

[SS-19]

# Çoklu İlaç Dirençli *A. baumannii* İzolatlarının OXA tipi Karbapenemaz Genlerinin Tespiti ve PFGE ile Moleküler Epidemiyolojik Analizi

Nergis Aşgın<sup>1</sup>, Barış Otlu<sup>2</sup> Elçin Kal Çakmaklıoğulları<sup>1</sup>, N. Canan Gürsoy<sup>2</sup>

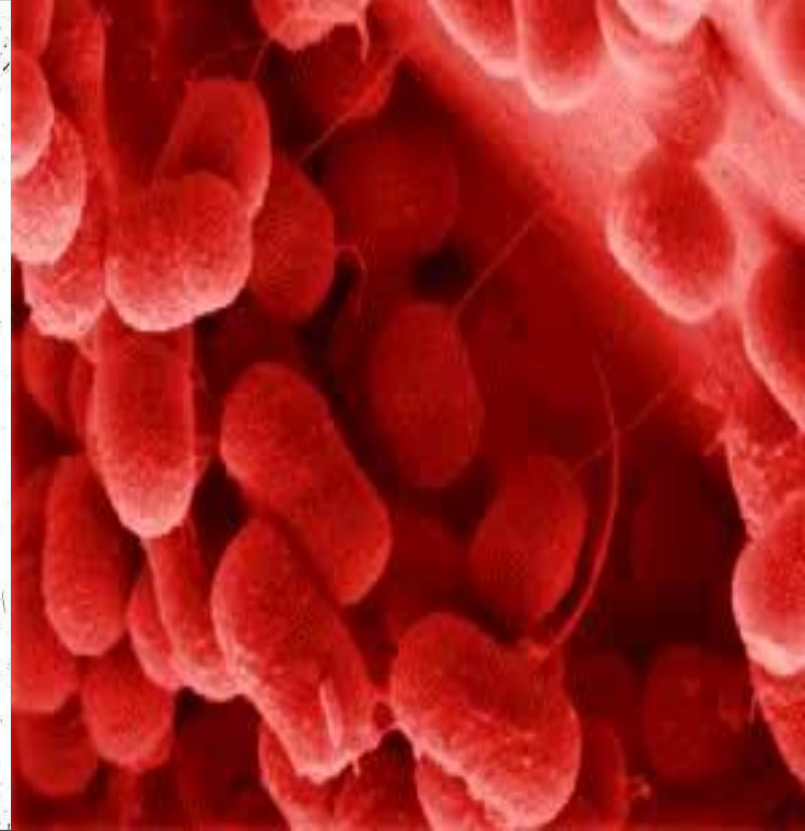
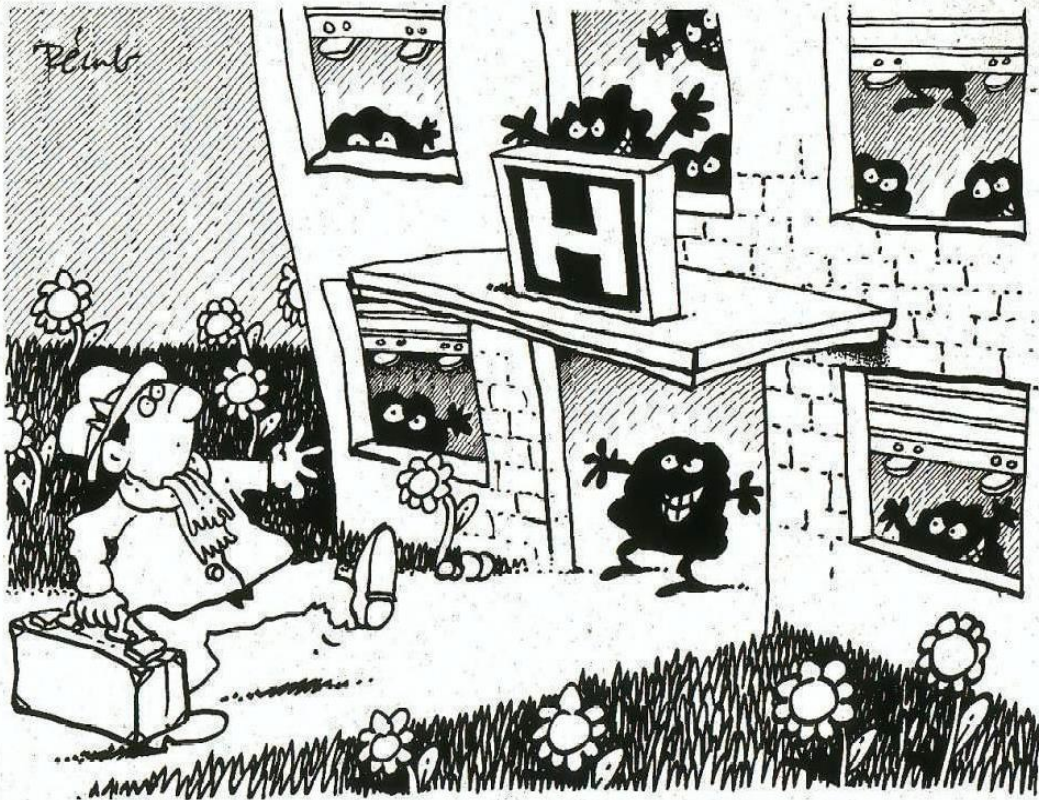
<sup>1</sup> Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Karabük

