$ was found as the predominant one with a frequency rate of 55.7% (n=289/519), followed by $bla_{\text{CTX-M2}}$ (63/519, 12.1%), $bla_{\text{CTX-M1}}$ (42/519, 8.1%), bla_{SHV} (40/519, 7.7%), bla_{GES} (8/519, 1.5%) and bla_{VIM} (1/519, 0.2%). Cooccurence of ESBL genes was detected in 16.3% (72/443) of the strains, being mostly TEM+CTX-M2 (20/72, 27.8%), TEM+SHV (11/72, 15.3%) and TEM+CTX-M1 (10/72, 13.9%). In addition, it was noted that the distribution of ESBL genes between isolates showed differences according to the provinces. Accordingly, none of the strains isolated from four provinces (Bolu, Niğde, Mersin, Kahramanmaraş) and from three provinces (Bolu, Kahramanmaraş, Diyarbakir) harbored $bla_{\text{CTX-M1/M2}}$ and bla_{SHV} genes, respectively. The bla_{TEM} gene was detected in isolates collected from all of the provinces, with a highest frequency in Niğde (28/31, 90.3%) and lowest in Trabzon (1/25, 4%). The presence of GES-11 type ESBLs was found only in the isolates sent from Niğde province (8/31; 25.8%). Screening of metallo-beta-lactamase VIM gene also yielded a single positive result amongst only Niğde isolates (1/31; 3.2%), and this gene was identified as VIM-5 type by DNA sequencing. This study which is the first comprehensive national research to characterize ESBLs in *A.baumannii* isolates by molecular methods, showed that the most prevalent ESBL type is TEM (289/519, 55.7%) amongst *A.baumannii* strains isolated from different regions of our country. The data of our study is parallel to the results of previous studies carried out from Turkey.

Keywords: *Acinetobacter baumannii; ESBL; TEM; SHV; CTX-M; GES; VIM; beta-lactamases, Turkey.*

GİRİŞ

Acinetobacter baumannii, idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni ve nozokomiyal septisemilere sebep olan önemli bir fırsatçı patojen bakteridir[1]. Doğada çok yaygın olarak bulunduğundan *A.baumannii* enfeksiyonlarının önlenmesi oldukça zordur. *A.baumannii*, tüm antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmede, çoklu hücresel mekanizmaları kazanma ve geliştirmede yetenekli olan bir bakteridir. Bilindiği gibi, hastanelerde antimikrobiyal ilaçların oldukça fazla kullanımı çoklu ilaç direncinin gelişimine neden olmaktadır[2]. Klinik önemine rağmen, *A.baumannii*'nin antimikrobiyal direnç mekanizması ve patojenitesi hala tam olarak açıklanabilmiş değildir. İlk defa 1980'li yıllarda tanımlanan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'lara en iyi örnekler, birbirlerinden bir ya da daha fazla sayıda aminoasit farklılığı ile ayrılan plazmid kaynaklı TEM ve SHV mutantları olan penisilinazlardır. Bugüne kadar dünya genelinde 217 TEM tipi ve 183 SHV tipi beta-laktamaz tespit edilmiş olup (http://www.lahey.org/Studies/) bunların çoğu *Klebsiella* türlerinde bulunmuştur. 2000'li yılların başlarında, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde rapor edilen TEM ve SHV grubuna dâhil olmayan GSBL'lere CTX-M, PER-1 ve VEB-1 eklenmiştir. CTX-M tipi GSBL, dünya genelinde enterobakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda artan bir oranda tespit edilmektedir[3,4]. Bu beta-laktamaz grubu, genellikle sefotaksime karşı aktif, seftadizime karşı ise hafif etkili olarak tanımlanmaktadır[5]. $bla_{\text{CTX-M}}$ sınıfında yer alan genlerin en yaygın iki grubu $bla_{\text{CTX-M1}}$ (CTX-M1, -3, -10, -11, -12, -15, vd.) ve $bla_{\text{CTX-M2}}$ (CTX-M-2, -4, -5, -6, -7 ve -20, TOHO-1, vd.) sınıflarıdır[5-7]. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki 12 ilin farklı hastanelerinden toplanan *A.baumannii* suşlarında beta-laktamaz genlerinin ($bla_{\text{oxa-51}}$, bla_{TEM}, bla_{SHV}, $bla_{\text{CTX-M1}}$, $bla_{\text{CTX-M2}}$, bla_{GES} ve bla_{VIM}) sıklığını ve çeşitliliğini belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatları

