T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

Acinetobacter baumannii suşlarının Direnç Genlerinin Tanımlanması

TCD-2012-4059

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr. Ayşegül ULU KILIÇ

Tıp Fakültesi/ Dahili Tıp Bilimleri / Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Emine Alp Meşe

Tıp Fakültesi/ Dahili Tıp Bilimleri / Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Ögr Gör. Salman Shaeer Ahmed

Tıp Fakültesi/ Dahili Tıp Bilimleri / Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Yard. Doç. Dr. Gökçen Dinç

Tıp Fakültesi/Temel Tıp Bilimleri/Tıbbi Mikrobiyoloji

MART 2015

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada maddi olarak destek sağlayan Erciyes Üniversitesi ‘Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne ve personeline teşekkürü bir borç biliriz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2.GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
4. BULGULAR	12
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	20
6. KAYNAKLAR	21

ÖZET

Giriş ve amaç: *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi ederken, epidemiyoloji, klonal ilişki ve çoklu ilaç direncinden sorumlu birçok ekstrinsik faktörü anlamak önemlidir. Bu çalışmada ilk amacımız *A. baumannii* moleküler epidemiyolojisi ve ekstrinsik karbapenem direnç mekanizmalarını tanımlamaktır. Ayrıca *A.baumannii*'nin moleküler tiplendirilmesinde kullanılan RAPD-PZR, PFGE ve REP-PZR yöntemlerinin karşılaştırılması ve gelişmekte olan ülkeler için hangi yöntemin maliyet etkin olduğunun araştırılması hedeflenmektedir.

Yöntem: OXA karbapenemazları kodlayan genleri (blaoxa-23-like, blaoxa-24-like, blaOXA-51-like and blaoxa-58-like) Multiplex PCR yöntemi uygulanarak tespit edildi. Çalışmada ayrıca *A.baumannii'*nin moleküler tiplendirilmesinde kullanılan RAPD-PZR, PFGE ve REP-PZR yöntemlerinin etkinlikleri ve maliyetleri karşılaştırıldı.

Sonuçlar: Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen toplam 205 çoklu ilaç direncine sahip *Acinetobacter spp.* izolatı dahil edildi. Izolatların hepsi karbapeneme dirençli bulundu. Toplam 205 izolatın 188'inde (%91.7) OXA-51-like tespit edildi. Blast analizinde DNA sekans benzerliği >%98 bulundu. Bu 188 izolat içinde multiplex PCR yöntemi ile 36 (%19) izolatta OXA-23-like, 62 (%33) izolatta OXA-24-like ve 30 (%16) izolatta OXA-58-like direnç genleri tespit edildi. Toplam 188 izolattan OXA-51 taşıyan 100 tanesine RAPD, REP ve PFGE moleküler tiplendirme yapıldı. RAPD ve REP tiplendirme sonuçları PFGE ile benzerdi. Maliyet ve iş yükü PFGE yönteminde RAPD ve REP yöntemine göre daha fazla idi, fakat PFGE'nin ayırıcı gücü daha yüksek bulundu.

Sonuç olarak, bir kurumda yıllar içinde yeni direnç genlerine sahip izolatlar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca gelişmekte olan ve kısıtlı kaynakları olan bir ülkede bu bulgular yıllar içinde kurumlarda yeni direnç genleri ortaya çıktığını vurgulamak açısından önemlidir.

ABSTRACT

Introduction and aim: It is important to understand the clonal relatedness, epidemiology and various extrinsic factors responsible for multidrug resistance to treat multidrug resistant *A. baumannii*. Our aim is to characterize extrinsic carbapenem resistance mechanisms and molecular epidemiology in *A.baumannii*. Also, we aimed characterize *A.baumannii* using various molecular typing methods in resource limited setting and to investigate the cost effectiveness.

Methods: Multiplex PCR was performed for detection of OXA carbapenemases encoding genes (blaoxa-23-like, blaoxa-24-like, blaOXA-51-like and blaoxa-58-like). RAPD, REP, and PFGE typing methods were used for molecular characterization and investigation of genetic diversity between local isolates and cost effectiveness was compared.

Results: This study included total number of 205 clinical isolates of multidrug resistant A*cinetobacter spp*. All strains were carbapenem resistant. OXA-51-like was present in 188 (91.7%) isolates out of 205 isolates. OXA-23, OXA-24 and OXA-58-like genes were studied in 188 isolates. BLAST analysis found ≥ 98% DNA sequence relatedness. In those isolates, 36 (19%) isolates carried OXA-23-like, 62 (33%) isolates carried OXA-24-like and 30 (16%) isolates carried OXA-58-like resistant genes. And DNA sequencing was performed to all OXA gene and similarity sequences was found to be accurate. A hundred out of 188 isolates with OXA-51 were studied for molecular characterization by RAPD, REP and PFGE typing. RAPD and REP typing were comparable with PFGE. Cost and labor intensity of PFGE is higher than RAPD and REP, however, discriminatory power in PFGE is better.

These results emphasize that new resistant genes can be introduced into the facilities during years. So, in low- middle income countries RAPD is a good choice for typing in infection control laboratories.

GİRİŞ

Acinetobacter baumanni dünyada hastane enfeksiyonlarının en sık etkenlerinden biridir. Birçok antibiyotik sınıfına karşı direnç geliştirebilme özelliği nedeniyle tedavi alternatiflerinin azalması büyük kaygı uyandırmaktadır. Karbapenemler *A.baumannii* enfeksiyonlarına karşı başarılı olmasına rağmen Türkiye dâhil tüm dünyadan birçok makalede karbapenem direnci rapor edilmiştir ve bu enfeksiyonların tedavisi ile ilgili problemler artmıştır. *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi ederken, epidemiyoloji, klonal ilişki ve çoklu ilaç direncinden sorumlu birçok ekstrinsik faktörü anlamak önemlidir. Bu çalışmada ilk amacımız *A. baumannii* moleküler epidemiyolojisi ve ekstrinsik karbapenem direnç mekanizmalarını tanımlamaktır.

