

PSEUDOMONAS AERUGINOSA KÖKENLERİNİN ÇEŞİTLİ ANTİMİKROBİKLERE DİRENÇ ORANLARININ ARAŞTIRILMASI

THE INVESTIGATION OF RESISTANCE RATIOS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES TO VARIOUS ANTIMICROBIALS

Onur ÖZGENÇ Ayten URBARLI Mine ERDENİZMENLİ Nilgün FİDAN Alpay ARI

SSK İzmir Eğitim Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir

Anahtar Sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, *in vitro* antibiyotik direnci, disk difüzyon yöntemi

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, *in vitro* antibiotic resistance, disk diffusion method

ÖZET

SSK İzmir Eğitim Hastanesi'nde *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi önemli bir direnç sorunu oluşturmaktadır. Hastanenin çeşitli birimlerinde ve poliklinikte tedavi gören hastalardan 1996 yılı içinde gönderilen klinik örneklerden infeksiyon etkeni ya da kolonizan olarak soyutlanan 199 *P. aeruginosa* suşunun değişik antibiyotiklere duyarlılıkları, NCCLS standartları doğrultusunda, disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antimikrobiklere direnç oranları (%) aşağıdaki gibidir: Amoksisilin-klavulanat 100, seftazidim 23, sefotaksim 81, aztreonam 44, imipenem 18, meropenem 17, gentamisin 64, netilmisin 42, amikasin 27, tobramisin 57, siprofloksasin 40, ofloksasin 55 ve norfloksasin 30. Yoğun Bakım Ünitesi'nde bu direnç oranları oldukça yüksek saptanmış ve özellikle aminoglikozit, kinolon ve hatta karbapenemlere karşı ciddi bir direnç sorunu dikkati çekmiştir. Toplam suşlarda oksimino beta-laktamlar arasında en düşük direnç oranı seftazidime (%23) karşıdır. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde, etken üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonama duyarlı bulunsa bile, bu izolatlardaki indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesi dolayısı ile, bu antimikrobiklerin kontrollü kullanılması gerektiği bilinmektedir. Sonuçta, hastane infeksiyonlarının kontrolü açısından, bu direnç paternlerinin her yıl belirlenmesinin ve antibiyotik kullanım politikalarının saptanmasının önemi üzerinde durulmuştur.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa has caused an important resistance problem in SSK Izmir Teaching Hospital. The susceptibilities of 199 *P. aeruginosa* strains, which were isolated from clinical specimens sent to the clinical microbiology laboratory from hospitalized patients or out-patient clinics in 1996 as colonizing bacteria or clinical pathogens, to various antimicrobials were investigated by using disk diffusion method following NCCLS standards. The resistance ratios (%) of *P. aeruginosa* strains to various antimicrobials were as follows: Amoxicillin-clavulanate 100, ceftazidime 23, cefotaxime 81, aztreonam 44, imipenem 18, meropenem 17, gentamicin 64, netilmicin 42, amikacin 27, tobramycin 57, ciprofloxacin 40, ofloxacin 55 and norfloxacin 30. In intensive care unit these resistance ratios were found highly elevated, and especially it was pointed out that *P. aeruginosa* isolates showed important resistance problems to aminoglycosides, quinolones, and even to carbapenems. Among oximino-beta lactams, the lowest resistance ratio of the total strains was found to ceftazidime (23%). It is known that although these strains are found to be susceptible to third generation cephalosporins and aztreonam, those antimicrobials should be used under control for the treatment of *P. aeruginosa* infections because of their inducible beta-lactamase activities. It can be concluded that determining the resistance patterns and antibiotic using policies every year is very important for the infection control of hospitals.

GİRİŞ

Hastane infeksiyonlarının önemli etkenlerinden biri olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında artan antimikrobik direnç oranları son yıllarda dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır. Bu kökenlerin çeşitli antimikrobik ajanlara karşı direnç kazanma mekanizmaları farklıdır (1, 2). *Pseudomonas aeruginosa* yapılarında bulunan AmpC geni sayesinde kromozomal -laktamaz salgılamaktadır. Enzim normalde bir represör mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken, ortama bir -laktam antibiyotik eklendiğinde enzim sentezi yüksek düzeylere ulaşacak şekilde uyarılabilmektedir. Böylece -laktamazları indüklenebilir türlerde 10^{-5} - 10^{-7} sıklığında sürekli yüksek düzeyde kromozomal enzim üretebilen "stabil dereprese" mutantlar ortaya çıkabilmektedir. Son yıllarda bu bakterilerde gözlenen dirençte daha çok bu dereprese kromozomal enzimlerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Dereprese mutantlar karakteristik olarak, karbapenemler dışındaki -laktamlara dirençlidirler (1, 3- 6).

