

Acinetobacter baumannii İzolatlarında *bla*_{OXA} Genlerinin Dağılımı: Çok Merkezli Bir Çalışma*

Distribution of *bla*_{OXA} Genes in *Acinetobacter baumannii* Strains: A Multicenter Study

İhsan Hakkı ÇİFTÇİ¹, Gülşah AŞIK², Engin KARAKEÇE³, Lütfiye ÖKSÜZ⁴, Server YAĞCI⁵, Emel SESLİ ÇETİN⁶, Mehmet ÖZDEMİR⁷, Ali Rıza ATASOY¹, Esra KOÇOĞLU⁸, Mustafa GÜL⁹, Muhammet Güzel KURTOĞLU¹⁰, Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR¹¹, Adnan SEYREK¹², Mustafa BERKTAŞ¹³, Bilge GÜLTEPE¹⁴, Ahmet AYYILDIZ¹⁵

¹ Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.

¹ Sakarya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sakarya, Turkey.

² Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

² Afyon Kocatepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Afyonkarahisar, Turkey.

³ Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya.

³ Sakarya Education and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Sakarya, Turkey.

⁴ İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Istanbul University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

⁵ Denizli Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Denizli.

⁵ Denizli State Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Denizli, Turkey.

⁶ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.

⁶ Suleyman Demirel University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Isparta, Turkey.

⁷ Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

⁷ Necmettin Erbakan University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Konya, Turkey.

⁸ Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bolu.

⁸ Abant İzzet Baysal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bolu, Turkey.

⁹ Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.

⁹ Sutcu Imam University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kahramanmaraş, Turkey.

¹⁰ Konya Numune Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya.

¹⁰ Konya Numune Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Konya, Turkey.

¹¹ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹¹ Istanbul University, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

¹² Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

¹² Fırat University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Elazığ, Turkey

¹³ Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

¹³ Yuzuncu Yil University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Van, Turkey

¹⁴ Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹⁴ Bezmialem Vakif University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

¹⁵ Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

¹⁵ Ataturk University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Erzurum, Turkey.

* Bu çalışmanın bir bölümü (OXA tipi direnç genlerinin tanımlanması için multiplaks RT PCR kiti geliştirilmesi), Sakarya Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına (Proje No: 2012-08-00-006) desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 07.02.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 30.09.2013

