

YOĞUN BAKIM ÜNİTESİ HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE METALLO-BETA LAKTAMAZ ORANLARININ BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND METALLO-BETA LACTAMASE PRODUCTION OF *PSEUDOMOMAS AERUGINOSA* STRAINS ISOLATED IN INTENSIVE CARE UNIT

Efgan GAYYURHAN¹, Yasemin ZER², Murat MEHLİ¹, Sadık AKGÜN¹

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gaziantep

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Merkez Laboratuvarı

Anahtar Sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, antimikrobiyal duyarlılık, metallo-beta-laktamaz, EDTA disk testi, yoğun bakım ünitesi

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial susceptibility, metallo-beta-lactamase, EDTA disk test, intensive care unit

Geliş: 26 Kasım 2007

Kabul: 09 Ocak 2008

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ) hastalarından Ocak-Mart 2007'de izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının ve bu suşlardan imipenem (IPM) dirençli olanlarda metallo-beta-laktamaz (MBL) oranlarının belirlenmesidir. Hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 89 *P. aeruginosa* suşu prospektif olarak incelenmiştir. Örneklerin 33'ü (%37.07) trakeal aspirat, 17'si (%19.10) idrar, 13'ü (%14.60) yara, 10'u (%11.23) üriner kateter, altısı (%6.74) kan kültürü, beşi (%5.61) dren ve beşi (%5.61) bronko -alveolar yıkama sıvısı (BAL) olarak bulunmuştur. İmipeneme dirençli olarak bulunan 18 (%20.22) *P. aeruginosa* suşunda MBL enzimi IPM-EDTA diskleri kullanılarak araştırılmıştır. Test edilen suşların 13'ünde (%72.22) MBL enzimi pozitif olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, *P. aeruginosa* suşlarındaki karbapenemlere dirençte, MBL enziminin yüksek oranda varlığı saptanmıştır.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the antimicrobial susceptibility and metallo-beta lactamase (MBL) presence in *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to imipenem (IPM) in a university hospital. Eighty-nine strains of *P. aeruginosa* isolated from various clinical specimens taken from patients in the Intensive Care Unit, Gaziantep University Hospital, in the period of January-March 2007, were prospectively studied. The studied samples were tracheal aspirate [33 (37.07%)], urine [17 (19.10%)], wound swab [13 (14.60%)], urinary catheter [10 (11.23%)], blood culture [6 (6.74%)], drain [5 (5.61%)] and broncho-alveolar lavage fluid [5 (5.61%)]. Eighteen (20.22%) of the strains were found resistant to IPM. Metallo-beta lactamase enzyme was tested by using IPM-EDTA disk in these 18 IPM resistant strains and the enzyme was found positive in 13 (72.22%) strains. In conclusion, MBL enzyme was present in most of the IPM-resistant *P. aeruginosa* strains.

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa çoğunlukla hastane infeksiyonları etkeni olan önemli bir patojendir. Özellikle hastanede yatan ve immun sistemi çeşitli nedenlerle zarar

görmüş olan hastalarda, pnömoni, bakteriyemi, yanık yarası infeksiyonları, malign otit, meninjit ve beyin apsesi, septik artrit ve osteomyelit, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, endokardit gibi klinik tablolara neden ol-

