

Pseudomonas aeruginosa İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Araştırılması

Özlem BUCAK*, Tekin TAŞ**, Esra KOÇOĞLU**, Şeyda KARABÖRK**

*Denizli Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı

**Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: *Pseudomonas aeruginosa*, karbapenemler dâhil antipseudomonal ilaçlara karşı direnç geliştirebilecek önemli bir nozokomiyal patojendir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının eradikasyonu için tedavi rejimleri giderek daha sınırlı hâle gelmektedir. Bu çalışmada, *P. aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranları ve imipeneme dirençli olanlarda metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimi varlığının fenotipik yöntemle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *P. aeruginosa* suşu değerlendirildi. Antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile CLSI kriterlerine göre belirlenmiştir. İmipenem dirençli ve orta duyarlı suşlarda, MBL varlığı açısından kombine disk (IMP-EDTA) test yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Antibiyotik direnç oranları imipeneme %25, sefepime %14, seftazidime %19, piperasilin/tazobaktam %10, aztreonam %24, siprofloksasine %11, tobramisine %6 ve amikasine %5 olarak bulundu. Metallo-beta-laktamaz üretimi, imipenem dirençli ve orta duyarlı *P. aeruginosa* suşlarının %80'inde tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızda, kombine disk test yöntemi ile elde edilen MBL pozitiflik oranı diğer çalışmalar ile uyumludur. İmipeneme dirençli bulunan suşlarda direnç yayılımını önlemek için MBL varlığı araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Metallo-beta-laktamaz, antibiyotik direnci, *Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY

Investigation of Metallo-Beta-Lactamase Producing Strains of *Pseudomonas aeruginosa*

Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is an important nosocomial pathogen frequently resistant to "antipseudomonal" drugs, including carbapenems. Treatment regimes for the eradication of *P. aeruginosa* infections are becoming increasingly limited. This study was conducted to determine the rate of resistance of *P. aeruginosa* strains to various antibiotics and to investigate the presence of metallo-beta-lactamases (MBLs) in the imipenem resistant strains using a phenotypic method.

Materials and Methods: The antibiotic susceptibilities of a total of 100 *P. aeruginosa* strains isolated from various clinical specimens, were determined by Kirby-Bauer disk diffusion method according to the CLSI guidelines. Combined disc (IMP-EDTA) test method was used for the presence of MBL in imipenem-resistant and intermediate strains.

Results: The antibiotic resistant rates determined for various antibiotics as follows: imipenem (25%), cefepime (14%), ceftazidime (19%), piperacillin/tazobactam (10%), aztreonam (24%), ciprofloxacin (11%), tobramycin (6%) and amikacin (5%). Metallo-beta-lactamase production was detected in 80% of the imipenem resistant and intermediate *P. aeruginosa* strains.

Conclusion: In our study, the MBL positivity rates obtained by the combined disc test method is consistent with other studies. MBL presence should be investigated in imipenem-resistant strains to prevent the spread of resistance.

Key words: Metallo-beta-lactamase, antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa hastanelerde direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. *P. aeruginosa* birçok antimik-

robiyale doğal dirençli olup, tedavi sırasında birden fazla antibiyotiğe direnç geliştirebilmektedir⁽¹⁾. Karbapenemler, hastane enfeksiyonlarına neden olan çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa*'ya karşı etkili antimikrobiyal

Alındığı tarih: 14.02.2015

Kabul tarihi: 16.03.2015

Yazışma adresi: Özlem Bucak, Denizli Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Denizli

e-posta: buke06@gmail.com

ajanlardandır. Özellikle Amp C ve Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimlerine dayanıklı olmaları nedeniyle ilk sırada kullanılan antibiyotik grubudur⁽²⁾. Karbapenemlere karşı direnç gelişmesi durumunda tedavi güçleşmektedir. Dış membran geçirgenliğinin azalması, atım pompa sistemi, penisilin bağlayan proteinlerdeki modifikasyon ve karbapenemleri hidrolize eden enzimlerin varlığı *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde etkili olmaktadır. Metallo-beta-laktamazlar (MBL), plazmid aracılığı ile horizontal olarak yayılması nedeniyle direnç gelişiminde diğer mekanizmalardan daha önemli olduğu düşünülmektedir⁽³⁾. MBL, Ambler sınıf B ve Bush grup 3'te yer alan beta-laktamazlardır. Metallo-beta-laktamazlar karbapenemler dâhil, aztreonam hariç tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize etmektedirler. MBL, beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli ancak etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), tiol bazlı bileşikler ve dipikolinik asite (DPA) duyarlıdır⁽⁴⁾. Tiol bazlı bileşikler *Acinetobacter* türlerinde ve DPA ise enterik bakterilerde MBL tespitinde kullanılabilmektedir.