ÖZET

Acinetobacter cinsi içerisinde hastane enfeksiyonlarının en önemli etkeni *Acinetobacter baumannii*'dir. Bu gram-negatif kokobasil, antimikrobiyal tedavide kullanılan çoğu antibiyotiğe dirençli olup aynı zamanda karbapenemlere de direnç geliştirme kapasitesindedir. Bu çalışmanın amacı, *A.baumannii*'nin OXA alt grupları için multiplaks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) kiti tasarlamak ve Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan *A.baumannii* izolatlarında OXA alt gruplarının dağılımını araştırmaktır. Çalışmaya, çeşitli illerdeki (Afyonkarahisar, Ankara, Bolu, Elazığ, Erzurum, Isparta, İstanbul, Kahramanmaraş, Konya, Sakarya, Van) 13 üniversite ve devlet hastanesinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında, 2008-2011 tarihleri arasında izole edilen toplam 834 *A.baumannii* klinik izolatu dahil edilmiştir. İzolatlar, konvansiyonel yöntemler ve otomatize sistemler [Vitek2 (bioMerieux, ABD) ve Phoenix (BD Diagnostic, MD)] kullanılarak tanımlanmış; duyarlılık testleri otomatize sistemler ve disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır. Tüm örneklerle *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like} ve *bla*_{OXA-58-like} genleri için qPCR uygulanmış; ayrıca, *bla*_{OXA-24-like} geni araştırılmasında konvansiyonel PCR yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamızda saptanan antibiyotik direnç oranları; amoksisilin-klavulanat için %96.8, siprofloksasin için %86.8, gentamisin için %74.7, amikasin için %71.7, sefaperazon-sulbaktam için %73.5, imipenem için %72.1 ve meropenem için %73 olarak izlenmiştir. Altı yüz iki (%72.2) izolat hem imipenem hem de meropeneme dirençli bulunmuştur. *A.baumannii* izolatları için en etkili antibiyotiğin, %100 duyarlılık oranı ile kolistin olduğu görülmüştür. İzolatların tümünde *bla*_{OXA-51-like} geni pozitif bulunmuş; ancak *bla*_{OXA-24-like} geni hiçbir izolatta gösterilememiştir. Toplam *bla*_{OXA-23-like} ve *bla*_{OXA-58-like} gen pozitiflikleri sırasıyla %53.7 ve %12.5 olarak saptanmıştır. Karbapeneme dirençli izolatların *bla*_{OXA-23-like} ve *bla*_{OXA-58-like} gen pozitiflikleri ise sırasıyla %74.4 ve %17.3 olarak tespit edilmiştir. Yirmi beş izolat hem *bla*_{OXA-23-like} hem de *bla*_{OXA-58-like} gen pozitifliği göstermiştir. *bla*_{OXA-24-like} hariç, karbapeneme dirençli izolatların tamamında OXA tipi genler saptanmıştır. Çalışmaya katılan merkezlerin *bla*_{OXA-23-like} ve *bla*_{OXA-58-like} gen pozitiflik oranları farklı bulunmuştur. Ek olarak, çalışma sürecinde *bla*_{OXA-58-like} gen pozitifliği azalırken, *bla*_{OXA-23-like} gen pozitifliği ile birlikte karbapenem direncinin arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, karbapenemler dahil antimikrobiyal tedavide kullanılan çoğu antibiyotiğe yüksek direnç gösteren *A.baumannii* izolatlarının kolistine duyarlılığı devam etmektedir. Hem *bla*_{OXA-23-like} hem de *bla*_{OXA-58-like} genleri karbapeneme dirençli *A.baumannii* klinik izolatlarında oldukça yaygın olmakla birlikte, yıllar içindeki *bla*_{OXA-23-like} pozitif izolatların artışı dikkat çekicidir. Günümüzde, hastane kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi için dirençli bakterilerin hızlı tanısında, multiplaks qPCR en uygun yöntemdir. Bu çalışmada geliştirilen multiplaks qPCR kiti karbapeneme dirençli *A.baumannii* klinik izolatlarında *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like} ve *bla*_{OXA-51-like} genlerinin hızlı tanısı ve sıklığının ortaya konmasında yararlı olabilir.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*; karbapenem direnci; OXA; multiplaks gerçek zamanlı PCR.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is the most important agent of nosocomial infections within the *Acinetobacter* genus. This gram-negative coccobacillus is intrinsically resistant to many antibiotics used in antimicrobial therapy, and capable of developing resistance including carbapenems. The objective of this study was to develop a multiplex real time polymerase chain reaction (qPCR) kit for OXA subgroups in *A.baumannii*, and to investigate the distribution of OXA subgroups in *A.baumannii* strains isolated from geographically different regions of Turkey. A total of 834 *A.baumannii* clinical isolates collected from different state and university medical centers in 13 provinces (Afyonkarahisar, Ankara, Bolu, Elazığ, Erzurum,

Isparta, İstanbul, Kahramanmaraş, Konya, Sakarya, Van) between 2008-2011, were included in the study. The isolates were identified by conventional methods and automated systems [Vitek2 (bioMérieux, ABD) and Phoenix (BD Diagnostic, MD)]. The susceptibility profiles of the isolates were studied with automated systems and standard disc diffusion method. All samples were subjected to qPCR to detect bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-23-like} and bla_{OXA-58-like} genes. A conventional PCR method was also used to detect bla_{OXA-24-like} gene. The resistance rates observed during the study period were as follows: 96.8% for amoxicillin-clavulanate, 86.8% for ciprofloxacin, 74.7% for gentamicin, 71.7% for amikacin, 73.5% for ceftazepime-sulbactam, 72.1% for imipenem and 73% for meropenem. Six hundred and two (72.2 %) isolates were resistant to both imipenem and meropenem. Colistin was found to be the most effective antibiotic against *A.baumannii* isolates with 100% susceptibility rate. All isolates were positive for bla_{OXA-51-like} gene, however bla_{OXA-24-like} gene could not be demonstrated in any isolate. Total positivity rates of bla_{OXA-23-like} and bla_{OXA-58-like} genes were found as 53.7% and 12.5%, respectively, while these rates were 74.4% and 17.3% in carbapenem-resistant isolates, respectively. Twenty-five isolates were positive for both bla_{OXA-23-like} and bla_{OXA-58-like} genes. All of the carbapenem-resistant isolates have OXA type genes with the exception of bla_{OXA-24-like} gene. The positivity rates for bla_{OXA-23-like} and bla_{OXA-58-like} genes varied for each center. In addition, there was a decrease in the frequency of bla_{OXA-58-like} gene, however both bla_{OXA-23-like} gene and carbapenem resistance rates increased during the study period. In conclusion, high rates of resistance to carbapenems were also remarkable but *A.baumannii* strains keep on sensitivity to colistin. Both bla_{OXA-23-like} and bla_{OXA-58-like} genes were shown to be widespread in carbapenem-resistant *A.baumannii* clinical isolates. However, bla_{OXA-23-like} gene positive strains were increased throughout the study. Currently, multiplex qPCR is the best way for rapid diagnosis of resistant bacteria for prevention of hospital-acquired infections. The multiplex qPCR kit developed in this study could be useful for rapid diagnosis and identify the frequencies of bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-51-like} and bla_{OXA-58-like} genes in carbapenem-resistant *A.baumannii* clinical isolates.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; carbapenem resistance; OXA; multiplex real-time PCR.