Pseudomonas aeruginosa bakterilerinde -laktamazlardan bağımsız olarak gelişen "intrensek direnç", dış membran geçirgenliğinin azalması ile birlikte iç membranda aktif "efflux" mekanizmasına bağlıdır (1, 2, 6, 7). *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine direnç plazmit veya transpozon kaynaklı sekonder -laktamazlar ile de kazanılabilmektedir. İmipenem direncinde karbapenemazlar ve D2 porin kaybı rol almaktadır (1, 6).

Direnç mekanizmaları çeşitli olan *P. aeruginosa* bakterilerinin yazarların çalıştığı hastanede soyutlanan suşlarının direnç oranlarının belirlenmesinin, bu bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde antimikrobiklerin seçimine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri kökenleri: Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 1996 yılı içinde gönderilen idrar, yara sürüntüsü ve solunum sistemi örneklerinden infeksiyon etkeni ya da kolonizan olarak soyutlanan 199 *P. aeruginosa* suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Bakteriler API 20NE (bio Mérieux) sistemi kullanılarak tanımlanmıştır. Kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testleri: *P. aeruginosa* izolatlarının amoksisilin-klavulanat (AMC), mezlosilin (MEZ), seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM), imipenem (İPM), meropenem (MEM), gentamisin (GN), netilmisin (NET), amikasin (AK), tobramisin (NN), siprofloksasin (CİP), ofloksasin (OFX) ve norfloksasin (NOR) duyarlılıkları BBL ve Oxoid diskleri kullanılarak disk difüzyon testi ile NCCLS standartları doğrultusunda araştırılmıştır. Orta duyarlı suşlar dirençli olarak kabul edilmişlerdir.

İndüklenebilir β -laktamaz aktivitesinin belirlenmesi:

Disk yaklaşım testi kullanılmıştır. Mueller-Hinton agar besiyerinin ortasına İPM (10 µg) diski, çevresine 2 cm. uzaklıkta olacak şekilde CAZ, CTX ve ATM diskleri yerleştirilmiştir. İnhibisyon zonu geniş olan suşlarda bu uzaklık 2.5 cm. olarak belirlenmiştir. Bu disklerin İPM diskinin bakan yüzünde düzleşme görülmesi, indüklenebilir enzimler açısından olumlu olarak değerlendirilmiştir (8).

BULGULAR

Tüm suşlar AMC'e dirençli saptanmıştır. Bunlardan üç suş az duyarlı sınırları içinde değerlendirilmiştir. Ayrıca AMC duyarlı bulunan üç suş API 20NE ile tam olarak tipendirilemediğinden çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır. Karbapenemler dışında, -laktam antibiyotiklerden en düşük direnç oranı seftazidime, en yüksek direnç oranı sefotaksime bulunmuştur. Amikasin en etkili aminoglikozit, norfloksasin en duyarlı florokinolon grubu antimikrobik olarak saptanmıştır (Tablo 1).

Suşların 146'sında seftazidim, 126'sında aztreonam ve 98'inde sefotaksim ile imipenem diskinin yakın kısmında indüklenme olumlu olarak değerlendirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin indüklenebilir -laktamaz aktivitesi tüm suşların 153 (%77)'ünde gösterilmiştir.

