

# *Acinetobacter baumannii* Kan İzolatlarının MALDI-TOF MS, ARDRA ve *bla*<sub>OXA-51</sub>-benzeri Gene Özgül Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanımlanması

The Identification of *Acinetobacter baumannii* Blood Isolates by MALDI-TOF MS, ARDRA and *bla*<sub>OXA-51</sub>-like Gene-Specific Real-Time PCR

Ayşegül GÖZALAN<sup>1</sup>(ID), Sibel AYDOĞAN<sup>2</sup>(ID), Demet HACİSEYİTOĞLU<sup>3</sup>(ID), Çiğdem KUZUCU<sup>4</sup>(ID), Fatma KÖKSAL<sup>5</sup>(ID), Ziya Cibali AÇIKGÖZ<sup>6</sup>(ID), Rıza DURMAZ<sup>6</sup>(ID)

<sup>1</sup> Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>1</sup> Alanya Alaaddin Keykubat University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Turkey.

<sup>2</sup> Ankara Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

<sup>2</sup> Ministry of Health Ankara City Hospital, Laboratory of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak.

<sup>3</sup> Bulent Ecevit University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Zonguldak, Turkey.

<sup>4</sup> İzmir Tınaztepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>4</sup> İzmir Tınaztepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

<sup>5</sup> İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>5</sup> Istanbul University Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

<sup>6</sup> Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

<sup>6</sup> Yıldırım Beyazıt University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology Ankara, Turkey.

\* Bu çalışma, 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD) Kongresi (28 Ekim-1 Kasım 2019, İzmir)'nde sözlü olarak sunulmuştur. Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 3001 Başlangıç Ar-Ge 116S249 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Makale Atfı:** Gözalan A, Aydoğan S, Haciseyitoğlu D, Kuzucu Ç, Köksal F, Açıköz ZC ve ark. *Acinetobacter baumannii* kan izolatlarının MALDI-TOF MS, ARDRA ve *bla*<sub>OXA-51</sub>-benzeri gene özgül gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanması. Mikrobiyol Bul 2020;54(4):535-546.

## ÖZ

*Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (Acb) kompleks; fenotipik olarak ayırt edilemez düzeyde benzer kabul edilen hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri olan *A.baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii* ve *Acinetobacter djikshoorniae* türleri ile çevresel bir tür olan *A.calcoaceticus*'tan oluşmaktadır. Acb kompleks içerisindeki türlerin antimikrobiyal duyarlılık ve klinik sonuçları farklı olduğu için tür düzeyinde tam ve doğru tanımlanmaları önemlidir. Konvansiyonel fenotipik yöntemler, en önemli klinik tür olan *A.baumannii* de dahil olmak üzere Acb kompleks üyesi türlerin tanımlanması için zaman alıcı, güvenilirlik ve yeterliliği düşük yöntemlerdir. Acb kompleks türlerinin tanımlanması için çoğaltılmış ribozomal DNA kesim analizi [amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)] ve *bla*<sub>OXA-51</sub>-benzeri genine özgül polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi güvenilir moleküler yöntemlerin rutin tanı laboratuvarlarında kul-

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Ayşegül Gözalan, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Oba, Fidanlık Caddesi, 07400 Alanya, Antalya, Türkiye.  
Tel (Phone): +90 242 518 1144, E-posta (E-mail): aysegul.gozalan@alanya.edu.tr

lanımı çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Son yıllarda, klinik laboratuvarlarda bakteri türlerinin tanımlanması için hızlı, düşük maliyetli ve kullanışlı matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada, *A.baumannii* kan izolatlarının tanısında MALDI-TOF yönteminin tanı performansını değerlendirmek amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2016-Aralık 2016 tarihleri arasında, üniversite hastanelerinin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen 180 adet tekrarlamayan karbapenem dirençli Acb kompleks (izolat numaraları: TR1-TR60) ve *A.baumannii* (TR61-TR180) kan izolatu alınmıştır. Tüm izolatlarda, *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> gene özgül gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR), ARDRA (kesim enzimleri-*AluI*, *CfoI*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*) ve MALDI-TOF MS (VITEK® MS, bioMérieux, Fransa) yöntemleri ile değerlendirilmiştir. ARDRA yöntemiyle TR10, TR31, TR35 ve TR52 izolatları dışında tüm izolatlarda *A.baumannii* olarak tanımlanmıştır. Tüm izolatlardan TR10, TR31 ve TR52 dışında kalan 177 izolatta *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> gen varlığı saptanmıştır. *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> gen varlığı gösterilemeyen bir izolat (TR31), ARDRA yöntemi ile *A.pittii* olarak tanımlanmıştır. ARDRA ve *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> gene özgül Rt-PCR yöntemlerinin birlikte *A.baumannii* olarak tanımladığı 176 izolat referans kabul edilerek, MALDI-TOF yönteminin tanı kapasitesi değerlendirilmiştir. Toplam 176 izolat için MALDI-TOF yönteminin duyarlılığı %99.4, özgüllüğü ise %75 olarak bulunmuştur. Yöntemin, *A.baumannii*'nin tür düzeyinde tanımlanması için doğruluk değeri %98.9 olarak hesaplanmıştır. MALDI-TOF sistemi, rutin tanı laboratuvarlarında giderek artan oranlarda kullanılan, bakterilerin cins, tür ve alt tür düzeyinde tanımlanmalarına olanak sağlayan yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir yöntemdir. MALDI-TOF yönteminin, veri tabanlarının geliştirilmesiyle, gelecekte rutin tanı laboratuvarlarında daha fazla türü tanımlayabilen, bakterilerde antibiyotik direnç ve virülans belirteçlerini test edebilen ideal bir sistem olacağını düşünüyoruz.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*; polimeraz zincir reaksiyonu; çoğaltılmış ribozomal DNA kesim analizi; matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyonu; kütle spektrofotometresi.