<sup>2</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Malatya

*Bu çalışma KBÜ BAP- 2014/2 KT 062 nolu proje olarak desteklenmiştir.*

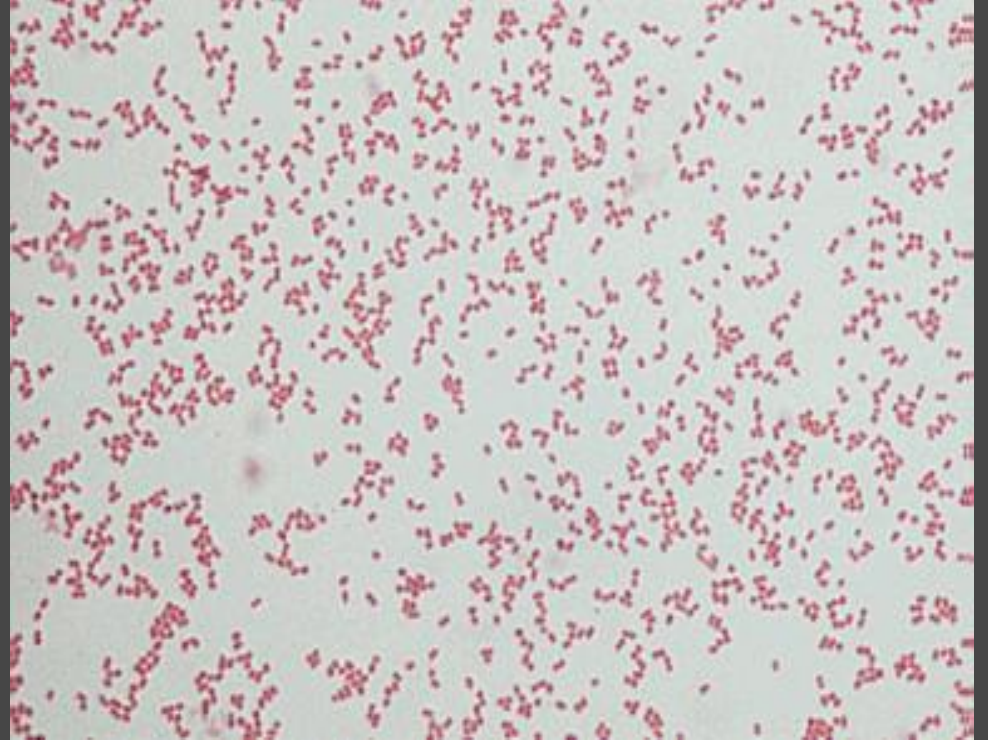
# GİRİŞ

*A. baumannii* özellikle yoğun bakım ünitelerinde mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olan nozokomiyal bir patojendir



# GİRİŞ

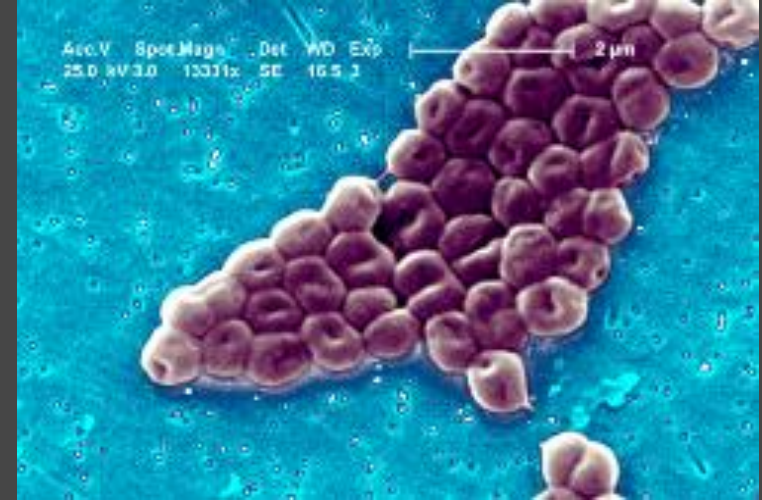
Karbapenemler dahil pek çok antibiyotiğe yüksek oranda dirençli olması tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır





# AMAÇ

- Bu çalışmada hastanemiz servis ve yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören 59 hastadan izole edilen 76 çoklu ilaç dirençli(ÇİD) *A. baumannii* suşunun karbapenemaz genlerinin tespiti ve suşlar arası klonal ilişkinin Pulsed Field Jel Elektroforez ( *PFGE* ) yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.