Çalışmaya, 2011-2012 yıllarında, ülkemizin değişik coğrafi bölgelerinde bulunan 12 ildeki farklı hastanelerden [Bolu (n=67), Tokat (n=47), Trabzon (n=25), Ordu (n=27), Diyarbakır (n=47), Niğde (n=31), Kayseri (n=36), Ankara (n=41), Kırıkkale (n=26), Kahramanmaraş (n=25), Mersin (n=40), İstanbul (n=107)] toplanan 519 klinik *A.baumannii* izolatı dahil edildi. İzolatların tanımlanması, konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra, otomatize Vitek 2 Compact (BioMerieux, Fransa) ve API 32GN (bioMerieux, Fransa) sistemleri ile yapıldı[8-10].

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlendi ve CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre değerlendirildi[11]. Suşların tigesiklin ve kolistine karşı duyarlılıkları ise BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) kriterlerine göre yorumlandı[12]. Kalite kontrol suşu olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

Tüm suşlarda OXA-51, CTX-M1, CTX-M2, TEM, SHV, GES ve VIM tipi beta-laktamaz gen varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı.

DNA İzolasyonu ve Direnç Genlerinin Çoğaltılması

Bakteri stokları, %5 koyun kanlı agara ekildi ve tek bir koloni seçilerek 3 ml Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine (%1 tripton, %0.5 maya özütü, %0.5 NaCl; pH: 7.4) pasajlanarak 16 saat 37ºC'de çalkalamalı inkübatörde gece kültürü yapıldı. Kalıp DNA izolasyonu için kültürün 1.5 ml'si mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 13.000 rpm'de 5 dakika çöktürüldü. Çökelti sıvısının üst kısmı atıldı ve sırasıyla 1 ml Tris tamponu ve steril distile su ile yıkandı. Son çökelti 500 µl deiyonize suda çözüldü ve 95°C'de 10 dakika ısıtılarak parçalandı. Preparat, 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Sıvının üst kısmı yeni bir tüpe aktarıldı ve 5 µl'si PCR uygulamasında kalıp DNA olarak kullanıldı.

Beta-laktamaz direnç genlerinin çoğaltılması için PCR yönteminde kullanılan tüm primerler Tablo I'de gösterildi. Standart PCR karışımları 50 µl son hacim olacak şekilde; 1.5 ünite DNA polimeraz I (Go*Taq*, Promega Co., ABD), 5 µl DNA, 10 µl 5X DNA polimeraz tamponu (Promega Co., ABD), 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 2.5 µl her bir dNTP (2 mM) ve 2 µl her bir primer (25 pmol/µl) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon işlemi, her bir gen için farklı koşullarda gerçekleştirildi. $bla_{CTX\text{-}M}$ genleri multipleks PCR ile araştırıldı ve PCR döngü koşulları; 95°C'de 2 dk. ilk ayrılmayı takiben, 30 döngü olarak 95°C'de 1 dk. denatürasyon, 55°C'de 1 dk. bağlanma, 72°C'de 1 dk. uzama ve 72°C'de 10 dk. son uzama olarak uygulandı. Sonuçlar PCR amplikonlarının büyüklüklerine göre CTX-M1 ve CTX-M2 olarak sınıflandırıldı. bla_{TEM} ve bla_{SHV} genlerinin tespitinde uygulanan koşullar; 95°C'de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben, 35 döngü olarak 95°C'de 45 sn. denatürasyon, bla_{TEM} için 56°C'de 45 sn. bağlanma, bla_{SHV} için 55°C'de 1 dk. bağlanma, 72°C'de 1 dk. uzama ve 72°C'de 10 dk. son uzama şeklinde idi. Bu koşullar bla_{GES} tipi genlerin tespiti için; 95°C'de 5 dk. ilk denatürasyonu