Bir klinik mikrobiyoloji laboratuarının uygun moleküler tiplendirme yöntemlerini kullanarak aktif ve pasif laboratuar temelli sürveyans yapması gerekmektedir. Pulse field gel electrophoresis (PFGE), randomly amplified polymorphism DNA (RAPD), repetitive sequencebased PCR (REP-PCR), multilocus sequence typing (MLST) ve daha birçok moleküler tiplendirme yöntemi klinik mikrobiyoloji laboratuarının önemli bir halkasıdır. Fakat özellikle kaynakları kısıtlı sağlık kurumlarında finansal ve teknik yetersizlik nedeniyle uygun tiplendirme yönteminin seçilmesi mümkün olmamaktadır. Çalışmamızda, her izolat için maliyet ve toplam laboratuvar maliyetinin ve çeşitli tiplendirme yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesini amaçlanmaktadır. Çalışmada ayrıca *A.baumannii*'nin moleküler tiplendirilmesinde kullanılan RAPD-PZR, PFGE ve REP-PZR yöntemlerinin karşılaştırılması ve gelişmekte olan ülkeler için hangi yöntemin maliyet etkin olduğunun araştırılması hedeflenmektedir.

GENEL BİLGİLER

Hastanelerde ortaya çıkan antibiyotik direnci klinisyenlere ciddi sorunlar oluşturmaktadır. *E.coli* direncinin 70 yıldan fazla süredir bilinmesine rağmen, fermantasyon yapmayan gram negatif kokobasil olan *A. baumannii* son zamanlarda dikkati çekmeye başlamıştır. *A. baumannii* cilt, yara ve idrar yolu enfeksiyonlarını da içeren daha çok hastanede yatan duyarlı hastaları hedef alan birçok fırsatçı hastane kaynaklı enfeksiyondan sorumludur (1-3). Son zamanlarda yapılan bir Avrupa çalışmasında hastane kökenli pnömoniye neden olan ilk sekiz neden arasında bildirilmiştir (4) ve hastanede kazanılan kan dolaşımı kaynaklı enfeksiyonlar arasında ise ikinci en sık patojendir (5). Klinik önemi açısından karbapenem dirençli *A. baumanni* hastane yatışının uzaması ve kan dolaşımı enfeksiyonuna bağlı yüksek kaba mortalite hızı ile ilişkilidir (2,5). Hastanemizde ventilatör ilişkili pnömonide kaba mortalite %65 olarak saptanmıştır ve *A. baumanni*İ hastanemizde ventilatör ilişkili pnömoni başta olmak üzere hastane enfeksiyonlarından sorumlu etkenlerin başında gelmektedir (6). İlk karbapenem dirençli *A. baumanni* 1985 yılında İskoçya'da bulunmuştur, daha sonra 1990'larda tüm dünyada hastane kökenli salgınlar bildirilmiştir (7). Hastane kökenli salgınlar arasında yayılımı genellikle hastane personeli aracılığıyla ve solunum ekipmanın kontaminasyonu yoluyla olmaktadır (8). *A.baumannii* suşları penisilin, sefalosporin, aminoglikozid ve florokinolonlara karşı çoklu ilaç direnci gösterir (1). Hastanemizde yapılan bir çalışmada izolatların yaklaşık %80'inin 3 genotipe ait olduğu belirlenmiştir. Tüm Acinetobacter suşlarının çoklu ilaç direnci gösterdiği ve Acinetobacter ile enfekte hastaların kaba mortalitesinin ise %80.5 olduğu saptanmıştır (5). Karbapenemler *A.baumannii* enfeksiyonlarına karşı başarılı olmasına rağmen Türkiye dâhil tüm dünyadan birçok makalede karbapenem direnci rapor edilmiştir ve halk sağlığı ile ilgili problemler artmıştır (9,10). Hastanemizde yoğun bakımlardan izole edilen suşlarda imipenem direnci %93.1 olarak saptanmıştır. *A.baumannii*'de karbapenem direnci genetik seviyede ya direncin horizontal kazanımı ya da endojen olarak efflux pompalarının aşırı ekspresyonu, porin kaybı ve penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) ya da daha doğrusu bu mekanizmaların çeşitli kombinasyonu ile olmaktadır (9). Enzimatik direnç, antibiyotiklerin girişi için gereken porinlerin ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak membran permeabilitesindeki değişiklikler ile daha da güçlenebilir. Porin kaybı 33- 36kDa protein (11), CarO denilen 29kDa ve 43kDa eksikliği ile dirençle ilişkilendirilerek imipenem direncine neden olmaktadır (12). PBP'deki değişiklik de karbapenem direncinin kaynağıdır. Bir çalışmada (12), karbapenem dirençli hipermutant yüksek düzeyde 24kDa protein üretimi ve düşük seviyede altı diğer PBP üretimi göstermiştir. Fakat bir diğer çalışmada 12 PBP nin *A.baumannii* izolatları arasında olduğunu tanımlamıştır (13). Dahası aktif eflux pompalarının ilaçla kaldırılması antimikrobiyal dirence önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır; direnç-nodülasyon-