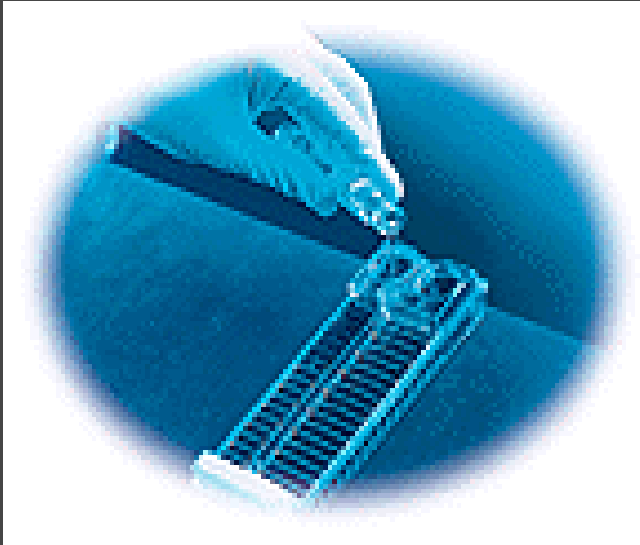
# YÖNTEM

- Kırkık yoğun bakım olmak üzere toplam 440 yataklı Karabük Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Mart 2013-Haziran 2015 tarihleri arasında, servis veya yoğun bakım ünitelerinde yatan 59 hastadan izole edilen çoklu ilaç dirençli 76 *A. baumannii* izolatu çalışmaya dahil edildi.
- Aynı hastadan izole edilen yakın tarihli (15 gün) izolatlar çalışma dışında bırakıldı



# YÖNTEM

- Suşların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıkları BD –Phoenix kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca Vitek MS MALDI-TOF (bioMérieux, Fransa) ile doğrulandı. İzolatlardan nükleik asit izolasyon için Qiasymphony (Qiagen, Almanya) sistemi kullanıldı. Elde edilen DNA örnekleri moleküler çalışmalar yapılıncaaya dek -20°C’de saklandı.



# CIM TESTİ

**İzolatların karbapenemaz aktiviteleri, fenotipik bir test olan CIM (Carbapenem Inactivation Method) ile araştırıldı;**

Bu amaçla, besiyerinde üretilen test edilecek saf bakteri kolonilerinden bir öze dolusu alınarak 400 µl su içerisinde süspanse edildi.

İçerisine 10 µg meropenem diski bırakılarak 35°C'de iki saat inkübe edildi.

Sonra meropenem diski bakteri süspanسیونundan çıkarılıp, 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanmış meropeneme duyarlı standart E. coli suşunun (ATCC 29522) inoküle edildiği Müller-Hinton besiyerine bırakıldı ve 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi.

Test edilen A. baumannii suşunda karbapenemaz üretimi mevcutsa, E. coli suşu, meropenem diski çevresinde herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmadan üreyebilmektedir.



# CIM TESTİ



- 1 ve 2 nolu suşlarda

Karbapenemaz aktivitesi mevcuttur.

(CIM pozitif)

- 3 nolu suşda  
karbapenemaz aktivitesi negatiftir.

(CIM negatif)



# Multiplex PCR

- OXA 23, OXA-51, OXA-58, VIM, GES, GIM, SPM karbapenemaz genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır.

Tablo. Direnç genlerinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin dizileri.

Primer	Primer dizisi (5'-3')	Çoğaltılan baz çifti (bç)
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i> like -F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i> like -R	ATTTCTGACCGCATTTCAT	
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> like -F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> like -R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i> like -F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i> like -R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	

# Multiplex PCR

**Amplifikasyon için GeneAmp PCR System 9700  
(Applied Biosystems/ USA) cihazı kullanıldı.**

Amplifikasyon koşulları;

94°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyonun ardından,  
94°C'de 30 saniye denatürasyon,  
primer bağlanması için 60°C'de 30 saniye  
ve 72°C'de 1 dakika uzama ile  
toplam 35 siklus ve  
final uzama olarak 72°C'de 10 dakika olacak şekilde uygulanmıştır

# PFGE

**İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin tespiti için; Durmaz ve arkadaşlarının uyguladıkları, “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır**

*Apa-I* enzimi kullanılarak CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Lab., Nazareth, Belgium); başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14°C, süre 24 saatlik elektroforez uygulanmıştır. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Pearson korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA ("Unweighthed Pairwise Grouping Matematical Avenaging) yöntemi kullanıldı.

İzolatlar benzerlik katsayıları göz önüne alınarak birbirleriyle %90'ın üzerinde benzerlik gösteren suşlar aynı klonda kabul edilmiştir. Benzerlik oranları %90'ın altında olan suşlar ise diğerlerinden farklı olarak değerlendirilmiştir.



# BULGULAR

- Hastaların; 32 'si (%55) erkek, 27 si (%45) kadındır.
- Yaş ortalaması; 70.3 (39-93)
- Hastaların; 47si (%80) yoğun bakım, 12' si (%20) servis hastasıdır.
- En sık görülen altta yatan hastalıklar; SVH (Serebrovaskuler Hastalık)