Tablo I. *Beta-laktamaz genlerinin amplifikasyonu için kullanılan primerler*

Primer	5′ → 3′	Ürün büyüklüğü (bp)	Tm (°C)
OXA-51	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	5
CTX-M1	F: GCGTGATACCACTTCACCTC R: TGAAGTAAGTGACCAGAATC	260	55
CTX-M2	F: TGATACCACCACGCCGCTC R: TATTGCATCAGAAACCGTGGG	341	
TEM	F: AGTATTCAACATTTYCGTGT R: TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	847	56
SHV	F: ATGCGTTATATTCGCCTGTG R: TTAGCGTTGCCAGTGCTC	843	55
GES	F: ATGCGCTTCATTCACGCAC R: CTATTTGTCCGTGCTCAGGA	863	55
VIM	F: ATTGGTCTATTTGACCGCGTC R: TGCTACTCAACGACTGAGCG	780	55

takiben, 34 döngü olarak 95°C'de 30 sn., 55°C'de 30 sn. bağlanma ve 72°C'de 1 dk. uzamadan sonra 72°C'de 5 dk. son uzama olarak uygulandı. bla_{VIM} tipi genlerin tespitinde ise; 94°C'de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben, 34 döngü olarak 94°C'de 30 sn. denatürasyon, 55°C'de 30 sn. bağlanma ve 72°C'de 45 sn. uzamadan sonra 72°C'de 7 dk. son uzama aşamaları gerçekleştirildi.

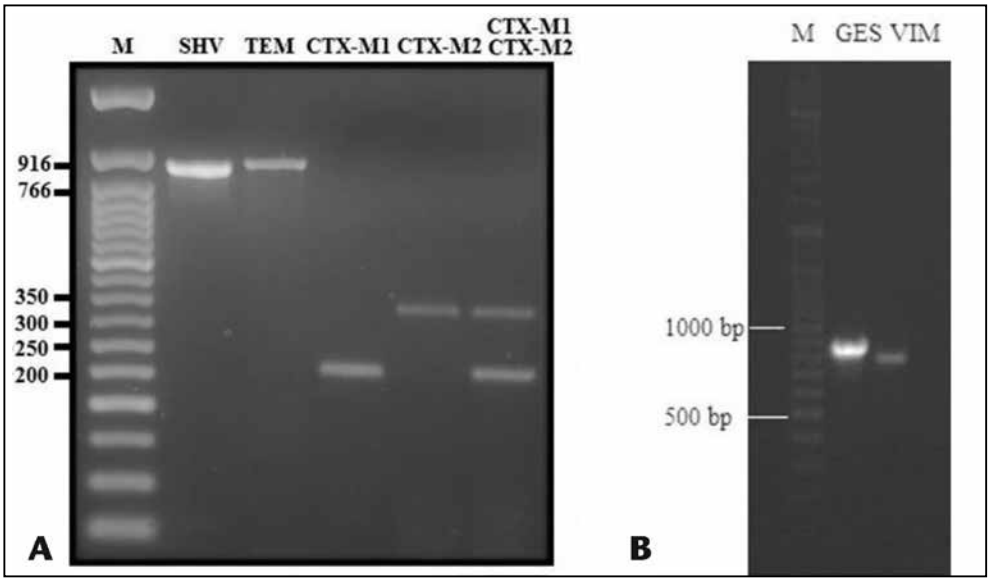
Tüm PCR ürünleri 0.5 mg/ml etidyum bromür içeren %1.4'lük agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 1). Jel kontrollerinde 100 baz çiftlik (bp) DNA belirteci (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, İngiltere) moleküler belirteç olarak kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 519 *A.baumannii* suşunun antibiyotiklere direnç oranları Tablo II'de verilmiş olup, en yüksek direncin seftazidim (%89.4), en düşük direncin ise kolistin (%0.6) için saptandığı görülmektedir.

İncelenen tüm suşlarda (%100) OXA-51 pozitif olarak bulunmuş; 443 (%85.4) suşun da araştırılan diğer beta-laktamaz genlerini taşıdığı saptanmıştır (Tablo III). Bu suşların %16.3'ünde (72/443) çoklu gen birlikteliği izlenmiştir (Tablo III). Beklenildiği üzere, koleksiyondaki baskın karakter TEM tipi beta-laktamazlar olmuştur (Tablo III).

