

Yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen Gram negatif çomaklarda indüklenebilir beta-laktamazların araştırılması

Investigation of inducible beta-lactamases in the Gram negative bacilli isolated from patients in the intensive care units

Emine Küçükateş¹, Erhan Kansız², Nazmi Gültekin³

İstanbul Üniversitesi, Kardiyoloji Enstitüsü, ¹Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ²Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, ³Kardiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

İletişim / Correspondence: Emine Küçükateş Adres / Address: Nevbahar Mah.Tevfik Fikret Sokak. Yılmaz Apt. No:62 Daire:7 Fındıkzade/İstanbul Tel: 0212 459 20 00/29529 E-mail: eates2002@yahoo.com

ÖZET

Çalışmamızda, cerrahi ve koroner yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan elde edilen 281 Gram negatif çomakta indüklenebilir beta-laktamaz (İBL) varlığı araştırılmıştır. Bunun için çift disk indüksiyon yöntemi kullanılmıştır. İBL pozitifliği *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında %40,5 ve *Enterobacter aerogenes* suşlarında da %20 olarak saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Yoğun bakım ünitesi, indüklenebilir beta-laktamaz, Gram negatif çomak

SUMMARY

In our study, a total of 281 Gram negative bacilli obtained from patients in the surgical and coronary intensive care units were investigated the production of inducible beta lactamases (IBLs). For IBLs, the double disk induction methods was used. IBL positivity was found to be 40.5% for *Pseudomonas aeruginosa*, and 20% for *Enterobacter aerogenes*.

Key words: Intensive care unit, inducible beta-lactamase, Gram negative rod

GİRİŞ

Bakterilerin antimikrobiyal direnci dünyada pek çok klinik problemin nedenidir. Antimikrobiyalin klinik kullanımı sonucu direnç gelişimi kaçınılmaz olduğu halde, yaygın direnç ve direnç mekanizmalarının çeşitliliği ve bakteriler arasındaki rölatif yaygınlığı son derece şaşırtıcıdır (1). Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere direncin en yaygın mekanizması beta-laktamaz üretimine dayanır (2). Son zamanlarda moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, substrat profili gibi özellikler açısından birbirinden farklı 400'ün üzerinde beta-laktamaz tanımlanmıştır. Bunlar arasında bulunan Amp C tipi sefalosporinazlar, Enterobacteriaceae üyeleri ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi türlerde çoklu beta-laktam direncine neden olmaları ve klinik tedavide kullanılan beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmele-

ri yönünden önemlidir (3). Hastanede karşılaşılan antimikrobiyal direnç konuları arasında en ciddi-lerinden biri Enterobacteriaceae ailesinde üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı oluşan dirençtir. Bu direnç esas olarak *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ve *Serratia marcescens* izolatları arasında bulunan Bush grup 1 kromozomal (Amp C) sefalosporinazların aşırı üretimiyle ilişkilidir. Bu sefalosporinazlar, karbapenemler (imipenem ve meropenem) ve dördüncü kuşak sefalosporinler (sefepim, sefpirom) hariç bütün beta-laktamlara (üçüncü kuşak sefalosporinler ve beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları) direnç oluşumunda yer alır(1,4). Gram negatif bakterilerin çoğu Amp C veya Bush grup 1 olarak adlandırılan kromozomal beta-laktamazları üretir. Normalde düşük düzeyde üretilen bu kromozomal Amp C veya Bush grup 1 tipi beta-laktamazlar ortamda bir indükleyici olduğunda,

sentezlerinin uyarılması, indükleyici ajan ortadan kalktığında sentezin yeniden normal düzeye inmesi nedeniyle “indüklenebilir beta-laktamazlar” (İBL) olarak da adlandırılırlar (1,3,4). *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Serratia* türleri arasında Amp C beta-laktamazın aşırı üretimi, bazı beta-laktam substratları indükleyerek stabil dereprese spontan mutasyonları oluşturabilir. Bu indüklenebilir veya stabil dereprese Amp C üreten suşların prevalansı; genişlemiş spektrumlu beta-laktam ajanların kullanımı ile yakından ilişkilidir. Bunlar da; özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar arasında gözlenir (1,4).