maktadır (1). *Pseudomonas* infeksiyonlarında antimikrobiallere direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda bulunması önemli bir sorundur. Çoklu direnç gösteren kökenlerin sayısı uygun olmayan antimikrobiyal ilaçların kullanımı nedeniyle giderek artmaktadır ve oluşan infeksiyonların tedavisi ciddi problemler oluşturmaktadır. Klinikte en fazla karşılaşılan direnç diğer Gram-negatif bakterilerde olduğu gibi, *P. aeruginosa*'da da beta-laktamaz enzimlerinin yol açtığı dirençtir (2). Beta-laktamazlar kromozom, plazmit veya transpozonlarla kodlanan enzimler olup beta laktam antibiyotikleri inaktive etmektedir. Sınıflandırılmalarında genellikle Ambler ve Bush-Jacoby-Medeiros klasifikasyon şemaları kullanılır (3). Ambler sınıf B ve Bush grup 3'te yer alan beta-laktamazlar MBL olarak bilinir klinik açıdan en önemli karbapenamlardır (4). Metallo-beta-laktamazlar genel olarak *Pseudomonaslar*'da bulunur. İmipenem (metallo-beta laktamaz) ve/veya meropenemi hidrolizleyen IPM ve VIM serisinden enzimler, SPM, GIM ve SIM enzimleri bu gruptadır. Bu enzimler monobaktamlar hariç tüm beta-laktam antibiyotikleri ve bu arada karbapenemleri hidrolize edebilmektedir (4, 5). MBL enzimleri aktif bölgelerinde Zn² iyonu bulunan enzimlerdir ve klasik beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken etilen, diammin tetra asetik asit (EDTA) veya merkaptobileşikler gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar (4). Metallo-beta-laktamazların saptanmasında bu özellikten yararlanarak IPM disklerine EDTA, seftazidim disklerine 2-merkaptopropiyonik asit emdirilerek disk sinerji testleri geliştirilmiştir (6). *Pseudomonas*'larda sıklıkla buldukları için tanımlanmaları önemlidir. Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)'nde izole edilen, IPM dirençli *P. aeruginosa* suşlarında MBL enzimi varlığının fenotipik olarak belirlenmesi amacı ile yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak-Mart 2007 tarihleri arasında YBÜ'nde yatmakta olan hastaların farklı klinik örneklerinden izole edilen 89 *P. aeruginosa* suşu prospektif olarak çalışılmıştır. Suşların identifikasyonu, klasik yöntemler ve Vitek2 (bio Mérieux) tam otomatik bakteri identifikasyon cihazı kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (7). Metallo-beta laktamaz aktivitesini belirlemek için IPM-EDTA disk testi yapılmıştır (8).

IPM-EDTA disk testi: Test suşları CLSI'nın önerdiği disk difüzyon yöntemine uygun olarak Mueller-Hinton agar besiyerine ekilmiştir. Plağa 2'şer tane IPM diski (10 µg) birbirlerinden 10 mm uzaklıkta yerleştirilmiştir. Disk-

lerin birinin üzerine 10 µl 0.5 M EDTA solüsyonu eklenecek plaklar 35° C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası küçük bir sinerjistik inhibisyon zonunun bile bulunması durumunda MBL pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Escherichia coli ATCC 25922 suşu kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Gaziantep Üniversitesi Hastane YBÜ'sinde Ocak-Mart 2007 tarihleri arasında yatmakta olan hastalardan izole edilen 89 *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. Örneklerin 33'ü (%37.07) trakeal aspirat, 17'si (%19.10) idrar, 13'ü (%14.60) yara, 10'u (%11.23) üriner katater, altısı (%6.74) kan kültürü, beşi (%5.61) dren ve beşi (%5.61) branko-alveoler lavaj idi. İzole edilen bakterilerin direnç oranları Tablo 1'de gösterilmiştir. Orta duyarlı bulunan suşlar dirençli olarak alınmıştır.

Suşların 18'inde (%20.22) IPM direnci bulunmuş olup en etkili antibiyotik de IPM olarak bulunmuştur.

İmipeneme dirençli olarak bulunan 18 *P. aeruginosa* suşunun IPM-EDTA disk testi ile 13'ünde (%72.22) MBL enzimi pozitif olarak saptanmıştır.

Tablo 1. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç oranları

Antibiyotik	Dirençli suş sayısı (%)
Ampisilin	89 (100)
Ampisilin-Sulbaktam	73 (82.02)
Aztreonam	48 (53.93)
Seftriakson	72 (80.89)
Sefpirom	68 (76.40)
Seftazidim	47 (52.80)
Sefotaksim	84 (94.38)
Sefepim	38 (42.69)
Sefaperazon-Sulbaktam	34 (38.20)
Gentamisin	45 (50.56)
Amikasin	19 (21.34)
Siprofloksasin	37 (41.57)
İmipenem	18 (20.22)
Meropenem	19 (21.34)
Piperasilin-Tazobaktam	38 (42.69)
Tikarsilin-Klavunat	45 (50.56)
Trimetoprim-Sulfometoksazol	89 (100)

TARTIŞMA

Pseudomonas aeruginosa nozokomiyal infeksiyon etkenlerinin başlıcalarından olup çoklu ilaç direnci nedeniyle sorun olan bir bakteridir. Özellikle uygunsuz antibiyotik kullanımı antimikrobiyal direnç artışının en önemli

nedeni olmakla birlikte, *P. aeruginosa* bir çok antibiyotik grubuna da intrinsik olarak dirençlidir (9).