hücre bölünmesi ailesi çoklu ilaç direncine atfedilmiştir. Efluks pompaları, hücre dışına pompalama yoluyla antibiyotiklerin etkilerinden etkili bir koruma sağlar (14). AdeABC ve AdeIJK *A.baumannii* de çoklu ilaç direncinde bilinen iki efluks pompa sistemidir (15). Horizontal direnç, moleküler Ambler sınıf B'nin (metaloenzimler) karbapenem hidrolize eden beta laktamazı ve Sınıf D enzimler (oksasilinaz) ile olmaktadır. Bu antibiyotik direnci küme şeklinde plazmid, transpozon ve Ekleme Sekans(ES) gibi mobil genetik elemanlar üzerinde taşınmaktadır (1). Oksasilinazlar (OXA) ile yayılan karbapenem direnci dünyanın birçok ülkesinde OXA–24 (İspanya), OXA–26 (Belçika), OXA–58 (Fransa ve Türkiye), OXA-23 (BK, Hong Kong ve Türkiye) ve OXA-27 (Singapur) izole edilmiştir (9,11,16). Birçok metaloenzimin Acinetobacter türleri ve gram negatif organizmalar arasında yayıldığı bulunmuştur (17,18). Fakat epidemiyolojik anlamda bölgesel yapılmış çalışmalar önemlidir ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Yüksek BlaOXA kopya plazmidlerde eksprese olan blaOXA genleri karbapenemlere direnç kazandırır, ISAba1 taşıyan plazmidler farklı klonlardan izole edilmiştir (19). *A.baumannii* klonal yayılması benzer boyutta aynı plazmid replikaz geni olan plazmidlerin yayılmasına katkıda bulunur (19,20). Aslında OXA geninin yüksek ekspresyonunun anahtar belirleyicisi üstündeki IS elemanıdır (19-21). 35'den fazla farklı OXA varyantı ilişkili olduğu IS'nin çeşitli sınıfları ile birlikte rapor edilmiştir (9,21,22), *A.baumannii*'de OXA ile ilgili olan IS ile ilgili daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır. Oksasilinazlara ek olarak IMP ve VIM varyantları gibi metaloenzimlerin iki büyük sınıfınında yüksek düzey karbapenem direnci gösterdiği bulunmuştur (19). Fakat Türkiye'de çeşitli genetik elemanlar üzerinde bulunan karbapenem direncinden sorumlu OXA varyantları ve metaloenzimler için daha ileri araştırmalar gerekmektedir. Sonuç olarak; daha iyi hasta tedavisi sağlamak için klonal ilişki, epidemiyoloji ve çoklu ilaç direncinden sorumlu birçok ekstrinsik faktörü anlamak önemlidir

GEREÇ VE YÖNTEM

***1.Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (Acb) komplexini diğer Acinetobacter suşlarından ayırmak için *A. baumannii'* nin fenotipik ve genotipik yöntemler kullanarak izolasyonu ve identifikasyonu:**

Bakterilerin toplanması: Erciyes Üniversitesi Hastanelerinden izole edilen 200 karbapeneme dirençli A.baumannii suşu kullanıldı.

Fenotipik identifikasyon: Acinetobacter türlerinin izole edilmesinde için kanlı agar ve biyokimyasal testler kullanıldı.

Genotipik identifikasyon: Biyofilm sentez genlerini (bfs) çoğaltmak için polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı; DNA piyasadaki genomik DNA purifikasyon (arıtma) kiti kullanılarak izole edilecektir. Reaksiyon TE tampon, primerler, yüksek doğruluklu PCR kiti; çoğaltılan ürünler elektroforez sonrası Etidyum bromid-prestained'de tespit edildi (22). PCR ampliconlarının purifikasyonu (arıtımı) PCR temizleme kiti kullanılarak yapılıp ve otomatik DNA sekanslama yapıldı. Sekans benzerlikleri için BLAST (Basic local alignment sequence tool) kullanılarak sonuçlar analiz edildi.

2.Plazmid üzerinde bulunan; klonlar ve türler içinde kolay transfer edilen oksasilinaz ve metaloenzimler gibi karbapenem dirençli β-laktamazların tanımlanması

Antimikrobiyal duyarlılık: A.baumannii klinik izolatları agar difüzyon, broth dilüsyon yöntemi ve Müller Hinton Agar plaklarında imipenem, tigesiklin, kolistin, ampisilin/sulbaktam, sefepim, amikasin, aztreonam, ciprofloksasin ve gentamisin gibi antimikrobiyal ajanlarla test edildi. Sonuçlar CLSI'a (Clinical and Laboratory Standard Institute) göre yorumlandı.

β-laktamaz izolasyonu ve identifikasyonu: Kaba β-laktamaz ekstresi ultrasonikatör ile hazırlanacaktır ve izoelektrik fokuslama(IEF) kökeni izoelektrik noktadan ayırmak için kullanıldı. Elektroforezden sonra jel nitrosefin ile boyanacaktır. İnhibisyon (önleme) yönteminde jel nitrosefin boyamayı takiben ilk olarak kloksasilin veya klavulonik asit içeren bir filtre kâğıdı kaplandı. Beta laktamazların pI 'sı referans örneklere göre belirlendi.

β-laktamaz genlerinin Multiplex PZR ile tespiti: Plazmid ve genomik DNA piyasadaki plazmid izolasyon ve genomik DNA izolasyon kitleri kullanılarak izole edildi. Oksasilinaz genleri (OXA-51, OXA-23, OXA-58, OXA-24, OXA-143, OXA-48) (23-24), metaloenzim genleri (IMP, VIM varyantları) için primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı ve Tris/HCl, Triton X-100 uygulayıcı olarak kullanıldı. Çoğaltılan ürünler elektroforezden sonra Etidyum bromid- boyama öncesi agaroz jelde belirlendi (25). PCR ampliconlarının purifikasyonu (arıtımı) PZR temizleme kiti kullanılarak yapılıp ve otomatik DNA sekanslama yapıldı. Sekans benzerlikleri için BLAST (Basic local alignment sequence tool) kullanılarak sonuçlar analiz edildi.