KOAH

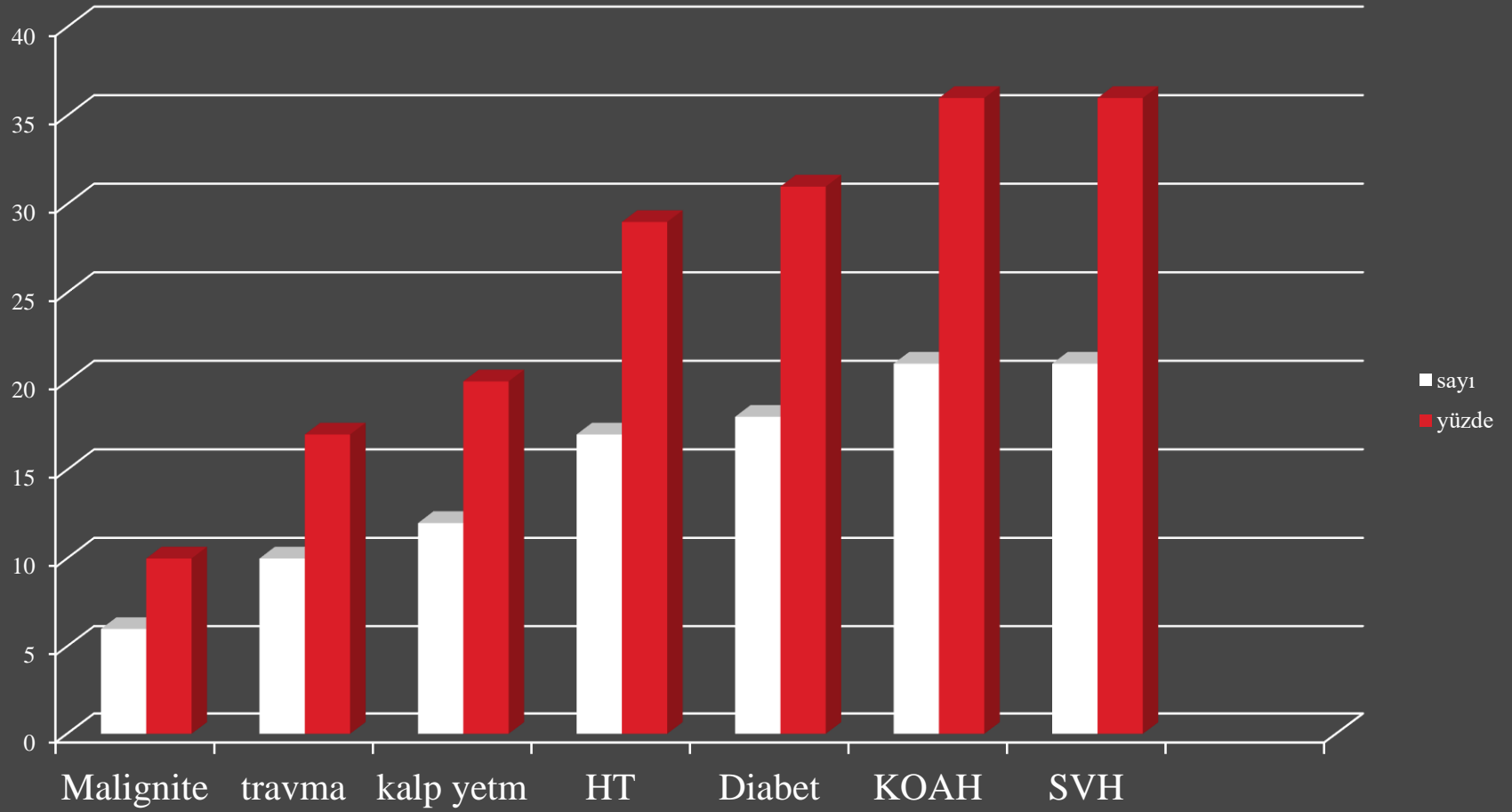
Diabet

- En sık görülen risk faktörleri; Entübasyon

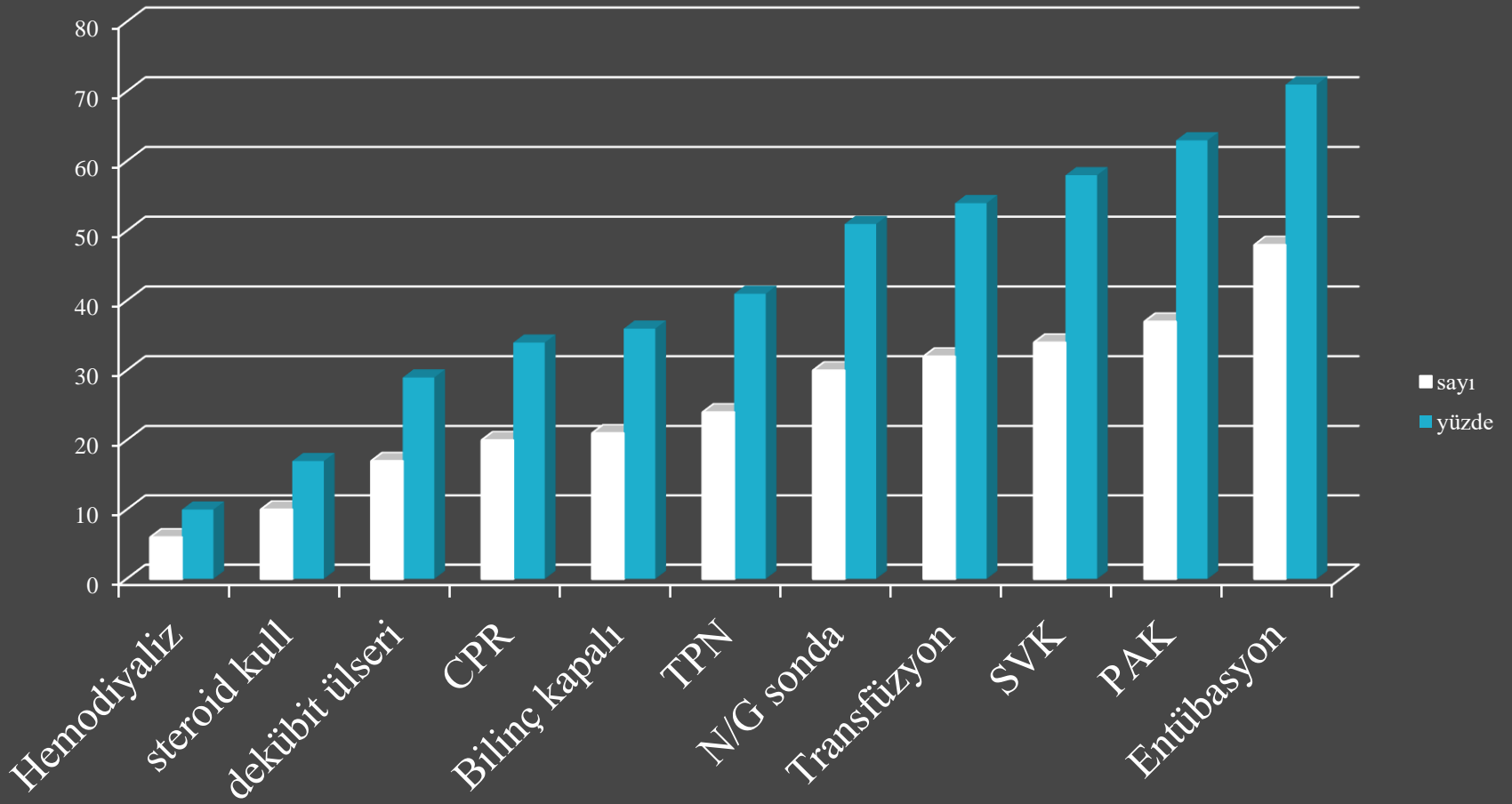
PAK(Periferik Arteriyel Kateterizasyon)

SVK (Santral Venöz Kateterizasyon)

# Alta Yatan Hastalıklar



# Hastalara Ait Risk Faktörleri

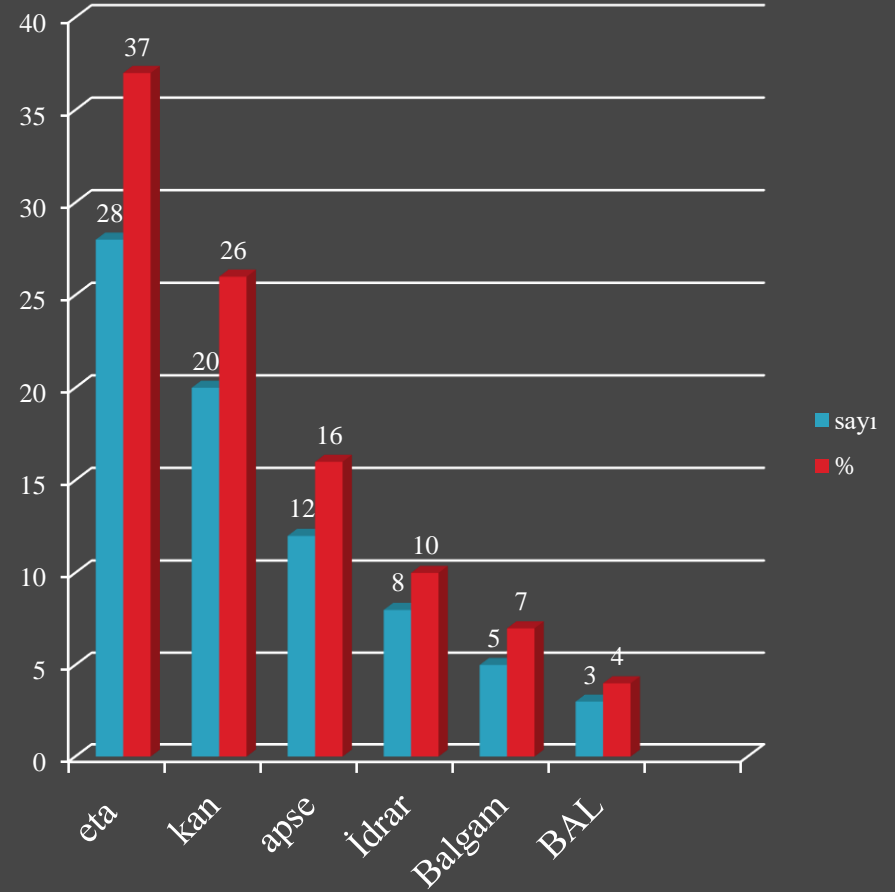




# BULGULAR

- ÇİD *A. baumannii* suşlarının (n=76)

- **28 ETA** (% 37)
- **20 Kan** (% 26)
- **12 Apse** (%16)
- **8 İdrar** (%10)
- **5 Balgam** (%7)
- **3 BAL** (% 4)



# BULGULAR

## Antibiyotik Direnç Oranları;

- Gentamisin, %100
- Seftriakson, %100
- Sulbaktam- ampisilin %100
- Sefepim %100
- Siprofloksasin %100,
- İmipenem %95,
- Meropenem %95
- Piperasilin-tazobaktam %95
- Amikasin %95 dirençli iken,
- Kolistin (%0) direnci saptanmamıştır.