Çalışmamızda, yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan elde edilen farklı klinik örneklerden izole edilen Gram negatif çomaklardaki indüklenebilir beta-laktamaz varlığı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü cerrahi ve koroner yoğun bakım ünitelerinde yatarak tedavi gören ve klinik olarak infeksiyon bulguları olan hastaların çeşitli klinik örneklerinden elde edilen 281 Gram negatif çomak incelenmiştir. Kan kültürleri için Bactec 9050 Blood Culture Instrument (Becton, Dickinson, Baltimore, USA) kullanılmıştır. Bütün örnekler kanlı agar, endo agar ve Mueller Hinton buyyonda (MHB) 35°C'de 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. Pozitif kültürlerden Gram boyama yapılmıştır. Bütün Gram negatif çomaklar API 32E ve 32GN system (BioMérieux, France) veya konvansiyonel metodlarla identifiye edilmiştir (5). İdentifikasyondan sonra bütün suşlar %10'luk gliserollü tripitik soy buyyonda -70 °C'de saklanmıştır.

İndüklenebilir beta-laktamaz varlığının belirlenmesi için çift disk indüksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, indükleyici ajan olarak imipenem (10 µg, Oxoid, UK) ve hedef antibiyotik olarak da seftazidim (30 µg, Oxoid) diskleri kullanılmıştır. Bulanıklığı 0.5 McFarland standartına göre ayarlanmış bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agara yayılmış ve imipenem ve seftazidim diskleri aralarındaki uzaklık 20 mm ola-

cak şekilde besiyerinin yüzeyine yerleştirilmiştir.

35 °C'de 18 saatlik inkübasyondan sonra, seftazidim diski çevresindeki inhibisyon zonunun indükleyici ajan olan imipenem diskine yakın kenarda belirgin bir düzleşme göstermesi ve düzleşme olan ve olmayan iki kenar arasındaki farkın ≥ 4 mm olması durumunda sonuç pozitif olarak kabul edilmiş ve suşun indüklenebilir beta-laktamaz oluşturduğu sonucuna varılmıştır(6,7).

Kontrol suşları olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı.

BULGULAR

Gram negatif çomakların çoğu, solunum yolundan (n=129; %45.9) ve kandan (n=99; %35.2) izole edilmiştir. Diğerleri ise, santral venöz kateter, idrar, yara, abse ve drenaj sıvılarından izole edilmiştir.

En sık izole edilen Gram negatif çomak *Acinetobacter baumannii* (%31.3) idi. Bunu, *Pseudomonas aeruginosa* (%28.1) izlemiştir. Çalışmaya alınan Gram negatif çomaklar arasındaki indüklenebilir beta-laktaz sıklığı *P. aeruginosa*'da %40.5 ve *E. aerogenes*'de %20 olarak saptanmıştır. Gram negatif çomakların cins ve tür dağılımı ve indüklenebilir beta-laktamaz varlığı oranları Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Gram negatif çomaklarda indüklenebilir beta-laktamaz varlığının dağılımı

Mikroorganizma	n=sayı	%	İndüklenebilir beta-laktamaz varlığı n=sayı	%
<i>A. baumannii</i>	88	31.3	6	6.8
<i>P. aeruginosa</i>	79	28.1	32	40.5
<i>E. aerogenes</i>	35	12.45	7	20
<i>E. coli</i>	35	12.45	0	0
<i>S. marcescens</i>	23	8.2	0	0
<i>S. maltophilia</i>	16	5.7	0	0
<i>P. mirabilis</i>	5	1.8	0	0