3. Uzak yerleşimli enfeksiyon kaynakları arasında *A. baumannii'*nin moleküler epidemiyoloji ve klonal ilişkisinin araştırılması ve RAPD-PZR, REP-PZR ve PFGE moleküler tiplendirmelerinin karşılaştırılması ve maliyet etkinliği RAPD (Random amplified polymorphic DNA) bazlı PZR ile genotipleme:

DNA ticari olarak elde edilebilen purifikasyon kitleri kullanarak izole edilecektir. RAPD yöntemi için amflikasyon ticari olarak elde edilebilen RAPD analiz kitleri kullanılarak yapıldı. Bu ürün primerler, termik polimerazlı analiz eden boncuklar, liyofilize tampon, dNTP ve sığır serum albumini içerir (26). Amflikonlar DNA moleküler referans göstergeleri ile birlikte jel elektroforez üzerinde etidyum bromid boyalı bandları tespit etmek için kullanıldı. REP(Repetitive extragenic palindromic sequenced based) PZR: Amplifikasyon reaksiyonları KCL, Tris-HCl, %1 Triton X-100, AmpliTaq gold polimeaz, dNTP'ler, Mg2+ ve primerler kullanılarak uygulandı (28). Amplifiye edilen ürünler boyama öncesi agaroz jelde görülebilecek ve antibiyotik direnç özellikleri karşılaştırıldı.

PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis): Üretici önerileri doğrultusunda genomik DNA ApaI ile kesildi. Disklerdeki endonükleaz kesilmiş genomik DNAlar PFGE ile ayrıldı. Diskler Tris-borate-EDTA tamponda agaroz jel içeren kuyucuklara yerleştirilerek PFGE sistemi kullanılarak DNA fragmanı ayrıldı. Çalışılan koşullar 24 saat 14°C'de, bir saniyelik bir başlangıç geçiş süresi ve finalde 30 saniye, 6 V/cm şeklinde olacaktır. Bakteriyofjdan λ' dan izole edilen DNA Concatemers DNA fragmanlarının yanında boyut karşılaştırılması için kullanıldı (29).

Bu çalışmada İtalya'da bir mekezde 3 Avrupa klonu istenerek izolatların bu klonlar ile yakınlığı da araştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya 205 hastadan elde edilen çoklu ilaç direncine sahip 205 *Acinetobacter spp.* izolatı dahil edildi. Hastaların 125'i (%61) erkekti, median yaş 58 (0-94) olarak bulundu. Izolatların 160'ı (%78.0) etken, 45'i (%22.0) ise kolonizan olarak kabul edildi ve hepsi karbapeneme dirençli bulundu. İzolatların elde edildiği klinik örnekler Tablo 1'de listelenmiştir. Hastaların alt hastalıkları, komorbid durumları ve hastalara uygulanan invasiv girişimler Tablo 2'de listelenmiştir.

Tablo 1. Klinik izolatların elde edildiği vücut bölgeleri

İzolasyon bölgesi	**N (%)**
Kan	37 (18.0)
Solunum örnekleri	85 (41.5)
İdrar	28 (13.7)
Deri ve yumuşak doku	38 (18.5)
Diğer	17 (8.3)

Tablo 2. Çoklu ilaç dirençli *A.baumannii* üremeleri olan hastaların alt hastalıkları ve komorbid durumları ve hastalara uygulanan invasiv girişimler ve tedaviler

Alt hastalıklar	**N (%)**
Malignensi	33 (16.1)
Karaciğer yetmezliği	7 (3.4)
Kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH)	31 (15.1)
DM	42 (20.5)
Kalp yetmezliği	24 (11.7)
Böbrek yetmezliği	41 (20.0)
Hipertansiyon	41 (20.0)
Kortikosteroid kullanımı	51 (24.9)
İnvasiv işlemler ve tedaviler	
Total parenteral nütrisyon	62 (30.2)
Reentübasyon	14 (6.8)
Enteral beslenme	72 (35.1)
Transfüzyon	118 (57.6)
Operasyon	67 (32.7)
Üriner katater	152 (74.1)
Periton diyalizi	6 (2.9)
SVK	117 (57.1)
Entübasyon	129 (62.9)
Mekanik ventilasyon	127 (62.0)
Trakeostomi	52 (25.4)
Arteryal katater	49 (23.9)
NG	10 (48.8)
PEG	14 (6.8)
Drenaj katateri	24 (11.7)
Göğüs tüpü	25 (12.2)
Ekstraventriküler drenaj	1 (0.5)
Bronkoskopi	7 (3.4)
Kolostomi	8 (3.9)

OXA karbapenemazları kodlayan genleri (blaoxa-23-like, blaoxa-24-like, blaOXA-51-like ve blaoxa-58-like) Multiplex PCR yöntemi uygulanarak tespit edildi.

Toplam 205 izolatın 188'inde (%91.7) OXA-51-like tespit edildi. Bu 188 izolat içinde OXA-23, OXA-24 ve OXA-58-like genleri çalışıldı ve 36 (%19) izolatta OXA-23-like, 62 (%33) izolatta OXA-24-like ve 30 (%16) izolatta OXA-58-like direnç genleri tespit edildi (Tablo 3, Şekil 1)

Tablo 3. OXA genlerinin varlığı ve dağılımı

Toplam izolat sayısı	OXA-51-like	OXA-23-like	OXA-24-like	OXA-58-like
205	188(91.7%)	36 (19%)	62 (33%)	30 (16%)

Şekil 1. OXA-51, OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 genlerinin varlığını gösteren bandlar