Bu çalışmada, farklı klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının, çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranları ve imipeneme dirençli olanlarda MBL enzimi varlığının fenotipik yöntemle belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplam 100 *P. aeruginosa* izolatu değerlendirilmiştir. İzolatlar konvansiyonel yöntemlerle ve otomatize sistemle (VITEK 2, bioMérieux, Fransa) tanımlanmış, antibiyotik duyarlılıkları "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir⁽⁵⁾. Disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde imipeneme dirençli ve orta duyarlı bulunan 25 *P. aeruginosa* suşu MBL enzim varlığı yönünden incelenmiştir. MBL enzim varlığını belirlemek için "imipenem-EDTA kombine disk difüzyon testi" uygulanmıştır. Bulanıklığı 0.5 McFarland olan bakteri süspansiyonları steril eküvyon ile Mueller-Hinton agar plaklarına yayılmıştır. Plaklara 2 adet imipenem (10 µg, Oxoid, İngiltere) diski yerleştirilmiştir. Disklerden birisinin üzerine pH 8'de hazırlanmış 0.5 M EDTA (HiMedia, Hindistan) solüsyonundan 5 µl eklenmiş ve plaklar etüvde 35-37°C'de 18-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra imipenem diski ile imipenem-EDTA'lı diski zon çaplarında 7 mm veya daha fazla fark bulunması MBL pozitif olarak kabul edilmiştir⁽²⁾.

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen 100 *P. aeruginosa* suşunun 50'si balgam, 21'i idrar, 15'i kan, 11'i yara ve diğer üçü de kateter, asit mayi ve beyin omurilik sıvısı örneklerinden izole edilmiştir.

P. aeruginosa suşlarının 25'i imipeneme, 14'ü sefepime, 19'u seftazidime, 10'u piperasilin/tazobaktama, 24'ü aztreonama, 11'i siprofloksasine, altısı tobramisine ve beşi amikasinine dirençli bulunmuştur. İmipeneme dirençli izolatların %80'inde (20/25) MBL enzim varlığı saptanmıştır. Elde edilen izolatların imipenem direncine ve MBL varlığına göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Elde edilen izolatların imipenem direnci ve MBL varlığına göre dağılımı.

İmipeneme duyarlılık durumu	MBL pozitif	MBL negatif
İmipeneme dirençli	16	4
İmipeneme orta duyarlı	4	1
Toplam	20	5

TARTIŞMA

P. aeruginosa'da ilk IMP-1 tipi MBL enzimi Japonya'dan bildirilmiş olup, daha sonra yeni MBL'lar (IMP, VIM, SPM, GIM, NDM-1) dünya çapında tanımlanmıştır⁽⁴⁾. MBL üreten gram-negatif bakteri enfeksiyonları yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Bu nedenle, bu son derece dirençli bakterilerin hızlı tanısı enfeksiyon kontrol yönetimi ve hekimlere uygun tedavi seçeneklerine yardımcı olmak için önemlidir⁽⁶⁾. CLSI tarafından MBL enzimlerinin tespiti için önerilmiş standart bir yöntem bulunmamaktadır⁽⁵⁾. Modifiye Hodge testi (MHT), *Enterobacteriaceae* izolatları için karbapenem direnci saptandığında karbapenemaz yapımının doğrulanması için önerilen bir test iken, artık 2012 CLSI kriterlerinde yer almamaktadır⁽⁷⁾. Çeşitli fenotipik yöntemler metallo-betalaktamaz üreten bakterilerin tespiti için kullanılabilir. Bu testler arasında; imipenemli veya seftazidimli EDTA veya 2-merkaptopropionik asit (MPA) disklerini kullanan çift-disk sinerji testi, seftazidim veya imipenemli EDTA kombine disk testi, MBL E-test ve imipenemli EDTA kullanan mikrodilüsyon testidir⁽⁸⁻¹⁰⁾. Ancak, tarama testi olarak kullanılan fenotipik yöntemlerden hangisinin daha duyarlı olduğuna dair kesin bilgiler yoktur⁽¹¹⁾.

Kombine disk testinde EDTA, membran geçirgenliği özelliğine sahip olması ve *P. aeruginosa* üzerinde zararlı etkiye neden olabileceğinden dolayı yalancı pozitifliğe neden olabilmektedir⁽¹²⁾. Yapılan bir çalışmada, kombine disk test ve çift disk sinerji testinde; IMP-1, VIM-2 ve SIM-1 gibi MBL üreten *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde DPA'in EDTA'ya göre daha iyi bir MBL inhibitörü olduğu belirtilmektedir⁽¹³⁾. Genotipik yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) MBL tespitinde tatmin edici sonuçlar vermesine rağmen, maliyet faktörü klinik laboratuvarlarda günlük test için uygulanmasını

sınırlandırmaktadır. PZR bulguları doğrultusunda MBL üretimi tespiti %100 doğruluk sergileyen MBL E-testinin tercih edilebileceği belirtilmiştir⁽¹²⁾.