TARTIŞMA

Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere en yaygın direnç mekanizması beta-laktamaz üretimine dayanır. Doğal olarak *Enterobacteriaceae* ailesine ait birçok tür ise kromozomal Ambler sınıfı olarak adlandırılan Amp C beta-laktamaz (fonksiyonel grup 1) üretir. Bu indüklenebilir biyosentez *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens* ve *Yersinia enterocolitica*'da görülür(2). Araştırmacılar tarafından Amp C indüksiyon mekanizması özellikle *E. cloacae* ve *C. freundii*' de yaygın olarak araştırılmıştır (8,9,10). *P. aeruginosa* suşlarının da düşük düzeyde kromozomal tip 1 beta-laktamaz ürettikleri bilinmektedir (11). İndüklenebilir beta-laktamazlar yüksek düzeyde üretildiklerinde karbapenemler hariç tüm beta-laktamları parçalayabilme özelliğindedir. İndüksiyon mekanizması düzgün çalışan suşlarda kromozomal beta-laktamazlar klinik olarak sorun oluşturmazlar. Ancak *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *E. cloacae* ve diğer *Enterobacter* türleri gibi nozokomiyal infeksiyonlarda sık rastlanan türlerde, indüksiyon kontrol mekanizmaları defektif olup bu nedenle de sürekli olarak yüksek düzeyde enzim üretebilen mutantlar bulunmaktadır. Bu da, bu suşlarda üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımının tedavide başarısızlığına yol açmaktadır. Bu şekilde, dereprese mutantlar hızla çoğalmaya başlayarak hastane florasına yerleşmektedir (3,12-14).

İndüklenebilir beta-laktamazların (İBL) varlığı disk indüksiyon testi ile gösterilebilir. Bu testte kuvvetli indükleyiciler olan imipenem veya sefoksitin diskleri ile üçüncü kuşak sefalosporin diskleri arasındaki mesafe 1,5-2 cm olacak şekilde yan yana agar üzerine yerleştirilir. Sefalosporin diskinin zonunda indükleyiciye bakan tarafta bir düzleşme olması İBL açısından pozitif olarak değerlendirilir. *Enterobacteriaceae* ailesi ve *P. aeruginosa* ile gelişen bakteremi gibi ciddi infeksiyonlarda, ikinci-üçüncü kuşak sefalosporinlerin ve

aztreonamın tek başına kullanılmasından kaçınılmalıdır (3).

İBL sıklığı antibiyotik kullanım alışkanlığına bağlı olarak hastaneden hastaneye, ilden ile, ülkeden ülkeye değişebilir. Çalışmamızda, en yüksek İBL varlığı *P. aeruginosa*'da %40.5 olarak bulunmuştur. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, *P. aeruginosa*'da İBL üretimini, Öztürkeri ve ark. (15) %35, Kandemir ve ark. (16) %30.7, Şanlıdağ ve ark. (17) %31, Büyükbaba ve ark. (18) %36, Gülay ve ark. (11) %61.3, Palabıyıkoglu ve ark. (19) %72, Tünger ve ark. (14) %48.5, Oldacay ve ark. (20) %60, Akata ve ark. (21) *Pseudomonas* spp.'de %41.2 olarak saptamışlardır. Sonuçlarımız Akata ve ark. (21) çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda, *E. aerogenes*'de İBL varlığı %20 olarak belirlenmiştir. Türkiye'de *Enterobacter* spp.'de yapılan çalışmalarda İBL varlığını, Kandemir ve ark. (16) %28.5, Akata ve ark. (21) %22, Büyükbaba ve ark. (18) %45, Tünger ve ark. (14) %19 olarak bulmuşlardır. Bizim sonuçlarımız da Akata ve ark. (21) ve Tünger ve ark. (14) çalışmaları ile uyumludur.

Sonuç olarak, *P. aeruginosa* ve *E. aerogenes*'de indüklenebilir beta-laktamazların saptanması tedavi sırasında dereprese mutantların gelişebilmesi açısından bir uyarı niteliğinde olmalı ve ek maliyet getirmeden disk difüzyon metoduyla beta-laktamaz enzimleri araştırılmalıdır. Saptandığında da antibiyotik duyarlılık test sonuçlarıyla birlikte klinisyene yorumlanarak bildirilmesinin, özellikle yoğun bakım ünitelerindeki ciddi infeksiyonlara karşı antibiyotiklerin doğru kullanımı ve seçimi açısından yararlı olduğu bilinmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Pfaller MA, Jones RN, Marshall SA, Coffman SL, Hollis RJ, Edmond MB, Wenzel RP. Inducible amp C β -lactamase producing Gram-negative bacilli from blood stream infections: frequency, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology in a national surveillance program (SCOPE). Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 28:211.
- 2- Fihman V, Rottman M, Benzerara Y, Delisle F, Labia R,