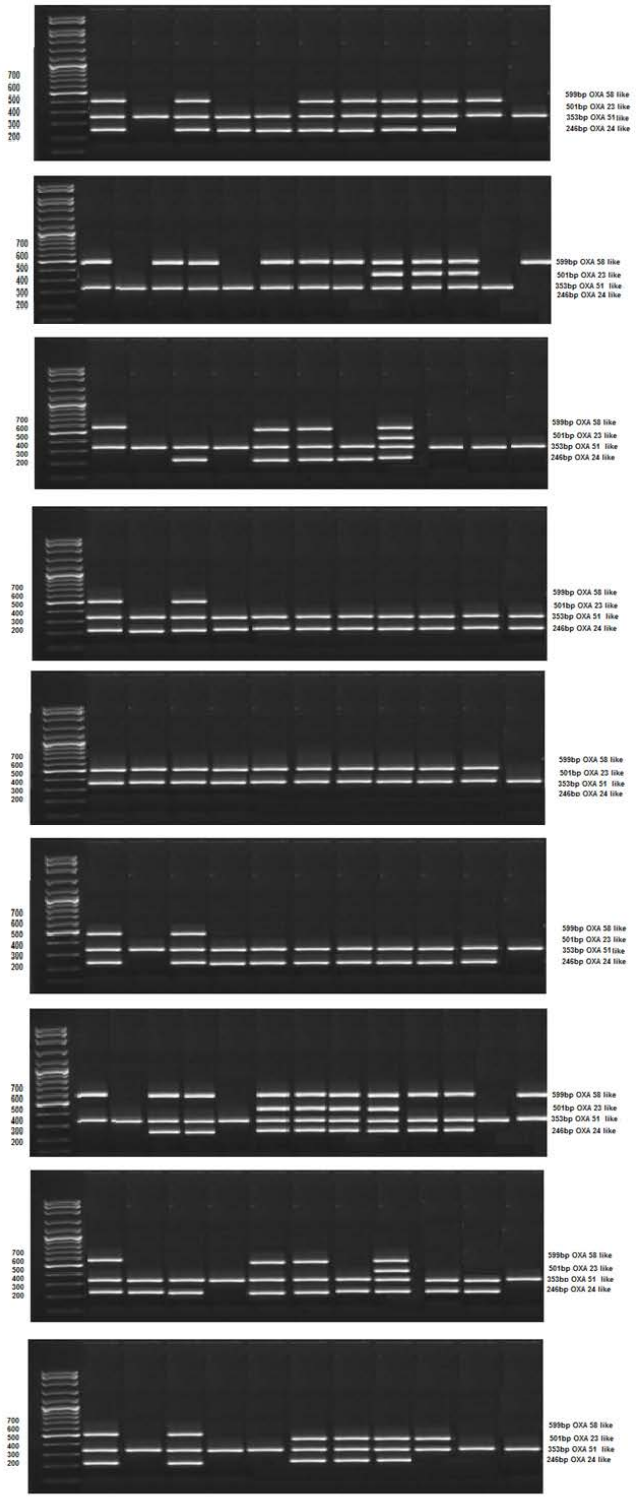


Figure 1. Bands showing presence of OXA-23, OXA-24, OXA-51 and OXA-58-like genes

PFGE sonuçlarına göre on üç farklı klonal kümelenme tespit edildi. On beş tane de tek klon vardı. Klon kümelerinin içinde %26'sı F klonuna ait, %17'si E klonuna aitti. 3 klon ise Avrupa klonlarına benzer bulundu. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde kümelenmeler tespit edildi. Tekli klonlar ise hastane içerisinde dağınık şekilde gözlendi. PFGE göre bulunan kümelenmeler , Avrupa klonları ile benzer kümelenmeler ve farklı yoğun bakım ve servislerde olan kümelenmeler aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4, 5).

Tablo 4. PFGE sonuçları

clusters		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A (EU1)	11	11.0	11.0	11.0
	B	9	9.0	9.0	20.0
	C	2	2.0	2.0	22.0
	D	2	2.0	2.0	24.0
	E	17	17.0	17.0	41.0
	F	26	26.0	26.0	67.0
	G (EU2)	5	5.0	5.0	72.0
	H	2	2.0	2.0	74.0
	I	2	2.0	2.0	76.0
	L	2	2.0	2.0	78.0
	M	2	2.0	2.0	80.0
	N (EU3)	3	3.0	3.0	83.0
	0	2	2.0	2.0	85.0
	UNIQUE	15	15.0	15.0	100.0
	Total	100	100.0	100.0	

Tablo 5. PFGE sonuçlarına göre belirgin kümelenmelerin hastanenin farklı yoğun bakım ve servislerinde dağılımı

Kümeler	Dahiliye YBÜ n (%)	Genel cerrahi YB n (%)	Göğüs Hastalıkları YB n (%)	Anestezi YB n (%)	Beyin Cerrahi YB n (%)	Koroner YB n (%)	Enfeksiyon Servisi n (%)
A (EU1)	11(40,7)	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	2 (25)	0	0	3 (50)
C	0	0	2 (25)	0	0	0	0
D	1	0	0	1 (12,5)	0	0	0
E	5 (18,5)	1 (10)	0	1 (12,5)	2 (40)	3 (60)	1 (16,6)
F	8 (29,6)	8 (80)	6 (75)	0	1 (10)	1 (20)	0
G (EU2)	0	0	0	0	0	1 (20)	1 (16,6)
H	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	0	2 (25)	0	0	0
L	0	0	0	0	2 (40)	0	0
M	0	0	0	0	0	0	0
N (EU3)	2 (7,4)	1 (10)	0	0	0	0	0
0	0	0	0	2 (25)	0	0	0
TEKLİ	0	0	0	0	0	0	1 (16,6)
Toplam	**27**	**10**	**8**	**8**	**5**	**5**	**6**

Toplam 188 izolattan OXA-51 taşıyan 100 tanesine RAPD, REP ve PFGE moleküler tiplendirme yapıldı. RAPD ve REP tiplendirme sonuçları PFGE ile benzerdi.