Çalışmamızda en sık saptanan dört GSBL tipinin (TEM, SHV, CTX-M-1 ve CTX-M-2) illere göre dağılım oranları Tablo IV'de verilmiştir. SHV tipi beta-laktamaz genlerinin Bolu, Kahramanmaraş ve Diyarbakır illerinden temin edilen izolatlarda; CTX-M-1 grubu beta-laktamaz genlerinin Bolu, Niğde, Mersin ve Kahramanmaraş illerindeki hastane izolatlarında; CTX-M-2 grubu beta-laktamaz genlerinin de Bolu, Ordu, Ankara, Kayseri, Niğde,



Şekil 1. (A) *bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M1} ve bla_{CTX-M2} genlerinin %1.4'lük agaroz jel analizi;* ***(B)*** *bla_{GES} ve bla_{VIM} genlerinin %1.4'lük agaroz jel analizi. M: Moleküler belirteç.*

Tablo II. *A.baumannii izolatlarının antibiyotiklere direnç oranları (n= 519)*

Antibiyotik	**Direnç oranı (%)**
Seftazidim	89.4
İmipenem	87.5
Siprofloksasin	82.9
Levofloksasin	81.1
Meropenem	78.6
Trimetoprim-sülfametoksazol	77.5
Amikasin	71.1
Piperasilin	69.2
Sefepim	67.8
Tetrasiklin	66.3
Ampisilin	61.8
Gentamisin	59.5
Piperasilin-tazobaktam	48.6
Seftriakson	23.9
Tobramisin	22.9
Sefoperazon/sülbaktam	21.0
Amoksasilin/klavulanik asit	15.2
Sülbaktam/ampisilin	11.9
Tigesiklin	2.7
Kolistin	0.6

Tablo III. *A.baumannii izolatlarında saptanan beta-laktamaz genlerinin dağılımı ve gen birliktelikleri*

GSBL genleri	**Pozitif suş sayısı (%)***	**Gen birliktelikleri**	**Olgu sayısı (%)****
VIM	1 (0.2)	TEM+SHV	11 (2.5)
GES	8 (1.5)	SHV+CTX-M1	4 (0.9)
SHV	40 (7.7)	SHV+CTX-M2	3 (0.7)
TEM	289 (55.7)	TEM+CTX-M1	10 (2.3)
CTX-M-1	42 (8.1)	TEM+CTX-M2	20 (4.5)
CTX-M-2	63 (12.1)	CTX-M1+CTX-M2	8 (1.8)
		TEM+SHV+CTX-M1	3 (0.7)
		TEM+SHV+CTX-M2	1 (0.2)
		SHV+CTX-M1+CTX-M2	1 (0.2)
		TEM+CTX-M1+CTX-M2	8 (1.8)
		TEM+SHV+CTX-M1+CTX-M2	3 (0.7)
Toplam	443 (85.4)	**Toplam**	72 (16.3)

* Yüzdeler, çalışılan toplam suş sayısına (n=519) göre alınmıştır. ** Yüzdeler, araştırılan genlerin saptandığı suş sayısına (n=443) göre alınmıştır.

Tablo IV. *SHV, TEM, CTX-M1 ve CTX-M2 genlerinin illere göre dağılımı*

İl (Toplam suş sayısı)	TEM n (%)*	SHV n (%)*	CTX-M1 n (%)*	CTX-M2 n (%)*
İstanbul (107)	53 (49.3)	7 (6.5)	11 (10.3)	51 (47.6)
Bolu (67)	37 (55.2)	0	0	0
Tokat (47)	34 (72.3)	4 (8.5)	5 (10.6)	5 (10.6)
Ordu (27)	20 (74.1)	7 (25.9)	1 (3.7)	0
Trabzon (25)	1 (4)	4 (16)	7 (28)	2 (8)
Ankara (41)	8 (19.5)	5 (12.2)	1 (2.4)	0
Kayseri (36)	24 (66.7)	4 (11.1)	6 (16.7)	0
Kırıkkale (26)	8 (30.8)	2 (7.7)	5 (19.2)	4 (15.4)
Niğde (31)	28 (90.3)	4 (12.9)	0	0
Mersin (40)	35 (87.5)	3 (7.5)	0	0
Kahramanmaraş (25)	6 (24)	0	0	0
Diyarbakır (47)	35 (74.5)	0	6 (12.7)	1 (2.1)
Toplam (519)	289 (55.7)	40 (7.7)	42 (8.1)	63 (12.1)

* Satır yüzdeleridir.