GİRİŞ

Acinetobacter türleri çeşitli çevresel ortamlarda yaşayabilme ve yüzeylere tutunabilme özellikleri nedeniyle fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Cins içerisinde *Acinetobacter baumannii*, başta ventilatörle ilişkili pnömoni, sepsis, menenjit, yumuşak doku ve idrar yolu olmak üzere pek çok enfeksiyona neden olabilen önemli bir insan patojenidir¹. *A.baumannii* enfeksiyonları için geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, büyük cerrahi girişim, hastanede ya da yoğun bakımda uzun süre yatarak tedavi olma, yanık, immün yetmezlik ve malignensi gibi durumlar risk faktörleri olarak ifade edilebilir².

Son yıllarda hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemi artan *A.baumannii*, çeşitli direnç mekanizmaları ile aminoglikozidlere, sefalosporinlere, kinolonlara ve karbapenemlere direnç kazanarak tedavide güçlükler neden olmaktadır. Her geçen gün daha sık enfeksiyon etkeni olarak izole edilmeleri, artan direnç oranları ve sınırlı sayıda tedavi seçeneği nedeniyle sorun giderek büyümektedir. Halen *A.baumannii* enfeksiyonlarına karşı son seçenek olarak elde tutulan kolistin ve polimiksin B'ye karşı direnç bildirimlerinde de artış söz konusudur^{3,4}. Diğer gram-negatif bakterilerde olduğu gibi, *A.baumannii* izolatlarında karbapenemleri de kapsayan beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişimi söz konusudur. Bu dirençten sıklıkla OXA türü beta-laktamazlar sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca OXA türü beta-laktamaz üreten *A.baumannii* izolatlarının çoğu, sadece karbapenem-

lere değil, kolistin ve tigesiklin dışında kalan ve klinikte yaygın kullanımı olan diğer tüm antibiyotiklere de dirençlidir⁵.

A.baumannii'de karbapenem direnci birden fazla mekanizmayla ortaya çıkabilse de direnç en sık beta-laktamaz enzimleri yoluyla gerçekleşmektedir. Bu enzimler D grubu beta-laktamaz sınıfına ait dört OXA alt kümesinde ifade edilmektedir. Bu kümeleri temsilen de genellikle doğal olarak bulunan OXA-51 ve kazanılmış OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 öne çıkmaktadır⁶.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), etken mikroorganizmaların hızla tanımlanması ve/veya miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır⁷. Uygulama alanları her geçen gün genişleyen bu yöntem, antibiyotik direncinin erken belirlenmesine de imkan vermektedir. Son yıllarda hastane enfeksiyonlarına neden olan dirençli etkenlerinin erken tanısı için çok sayıda ticari kit üretilmiş ve kullanıma sunulmuştur^{8,9}. Bu çalışmanın amacı, *A.baumannii*'nin OXA alt grupları için multiplex qPCR kiti tasarlamak ve Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan *A.baumannii* izolatlarında OXA alt gruplarının dağılımı araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Acinetobacter baumannii İzolatları

Çalışmaya, farklı coğrafi bölgelerden (Afyonkarahisar, Ankara, Bolu, Elazığ, Erzurum, Isparta, İstanbul, Kahramanmaraş, Konya, Sakarya, Van) seçilen 13 üniversite ve devlet hastanesinin tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında 2008-2011 tarihleri arasında yatan hastalardan alınan trakeal aspirat, kan, idrar ve yara yeri örneklerinden izole edilen 834 *A.baumannii* klinik izolatu alındı. İzolatların 753 (%90.3)'ü yoğun bakım ve 81 (%9.7)'i nöroloji, genel cerrahi ve dahiliye servislerinde uzun dönem yatarak tedavi gören hastalardan izole edilmişti. Aynı hastadan izole edilen suşlardan sadece biri çalışmaya dahil edildi.