## ABSTRACT

The *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (Acb) complex consists of phenotypically very similar nosocomial species; *A.baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii* and *Acinetobacter djikshoorniae* and one environmental species *A.calcoaceticus*. The rapid and accurate identification of the members of Acb complex is critical as these nosocomial pathogens can show differences in antimicrobial susceptibility and clinical outcomes. The conventional phenotypic methods are slow, unreliable and less efficient for the differentiation of Acb complex species, including the *A.baumannii* species within the Acb complex. Although various molecular methods are available, such as amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene specific PCR, they are usually inconvenient for the routine diagnostic laboratories. Recently, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) offers an opportunity for rapid, cost-effective and convenient bacterial identification in routine diagnostic procedures conducted in clinical laboratory. In this study, we aimed to evaluate the diagnosis performance of MALDI-TOF MS system to identify blood isolates of *A.baumannii*. A total of 180 non-duplicate carbapenem resistant Acb complex (strain numbers; TR1-TR60) and *A.baumannii* (TR61-TR180) blood isolates were collected from the intensive care units of the three university hospitals in Turkey from January 2016 to December 2016. All isolates were evaluated by using *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene specific real time (Rt-PCR) analysis, ARDRA (restriction enzymes-*AluI*, *CfoI*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*) method and MALDI-TOF MS (VITEK® MS, bioMérieux, France) system. All the strains except TR10, TR31, TR35 and TR52 were identified as *A.baumannii* by ARDRA method. Out of 177 of all the isolates, presence of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene was found except for TR10, TR31 and TR52 isolates. However, TR31 without the presence of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene was identified as *A.pittii* using the ARDRA. Totally 176 isolates which were identified as *A.baumannii* by both of the methods, ARDRA and Rt-PCR- *bla*<sub>OXA-51-like</sub> were accepted as a reference for the evaluation of the diagnosis performance capacity of the MALDI-TOF MS. Overall, for all 176 isolates tested, the sensitivity obtained with the MALDI-TOF MS were 99.4% with 75% specificity. The accuracy value of the method was determined as 98.9% for the identification of *A.baumannii* to the species level. MALDI-TOF MS is increasingly used in diagnostic microbiology for the routine identification of bacteria to the genus, species or subspecies level with high rates of sensitivity and specificity. In future, by expanding the database, MALDI-TOF MS system would possibly become the ideal method for routine diagnostic laboratories that could potentially identify more species and even determine some characteristics of antimicrobial resistance and virulence determinants.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*; polymerase chain reaction; amplified ribosomal DNA restriction analysis; matrix-assisted laser desorption-ionization; mass spectrometry.

## GİRİŐ

*Acinetobacter* cinsi bakteriler gram-negatif, nonfermentatif ve zorunlu aerop mikroorganizmalardır. Gnmzde halen *Acinetobacter* cinsi ierisinde 63 farklı tür bulunmaktadır<sup>1</sup>. *Acinetobacter* cinsi içerisinde hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu türler arasında *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii* ve çevresel bir tür olan *Acinetobacter calcoaceticus* bulunmaktadır. Bu türler, fenotipik ve biyokimyasal olarak ayırt edilemez düzeyde benzer özelliklere sahiptir. Genotipik olarak farklılık gösteren ancak fenotipik olarak ayırt edilemez olan bu türler, *A.calcoaceticus-A.baumannii* kompleks (Acb kompleks) olarak adlandırılmıŐtır<sup>2</sup>.

Son yıllarda, Acb kompleks içerisine iki yeni patojenik tür; *A.baumannii* ve *A.nosocomialis* ile yakın iliŐkili *Acinetobacter seifertii* ve *A.pittii* ile yakın iliŐkili olan *Acinetobacter dijksborniae* dahil edilmiştir<sup>3,4</sup>. Acb kompleks içerisindeki türlerin kolonizasyon ve patojenite yetenekleri ile antimikrobiyal duyarlılık ve klinik sonuçları farklı olduğu için bunların tam ve doğru tanımlanmaları önemlidir. *Acinetobacter* cinsi içerisinde antibiyotik direnci ve mortalitesi en yüksek tür *A.baumannii*'dir. *A.baumannii*'nin son yıllarda kolistin, polimiksin B ve tigesiklin dahil hemen tüm antibiyotiklere direnç geliŐtirdiđi bildirilmektedir<sup>5</sup>.

*Acinetobacter* türlerinin tanımlanması için biyokimyasal yöntemler ve otomatize sistemlerin güvenilirliği dŐktr. Günümüzde, Acb kompleks içerisindeki türlerin tanımlanması için kullanılan moleküler yöntemler; ođaltılmıŐ ribozomal DNA kesim analizi [amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)]<sup>6,7</sup> "16S-23S rRNA intergenic spacer (ITS)" ve recA dizi analizi<sup>8,9</sup>, DNA giraz B gen (*gyrB*) dizi analizi<sup>10</sup> ve RNA polimeraz  $\beta$ -subunit gen (*rpoB*) dizi analizidir<sup>11</sup>. *A.baumannii*'nin tanımlanmasında basit ve güvenilir moleküler yöntemlerden biri de bu mikroorganizmaya özgül intrinsik *bla*<sub>OXA-51</sub>-benzeri genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmesidir<sup>12,13</sup>.