Mersin ve Kahramanmaraş illerinden izole edilen suşlarda bulunmadığı belirlenmiştir (Tablo IV). GES-11 tip GSBL varlığı ise sadece Niğde izolatlarında (8/31; %25.8) saptanmıştır. Metallo-beta-laktamaz VIM taramasında, sadece Niğde'den izole edilmiş olan bir suşta bu gene rastlanmıştır (1/31; %3.2). Bu gen, yapılan klonlama ve DNA dizi analizi sonucunda VIM-5 tipi olarak tanımlanmıştır.

TARTIŞMA

A.baumannii penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozidler, tetrasiklinler gibi çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli olan ve bağışıklığı zayıf hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açan bir bakteridir[13]. *A.baumannii*'nin beta-laktam antibiyotiklere karşı yaygın direnç mekanizması, beta-laktamaz üretimi ile ilişkilidir[14]. Ülkemizde çeşitli hastanelerde yapılan çalışmalarda da, *Acinetobacter* türlerinde gittikçe artan düzeyde antibiyotik direnç oranları bildirilmektedir. Değişen epidemiyolojik koşullar ve farklı antibiyotik kullanım paternlerinden dolayı antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılık, ülkeler, bölgeler ve hatta hastaneler arasında değişim göstermektedir. Bu nedenle uygun antibiyotiklerin kullanımında yerel sürveyans verilerinin dikkate alınması önemlidir[15,16]. Bizim çalışmamızda belirlenen antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde, ülkemizde daha önce yapılan çalışmalar ile benzer olduğu görülmektedir. Çalışmada en etkili antibiyotikler kolistin ve tigesiklin olarak bulunurken, penisilin, sefalosporin, kinolon ve karbapenem grubu antibiyotiklere karşı, diğer çalışmalarda bildirildiği gibi, yüksek oranda direnç gelişmiş olduğu izlenmektedir (Tablo II). Buna karşın Iraz ve arkadaşlarının[17] İstanbul'da yaptığı çalışmada %46; Karagöz ve arkadaşlarının[18] Ankara'da yaptığı çalışmada ise %40.2 oranı ile oldukça yüksek bulunan *A.baumannii*'de tigesiklin direnci, Bolu'da yapılan bir çalışmada[19] %22, Malatya'da yapılan bir çalışmada[20] ise %0 olarak bildirilmiştir.

TEM, SHV ve CTX-M grupları sınıf A geniş spektrumlu beta-laktamazlardır. CTX-M enzimleri TEM ve SHV gruplarına %40 oranında benzemektedir. TEM veya SHV tipi beta-laktamaz türevleri, 1980'lerden beri hastane kaynaklı patojenler arasında görülen GSBL'lerin önde gelenleridir. Bunun yanında 1995'ten beri, Avrupa, Asya, Güney Amerika ve ABD harici Kuzey Amerika gibi dünyanın önemli bir kısmında CTX-M tipinin hızla arttığı da bildirilmektedir[4]. Günümüzde ise özellikle Avrupa'da CTX-M-15'in baskınlığı ile CTX-M üreten GSBL pozitif patojen suşların (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter cloaceae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S.enterica*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii* ve *Providencia rettgeri*) dramatik bir artış gösterdiği belirtilmektedir[21]. ABD'de de, CTX-M kaynaklı hastalıklarda yayılımın olduğu ve 2007 yılından beri CTX-M-14 ve M-15 tiplerinin görüldüğü kaydedilmiştir[22]. Özellikle son yıllarda, CTX-M-15 üreten *A.baumannii* izolatlarının bildirimindeki artış dikkat çekicidir[23-26]. Ülkemizde Aşık ve arkadaşlarının[27] yaptığı çok merkezli bir çalışmada, 763 klinik *A.baumannii* izolatının %24.6'sında PER-1 tip GSBL varlığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda da *A.baumannii* izolatlarında GSBL pozitiflik oranı; Suudi Arabistan'da %94, Mısır'da %75, Çin'de %30 ve İran'da %7 olarak rapor edilmektedir[25,28-30]. GSBL üreten *A.baumannii* suşlarının ortaya çıkışı ve yayılımı endişe vericidir. Buna ilaveten *A.baumannii* ile yapılan çalışmalarda, geçirgenlik ve dışa atım gibi enzimatik olan ve olmayan direnç mekanizmalarının sıklıkla birikimi nedeniyle, fenotipik tiplendirme yöntemleriyle GSBL üretiminin belirlenmesinin oldukça zor olduğunu vurgulamak gerekir. Bu durum, bu özel izolatların sessiz bir şekilde yayılmalarını kolaylaştırmaktadır[7].