Kültür, Antibiyogram ve Tanımlama

İzolatlar Vitek2 (bioMerieux, ABD) ve Phoenix (BD Diagnostic, MD) otomatize sistemleri ve konvansiyonel yöntemlerle (Gram boyama, oksidaz testi, üç şekerli demirli besiyerinde üreme ve hareket özelliği) tanımlandı. Antibiyotik duyarlılık çalışmaları otomatize sistemler ve disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Phoenix sonucu bildirilen 107 izolata ait duyarlılık sonuçları Vitek2 sistemi ile tekrarlandı ve ek olarak imipenem ve meropenem disk difüzyon yöntemiyle test edildi. Disk difüzyon çalışmalarında imipenem ve meropenem duyarlılıkları için "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" sınır değerleri dikkate alındı¹⁰. Referans suş olarak *A.baumannii* ATCC 19606 kullanıldı.

Primer ve Prob Tasarımı

Çalışmada kullanılacak primer ve problemler belirlemek için, *A.baumannii* OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58 alt gruplarına ait farklı diziler "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" veri bankasından alındı. ClustalW programı ile sıralanan diziler, Jalview programı ile ilgili dizi grupları içerisinde değişmeyen ve diğer gruplardan

farklılık gösteren bölgeler gözetilerek, Vector NTI programının da yardımıyla primer ve prob alternatifleri belirlendi. Çalışma multipleks qPCR olarak optimize edileceğinden ilgili primer ve problemlerin birbirleriyle etkileşimi Vector NTI programı ile araştırılarak uygun olan diziler sentezletildi. Primer ve problemlerin T_m dereceleri kendi içlerinde birbirine yakın tutuldu, ancak problemlerin T_m derecelerinin primerlerden en az 6-7°C daha fazla olmasına özen gösterildi. Ek olarak çoğalan bölgelerin birbirinden ayrımı için problemler farklı boyalarla işaretli olarak sentezlendi (Tablo I).

PCR protokollerinin doğrulanması için; sentezletilen primer kontrolü bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-24-like}, bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-58-like} genleri için bağımsız PCR ile yapıldı. Çalışmada kullanılan primer büyüklükleriyle uyumlu agaroz jel elektroforez görüntüsü veren PCR ürünleri dizilerek NCBI veri bankası dizileriyle karşılaştırıldı. Dizileme ile bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-58-like} genleri için oluşturulan multipleks qPCR deneylerinde kullanılacak problemler kontrol edildi.

Nükleik Asit İzolasyonu ve Moleküler Çalışmalar

DNA eldesi için, 1/100 triton X içeren 250 µl lizis tamponu içine 18-24 saat inkübe edilmiş saf kültürlerden 2-3 koloni eklenerek süspanse edildi. Hazırlanan bakteri süspansiyonu 10 dakika kaynatıldı ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın 50 µl'si dikkatlice alınarak moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tüm örnekler bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-51-like} ve bla_{OXA-58-like} genleri için multipleks qPCR uygulandı. bla_{OXA-24-like} geni araştırılmasında konvansiyonel PCR yöntemi kullanıldı. qPCR optimizasyonu ve konvansiyonel PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 834 klinik *A.baumannii* izolatının Vitek2 ile yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda; %96.8 amoksisilin-klavulanat, %86.8 siprofloksasin, %74.7 gentamisin, %73.5 sefaperazon-sulbaktam, %73 meropenem, %72.2 imipenem ve %71.7

Tablo I. Çalışmada Kullanılan Primerler

Alt gruplar	Primer yönü	Dizi	GeneBank No	Prob	
OXA-23	F	5'CGGTCTTGATCTCATGCAA-3'	GQ849192.1	HEX	
	R	5'-CCCAACCAGTCTTTCCAAA-3'			
OXA-24	F1	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAA-3'	AJ239129.1	-	
	R1	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'			
	F2	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAA-3'			Woodford ve ark. ¹¹
	R2	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'			
OXA-51	F	5'-TCAGCAAGAGGCACAGTTT-3'	EU255296.1	FAM	
	R	5'-GCTGAACAACCCATCCAGTT-3'			
OXA-58	F	5'-AATTGGCAGTCGTATTGGT-3'	EU131095.1	Cy5	
	R	5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'			

amikasin direnci saptanmıştır. Vitek2 ile 602 (%72.2) suş hem imipenem hem de meropeneme dirençli bulunmuş; tüm *A.baumannii* izolatlarının kolistine duyarlı olduğu saptanmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle tespit edilen imipenem ve meropenem direnci ise sırasıyla %74.8 (624/834) ve %75.7 (631/834) oranındadır.