*Acinetobacter* türlerinin tanımlanması için moleküler yöntemlerin rutin tanı laboratuvarlarında kullanımı her zaman mümkün olamamaktadır. Son yıllarda, klinik laboratuvarlarda bakteri türlerinin tanımlanması için ribozomal proteinleri temel alan matris ile desteklenmiş lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] yöntemi geliştirilmiştir. MALDI-TOF MS sisteminin, rutin klinik laboratuvarlarında bakteriyel tanımlama için hızlı, uygun maliyetli, kullanışlı ve yüksek verimlilikte olduğu bildirilmektedir<sup>13,14</sup>.

Bu çalışmada, üç farklı bölgede bulunan niversite hastanelerinin yoğun bakım nitesi (YB) hastalarından izole edilen *A.baumannii* kan izolatlarının tanısında MALDI-TOF MS temelli VITEK<sup>®</sup> MS (bioMrieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve referans moleküler yöntemlerin karŐılaŐtırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu alıŐma, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Klinik AraŐtırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 17.02.2016 ve Karar no: 33).

**Tablo 1.** Çalışmada Kullanılan İzolatların, İlk Tanımlandıkları Merkez ve Yöntemlerine Göre Dağılımı

İzolat No	Merkez	Yöntem	İzolat
TR1-TR60	Ankara	Fenotipik yöntemler	Acb kompleks
TR61-TR120	Malatya	MicroScan WalkAway Plus System	<i>Acinetobacter baumannii</i>
TR121-TR180	İstanbul	Phoenix	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Bu çalışma, Ankara, Malatya ve İstanbul Tıp Fakültesi hastanelerinde gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışma olarak planlandı. Ocak 2016-Aralık 2016 tarihleri arasında YBÜ'lerde tedavi gören hastaların kan örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli Acb kompleks (izolat numaraları: TR1-TR60) ve *A.baumannii* (TR61-TR180) izolatları araştırmaya dahil edildi. Her hastanın yalnız tek bir örneğinden elde edilen izolatlar o merkeze ait -20°C derin dondurucularda saklandı (Tablo 1).

### DNA İzolasyonu

*A.baumannii* izolatları %5 koyun kanlı agara ekildi, plaklar 37°C'lik etüvde 16-18 saat üremeye bırakıldı. Üreyen bakteriler eküvyon ile toplanıp 500 µl fosfat tamponu (PBS) içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Sonrasında vortekslenen tüpler, DNA izolasyonu için ısı bloğunda 100°C'de 10 dakika tutuldu. Ardından 10.000 rpm'de 1 dakika çevrilerle süpernatant DNA olarak kullanıldı. DNA örnekleri, kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

### ARDRA Yöntemi ile Tanımlama

PCR reaksiyon karışımı toplam 50 µl hacimde hazırlanarak, içerisine 25 µl 2X PCR master mix-DreamTaq Green PCR (ThermoFisher Scientifics, Life Technologies, ABD) ve her bir primerden 10 pmol ve 5 µl kalıp DNA konuldu. Çalışmada kullanılan primerler 16S rDNA bölgesine yönelik olup, dizileri 5'-TGG CTC AGA TTG AAC GCT GGC GGC-3'forward ve 5'-TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CA-3'reverse şeklindedir<sup>6</sup>. PCR, CFX96 (Bio-Rad, Hercules, ABD) gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) cihazında gerçekleştirildi. PCR döngüleri; 95°C'de 3 dakika ilk denatürasyonu takiben, 40 döngü 30 saniye 95°C'de denatürasyon, 30 saniye 60°C'de bağlanma, 1 dakika 72°C'de amplifikasyon işlemleri ve son olarak da 72°C'de 10 dakika uzama şeklinde uygulandı.

Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz 3:1 jelde 30 dakika yürütüldükten sonra Molecular Imager® GelDoc TM XR+ (BioRad, ABD) görüntüleme sistemi ile değerlendirildi. Yaklaşık 1.500 baz çifti (bp) büyüklüğünde bantların varlığı pozitif olarak değerlendirildi. Her çalışmada, negatif kontrol olarak steril ultra saf su ve pozitif kontrol olarak *A.baumannii* ATCC19606 suşu kullanıldı.

Amplifikasyon ürününden 9 µl, 5 U restriksiyon enzimi içeren 20 µl restriksiyon tamponu (Promega, ABD) içerisinde 37°C'de dört saat inkübe edilmiştir. Restriksiyonu sonlandırmak için 5 ml 5X sample buffer [gliserol, %25 (wt/vol), sodyum dodesil sülfat,

%0.5 (wt/vol), EDTA, 50 mM; bromfenol blue, %0.05] eklendi. Restriksiyon fragmanları %2.5'lik Nusieve agaroz 3:1 jel kullanılarak görüntülenmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir<sup>6,7</sup>. Çalışmada *A.baumannii* ATCC 19606 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Enzim kesimi için *Alul*, *Cfol*, *Mbol* *Mspl*, *Rsal* enzimleri kullanılmıştır. n çalışma için beş örnek (156, 163-166) enzimlerin hepsiyle kesim yapıldıktan sonra sonuçlar literatür bilgisi eşliğinde değerlendirildi, *Mspl* ve *Rsal* enzimlerinin ARDRA profilini belirlemede ek bir bilgi sağlamadığı anlaşılarak, kalan örnekler için *Alul*, *Cfol*, *Mbol* enzimleri ile çalışmaya devam edildi<sup>6</sup>.