Sunulan bu çalışma, Türkiye'de *A.baumannii* suşlarında GSBL'nin moleküler yöntemlerle karakterize edildiği ulusal çaplı ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda, ülkemizin farklı bölgelerindeki 12 hastaneden örneklenen *A.baumannii* izolatlarında, TEM, SHV, GES ve CTX-M tipi beta-laktamaz üreten suşların oranları ortaya konmuştur. Verilerimiz, en yaygın olan tipin %55.7 oranı ile TEM olduğunu; bunu %12.1 ile CTX-M2, %8.1 ile CTX-M1, %7.7 ile SHV ve %1.5 ile GES'in izlediğini göstermiştir. GES pozitif izolatlar için yapılan DNA dizi analizi sonucunda, GES-11 tipi tanımlanmıştır. GES-11, Ambler pozisyon 243'de görülen Gly243Ala değişimi ile GES-1'den ayrılmaktadır. Belçika'da Bogaerts ve arkadaşlarının[31] çalışmasında, incelenen 125 izolatın dördünde GES-11, GES-12 ve Türk hastadan elde edilen bir izolatta da GES-14'e rastlanmıştır. GES-14, GES-11'den Gly170Ser değişim farkı ile ayrılmaktadır. GES-11 ayrıca, Fransa'da Moubareck ve arkadaşları[32] tarafından bir *A.baumannii* BM4674 suşunda da tanımlanmıştır. Ülkemizde Çiçek ve arkadaşlarının[8] yaptığı çalışmada ise, 101 *A.baumannii* izolatının 16'sında GES-11, sekizinde de GES-22 tespit edilmiş; bu araştırma, *A.baumannii*'de GES-11'in Türk popülasyonunda ilk gösterimi olarak literatüre girmiştir. Zeka ve arkadaşları[33] da, Türkiye'de örnekledikleri 60 izolatın beşinde GES-11 bulduklarını rapor etmişlerdir.

GSBL üreten *A.baumannii* izolatlarında CTX-M, TEM ve SHV tipi beta-laktamazların varlığı, penisilin, yaygın ve geniş spektrumlu sefalosporin ve aztreonamlara direnç ile ilişkilidir. Türkiye'de *A.baumannii* suşlarında en yaygın GSBL olarak TEM enzimleri görülmekte ve onu da sırasıyla CTX-M ve SHV izlemektedir. Dolayısıyla dirençle baş edebilmek için her kurum kendi direnç profilini takip etmeli; bu bağlamda kurumlarda akılcı antibi-