İzole edilen *P. aeruginosa* suşlarında sefalosporin grubu antibiyotiklerden seftriaksona %80.89, seftazidime %52.80, sefotaksime %94.38, sefepime %42.69 oranında direnç bulunmuştur. Amikasine direnç %21.34, siprofloksasine %41.57 oranında saptanmıştır. Klinikte Zer ve ark. (10)'nın bu çalışmadan yaklaşık altı yıl önce yaptıkları benzer bir çalışmada, sefalosporin grubu antibiyotiklere yukarıda belirtilen sırasıyla; %66.1, %31.5, %66.1, %18.8 oranında, amikasine %22.8 ve siprofloksasine %18.1 oranında direnç bulmuşlardır. Direnç oranlarında gerçekten kayda değer artışların olması düşündürücü ve üzücüdür.

Türkiye'de *P. aeruginosa* ile yapılan antibiyotik direnç oranlarının yüksek bununla birlikte oldukça farklı olduğu da gözlemlenmiştir. Özkalay ve ark. (11) 1999-2005 yıllarında kliniklerinde sırası ile seftazidim direncini %32-62, sefepim direncini %35-34, amikasin direncini %22-12, siprofloksasin direncini %42-23 olarak bulmuş olup, bizim hastanemizdeki aksine yıllar içerisinde dirençlerinin azaldığı bildirilmiştir. Fidan ve ark. (12) da seftriaksona %25, seftazidime %23, amikasine %18 ve siprofloksasine %15 oranında direnç bildirmiş olup, bizim direnç oranlarımızın altında olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, bu çalışmada bulmuş olduğumuz oranlara benzer direnç oranları da vardır (9, 13, 14).

Metallo-beta laktamaz laktamaz enzimi, *P. aeruginosa* suşlarındaki dirençten sorumlu enzimlerden biri olup bakterinin karbapenemler dahil, aztreonam dışındaki tüm beta laktam antibiyotiklere direncine neden olmaktadır (4, 5). Türkiye'de *P. aeruginosa* suşlarında karbapenem grubu antibiyotiklerden IPM direnç oranlarının yıllar içerisinde giderek arttığı gözlenmektedir. 1995-2001 yılları arasında %17, 2002-2005 yılları arasında % 37 olarak bildirilmiştir (15). Bizim incelemiş olduğumuz suşlarda bu oran %20.22 olarak bulunmuştur. Ampirik tedavide ve özellikle GSBL pozitif suşlarda karbapenemlerin tercih

edilmesinin direnç artışının en önemli nedeni olduğu düşünülmektedir.

İmipeneme direnç mekanizmalarından biri olarak kabul edilen MBL enzimi fenotipik olarak, çift disk sinerji testi, IPM-EDTA kombine disk testi, MBL E test ve modifiye Hodge testi gibi çeşitli yöntemler ile saptanabilmektedir. Bu yöntemler henüz CLSI tarafından standardize edilmemiştir. Çeşitli çalışmalarda bu yöntemler genotipik yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile enzimin rutin olarak belirlenip bildirilmesi her hastane için uygulanabilir olmamakla birlikte, fenotipik bazı yöntemlerle enzimin saptanabileceği belirtilmektedir. Modifiye Hodge testi ve IPM-EDTA ile yapılan çalışmalar, bu testlerin kullanılabilir testler olduğunu göstermiştir. Modifiye Hodge testi basit bir test olmasına rağmen yalancı pozitiflikler bildirilmiştir. Farklı çalışmalar IPM'in iyi bir sustrat olduğunu ve MBL inhibitörleri içinde EDTA'nın daha başarılı sonuçlar verdiği vurgulanmaktadır (16). Bu çalışmada uygulamış olduğumuz IPM-EDTA disk testi özgüllüğü ve duyarlılığı oldukça yüksek olan ve rutin laboratuvarında kullanılabilirliği önerilen bir testtir (17, 18).