Şekil 2. RAPD bandları

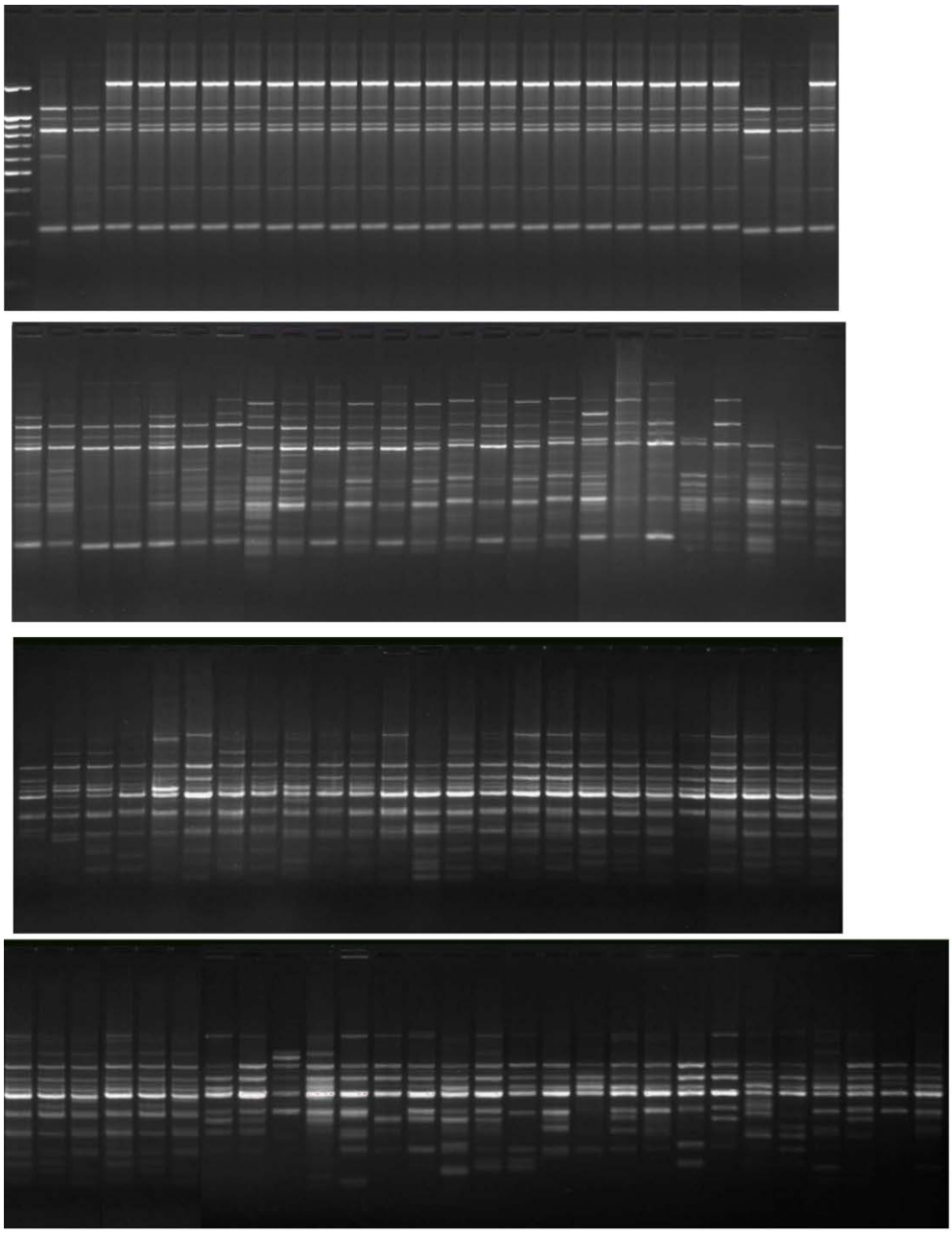


FIGURE 2 SHOWING BANDS OF RAPD
RAPD typing were comparable with PFGEisolates from 1-100 with EU1, EU2 and EU3 as reference starins.