En etkili antibiyotik KOLİSTİN

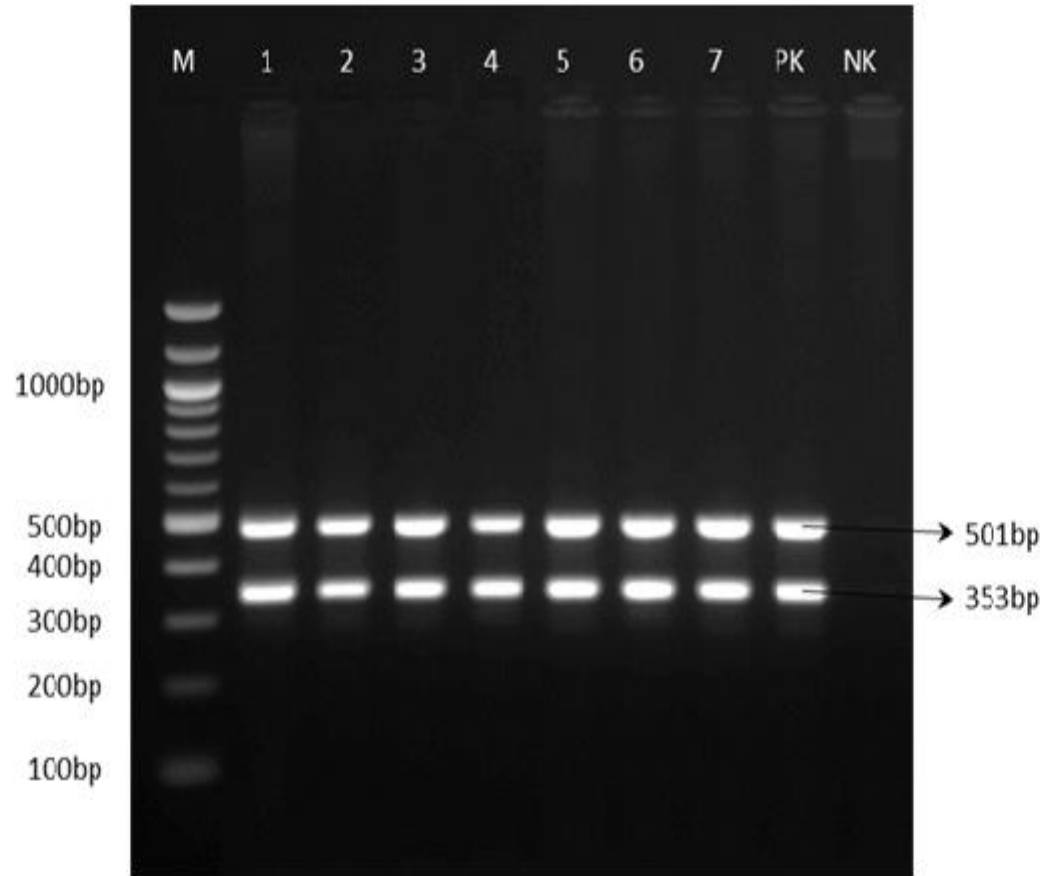
# BULGULAR

- CIM testi 76 izolatın 72'sinde pozitif 4'ünde negatif bulunmuş olup bunlar imipenem ve meropeneme duyarlı suşlardı
- Böylece karbapenemaz aktivitesi ile CIM testinin %100 uyumlu olduğu gözlenmiştir



# BULGULAR

- Multipleks PCR sonuçlarına göre;
- *A. baumannii* türleri için spesifik intrinsik bla<sub>OXA-51</sub> tüm izolatlarda pozitif bulunmuştur.
- OXA-tipi karbapenemazlardan bla<sub>OXA-23</sub> imipenem dirençli 72 izolatın hepsinde pozitif bulunmuştur.
- İmipenem duyarlı dört izolatta ise bla<sub>OXA-23</sub> saptanmamıştır.
- PCR sonuçları ile CIM testi birbirleriyle % 100 uyumlu bulunmuştur.
- Hiçbir izolatta bla<sub>OXA-58</sub> tespit edilmemiştir.