Klinik hastalarından iki, yoğun bakım servisinde 16 *P. aeruginosa* kökeni tüm antimikrobiklere dirençli bulunmuştur. Klinik hastalarından dokuz, poliklinik hastalarından iki ve yoğun bakım servisinde dört izolatın karbapenemler dışındaki tüm -laktamlara yüksek oranda

Tablo 1. *P. aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç oranları (%)

<i>P. aeruginosa</i>	AMC	MEZ	CAZ	CTX	ATM	İPM	MEM	GN	NET	AK	NN	CİP	OFX	NOR
Toplam suş (199)	100	64	23	81	44	18	17	64	42	27	57	40	55	30
Klinik (73)	100	67	16	55	34	11	8	35	28	30	48	25	35	21
Poliklinik (94)	100	59	6	84	30	3	9	69	34	11	57	44	66	27
Yoğun Bakım (32)	100	81	75	87	81	66	53	81	75	69	78	66	69	62

AMC: Amoksisilin-klavulanat, MEZ: Mezlosilin, CAZ: Seftazidim, CTX: Sefotaksim, ATM: Aztreonam, İPM: İmipenem, MEM: Meropenem, GN: Gentamisin, NET: Netilmisin, AK: Amikasin, NN: Tobramisin, CİP: Siprofloksasin, AK: Amikasin, NN: Tobramisin, CİP: Siprofloksasin, OFX: Ofloksasin, NOR: Norfloksasin

direnç gösterdiği belirlenmiştir. Klinik ve poliklinikten olmak üzere dört izolatta mezlosilin ve oksimino -laktam direnci ile birlikte meropenem ve siprofloksasin direnci saptanmıştır.

Kontrol suşunun, disk difüzyon testi ile inhibisyon zon çapları kabul edilebilir sınırlar içinde değerlendirilmiştir. İndüklenebilir -laktamaz aktivitesi olumlu bulunmuştur.

TARTIŞMA

Poliklinik hastalarına ait *P. aeruginosa* izolatlarında kinolon grubu dışındaki çeşitli antimikrobiklerin, yatan hastalara oranla, daha etkili olduğu gösterilmiştir. Hastane kökenli ve özellikle yoğun bakım ünitelerine ait suşlarda ise antibiyotik direncinin yüksekliği dikkat çekmiştir. Gür ve ark. (9) yoğun bakım ünitelerindeki *P. aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere dirençleri, bu çalışmanın sonuçları ile karşılaştırıldığında, daha düşük oranlarda bulunmuştur.

Yoğun Bakım Ünitesi suşlarının 16'sı tüm antimikrobiklere dirençli bulunmuştur. Benzer çalışmalarda yoğun bakım ünitelerinde çoklu ilaç direnci, imipenem dahil tüm -laktam antibiyotiklerle bildirilmiştir (10). Bu çalışmada yoğun bakım ünitelerine ait kökenlerin antibiyotiklere çoğunlukla dirençli ve direnç paternlerinin benzer oluşu ile, *P. aeruginosa* bakterilerinin bu birimin kolonizan kökeni olabileceği düşünülmüştür.

Bugünkü çalışmanın sonuçları *P. aeruginosa* kökenlerinin kinolon ve aminoglikozitlere karşı olan yüksek direncinin, -laktam antibiyotiklerde olduğu kadar, bu grup antimikrobiklerin seçiminde de dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir. Kinolon direnci *gyr* genindeki mutasyonla olabildiği gibi bakteri membran geçirgenliğinin azalması ile de kazanılabilmektedir. "Permeabilite direnci" aminoglikozit antibiyotiklerle de ortaya çıkabilmektedir. Bu ikinci durumda, sadece kinolonlara değil, yapısal olarak ilgisiz antibakteriyellere de direnç gelişmektedir (2, 6, 11). Ancak aminoglikozit direncinin en sık ve en önemli mekanizması, aminoglikozitlerin bazı bakteriyel enzimlerle modifiye edilmesidir. Bu grup antibiyotikler içinde ciddi direnç problemi olmayan amikasin karşı da, son yıllarda fazla kullanım ile, direnç oranında artış gözlenmiştir (2, 12). İzmir'de yapılan bir çalışmada, siprofloksasin ve amikasin direnci, bu çalışmanın sonuçları ile tamamen uyumlu, gentamisin direnci daha düşük oranda bulunmuştur (13).