A.baumannii enfeksiyonları için tedavi alternatifi olan imipenem ve meropeneme direnç, çalışmaya katılan hastaneler arasında farklılıklar göstermiştir (Tablo II). Benzer durum, çalışmada irdelenen yıllar açısından da gözlenmiştir. İmipenem ve meropenem için direnç 2008 yılına kıyasla 2011 yılında ciddi artış göstermiştir.

Konvansiyonel PCR çalışmalarında *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like} ve *bla*_{OXA-58-like} genleri için pozitiflikler saptanmıştır. Beklenen baz büyüklüğünde agaroz jel elektroforez görüntüsü veren PCR ürünlerinin kontrol amaçlı dizilenecek NCBI veri bankası dizileriyle karşılaştırma yapılmış ve birebir uyum izlenmiştir. Ancak, gerek NCBI dizileri esas alındığında gerekse sentezlenen ya da literatürde bildirilen primer çiftleri kullanıldığında, *bla*_{OXA-24-like} geni için pozitiflik gösterilememiştir.

Optimize edilen multipleks qPCR çalışmalarında *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like} ve *bla*_{OXA-58-like} pozitiflikleri saptanmıştır. Yalnızca *bla*_{OXA-51-like} çalışmaya katılan tüm izolatlarda pozitif bulunmuştur. Çalışmaya katılan merkezlerin *bla*_{OXA-23-like} ve *bla*_{OXA-58-like} gen pozitiflik oranları arasında farklar saptanmakla birlikte, tüm izolatlar için *bla*_{OXA-23-like} ve *bla*_{OXA-58-like} gen pozitiflikleri sırasıyla %53.7 (n= 448) ve %12.5 (n= 104) olarak belirlenmiştir (Tablo II). Karbapeneme dirençli izolatlar arasında *bla*_{OXA-23-like} ve *bla*_{OXA-58-like} gen pozitiflik oranları sırasıyla %74.4 (n= 448) ve %17.3 (n= 104) olarak bulunmuştur. Yirmi beş izolat hem *bla*_{OXA-23-like} hem de *bla*_{OXA-58-like} gen pozitifliği göstermiştir.

Çalışma sürecinde *bla*_{OXA-58-like} gen pozitifliğinde sınırlı oranda bir azalma gözlenmiştir. Özellikle 2011 yılında saptanan %6.1 (n= 6) oranındaki *bla*_{OXA-58-like} pozitifliği dikkat çekici bulunmuştur. Ek olarak, *bla*_{OXA-23-like} gen pozitifliklerinde yıllar içinde önemli bir artış söz konusudur. Bilhassa 2008 yılı izolatlarına oranla 2011 yılı izolatlarında üç kat yüksek oranda *bla*_{OXA-23-like} gen pozitifliği saptanmıştır. Direnç ile ilişkili gen bölgelerinin oranındaki bu artış, imipenem ve meropenem direncindeki artışla da paralellik göstermektedir.

TARTIŞMA

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli *Acinetobacter* türlerinin neden olduğu hastane enfeksiyonlarında artış göze çarpmaktadır. Bu durum tedavide kullanılabilecek antibiyotiklerin etkisiz kalmasına yol açarak mikroorganizmanın kontrol edilmesini ve gelişen enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. Beta-laktam ajanlardan karbapenemler çok geniş etki spektrumları, antimikrobiyal aktivite, iyi bir klinik etkinlik ve olumlu güvenlik profili ile birçok ciddi enfeksiyonun ampirik tedavisinde ilk tercih olarak değerlendirilmektedir^{1,3,5}. Ülkemizde yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, *A.baumannii* izolatlarında karbapenemlere direnç oranları %80'e yaklaşmıştır¹². Altı yıllık süre içinde 1532 *Acinetobacter* izolatı ile İspanya'da yapılan bir araştırmada, yıllar içerisinde birçok antibiyotiğe karşı direncin en az iki kat arttığı, imipenem direncinin ise %1.3'den %80'e ulaştığını bildirilmiştir¹³. Çalışmamız sürecinde de direnç oranlarında önemli artış gözlenmiş ve karba-

Tablo II. Klinik Örneklere İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında OXA 23, OXA 58 ve Antibiyotik Direnç Durumu