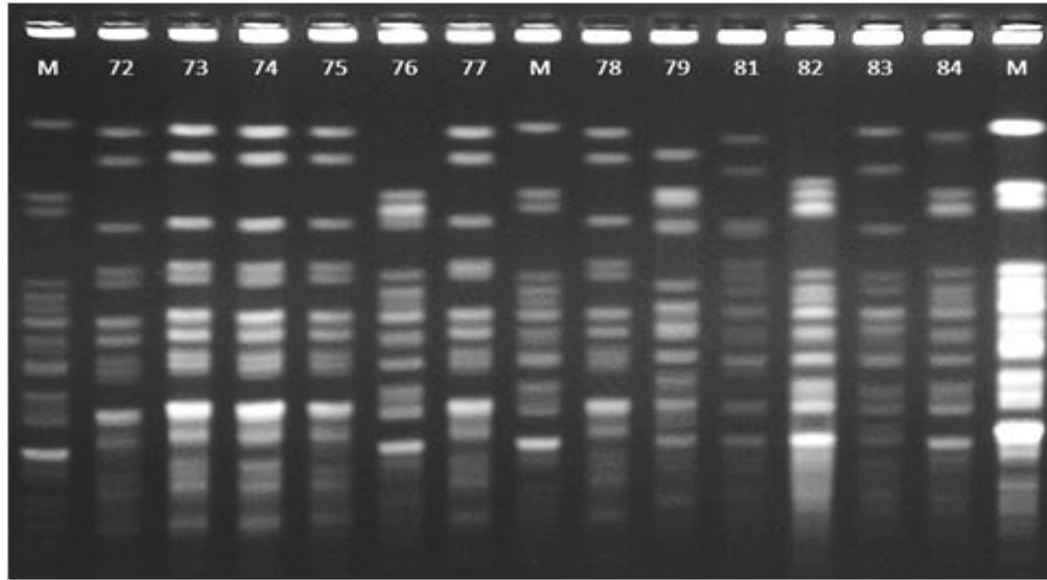
Şekil A. *baumannii*'de OXA-23 (501 bp) ve OXA-51 (353 bp) genlerinin % 1.5'luk agaroz jel elektroforezda gösterilmesi. NK: Negatif kontrol. PK: Pozitif kontrol M: 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, US)

## BULGULAR (PFGE)

- PFGE ile 76 izolat arasında klonal olarak ilişkili suşlar 7 küme içerisinde toplanmıştır (tolerans 1.0, cutoff %90).
- İzolatların 63'ü herhangi bir küme içerisinde yer almakta olup, kümeleşme oranı %83'dür.
- Klonal olarak ilişkili bulunan izolatların tamamının, karbapenem direncine yol açan OXA-23 genini taşıdığı görülmüştür.
- OXA-23 negatif/OXA-51 pozitif suşların sporadik izolatlar içerisinde yer aldığı görülmektedir.
- Farklı tarihlerde aynı hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen suşların PFGE paternleri incelendiğinde; hem nüklere hem de re-infeksiyonlara rastlandığı görülmektedir.

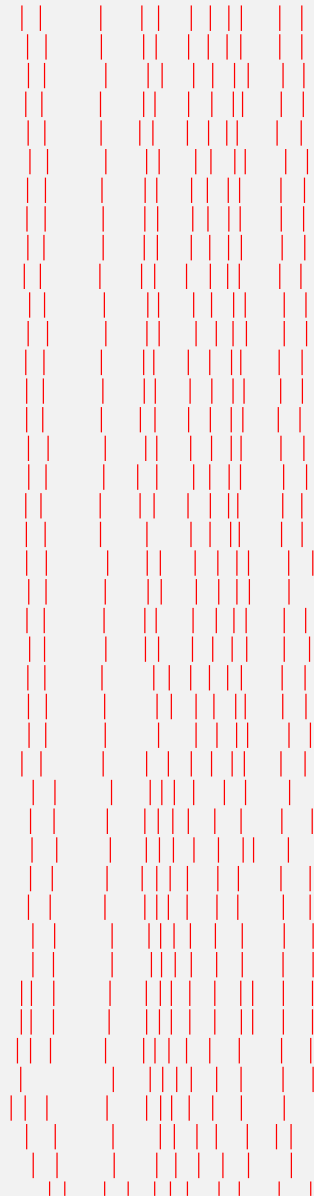
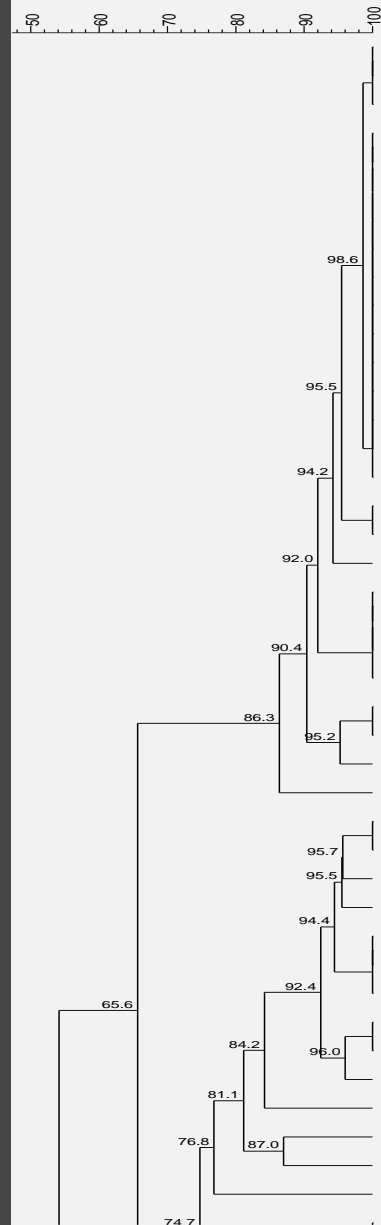
## *A. baumannii* izolatlarının PFGE paternleri