Pseudomonas aeruginosa'nın dirençli suşlarına en etkili antibiyotığın seçimi klinik önem taşımaktadır. Çalışmada imipenem ve meropenem direnci düşük olmamakla beraber, karbapenemlerin en etkili antibiyotikler olduğu ve -laktam grubu dışında sırasıyla amikasin ve norflok-

sasinin daha etkili olduğu gösterilmiştir. Yazarların kliniğinde 1994 yılında yapılan bir çalışmada (14), imipenem direnci %4 bulunmuştu. Karbapenem direnci çoğunlukla D2 porin kaybına bağlı dış membran geçirgenliğinin bozulması ile ilgilidir. Meropenem direnci, daha fazla sıklıkla intrinsek dirençle ilgilidir (1, 7).

İmipeneme direnç olmaksızın, azlosilin, seftazidim, meropenem ve siprofloksasine azalmış duyarlılık tipik "intrinsek direnç" paternini göstermektedir. Birbirinden yapısal olarak bağımsız birçok antimikrobiğe direnç kazandıran bu mekanizma, bir dış membran proteini (OprM)'nin aşırı yapımına bağlıdır (1, 7, 11). Bu çalışmada intrinsek dirence örnek oluşturacak dört suş belirlenmiştir.

Plazmit kaynaklı -laktamaz aktivitesi, *P. aeruginosa* kökenlerinde %2-4 arasındadır (15, 16). Ancak Fransa kökenlerinde bu oran %7-12'lere ulaşmaktadır (1). PSE-1, PSE-3 ve PSE-4 -laktamaz grubu AMC ile inhibe olabilmektedir ve OXA enzimleri grubunu da içermek üzere tüm bu plazmit kaynaklı enzimler sefotaksim ve aztreonama duyarlıdırlar (17).

Grup 1 -laktamazların AMC ile inhibe olmamaları karakteristiktir (18). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının düşük düzeyde kromozomal tip 1 -laktamaz ürettikleri ve -laktam antibiyotik varlığında, -laktamaz yapımının uyarıldığı bilinmektedir (3). -laktam antibiyotikler kromozomal -laktamaz salınımını uyarma yetenekleri birbirinden farklıdır. İmipenem ve sefoksitin gibi antimikrobik ajanlar kuvvetli indükleyicilerdir. *In vitro* olarak güçlü bir indükleyici antibiyotik diski yanına, zayıf indükleyici bir -laktam diski yerleştirerek, indüklenebilir -laktamaz aktiviteleri çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. Gülay ve ark. (19) indüklenebilir seftazidim aktivitesini %61 saptamışlardır. Bu çalışmada da seftazidim ile bu oran %73 bulunmuştur.

Kromozomal -laktamazların aşırı miktarda salgılanması sonucunda ortaya çıkan selektif dereprese mutantlar, imipeneme duyarlı oldukları halde, piperasilin, seftazidim ve aztreonama yüksek düzeyde dirençlidirlar (2, 5, 10, 16, 20). Liu ve ark. (16) *P. aeruginosa* kökenlerinde 2/170 oranında dereprese mutant saptamışlar ve bu oranın Kuzey Amerika, Avrupa ve özellikle Atina'da son yıllarda çok artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada çoğunluğunu yoğun bakım ünitesi kökenlerinin oluşturduğu, tüm antimikrobiklere dirençli bulunan suşların dışındaki 15 kökende de, bu grup -laktam antibiyotiklere yüksek düzeyde direnç olması dolayısı ile inhibisyon zonu ölçülemedi. Bu suşların karbapenemlere de duyarlı olmaları ile olası dereprese mutantlar olabileceği şeklinde yorum yapılmıştır. *Enterobacteriaceae* grubu bakteriler ile yapılan bir çalışmada (10), dereprese mutant sıklığı %14 olarak bildirilmiştir. Kaygusuz ve ark.

(21) tarafından *P. aeruginosa* izolatlarında dereprese mutant sıklığı %25 oranında saptanmıştır.

Özellikle pulmoner ve kemik yerleşimli infeksiyonlarda, bakteremilerde, "labil zayıf indükleyiciler" in enzim sentezini *in vivo*, *in vitro* olduğu kadar zayıf uyardığı düşünülmektedir (4, 5). Bu nedenle karbapenem dışındaki -laktam antibiyotiklerle tedavi sırasında, stabil dereprese mutant gelişebileceği ve tedavi başarısızlığı sözkonusu olabileceği konusunda, klinik mikrobiyoloji laboratuvarı klinisyeni uyarmak durumundadır.