Şehir/Yıl	İzolat sayısı	OXA _{bla-23} -like				OXA _{bla-58} -like				Antibiyotik Direnç					
		Pozitif		Negatif		Pozitif		Negatif		MEM (%)			IPM (%)		
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	R	I	S	R	I	S		
Afyonkarahisar/2008	42	2 (4.8)	40 (95.2)	7 (16.7)	35 (83.3)	42.9	11.9	45.2	38.1	9.5	52.4				
Kahramanmaraş/2008	32	16 (50)	16 (50)	1 (3.1)	31 (96.9)	65.6	0	34.4	65.6	0	34.4				
Van/2008	62	12 (19.4)	50 (80.6)	12 (19.4)	50 (80.6)	43.6	6.5	50	43.6	1.6	54.8				
Afyonkarahisar/2009	79	19 (24.1)	60 (75.9)	16 (20.3)	63 (79.7)	53.2	7.6	39.2	49.4	11.4	39.2				
İstanbul/2009	41	26 (63.4)	15 (36.6)	9 (22)	32 (78)	90.2	2.4	7.3	90.2	2.4	7.3				
Konya/2009	65	59 (90.8)	6 (9.2)	0	65 (100)	92.3	1.5	6.2	92.3	0	7.7				
Bolu/2009	43	29 (67.4)	14 (32.6)	0	43 (100)	81.4	0	18.6	76.7	4.7	18.6				
Afyonkarahisar/2010	105	78 (74.3)	27 (25.7)	2 (1.9)	103 (98.1)	80	3.8	16.2	80	2.9	17.1				
Ankara/2010	50	15 (30)	35 (70)	11 (22)	39 (78)	60	0	40	60	0	40				
Erzurum/2010	49	22 (44.9)	27 (55.1)	10 (20.4)	39 (79.6)	69.4	0	30.6	69.4	0	30.6				
Isparta/2010	94	36 (38.3)	58 (61.7)	29 (30.9)	65 (69.1)	72.3	4.3	23.4	72.3	0	27.7				
Konya/2010	74	66 (89.2)	8 (10.8)	1 (1.4)	73 (98.4)	98.7	0	1.3	98.7	0	1.4				
Van/2011	18	14 (77.8)	4 (22.2)	0	18 (100)	94.4	0	5.6	94.4	0	5.6				
Elazığ/2011	16	8 (50)	8 (50)	4 (25)	12 (75.5)	81.3	0	18.7	81.3	0	18.8				
Sakarya/2011	46	33 (71.7)	13 (28.3)	2 (154)	44 (84.6)	71.7	6.5	21.8	71.7	6.5	21.7				
İstanbul/2011	18	13 (77.2)	5 (22.8)	0	18 (100)	94.4	0	5.6	94.4	0	5.6				
Toplam	834	448 (53.7)	386 (46.3)	104 (12.5)	730 (87.5)	73	3.4	23.6	72.2	2.8	25.1				

IPM: İmipenem; MEM: Meropenem; R: Dirençli; I: Orta dirençli; S: Duyarlı.

penem direncinin %70'in üzerine çıktığını saptanmıştır. Ek olarak çalışmalarda meropenem direncinin imipeneme oranla daha yüksek olduğu da bildirilmektedir¹⁴. Benzer şekilde çalışmamızda da meropenem direnci imipeneme oranla daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda OXA alt tiplerinin araştırılması amacıyla multipleks qPCR uygulanan 834 izolatın tamamında *bla*_{OXA-51-like} geninin varlığı gösterilmiştir. *A.baumannii* türüne özgül *bla*_{OXA-51-like} geninin tüm izolatlarda tespit edilmiş olması, çalışmaya dahil edilen izolatların tanımlanmasını moleküler olarak doğrular niteliktedir. Buna karşın iki farklı primer kullanılarak yapılan konvansiyonel PCR çalışmalarında, ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmaya dahil edilen hiçbir izolatta *bla*_{OXA-24-like} gen pozitifliği gösterilememiştir^{15,16} (Tablo III).

Yurt içi ve yurt dışından yapılan çalışmalarda, *bla*_{OXA-23-like} için %0-98.4 arasında pozitiflik oranları bildirilmektedir¹⁵⁻¹⁸ (Tablo III). Çalışmamızda, ülkemizin farklı bölgelerinden toplanan 834 *A.baumannii* izolatı ile yapılan multipleks qPCR çalışmaları sonucunda %53.7 oranında *bla*_{OXA-23-like} gen pozitifliği saptanmıştır. Karbapeneme dirençli 602 *A.baumannii* izolatı ile yapılan multipleks qPCR çalışmaları sonucunda da %74.4 (448/602) oranında yüksek *bla*_{OXA-23-like} gen pozitifliği tespit edilmiştir. Pozitiflik oranında yıllar içinde gözlenen artış da dikkat çekicidir. Bu yüksek oran, ülkemizdeki karbapeneme dirençli *A.baumannii* izolatlarında, direncin temel nedeninin *bla*_{OXA-23-like} gen pozitifliği olabileceğini düşündürmektedir.