Çalışmamızda MBL enziminin belirlenmesi için imipeneme dirençli 25 *P. aeruginosa* suşunda fenotipik yöntemlerden kombine disk testi kullanılmıştır. İmipeneme dirençli izolatlarda MBL üretimi kombine disk testi ile 20 (%80) suшта tespit edilmiştir. Türkiye'de kombine disk testi ile yapılan çalışmalarda MBL oranları %31 ile %80 arasında değişmektedir^(11,14-17). Demirdağ ve ark.⁽¹⁵⁾ yaptıkları araştırmada, elde edilen sonuçların analizine göre kombine disk testinin, MHT'ye kıyasla daha duyarlı olduğu saptamışlardır. Ülkemizde *P. aeruginosa* izolatlarında MBL pozitiflik oranı ve MBL tespitinde kullanılan fenotipik yöntemler Tablo 2'de gösterilmiştir. Prajapati ve ark.⁽¹⁸⁾ MBL oranını kombine disk test yöntemiyle %50, çift disk sinerji testi ile %27 olarak bulmuş ve kombine disk testinin diğer yöntemlere göre duyarlılığının daha fazla olduğunu savunmuşlardır. Behera ve ark.⁽¹⁹⁾ kombine disk testi yöntemiyle MBL oranını %76 olarak bulmuşlar ve bu çalışmada kullandıkları diğer fenotipik yöntem olan E-test ile kombine disk testinin duyarlılık olarak eşit olduğu fakat maliyet kısıtlılığı nedeniyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında basit fenotipik tarama yöntemi olarak kombine disk testinin kullanılabilirliğini ileri sürmüşlerdir. Bashir ve ark.⁽²⁰⁾ MBL oranını kombine disk testi yöntemiyle %86.8 olarak bulmuşlardır. 2014 yılında yapılan bir çalışmada ise imipeneme dirençli suşların hepsinde kombine disk test yöntemi ile MBL pozitif bulunmuştur⁽²¹⁾. Mouawad ve ark.⁽²²⁾ çalışmasında kombine disk testi ile MBL oranı %90 bulunmuş ve çalışmalarda imipenem EDTA kombine disk testinin yanlış pozitif sonuçlar verebileceği ve dolayısıyla sonuçların MBL E-test ile karşılaştırılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Tablo 2. Ülkemizde *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında MBL pozitiflik oranı ve kullanılan fenotipik yöntemler.

Çalışma	Yıl	Bölge	Karbapenem dirençli suş sayısı	MBL oranı (%)	Yöntem
Bu çalışma	2014	Bolu	25	80	Kombine disk testi
Bulut ve ark. ⁽¹⁷⁾	2013	Elazığ	20	80 100 60 60	Kombine disk testi Çift disk sinerji MHT E-Test
Cesur ve ark. ⁽¹⁶⁾	2012	Çok merkezli	186	31	Kombine disk testi
Demirdağ ve ark. ⁽¹⁵⁾	2011	Elazığ	43	37 79	MHT Kombine disk testi
Sesli Çetin ve ark. ⁽¹¹⁾	2009	Isparta	52	62 73 58 40	Kombine disk testi Çift disk sinerji MHT E-Test
Gayyurhan ve ark. ⁽¹⁴⁾	2008	Gaziantep	18	72	Kombine disk testi

(MHT: Modifiye Hodge Test)

Ülkemizde farklı merkezlerde yapılan çalışmalarda, *P. aeruginosa* suşlarının imipeneme karşı direnç oranı %18 ile %46 arasında değişmektedir^(11,14,15,23,24). Direnç oranımız (%25) bu çalışmalar ile uyumludur. Çalışmamızda, tobramisin ve amikasin'in duyarlılık oranlarını sırasıyla %94 ve %95 olarak tespit ettik. *P. aeruginosa*'ya karşı amikasin ve tobramisin, imipenemden daha etkili bulunmuştur.