Sonuç olarak, *P. aeruginosa* izolatlarının direnç paternlerinin çalışmanın yapıldığı yıla, bölgeye, hastaneye ve

hatta kliniğe göre değişkenlik gösterebileceği bilindiğinden, bu direnç oranlarının her yıl her hastanede saptanmasının önemi vardır. Bu durum, enzim substrat ilişkisinin, izoelektrik nokta veya DNA hibridizasyon çalışmaları gibi ileri teknolojilerin uygulanmadığı merkezlerde, direnç mekanizmaları konusunda yaklaşımda bulunmaya yardımcı olabilecektir. Ayrıca direnç profillerinin belirlenmesi, bu çalışmada yoğun bakım ünitesinde olduğu gibi, izolatanın bir servisin kolonizan bakterisi olabileceği konusunda dikkat çekebilme ve alınması gereken önlemler konusunda hastane infeksiyon kontrol komitesini yönlendirebilmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Chen HY, Yuan M, Livemore DM.** Mechanisms of resistance to -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol* **1995**; 43: 300-9.
2. **Fujita J, Negayama K, Takigawa K, Yamagishi Y, Kubo A, Yamaji Y.** Activity of antibiotics against resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **1992**; 29: 539-46.
3. **Livemore DM.** Clinical significance of -lactamase induction and stable derepression in gram negative rods. *Eur J Clin Microb Infect Dis* **1987**; 6: 439-45.
4. **Livemore DM, Yang YJ.** -lactamase lability and inducer power of newer -lactam antibiotics in relation to their activity against -lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **1987**; 155: 775-82.
5. **Livemore DM.** -lactamase evolution and its clinical consequences. *J Infect Dis Antimicrob Agents* **1995**; 12: 27-31.
6. **Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA.** Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, **1995**: 212-25.
7. **Masuda N, Ohya S.** Cross-resistance to meropenem, cephems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**; 36: 1847-51.
8. **Tausk F, Evans ME, Patterson LS, Stratton CW.** Imipenem induced resistance to antipseudomonal -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **1985**; 28: 41-5.
9. **Gür D, Ünal S ve Çalışma Grubu.** Yoğun Bakım ünitelerinden izole edilen gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere *in vitro* duyarlılıkları. *Flora* **1996**; 1: 153-9.
10. **Snydman DR.** Clinical implications of multi-drug resistance in the intensive care unit. *Scand J Infect Dis* **1991**; 78 (Suppl): 54-63.
11. **Satake S, Yoshihara E, Nakae T.** Diffusion of -lactam antibiotics through liposome membranes reconstituted from purified porins of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**; 34: 685-90.
12. **Gilbert DN.** Aminoglycosides. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, **1995**: 279-6.
13. **Yücesoy M, Biberoglu K, Yuluğ N.** İnfeksiyon etkeni Gram-negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık paternlerinin E testi ile araştırılması. *İnfek Derg* **1996**; 10: 229-33.
14. **Özgenç O, Oran E, Urbarlı A.** Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının imipenem duyarlılıkları. (Özet). *ANKEM Derg* **1996**; 10: 41.
15. **Coleman K, Athalye M, Clancey A, Davison M, Payne DJ, Perry CR.** Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. *J Antimicrob Chemother* **1994**; 33: 1091-116.
16. **Liu PYF, Gür D, Hall LMC, Livemore DM.** Survey of the prevalence of -lactamases amongst 1000 gram negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *J Antimicrob Chemother* **1992**; 30: 429-47.
17. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39: 1211-33.
18. **Bush K.** Characterization of -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **1989**; 33: 259-63.
19. **Gülşay Z, Biçmen C, Yuluğ N.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenbilir seftazidimazların araştırılması. *İnfek Derg* **1996**; 10: 329-31.
20. **Sirotnik DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL, Husson MO, Lemozy J, et al.** Resistance to cefotaxime and seven other -lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3-year survey in France. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**; 36:1677-81.
21. **Kaygusuz A, Öngen B, Gürler N, Töreci K.** İndüklenilen beta-laktamaz oluşturduğu bilinen türlerden ardarda izole edilen 303 suşta stabili dereprese mutant sıklığı (Özet). *ANKEM Derg* **1996**; 10: 122.