Karbapenem direncinden sorumlu olup Çin¹⁹, Kore²⁰ ve Tayvan²¹ hariç pek çok ülkeden bildiri yapılan *bla*_{OXA-58-like} geni için, çalışmamıza dahil edilen tüm izolatlarda %12.8 oranında pozitiflik elde edilmiştir. Karbapeneme dirençli 602 *A.baumannii* izolatı ile yapılan multipleks qPCR çalışmaları sonucunda da %17.3 (104/602) oranında *bla*_{OXA-58-like} gen pozitifliği saptanmıştır. Bölgesel farklılıklar göze çarpmakla birlikte, yıllar içinde *bla*_{OXA-58-like} pozitifliğinde azalma söz konusudur. Özellikle 2011 yılı izolatları arasında *bla*_{OXA-58-like} gen pozitifliğinin %6.1'e gerilemesi dikkat çekicidir. Bu durumun, *bla*_{OXA-23-like} pozitif izolatların, hastanelerin yoğun bakım ünitelerindeki kolonizasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızda hem *bla*_{OXA-23-like} hem de *bla*_{OXA-58-like} pozitif bulunan 25 *A.baumannii* izolatının tamamı, literatürle uyumlu olarak karbapenemlere dirençli bulunmuştur²⁰.

Hastane enfeksiyonlarına neden olan dirençli etkenlerin hızla tanımlanması için son yıllarda moleküler testlere sıkça başvurulmaktadır^{8,9}. Ancak dirençli *A.baumannii* izolatlarının erken tanısı için henüz yaygın olarak kullanılan testler bulunmamaktadır. Araştırma amaçlı yapılan çalışmalarda bildirilen multipleks PCR'nin en önemli olumsuzlukları; PCR ve elektroforez basamaklarından oluşması, zaman alıcı olması ve hem uygulama hem de değerlendirme aşamalarında nitelikli elemana ihtiyaç duyulmasıdır¹¹. Bu çalışmada geliştirilen ve kullanıma hazır hale getirilen multipleks qPCR kiti, tek basamaktan oluşmakta, hızlı sonuçlanmakta ve uygulama ve değerlendirme aşamalarında nitelikli personele ihtiyaç duymamaktadır. Sonuç olarak, karbapenemler dahil antimikrobiyal tedavide kullanılan çoğu antibiyotige yüksek direnç gösteren *A.baumannii* izolatlarının kolistine duyarlılığı devam etmektedir. Hem *bla*_{OXA-23-like} hem de *bla*_{OXA-58-like} genleri, karbapeneme di-

Tablo III. OXA Gen Dağılımının Yıllara Göre Ulusal ve Uluslararası Verileri

Kaynak	Yer	Yıl	Sayı	<i>bla</i> _{OXA-23} (%)	<i>bla</i> _{OXA-24} (%)	<i>bla</i> _{OXA-51} (%)	<i>bla</i> _{OXA-58} (%)
Park ve ark. ²⁰	Kore	2004	58*	12	-	-	-
Marque ve ark. ²²	Avrupa	2005	48**	6.3	18.8	-	45.8
Vahaboğlu ve ark. ²³	Türkiye	2006	72**	-	-	77.7	17.9
Villegas ve ark. ¹⁸	Kolombiya	2007	66*	98.4	0	100	0
Wang ve ark. ¹⁹	Çin	2007	221**	97.7	-	84.6	-
Feizabadi ve ark. ²⁴	İran	2008	128**	25.0	17.9	84.4	9.0
Townner ve ark. ²⁵	ARPAC	2008	100**	8.3	5.2	96.0	18.8
Lee ve ark. ²⁶	Güney Kore	2009	144**	46.0	-	-	-
Mendes ve ark. ²⁷	SENTRY	2009	544 ^a	95.0	5.6	94.1	11.9
Papa ve ark. ¹⁷	Yunanistan	2009	164*	0	0	100	96.9
Morovat ve ark. ²⁸	İran	2009	80*	25.0	15.0	100	21.5
Ergin ve ark. ¹⁵	Türkiye	2004-2010	100*	31.0	0	100	23.0
Nowak ve ark. ²⁹	Polonya	2005-2010	104***	44.2	0	100	0
Yang ve ark. ²¹	Tayvan	2010	1265 ^b	96.3	0.5	100	-
Cicek ve ark. ¹⁶	Türkiye	2011-2012	101	78.2	0	100	0
Bu çalışma	Türkiye	2008-2011	834*	52.4	0	100	12.5
			602***	74.4	0	100	17.3