- Philippon A, Arlet G. BUT-1: a new member in the chromosomal inducible class C β -lactamases family from a clinical isolate of *Buttiauxella* sp. FEMS Microbiol Lett 2002; 213:103.
- 3- Gülay Z. İndüklenebilir beta-laktamazlar; özellikleri, epidemiyolojisi ve klinik önemi, "Ulusoy S (editör): Beta laktamazlar ve Klinik Önemi", Mezuniyet Sonrası Eğitim Dizisi, s-45, Bilimsel Tıp Yayınları, Ankara, 2005.
- 4- Pfaller MA, Jones RN. MYSTIC Study Group (Europe). Antimicrobial susceptibility of inducible AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme, Europe 1997-2000. Int J Antimicrob Agents 2002;19:383.
- 5- Koneman EW, Allen SD, Jonda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th. JB Lippincott Co, Philadelphia, 1997.
- 6- Philips I. British Society for Antimicrobial Chemotherapy Party Working A guide to sensitivity testing. J Antimicrob Chemother 1991;37:1.
- 7- Bal Ç. Beta-laktamaz testleri ve rutinde kullanımları. In: Gür D, Söyletir G, Bal Ç, Dündar V, Sümerkan B, Köksal İ, Çiftçi U, (ed). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS) Çalışma Grubu. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı kitabında. s.101. İstanbul, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 1997.
- 8- Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B. The signal molecule for β -lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2113.
- 9- Jacobs C, Frere JM, Normark S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria. Cell 1997;88:823.
- 10- Honore N, Nicolas MH, Cole ST. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. EMBO J 1986;5:3709.
- 11- Gülay Z, Biçmen C, Yuluğ N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir seftazidimazların araştırılması. İnfeks Derg 1996;10:329.
- 12- Jarvis WR. Preventing the emergence of multidrug-resistant microorganisms through antimicrobial use controls: the complexity of the problem. Infect Control Hosp Epidemiol 1996;17:490.
- 13- Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557.
- 14- Tünger Ö, Sivrel Arısoy A, Özbakkaloğlu B, Gazi H. Nozokomiyal Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz varlığının araştırılması. Flora 2001;6:37.
- 15- Öztürkeri H, Kocabeyoğlu Ö, Koşan E, Diler M, Özcan Ş. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında sefoksitin ile beta-laktamaz indüksiyonu. ANKEM Derg 1997;11:429.
- 16- Kandemir O, Ersöz G, Şahin E, Kaya A. Hastanede yataraj tedavi gören hastalardan soyutlanan Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve indüklenebilir kromozomal beta laktamaz sıklığı. Türk Mikrobiol Cem Derg 2002; 32:207.
- 17- Şanlıdağ T, Öztöp Y, Saygı G. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir β -laktamaz belirlenmesinde iki farklı yöntemin etkinliğinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiol Cem Derg 1998;28:34.
- 18- Büyükbaba Ö, Katrancı H, Nakipoğlu Y, Derbentli Ş. Gram negatif çomaklarda indüklenebilir beta-laktamaz belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi. ANKEM Derg 1997;11:419.
- 19- Palabıyıkoglu İ, Bengisun S. Hastanede yatan hastalardan izole edilen Gram negatif çomaklarda seftazidim ve sefepimin in vitro etkinliklerinin karşılaştırılması ve indüklenebilir β -laktamazların araştırılması. Türk Mikrobiol Cem Derg 1999;29:158.
- 20- Oldacay M, Oldacay S, Erdem G. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında kromozomal beta-laktamaz yapımı. İnfeks Derg 2003;17:197.
- 21- Akata F, Otkun M, Teker B, Karabey O, Öğütlü A, Tuğrul M, Dündar V. Nozokomiyal Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz sıklığı. İnfeks Derg 1997;11:255.