CLSI 2013 kriterlerine göre *P. aeruginosa*, karbapenemler için disk difüzyon zon çapları daha geniş ve minimum inhibitör konsantrasyon değerleri ortalama 1-2 dilüsyon daha düşük belirlenmiştir. Bu yeni rehber göre eskiden duyarlı olan pek çok suş orta düzey veya tam dirençli tanımlanmaktadır⁽²⁵⁾. Dolayısıyla yeni direnç sınır değerleri uygulandığında tedavi kararlarının verilebilmesi için karbapenemaz araştırılma gereksinimini azaltacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızdaki kombine disk testi ile elde edilen MBL oranları ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. Sonuç olarak, antimikrobiyal maddelere karşı hızla gelişen direnç sorununun önüne geçebilmek için her hastane kendi antibiyotik duyarlılık

profillerini belirlemeli ve ampirik antibiyotik tedavisine başlarken bunu dikkate almalıdır. *P. aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde antibiyogram sonuçlarına göre antibiyotik kullanılmalıdır. İmipeneme dirençli bulunan *P. aeruginosa* suşlarında direnç yayılımını önlemek için MBL varlığı açısından araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. **Pier GB, Ramphal R.** *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone 2005; 2587-615.
2. **Öcal D.** Gram negatif bakterilerde antibakteriyal direnç fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirim. *ANKEM Derg* 2012; 26:154-64.
3. **Ryoo NH, Ha JS, Jeon DS, Kim JR.** Prevalence of metallo-β-lactamases in imipenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Clin Microbiol* 2010; 13:169-72. <http://dx.doi.org/10.5145/KJCM.2010.13.4.169>
4. **Renu G, Rajeev T, Smita S.** Existence of metallo beta lactamases in carbapenem susceptible gram negative bacilli: A cause for concern. *J Clin Diagn Res* 2010; 4:2679-84.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th Informational Supplement. CLSI document M100-S21, CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2011.
6. **Wan Nor Amilah WA, Noor Izani NJ, Ng WK, Ashrafal Haq J.** A simple screening test for the detection of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* in a tertiary care hospital.

- tal. *Trop Biomed* 2012; 29:588-97.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard -ninth edition, M07-A9. Wayne, PA: CLSI; 2012.
 8. **Bareja R, Grover PS, Singh VA, et al.** Rapid detection of metallo-beta-lactamase in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and acinetobacter specie. *J Adv Res Biol Sci* 2011; 3:90-3.
 9. **Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y.** Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4623-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003>
 10. **Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL.** Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:5-11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.01.002>
 11. **Sesli-Çetin E, Tetik T, Kaya S, Cicioğlu-Aridoğan B.** *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. *İnfeks Derg* 2009; 23:51-5.
 12. **Khosravi Y, Vellasamy KM, Tay ST, Vadivelu J.** Molecular detection and characterisation of metallo- β -lactamase (MBL) genes and integrons of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. In: Méndez-Vilas A. (ed) "Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education", Formatex Research Center, 2013; 515-21.
 13. **Yong D, Lee Y, Jeong SH, Lee K, Chong Y.** Evaluation of double-disk potentiation and disk potentiation tests using dipicolinic acid for detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3227-32.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00818-12>
 14. **Gayyurhan E, Zer Y, Mehli M, Akgün S.** Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz oranlarının belirlenmesi. *İnfeks Derg* 2008; 22:49-52.
 15. **Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M.** Yoğun bakımda izole edilen *Pseudomonas* spp. suşlarında metallo-beta-laktamaz sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg* 2011; 25:150-6.
 16. **Cesur S, Yıldız E, Irmak H, ve ark.** Türkiye'de yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz enzimlerinin ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2012; 32:687-93.
<http://dx.doi.org/10.5336/medsci.2011-24972>
 17. **Bulut Y, Çağlar H.** Gram negatif non-fermantatif bakterilerde metallo-beta-laktamaz enziminin farklı yöntemlerle gösterilmesi. *FÜ Sağ Bil Tıp Derg* 2013; 27:135-40.
 18. **Prajati SB, Vegad MM, Mehta SJ, Kikani KM, Kamothi MN, Pandya JM.** An evaluation of two different phenotypic methods for detection of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas* isolates. *J Cell Tissue Res* 2011; 11:2601-4.
 19. **Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V.** An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26:233-7.
<http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.39587>
 20. **Bashir D, Manzoor AT, Bashir AF, et al.** Detection of metallo-beta-lactamase (MBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care hospital in Kashmir. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5:164-72.
 21. **Yassin NA, Khalid HM, Hassan AO.** Prevalence of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in wound infections in Duhok city, Iraq. *Int J Res Med Sci* 2014; 2:1576-9.
<http://dx.doi.org/10.5455/2320-6012.ijrms20141162>
 22. **Mouawad R, Afif C, Azar E, et al.** Effect of antibiotic consumption on resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Lebanese patients with emphasis on MBL production. *Adv Microbiol* 2013; 3:382-8.
<http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.34052>
 23. **Özdemir M, Erayman İ, Türk Dağı H, Baykan M, Baysal B.** Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2009; 23:122-6.
 24. **Uzun B, Güngör S, Yurtsever SG, Afşar İ, Demirci M.** Yoğun bakım hastalarının kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumları. *ANKEM Derg* 2012; 26:55-60.
<http://dx.doi.org/10.5222/ankem.2012.055>
 25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23rd Informational Supplement (M100-S23). Wayne, PA: CLSI; 2013.