* *A.baumannii*;

** *Acinetobacter* spp.;

*** Karbapeneme dirençli *A.baumannii*;

a: Çok ilaca dirençli 230 izolatta OXA geni bakılmıştır; b: Çok ilaca dirençli 192 izolatta OXA geni bakılmıştır.

rençli *A.baumannii* klinik izolatlarında oldukça yaygın olmakla birlikte, yıllar içindeki *bla*_{OXA-23-like} pozitif izolatların artışı dikkat çekicidir. Günümüzde, hastane kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi için dirençli ajanların hızlı tanısında multipleks qPCR en iyi yoldur. Bu çalışmada geliştirilen multipleks qPCR kiti karbapenem dirençli *A.baumannii* klinik izolatlarında *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like} ve *bla*_{OXA-58-like} genlerinin hızlı tanısı ve sıklığının ortaya konmasında yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Coelho J, Woodford N, Turton J, Livermore DM. Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? J Hosp Infect 2004; 58(3): 167-9.
2. Çetin ES, Tetik T, Kaya S, Arıdoğan BC. Polimiksin B'nin imipenem dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı in-vitro aktivitesi. ANKEM 2011; 25(2): 94-8.
3. Çiftci İH, Aşık G. *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. ANKEM 2011; 25(3): 196-207.
4. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. J Antimicrob Chemother 2007; 60(5): 1163-7.
5. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. Antimicrob Agent Chemother 2006; 50(2): 756-8.
6. Towner JK. Molecular basis of antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. pp: 321-43. In: Gerischer U (ed), *Acinetobacter Molecular Biology*. 2008, Caister Academic Press, UK.
7. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology 2002; 148(1): 257-66.
8. Renwick L, Holmes A, Templeton K. Multiplex real-time PCR assay for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Pantone-Valentine leukocidin from clinical samples. Methods Mol Biol 2013; 943(2):105-13.
9. Cantarelli V, Cavalcante B, Pilger DA, et al. Rapid detection of Van genes in rectal swabs by real time PCR in Southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44(5): 631-2.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first Informational Supplement. CLSI Document M100-S21, 2011. CLSI, Wayne, PA.
11. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(4): 351-3.
12. Kuşçu F, Öztürk DB, Tütüncü EE ve ark. Çoğul antibiyotik dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında tiGESiklin duyarlılık oranlarının E-test yöntemiyle araştırılması. Klimik Derg 2009; 22(2): 48-51.
13. Ruiz J, Nunez ML, Perez J, Simarro E, Martinez- Campos L, Gomez J. Evolution of resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* over a 6-year period. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18(4): 292-5.
14. Balcı M, Bitigen M, Kandemir B, Türk Arıbaş E, Erayman I. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılığı. Ankem 2010; 24(1): 28-33.
15. Ergin A, Hascelik G, Eser OK. Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. Scand J Infect Dis 2013; 45(1): 26-31.
16. 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 2013 July 19. doi: 10.1111/1469-0691.12338 [Epub ahead of print]
17. Papa A, Koulourida V, Souliou E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a newly established Greek hospital. Microb Drug Resist 2009; 15(4): 257-60.
18. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. Antimicrob Agent Chemother 2007; 51(6): 2001-4.

19. Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51(11): 4022-8.
20. Park KO, Son HC, Bae IK, Jeong SH. Molecular epidemiology of infection caused by OXA-23 or IMP-1 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Clin Microbiol* 2005; 8(2): 121-9.
21. Yang SC, Chang WJ, Chang YH, et al. Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in central Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29(5): 601-4.
22. Marque S, Poirel L, Heritier C, et al. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9): 4885-8.
23. Vahaboğlu H, Budak F, Kasap M, et al. High prevalence of OXA-51 type class D β -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centers. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(3): 537-42.
24. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla*_{OXA} genes among *Acinetobacter* spp. isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61(4): 274-8.
25. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M; ARPAC Steering Group. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(2):161-7.
26. Lee K, Kim MN, Choi TY, et al; KONSAR Group. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(6):520-4.
27. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Ronald N, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(1): 55-9.
28. Morovat T, Bahram F, Mohammad E, Setareh S, Feizabadi MM. Distribution of different carbapenem resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in Tehran Hospitals. *New Microbiol* 2009; 32(3): 265-71.
29. Nowak P, Paluchowska P, Budak A. Distribution of *bla*_{OXA} genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol* 2012; 35(3): 317-25.