Çalışmamızda IPM dirençli 18 suşun 13'ünde (%72.22) MBL saptanmıştır. Çeşitli çalışmalarda bu oran % 0-31 olarak bildirilmektedir (12, 19-21). Bu çalışmalarda sadece IPM dirençli *P. aeruginosa* suşları değil, tüm *Pseudomonas* suşları ile çalışılmış olduğundan oranların bizim verilerimizden sayısal olarak düşük olduğu gözlenmektedir. Karbapenem dirençli suşlarla yapılan çalışmalarda MBL oranları daha yüksektir (22, 23). Metallo-beta-laktamaz enzimi saptamak için kullanılan fenotipik yöntemlerden geçerli olanları laboratuvarında rutin olarak kullanılmalı ve raporlanmalıdır. En azından hastane direnç profili göz önünde tutularak, YBÜ gibi kritik hastalarda mutlaka belirlenmelidir. Bu direnç yayılımının kontrol edilmesi bakımından oldukça önemlidir. İmipenem-EDTA testi kolay uygulanabilmesi ve değerlendirilmesinin daha standart olması açısından rutin laboratuvarında uygulanabilecek bir tarama testi olarak gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Akalın H. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları ve tedavisi. KLİMİK 2007, XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (Antalya, 2007) kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneği, 2007: 208-14.
2. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1-11.
3. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White
4. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 321-33.
5. Bal Ç. Febril nötropenik hasta ve beta laktamaz direnci. 7. Febril Nötropeni Simpozyumu (Ankara, 2006) kitabında, Ankara: Febril Nötropeni Derneği 2006: 13-6.

6. **Hoşgör Limoncu M, Ermertcan Ş, Çavuşoğlu C, Eraç B.** Hastane infeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* kökenlerinde metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2006**; 36: 79-82.
7. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. 12th Informational Supplement. Approved Standard M100-S12. Wayne, Pa: NCCLS, **2002**.
8. **Lee K, Shin HB, Kim YA, Young D, Yum JD.** Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* **2001**; 7: 88-91.
9. **Ayyıldız A, Kocazeybek B, Aritürk S.** Değişik klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* **2002**; 16: 1-3.
10. **Zer Y, Balcı İ, Karslıgil T, Bayram A, Ekşi F.** Çeşitli örneklerden izole edilen *Pseudomonas*'ların tiplendirilmesi, antibiyotik duyarlılıkları ve sefepimin anti-pseudomonas etkinliği. *KLİMİK Derg* **2000**; 13: 33-5.
11. **Özakalay N, Ağuş N, Cengiz A, Taneri N.** *Pseudomonas* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim: 1999-2002-2005. *ANKEM Derg* **2006**; 20 (Ek 1): 6.
12. **Fidan I, Çetin Gürelik F, Yüksel S, Sultan N.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *ANKEM Derg* **2005**; 19: 68-70.
13. **Ardıç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T.** Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının karbapenemlere ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg* **2004**; 18: 145-8.
14. **Akkurt A, Gündül Yavuz S, Uyar Y, Karadağ A, Esen Ş, Günaydın M.** 1999-2000 yıllarında yoğun bakım ünitesinden izole edilen bakterilerde antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* **2002**; 16: 14-17.
15. **Willke-Topçu A.** Çoklu dirençli Gram negatif basiller ve infeksiyonlar: Ülkemizde direnç durumu. *XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (2007, Antalya)* kitabında İstanbul: *KLİMİK Derneği*, **2007**: 201-3.
16. **Sarı H.** Karbapenemlere dirençli Gram negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/meropenem EDTA disk yöntemi ve modifiye Hodge testi ile metallo-beta-laktamaz (MBL) varlığının araştırılması [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, **2005**.
17. **Young D, Lee K, Yum JM, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y.** Imipenem-EDTA disk method for differentiation metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 3798-801.
18. **Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL.** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 3125-9.
19. **Gencer S, Ak Ö, Benzonana N, Baturel A, Özer S.** Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in teaching hospital of Turkey. *Ann Clin Microb Antimicrob* **2002**; 1: 1-4.
20. **Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, et al.** Simple microdilution test for detection of metallo-β-lactamase producing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 4388-90.
21. **Oh EJ, Lee S, Park YJ, et al.** Prevalence of metallo-β-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-β-lactamase. *J Microbiol Methods* **2003**; 54: 411-8.
22. **Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A.** Detection of metallo-beta-lactamase production and antibiotic resistance with Etest method in *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Klebsiella* strains in Turkey. *J Infect Chemother* **2004**; 10: 257-61.
23. **Sarı H.** Karbapenemlere dirençli gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/meropenem EDTA disk yöntemi ve modifiye Hodge testi ile metallo-beta-laktamaz (MBL) varlığının araştırılması [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: SB Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, **2005**.

İLETİŞİM

Dr. Yasemin ZER
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi
Şahinbey Hastanesi Merkez Laboratuvarı
27310 GAZİANTEP
e-posta: yaseminzer@hotmail.com