### *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> Genine zgl Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

PCR reaksiyon karışımı toplam 25 l hacimde, içerisinde 12.5 l 2XPCR karışımı (Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX pPCR Master Mix, Life Technologies, ABD), her biri 12.5 pmol olan primer ve 5 l kalıp DNA konuldu. PCR sırasında kullanılacak olan *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> gen bölgesine yönelik primer dizileri; *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> F için 5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3' ve *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> R için 5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3' Şeklinde kullanıldı<sup>15</sup>.

PCR döngüleri; 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyonu takiben, 40 döngü 15 saniye 95°C'de denatürasyon, 30 saniye 60°C'de primer bağlanması, 1 dakika 72°C'de amplifikasyon ve ardından 72°C'de 5 dakika uzama Şeklinde uygulandı.

SYBR Green içeren Rt-PCR'nin kullanıldığı aşamada amplifikasyon, Rotor Gene 6000 platform (Corbett Research, Avustralya) Rt-PCR cihazında gerçekleştirildi. Bağlanma ve uzama aşamalarında sinyal toplama programı uygulandı. Çalışmada, *A.baumannii* ATCC 19606 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı<sup>12,16</sup>.

### MALDI-TOF MS Sistemi ile Tanımlama

Derin dondurucudan çıkarılan izolatlar, %5 koyun kanlı besiyerine iki kez pasajlanarak 35°C'de ve aerobik ortamda inkübe edildi. Üreyen bu kolonilerden alınan bir parça, MALDI-TOF sisteminin (VITEK<sup>®</sup> MS, bioMrieux, Fransa) slaytlarındaki kuyucuklara ince bir tabaka Şeklinde yayıldı ve üzerine 1 L matriks solüsyonu ( $\alpha$ '-Cyano-4-hydroxycinnamic acid= C.H.C.A.) (bioMrieux, Fransa) damlatıldı. Her bir koloniden iki adet yayma hazırlandı. Yaymalardan biri tanımlama için kullanılırken, diğeri gereksinim olduğunda kullanılmak üzere hazır tutuldu. Firmanın kullanım nerisi doğrultusunda, her 16 kuyucuk için 1 adet *Escherichia coli* ATCC 8739 suşu kullanıldı. Bu slaytlar daha sonra MALDI-TOF sistemine (VITEK<sup>®</sup> MS, bioMrieux, Fransa) bakterinin tanımlanması için yüklendi. Slaytlara yayılan bakteriler, süre sonunda bu sistemin kullandığı MYLA<sup>®</sup> software v3.2. (bioMrieux, Fransa) yardımıyla kütüphanesindeki bakterilerle kıyaslanması yoluyla değerlendirilerek isimlendirildi. Uyum oranı %90'ın üzerinde olan izolatların tanımlanmaları kabul edildi.

### İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS versiyon 23.0 (IBM, Armonk, ABD) yazılımı kullanıldı. ARDRA ve Rt-PCR-*bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> yöntemlerinin birlikte *A.baumannii* olarak tanımladığı izolatlar

referans kabul edilerek, MALDI-TOF MS yönteminin performans kapasitesi [geçerlilik; duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD)] hesaplandı.

## BULGULAR

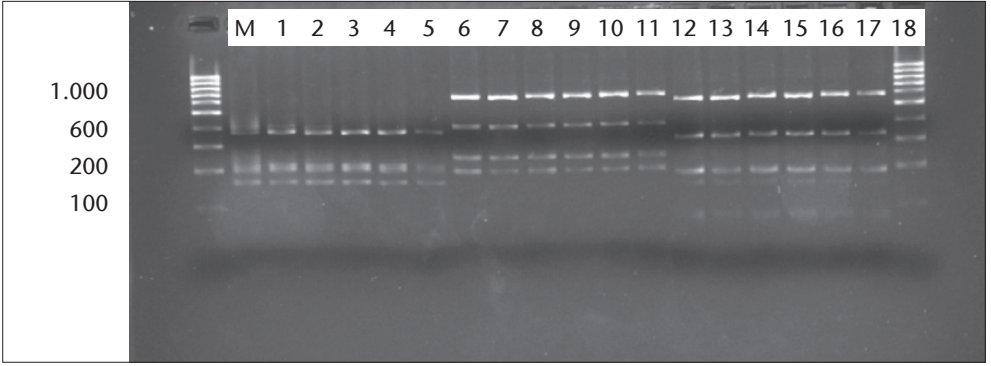
ARDRA yöntemiyle 180 izolattan dördü (TR10, TR31, TR35 ve TR52) dışında tüm izolatlar *A.baumannii* olarak tanımlanmıştır. TR31 izolatu dışında, tüm izolatlarda sırasıyla; *AluI*, *CfoI*, *Mbol* enzimleri için 1,1,1 paternleri saptanmıştır. Otuz bir numaralı örnek için ise *AluI*, *CfoI*, *Mbol*, *MspI* ve *RsaI* enzimleri için sırasıyla 1, 2, 3, 3, 1 paternleri elde edilmiş ve *A.pittii* olarak tanımlanmıştır (Tablo II). ARDRA 16S rRNA gen kesim paternlerine ait görüntüler sırasıyla Resim 1-4'te verilmiştir.