Şekil. İzolatların PFGE paternleri:



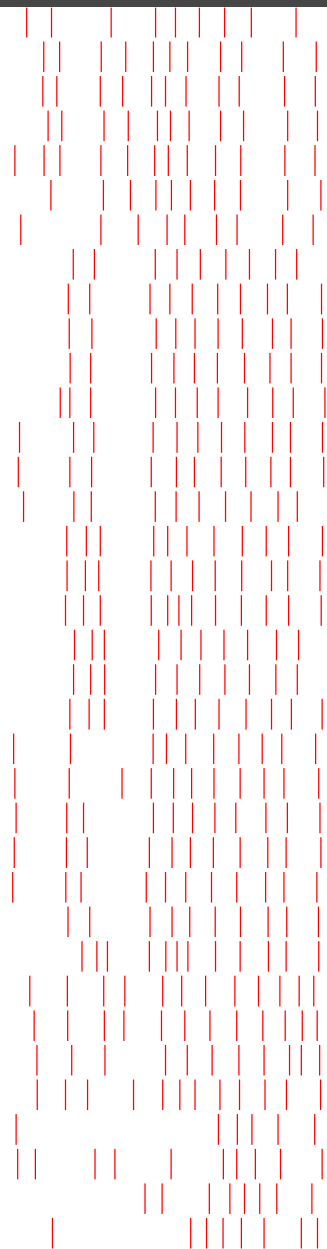
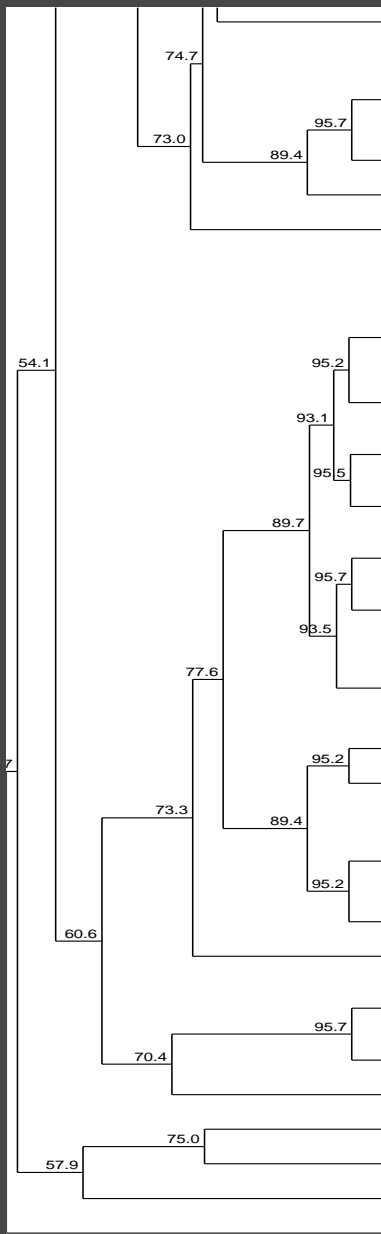
**A. baumannii Apa-I**

**A. baumannii Apa-I**



**Suş No Oxa 51/23 Genotip**

36	+/+	A
74	+/+	A
39	+/+	A
18	+/+	A
73	+/+	A
20	+/+	A
23	+/+	A
25	+/+	A
28	+/+	A
65	+/+	A
45	+/+	A
47	+/+	A
67	+/+	A
68	+/+	A
70	+/+	A
72	+/+	A
24	+/+	A
21	+/+	A
77	+/+	A
10	+/+	A
12	+/+	A
56	+/+	A
44	+/+	A
27	+/+	A
46	+/+	A
2	+/+	A
35	+/+	A
8	+/+	B
59	+/+	B
81	+/+	B
62	+/+	B
22	+/+	B
41	+/+	B
42	+/+	B
54	+/+	B
55	+/+	B
30	+/+	B
40	+/+	B
33	+/+	B
83	+/+	B
5	+/+	B
13	+/+	C



5	+/+	
13	+/+	C
16	+/+	C
58	+/+	C
57	+/+	C
26	+/+	
69	+/+	
6	+/+	D
15	+/+	D
43	+/+	D
53	+/+	D
82	+/+	D
50	+/+	D
51	+/+	D
84	+/+	D
37	+/+	D
76	+/+	D
34	+/+	D
4	+/+	D
7	+/+	D
48	+/+	D
3	+/+	E
38	+/+	E
19	+/+	F
29	+/+	F
31	+/+	F
60	+/+	F
71	+/+	
64	+/+	G
66	+/+	G
79	+/+	G
14	+/+	
9	-/-	
11	-/-	
52	-/-	
32	-/-	



# SONUÇ

- Hastanemizde tek klondan köken alan bir *A. baumannii* epidemisi söz konusu değildir.
- Multiklonal bir yayılım mevcuttur.
- Ancak kümeleşme oranı oldukça yüksektir. (%83)
- Bu da hastalar arası çapraz bulaşın sık olduğunu göstermektedir.
- Bu nedenle enfeksiyon kontrol programının daha sistemli ve etkin bir şekilde uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır

# TEŞEKKÜRLER



*drelcinkal@karabuk.edu.tr*