Şekil 3. REP bandları

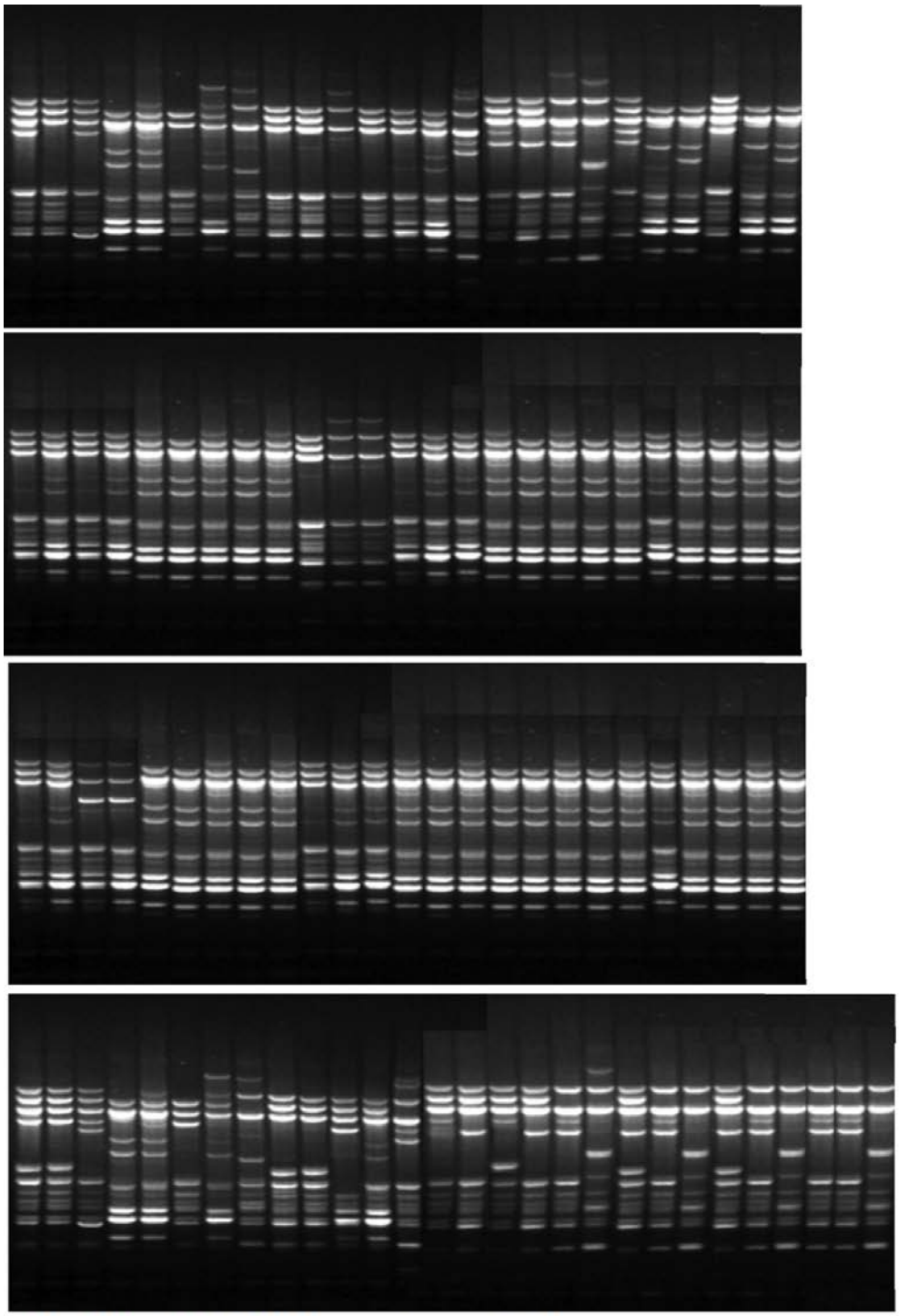


FIGURE 3 SHOWING REP-PCR BANDS

REP typing were show from 1-100 isolates with EU1, EU2 and EU3 as reference

Tekniklerin etkinlik ve maliyet karşılaştırılması yapıldı. PFGE tekniğinin daha uzun sürdüğü (1 hafta) ve örnek başına maliyetinin daha yüksek bulunmasına rağmen RAPD ve REP yöntemleri hem maliyet hem de çalışma süresi açısından daha düşüktü. Bun akarşılık PFGE'de ayırıcı gücü daha yüksek tespit edildi (Tablo 5).

Tablo 5. Farklı moleküler tekniklerin toplam maliyet ve etkinlik karşılaştırılması

Özellik	PFGE	RAPD	REP
Süre	1 hafta	8 saat	8 saat
Örnek başına maliyet	€2.7	€1	€1
20 örnek için harcanan zaman	9.5 saat	2.5 saat	2.5 saat
Malzeme maliyeti	€28,000	€6,000	€6,000
İş yükü	Çok fazla	normal	fazla
Ayırıcı gücü	Yüksek	Normal	düşük

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamız sonucunda blaoxa -23-like, blaoxa-24-like ve blaoxa-58-like direnç genlerinin varlığı tespit edildi. Fakat daha önce Türkiye'den yapılan çalışmalarda OXA-23 ve OXA-58 genleri sıklıkla rapor edilmişti (30-32) . Bu çalışmada ise 62 (%33) izolatta OXA-24 olduğu görüldü. Ayrıca daha önce merkezimizden yapılan başka bir çalışmada ise OXA-58 en sık görülen direnç geni olarak rapor edilmişti (33).

Lokal izolatların Avrupa klonları I, II,III ile benzerliği tespit edildi. Avrupa klonu III 'ün varlığı bu bölgede ilk defa tespit edildi.

Maliyet ve iş yükü PFGE yönteminde RAPD ve REP yöntemine göre daha fazladır, fakat PFGE'nin ayırıcı gücü daha yüksektir ve altın standart olarak kabul edilmektedir. RAPD ve REP, PFGE ile karşılaştırılabilir olmasına rağmen REP yöntemi ile bazı tutarsızlıklar mevcuttur.

Sonuç olarak bu bulgular yıllar içinde kurumlarda yeni direnç genleri ortaya çıktığını vurgulamak açısından önemlidir. RAPD yöntemi geliişmekte olan ve kısıtlı kaynakları olan ülkelerde enfeksiyon kontrol uygulamalarında genotipik analiz yöntemi olarak iyi bir seçenek olabilir.

KAYNAKLAR

1. Mussi, M.A., Limansky, A.S. and Viale, A.M. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of Acinetobacter baumannii: Natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β–barrel outer membrane. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005; 49:1432-1440.

2. Wu, T.C. Carbapenem-resistant or multidrug-resistant Acinetobacter roteins. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005; 49:1432-1440. 2. Wu, T.C. Carbapenem-resistant or multidrug-resistant Acinetobacter baumannii-a clinician's perspective. The Hongkong medical dairy. 2011; 16(4): 6-9.

3. Hu, W.S., Yao, S.M., Fung, C.P., Hsieh, Y.P., Liu, C.P. and Lin, J.F. () An OXA- 66/OXA-51-Like carbapenemases and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2007; 51(11), 3844-3852.

4. 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.

5. Alp, E., Esel, D., Yildiz, O., Voss, A., Melchers, W. and Doganay, M. () Genotypic analysis of Acinetobacter bloodstream infection isolates in a Turkish university hospital. Scandinavian journal of infectious diseases, 2008; 38(5):335-3340.

6. Alp E, Güven M, Yildiz O, Aygen B, Voss A, Doganay M. Incidence, risk factors and mortality of nosocomial pneumonia in intensive care units: a prospective study. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2004; 15;3:17.

7. Dalla-Costa, L.M., Coelho, J.M., Souza, H.A.P.H.M., Castro, M.E.S., Stier, C.J.N., Bragagnolo, K.L., Neto, A.R., Filho, S.R.P., Livermore, D.M. and Woodford, N. Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 enzyme in Curitiba. Brazil. Journal of clinical microbiology. 2003;41(7), 3403-3406.

8. Cisneros, J.M. and Rod Rodriguez-Bano, J. Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii: epidemiology, clinical features and treatment. Clinical microbiology and infectious diseases, 2002; 8: 687-693.

9. Gur, D., Korten, V., Unal, S., Deshpande, L.M. and Castanheira, M. 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. Journal of medical microbiology. 2008; 57: 1529-1532.