Çalışmaya alınan izolatlardan 177'sinde bla<sub>OXA-51-benzeri</sub> geni saptanmıştır. Üç izolatta bla<sub>OXA-51-benzeri</sub> geni saptanamamıştır. Bu izolatlardan ikisi (TR10 ve TR52) MALDI-TOF MS ile *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanmıştır. bla<sub>OXA-51-benzeri</sub> geni saptanamayan üçüncü izolat (TR31), ARDRA ve MALDI-TOF MS ile *A.pitti* olarak tanımlanmıştır. ARDRA ile tanımlanamayan izolatta (TR35); bla<sub>OXA-51-benzeri</sub> geni saptanmış ve MALDI-TOF MS ile *A.baumannii* olarak belirlenmiştir (Tablo II).

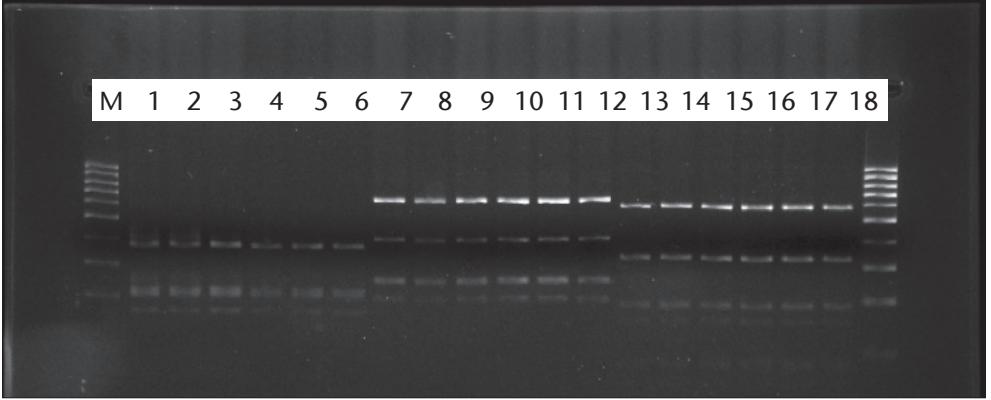
ARDRA ve Rt-PCR-bla<sub>OXA-51-benzeri</sub> yöntemlerinin birlikte *A.baumannii* olarak tanımlandığı izolatlar referans kabul edilerek MALDI-TOF MS yönteminin tanı performans kapasitesi değerlendirilmiştir. VITEK® MS yöntemi ile *A.baumannii* türlerinin %99.4'ünün doğru tanımlandığı saptanmıştır (Tablo III).

**Tablo II.** *Acb* Kompleks ve *A.baumannii* İzolatlarının PCR-bla<sub>OXA-51-benzeri</sub> ARDRA ve MALDI-TOF Yöntem Sonuçları

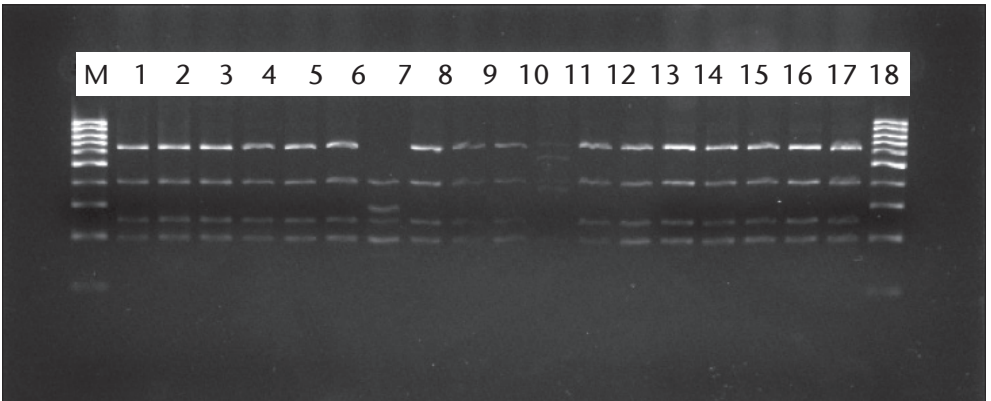
ARDRA								
Yöntem	OXA-51 geni	<i>AluI</i>	<i>CfoI</i>	<i>Mbol</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	ARDRA sonuç	MALDI-TOF
<i>A.baumannii</i> - <i>A.calcoaceticus</i> (n= 60) (Ankara-Fenotipik yöntemler)								
56 izolat	Pozitif	1	1	1			<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>
4 izolat								
TR10	Negatif						Tanımlanamadı	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
TR31	Negatif	1	2	3	3	1	<i>A.pittii</i>	<i>A.pittii</i>
TR35	Pozitif						Tanımlanamadı	<i>A.baumannii</i>
TR52	Negatif						Tanımlanamadı	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>A.baumannii</i> (n= 60) (Malatya-MICROSCAN WALKAWAY PLUS)								
TR61-TR120	Pozitif	1	1	1			<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>
<i>A.baumannii</i> (n= 60) (İstanbul-PHOENIX)								
59 izolat	Pozitif	1	1	1			<i>A.baumannii</i>	<i>A.baumannii</i>
1 izolat								
TR163	Pozitif	1	1	1	3	2	<i>A.baumannii</i>	<i>A.pittii</i>