yotik kullanımı politikaları belirlenmeli ve sıkı denetimi yapılmalıdır. Sonuç olarak, morbidite ve mortalitesi yüksek hastane enfeksiyonlarından sorumlu *A.baumannii* suşlarının direnç özelliklerinin belirlenmesine yönelik epidemiyolojik çalışmalar, ampirik tedavide klinisyene yol göstermesi açısından yararlıdır. *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak olan antibiyotikler, bu veriler ışığında ve hastane enfeksiyonları kontrol komitelerinin önerileri doğrultusunda seçilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Rezaee MA, Pajand O, Nahaei MR, et al. Prevalence of Ambler class A β-lactamases and ampC expression in cephalosporin-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 76(3):330-4.
2. Krizova L, Poirel L, Nordmann P, Nemec A. TEM-1 β-lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2013; 68(12): 2786-91.
3. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 1-14.
4. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Lagakis NJ. CTXM- type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 2000; 14(2):137-42.
5. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(10):3758-64.
6. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. FEMS Microbiol Lett 2001; 201(2): 237-41.
7. Potron A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(12): 5946-8.
8. Cicek AC, Saral A, Iraz M, et al. OXA- and GES-type β-lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. Clin Microbiol Infect 2014; 20(5): 410-5.
9. Cicek AC, Duzgun AO, Saral A, et al. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(9): 743-7.
10. Cicek AÇ, Duzgun AÖ, Saral A, Sandalli C. Determination of a novel integron-located variant ($bla_{OXA-320}$) of Class D β-lactamase in *Proteus mirabilis*. J Basic Microbiol 2014; 54(10): 1030-5.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd Informational Supplement, M100-S22, 2012. CLSI, Wayne, PA.
12. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing. Version 12 May 2013. Available at: http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf
13. Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(11): 4022-8.
14. Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Barrero-Almodovar AE. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. Clin Infect Dis 2001; 33(7): 939-46.
15. Bayram Y, Gültepe B, Bektaş A, Parlak M, Güdücüoğlu M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. Klimik Derg 2013; 26(2): 49-53.
16. Aral M, Doğan S, Paköz NİE. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. ANKEM Derg 2010; 24(4): 215-9.
17. Iraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının incelenmesi. ANKEM Derg 2012; 26(2): 80-5.
18. Karagöz A, Baran I, Aksu N, Acar S, Durmaz R. Kan kültürlerinden izole edilen tek klonlu *Acinetobacter baumannii* suşlarının karakterizasyonu ve antibiyotik direnç profillerinin incelenmesi. Mikrobiyol Bul 2014; 48(4): 566-76.

19. Mengeloğlu FZ, Çopur Çiçek A, Koçoğlu E, Sandallı C, Budak EE, Özgümüş OB. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının sınıf 1 ve 2 integron taşıyıcılığı ve yeni bir gen kaseti birlikteliği: *bla*OXA-11-*cmlA7*. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 48-58.
20. Mansur A, Kuzucu Ç, Ersoy Y, Yetkin F. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde 2008 yılında yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2009; 23(4): 177-81.
21. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother 2007; 59(2): 165-74.
22. Castanheira M, Mendes RE, Rhomberg PR, Jones RN. Rapid emergence of blaCTX-M among *Enterobacteriaceae* in U.S. Medical Centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). Microb Drug Resist 2008; 14(3): 211-6.
23. Shakil S, Khan AU. Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from urine from an Indian hospital. J Chemother 2010; 22(5): 324-7.
24. Zago MC, Viana GF, Ecker AB, et al. First report of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil. J Hosp Infect 2016; 92(3): 298-9.
25. Alyamani EJ, Khiyami MA, Booq RY, et al. Molecular characterization of extended−spectrum beta−lactamases (ESBLs) produced by clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015; 14: 38.
26. Ruppé E, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. Ann Intensive Care 2015; 5(1): 61.
27. Aşik G, Özdemir M, Kurtoğlu MG, et al. Detection of the frequency of PER-1 type extended-spectrum β-lactamase–producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Turkey: a multicenter study. Turk J Med Sci 2014; 44(6): 1041-6.
28. Al-Agamy MH, Khalaf NG, Tawfick MM, et al. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. Int J Infect Dis 2014; 22: 49-54.
29. Huang ZM, Mao PH, Chen Y, et al. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii.* Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 2004; 25(5): 425-7.
30. Safari M, Nejad ASM, Bahador A et al. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumanni*i strains isolated from patients of intensive care units (ICU). Saudi J Biol Sci 2015; 22(4): 424-9.
31. Bogaerts P, Naas T, El Garch F, et al. GES extended-spectrum β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(11): 4872-8.
32. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(8): 3579-81.
33. Zeka AN, Poirel L, Sipahi OR, et al. GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. J Antimicrob Chemother 2014; 69(4): 1145-6.