10. Wong, E.W., Yusof, M.Y., Bt Mansor, M., Anbazhagan, D., Ong, S.Y. and Sekaran, S.D. Disruption of adeB gene has greater effect on resistance to meopenems than adeA gene in

Acinetobacter spp. Isolated from University Malaya Medical Centre. Singapore medical journal. 2009; 50(8):822-826.
11. Poirel, L. and Nordmann, P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: azım alanları gerektiği kadar uzatılabilir mechanisms and epidemiology. Clinical microbiology and infectious diseases. 2006; 12: 826-836.
12. Tomas, M.D.M., Beceiro, A. and Perez, A. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36- kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005; 49: 5172-5175.
13. Fernandez, F.F., Martinez, L.M., Conejo, M.C., Ayala, J.A., Pereal, E.J. and Pascuali, A. Relationship between lactamases production, outer membrane protein and penicillinbinding protein profiled on the activity of carbapenems against isolates of Acinetobacter baumannii. The British Society of antimicrobial chemotherapy. 2003: 51; 565-574.
14. Magnet, S., Courvalin, P. and Lambert, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454, Korea. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001; 45(12):3375-3380.
15. Damier-Piolle, L., Magnet, S., Bremont, S., Lambret. T. and Courvalin. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008; 52(2), 557-562.
16. Andriamanantena, T.S., Ratisma, E., Rakotonrina, H.C., Randrianirina, F., Ramparany, L., Carod, J.F., Richard, V. and Talarim, A. Dissemination of multidrug resistant Acinetobacter baumannii in various of Antananarivo Madagascar. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2010; 9:17.
17. Santella, G., Pollini, S., Docquier, J.D., Mereuta, A.I., Gutkind, G., Rassolini, G.M. and Radice, M. Intercontinental dissemination of IMP-13-produing Pseudomonas aeruginosa belonging in sequence type 621. Journal of clinical microbiology. 2010; 48(11): 4342-4343.
18. Koh, T.H., Babini, G.S., Woodford, N., Sng, L.H., Hall, L.M.C. and Livermore, D.M. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β-lactamase in Klebsiella pneumoniae from Singapore. The Lancet, 1999; 353(9170): 2162.
19. Chen, T.L., Lee, Y.T., Kuo, S.C., Hsueh, P.R., Chang, F.Y., Siu, L.K., Ko, W.C. and Fung, C.P. Emergence and distribution of plasmids bearing the bla(OXA-51-like) gene with an upstream ISAba1 in carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates in Taiwan. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2010; 54(11): 4575-4581.
20. Bonomo, R.A. and Szabo, D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. Clinical Infectious Diseases. 2006; 43:49-56.

21. Lee, K., Yum, J.H. and Yong, D. Novel metallo-β-lactamases gene bla (SIM-1), in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005; 36: 196-199

22. Walter-Rasmussen, J. and Hoiby, N. (2006) OXA-type carbapenemases. Journal of antimicrobial chemotherapy; 57:373-383.

23. Zhang, L., Ding, G., Wei, L., Pan, X., Mei, L., Zhang, Y. and Lu, Y. (2011) Establishment of novel target-based-real-time quantitative PCR method for Acinetobacter baumannii. Diagnostic molecular pathology, 20(4), pp. 242-248.

24. Higgins, P.G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P and Seifert, H (2009) OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase in Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(12), pp. 5035-5038.

25. Woodford, N., Ellington, M.J., Coelho, J.M., Turton, J.F., Ward, M.E., Brown, S., Amyes, S.G.B and Livermore, D.M (2006) Muliplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. International Journal of Antimicrobial Agents, 27(4), pp. 351-353.

26. Amudhan, S.M., Sekar, U., Arungiri, K. and Sekar, B. (2011) OXA beta-lactamasesmediated carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii. Indian journal of medical microbiology, 29(3), pp. 269-274.

27. Giordano, A., Varesi, P., Bertini, A., Villa, L., Dionisi, A.M., Venditti, M., carfagna, P., Luzzi, I., Mancini, C. and Carattoli, A. (2007) Outbreak of Acinetobacter baumannii producing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. Microbial drug resistance, 13(1), pp. 37-43.

28. Andriamanantena, T.S., Ratisma, E., Rakotonrina, H.C., Randrianirina, F., Ramparany, L., Carod, J.F., Richard, V. and Talarim, A. (2010) Dissemination of multidrug resistant azım alanları gerektiği kadar uzatılabilir Acinetobacter baumannii in various of Antananarivo Madagascar. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, pp. 9-17.

29. Zhou, H., Pi, B.R., Yang, Q., Yu, Y.S., Chen, Y.G., Li, L.J. and Zheng, S.S. (2007) Dissemination of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii strains carrying the ISAba1-blaOXA-23 genes in a Chinese hospital. Journal of medical microbiology, 56, pp. 1076-1080.

30. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, Kolayli F, Eroglu C. High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of Acinetobacter spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. J Antimicrob Chemother. 2006 Sep;58(3):537-42.

31. Ertürk AE, Ciçek AE, Gümü A, Cüre E, En A, Kurt A, Karagöz A, Aydo An N, Sandall C, Durmaz RZ. Molecular characterisation and control of Acinetobacter baumannii isolates resistant to multi-drugs emerging in inter-intensive care units. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014 Jul 22;13(1):36.

32. Ciftci IH, Aşık G, Karakeçe E, Oksüz L, Yağcı S, Sesli Çetin E, Ozdemir M, Atasoy AR, Koçoğlu E, Gül M, Kurtoğlu MG, Köksal Çakırlar F, Seyrek A, Berktaş M, Gültepe B, Ayyildiz A. Distribution of blaOXA genes in Acinetobacter baumannii strains: a multicenter study. Mikrobiyol Bul. 2013 Oct;47(4):592-602.

33. Gülmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore DM. Carbapenem-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. Int J Antimicrob Agents. 2008 Jun;31(6):523-6