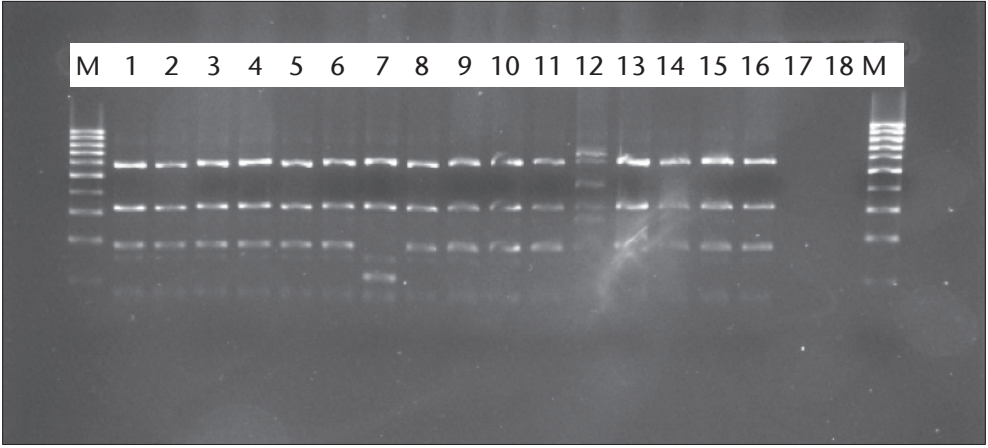
**Resim 1.** 1-6 numaralı örneklere ait farklı enzimler ile elde edilmiş restriksiyon paternlerine ait görüntü (sırasıyla AluI (1-6. kuyucuklar), CfoI (7-12. kuyucuklar), MboI (13-18. kuyucuklar). M: 100 bp büyüklüğünde moleküler belirteç.



**Resim 2.** 13-18 numaralı örneklere ait farklı enzimler ile elde edilmiş restriksiyon paternlerine ait görüntü (sırasıyla AluI (1-6. kuyucuklar), CfoI (7-12. kuyucuklar), MboI (13-18. kuyucuklar). M: 100 bp büyüklüğünde moleküler belirteç.



**Resim 3.** 25-42 numaralı örneklere ait CfoI (1-18. kuyucuklar) enzim restriksiyon patern görüntüsü. M: 100 bp büyüklüğünde moleküler belirteç.



**Resim 4.** 25-40 numaralı örneklerle ait *Mbol* (1-16. kuyucuklar) enzim restriksiyon patern görüntüsü. M: 100 bp büyüklüğünde moleküler belirteç.

**Tablo III.** *A.baumannii* Tür Tanımlanmasında MALDI-TOF MS Yönteminin Geçerlilik Testleri

(ARDRA and PCR <i>bla</i> <sub>OXA-51-benzeri</sub> gene)	MALDI-TOF	
	<i>A.baumannii</i>	Non- <i>A.baumannii</i>
<i>A.baumannii</i> (n= 176)	175	1
Non- <i>A.baumannii</i> (n= 4)	1	3
Değer	%	%95 Güven Aralığı
Duyarlılık	99.4	%96.9-99.9
Özgüllük	75.0	%19.4-99.4
Pozitif prediktif değer	99.4	%97.0-99.9
Negatif prediktif değer	75.0	%28.2-95.8
Doğruluk	98.9	%96.0-99.9

## TARTIŞMA

*Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* kompleks (Acb kompleks); *A.calcoaceticus* (genomic species 1), *A.baumannii* (genomic species 2), *A.pittii* (genomic species 3) ve *Acinetobacter nosocomialis* (genomic species 13TU) türlerini içermektedir<sup>17</sup>. Acb kompleksinde yer alan türlerin epidemiyolojik özellikleri, antibiyotik duyarlılık profilleri ve klinikteki uyumları farklılıklar göstermektedir. Dolayısıyla hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan bu türlerin tanımlanması, tedavi yaklaşımları ve enfeksiyon kontrol önlemlerine yön vermesi açısından önemlidir<sup>18</sup>.

Acb kompleks içerisindeki en önemli klinik tür olan *A.baumannii*'nin tanımlanması için rutin laboratuvarlarda kullanılan standart biyokimyasal testler ve otomatize sistemler düşük güvenilirliği olan yöntemler olarak kabul edilmektedir. Moleküler yöntemler ise



*Acinetobacter* türlerinin ayırımında güvenilir fakat yalnızca referans laboratuvarlarda uygulanabilen ve maliyetli tekniklerdir<sup>19</sup>.

*Acinetobacter* türlerinin ayırımında "güvenilir belirleyici" olarak kabul edilen intrinsik karbapenem direnç genini  $bla_{OXA-51}$  ilk olarak 2005 yılında Brown ve arkadaşları<sup>20</sup> tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra, bu genin pek çok varyantı olduğu gösterilmiş ve tüm varyantları  $bla_{OXA-51-benzeri}$  başlığı altında toplanmıştır<sup>12</sup>.

*A.baumannii*'nin tür düzeyinde tanımlanmasında intrinsik  $bla_{OXA-51-benzeri}$  gen varlığının bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ilk olarak Turton ve arkadaşları<sup>12</sup> tarafından bildirilmiştir. Çalışmaya alınan 106 *A.baumannii* klinik izolatu ve ATCC 19606 suşunda PCR yöntemi ile  $bla_{OXA-51-benzeri}$  geni varlığı tespit edilirken, diğer türlerde bu genin bulunmadığı saptanmıştır<sup>12</sup>.

Bununla birlikte, PCR yönteminin,  $bla_{OXA-51-benzeri}$  geninin bugüne kadar tanımlanan tüm varyantlarını tespit edememe gibi bir sınırlaması olduğu bilinmektedir<sup>12,21</sup>.  $bla_{OXA-51-benzeri}$  geni *ISAbat5* veya *ISAbat9* ile kesintiye uğrayabildiği için *A.baumannii*'nin tanısında  $bla_{OXA-51-benzeri}$  genine zgl PCR yönteminin güvenilir olmadığı, yalnız negatif sonuçlar verebildiği bildirilmiştir<sup>22,23</sup>. Ayrıca horizontal gen transferi ile *A.baumannii* olmayan türlerin  $bla_{OXA-51-benzeri}$  geni kazanabileceği ve yalnız pozitif sonuçlara neden olabileceği gösterilmiştir<sup>24</sup>.

Wang ve arkadaşları tarafından,  $bla_{OXA-51-benzeri}$  geninin *A.baumannii* tanısında belirleyici olduğu bildirilen bir çalışmada<sup>13</sup>, 2197 adet  $bla_{OXA-51-benzeri}$  geni pozitif *A.baumannii* izolatından yalnızca birinde *ISAbat9* varlığı gösterilmiştir. Günümüze kadar gerçekleştirilen birçok çalışmada *A.baumannii*'nin tür düzeyinde tanımlanması için  $bla_{OXA-51-benzeri}$  gen varlığının gösterilmesi, tek başına veya diğer gen bölgelerini hedef alan farklı bir moleküler yöntem ile birlikte kullanılmaktadır<sup>18</sup>.

Bu çalışmada incelenen 180 Acb kompleks izolatının 177 (%98.3)'sinde  $bla_{OXA-51-benzeri}$  geni saptanmış ve tümü ARDRA ve/veya MALDI-TOF yöntemi ile *A.baumannii* olarak tanımlanmıştır.  $bla_{OXA-51-benzeri}$  geni saptanamayan  izolatu, ARDRA ve/veya MALDI-TOF yöntemi ile *A.baumannii* dışı olarak isimlendirilmiştir.

Son yıllarda; *Acinetobacter* cinsi içerisindeki türlerin tanımlanmasında  $bla_{OXA-51-benzeri}$  gen bölgesinin yanı sıra 16S rRNA, 16S-23S rRNA ITS ve recA gibi çeşitli gen bölgelerini hedef alan PCR temelli yöntemler kullanılmaktadır. ARDRA; 16S rRNA geninin amplifikasyonu ve farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilen fragmanların görüntülenmesi temeline dayanan ve *Acinetobacter haemolyticus* ile *Acinetobacter johnsonii* dışındaki tüm *Acinetobacter* türlerini tanımlayabilen bir yöntemdir<sup>18</sup>.

Chang ve arkadaşları, Acb kompleks içerisindeki türlerin tanımlanmasında ARDRA'nın güvenilir bir yöntem olduğunu, ancak aynı türe ait farklı suşlar arasında birden fazla ARDRA profilinin görülebileceğini ve bu nedenle gram-negatif basillerin cins ya da tür düzeyinde tanımlanması için 16S rRNA'nın 527 bp gen sekansının yeterli olacağını bil-

dirmişlerdir<sup>8</sup>. Bununla birlikte, Shehata ve arkadaşları<sup>25</sup> 81 klinik *A.baumannii* izolatını tiplendirdikleri çalışmalarında, ARDRA (kesim enzimleri: Alu I, Mbo I, Msp I) yönteminin ayırt edici gücünün düşük olduğunu belirtmişlerdir. ARDRA yöntemi, tekrarlanabilirlik ve sonuçların laboratuvarlar arası paylaşımı açısından çözülmemiş sorunları olmakla birlikte, *Acinetobacter* cinsi bakterilerin tür ayrımında doğru, hızlı ve kolay bir yöntem olarak birçok araştırmada kullanılmaktadır<sup>26,27</sup>.

Bu çalışmada, merkezlerde daha önce *A.baumannii* olarak tiplendirilmiş 180 izolatın 176'sı ARDRA ile *A.baumannii*, biri ise *A.pittii* olarak sonuçlandırılmıştır. Kalan üç örnekten *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> geni pozitif bulunmuş olan bir örnek, MALDI-TOF yöntemi ile *A.baumannii* olarak tiplendirilmiştir (TR35). Sonuç olarak; *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> gen varlığı ile ARDRA sonuçları uyumlu bulunmuş (179/180, %99.4) ve *A.baumannii* tür düzeyinde tanımlanması için referans yöntemler olarak *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> genin PCR yöntemi ile gösterilmesi ve ARDRA yöntemleri birlikte kullanılmıştır.

MALDI-TOF, son yıllarda rutin tanı laboratuvarlarında giderek artan oranlarda kullanılan, bakterilerin cins, tür ve alt tür düzeyinde tanımlanmalarına olanak sağlayan bir tekniktir. Acb kompleks türlerinin tanımlanması için MALDI-TOF'un duyarlılık ve özgüllük değerlerinde farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların nedeni genellikle çalışmalardaki yöntemsel farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Örneğin bir çalışmada; geleneksel yöntemler ile duyarlılık %91, özgüllük %98 olarak rapor edilirken, bu oran bakteri kolonileri formik asit ve asetonitril ile modifiye ekstraksiyon uygulandığı zaman duyarlılık ve özgüllük değerlerinin %98'in üzerine yükseldiği rapor edilmiştir<sup>19</sup>.

Espinal ve arkadaşları<sup>14</sup> tür düzeyinde tanımlanmış *A.nosocomialis* (n= 18), *A.pittii* (n=17), *A.baumannii* (n= 18) ve yedi farklı *Acinetobacter* türünü kullanarak MALDI-TOF (Bruker, ABD) veri setinin tanı performansını değerlendirmiş; referans suşlar için doğruluk oranını %85, *A.baumannii* için %100, *A.pittii* için ise %94 olarak bildirmişlerdir. Kan kültürü örneklerinden izole edilen *Acinetobacter* türlerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, VITEK<sup>®</sup> MS, VITEK<sup>®</sup> 2 ve MicroScan sistemleri için duyarlılık oranları, sırasıyla %90.3, %89.2 ve %86.9 olarak belirlenmiştir<sup>28</sup>.

Bu çalışmada; MALDI-TOF'un *Acinetobacter* türlerinin tanımlanması için geçerlilik değerleri hesaplanmıştır. ARDRA ve Rt-PCR ile *bla*<sub>OXA-51-benzeri</sub> gen varlığının gösterilmesi teknikleri referans yöntemler olarak kabul edilmiştir. Toplam 180 izolat değerlendirilmiş ve MALDI-TOF'un duyarlılığı %99.3, özgüllüğü %75.0, doğruluk değeri %98.9 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak; rutin tanı laboratuvarlarında kullanılan konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırıldığında, MALDI-TOF MS yönteminin *Acinetobacter* türlerini tam ve doğru bir şekilde tanımlayabilmesi için örnek başına 5 dakikadan daha kısa sürede izolatların %98'inden fazlasını daha düşük maliyetle ve daha yüksek doğruluk değeri ile tanımladığı izlenmiştir. MALDI-TOF yönteminin, veri tabanlarının geliştirilmesiyle, gelecekte rutin tanı laboratuvarlarında daha fazla türü tanımlayabilen, bakterilerde antibiyotik direnç ve virülans belirteçlerini test edebilen ideal bir sistem olacağını düşünmekteyiz.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu alışma, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 17.02.2016 ve Karar no: 33).

## ÇIKAR ÇATIŐMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar atışması bildirmemişlerdir.

## TEŐEKKÜR

Bu alışma; TBTAK 3001- Başlangıç Ar-Ge projeleri Destekleme Programı (proje no: 116S249) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Acinetobacter*. <https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter> Erişim tarihi: 15.12.2019
2. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol 1991; 29(2): 277-82.
3. Neme A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2015; 65(Pt 3): 934-42.
4. Cosgaya C, Marı-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, et al. *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int J Syst Evol Microbiol 2016; 66(10): 4105-11.
5. Doi Y, Murray G, Peleg AY. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. Semin Respir Crit Care Med 2015; 36(1): 85-98.
6. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J Clin Microbiol 1995; 33(1): 11-5.
7. Dijkshoorn L, Van Harsseelaar B, Tjernberg I, Bouvet P J, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. Syst Appl Microbiol 1998; 21(1): 33-9.
8. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1632-9.
9. Yang Q, Rui Y. Two multiplex real-time PCR assays to detect and differentiate *Acinetobacter baumannii* and non-baumannii *Acinetobacter* spp. carrying *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58like</sub> genes. PLoS ONE 2016; 11(7): e0158958.
10. Lee MJ, Jang SJ, Li XM, Park G, Kook JK, Kim MJ, et al. Comparison of rpoB gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, gyrB multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 78(1): 29-34.
11. Khosravi AD, Sadeghi P, Shahrahi AH, Heidarieh P, Sheikhi N. Molecular methods for identification of *Acinetobacter* species by partial sequencing of the rpoB and 16S rRNA genes. J Clin Diagn Res 2015; 9(7): DC09-13.
12. Turton J, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol 2006; 44(8): 2974-6.
13. Wang J, Ruan Z, Feng Y, Fu Y, Jiang Y, Wang H, et al. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. PLoS ONE 2014; 9(8): e104882.

14. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(11): 1097-103.
15. Hou C, Yang S. Drug resistant gene of *bla*<sub>OXA-23'</sub>, *bla*<sub>OXA-24'</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(8): 13859-63.
16. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(4): 351-3
17. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* 2011; 162(4): 393-404.
18. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. *Future Sci OA* 2019; 5(6): FSO395.
19. Marí-Almirall M, Cosgaya C, Higgins PG, Van Assche A, Telli M, Huys G, et al. MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel A.seifertii and A.dijkshoorniae species. *Clin Microbiol Infect* 2017; 3(3): 210.e1-210.e9.
20. Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2005; 1(1): 15-23.
21. Evans BA, Amyes SGB. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(2): 41-63.
22. Zander E, Higgins PG, Fernández-González A, Seifert H. Detection of intrinsic *bla*<sub>OXA-51-like</sub> by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Med Microbiol* 2013; 303(2): 88-9.
23. Ahmadi A, Salimizand H. Delayed identification of *Acinetobacter baumannii* during an outbreak owing to disrupted *bla*<sub>OXA-51-like</sub> by ISAbA19. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 50(1): 119-22.
24. Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, et al. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene that is intrinsic to *A.baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(2): 1124-7.
25. Shehata AI, Al-Aidan AA, Al-Shahrani B, Al-Harbi NA, Alharbi SA. Typing of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospital patients by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Biosci Biotech Res Asia* 2011; 8(2): 469-82.
26. Ahmed SS, Alp E. Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A.baumannii* strains. *J Infect Dev Ctries* 2015; 9(4): 347-54.
27. Gómez RF, Castillo A, Chávez-Vivas M. Characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter* ssp. strains isolated from medical intensive care units in Cali - Colombia. *Colomb Med (Cali)* 2017; 48(4):1 83-90.
28. Lee SY, Shin JH, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based VITEK MS system for the identification of *Acinetobacter* species from blood cultures: comparison with VITEK 2 and MicroScan systems. *Ann Lab Med* 2015; 35(1): 62-8.