

Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Metallobetalaktamaz Üretiminin Araştırılması

Banu BAYRAKTAR(*), Dilek YILDIZ(**), Emin BULUT(*)

(*) Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul
(**) Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

ÖZET

Kasım 2002-Kasım 2003 tarihleri arasında Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma hastanesi yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatları prospektif olarak toplanmıştır. Farklı hastalardan izole edilen 27 suş değerlendirilmiştir. Meropenem(MP) ve imipenem(IP) için minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) Etest ile saptanmıştır. Suşların, seftazidim (CAZ), aztreonam(ATM), piperasillin+tazobaktama (TZP) duyarlılıkları disk diffüzyon metoduyla belirlenmiştir. Metallo beta-laktamaz (MBL) taraması Etest yöntemiyle yapılmış ve 27 suştan 17'sinde MBL pozitif bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Metallobetalaktamaz (MBL), *Pseudomonas*, antibiyotik direnci

SUMMARY

Investigation of Metallo beta-lactamase Production in Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated in Intensive Care Unit

From November 2002 to November 2003 carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from intensive care unit were collected prospectively. Twenty seven nonduplicated isolates were evaluated. MIC values of meropenem (MP) and imipenem (IP) were detected by Etest. Ceftazidime(CAZ), aztreonam(ATM), piperasillin+tazobactam (TZP) susceptibilities of starins were determined by disk diffusion test. Screening for metallo beta-lactamase (MBL) production was carried out in these isolates by Etest. Seventen strains out of 27 were found as MBL producers.

Key words: Metallobetalactamase (MBL), *Pseudomonas*, antibiotic resistance

GİRİŞ

Karbapenemler *P.aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan güçlü antibiyotiklerdir(1,2). Ancak dış membran permeabilitesinin azalması, efflux pompalarının up regülasyonu ve karbapenemaz üretimi gibi mekanizmalar *Pseudomonas* suşlarında karbapenem direncine yol açabilmektedir(1,2,3).

Karbapenemazlar içinde Ambler moleküler sınıflamasında B sınıfını oluşturan metallobetalaktamazlar (MBL) klinik açıdan en önemli grubu oluşturmaktadır. MBL'ların substrat profilleri çok geniş olup genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri(sefotak-

sim,seftazidim, sefepim) ve karbapenemleri (imipenem,meropenem,panipenem)

içermektedir(4,5).1991 de Japonya'da *S.marcescens* de tanımlanan IMP-1 ilk edinsel karbapenem direnç enzimidir(4). IMP-1'i kodlayan blaIMP genlerinin integronlarda yer alması nedeniyle diğer Gram negatif bakterilere transfer olabildiği gösterilmiştir. Gerek spektrumunun genişliği gerekse transfer olabilmeye özelliği nedeniyle, MBL üreten bakterilerin hızla belirlenmesi hem klonal yayılımın önlenmesi hem de bu direnç genlerinin hastane ortamında diğer

bakteri türlerine aktarılma olasılığının ortadan kaldırılması açısından önemlidir (5,6,7,8,9). Konvansiyonel duyarlılık testleri ile bu enzimlerin varlığının gösterilmesi mümkün olmamakta, ilgili genin moleküler tekniklerle aranması veya enzim testlerinin yapılması gerekmektedir(4,9). Ancak bu metodlar rutin tarama için uygun değildir. MBL'ların aktivitele-ri sulbaktam, klavulanikasit ve tazobaktam gibi konvansiyonel betalaktamaz inhibitörleriyle baskılanamazken, EDTA gibi şelasyon yapan maddelerce inhibe edilebilmektedir(2,4,10). Bundan yararlanılarak disk diffüzyon prensibine dayalı fenotipik testler geliştirilmeye çalışılmıştır. Yine aynı prensipten yola çıkarak geliştirilen imipenem/imipenem+EDTA (IP/IPI)

E testleri kullanıma girmiştir(5,9,10,11).

Bu çalışmada prospektif olarak bir yıl süre ile Şişli Etfal Hastanesi yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *P.aeruginosa* suşlarında MBL sıklığının E test ile araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri suşları. Kasım 2002-Kasım 2003 tarihleri arasında prospektif olarak yoğun bakım ünitesinde yatan 27 hastadan izole edilen, disk diffüzyonla imipenem ve meropeneme dirençli bulunan 27 *P. aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm suşlar BBL Crsytal E/NF ID sistem ile *P.aeruginosa* olarak identifiye edilmiştir.

Duyarlılık testleri. Suşların seftazidime(CAZ), aztreonama(ATM) ve piperasillin/ tazobaktama(TZP) duyarlılıkları disk diffüzyon yöntemiyle NCCLS'e uygun olarak yapılmıştır. Meropenem ve imipenem için MİK değerleri Etest ile saptanmıştır. Mueller-Hinton agar yüzeyine 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlanmış inokulum yayılarak üzerine E test şeritleri yerleştirilmiş, 35°C de 20 saat inkübasyonu takiben inhibisyon elipsinin şeridi kestiği noktadaki sayısal değer MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

Etest ile MBL saptanması. Bir tarafında imipenem (IP) (4-256 mg/ml), diğer tarafında IP (1-64 mg/ml) ve sabit konsantrasyonda EDTA içeren, iki taraflı Etest MBL şeritleri kullanılmıştır. Birbirine zıt yönde oluşan iki elipsin şeridle kesiştiği noktalardaki sa-

yısal değerler birbirine oranlandığında 8 ve üzerinde bir değer elde edilmesi, başka bir deyişle IP MİK değerinin EDTA varlığında en az 3 log₂ dilüsyon ve üzerinde azalması MBL pozitifliği olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Toplam 27 suştan 17'sinde (%66.6) Etest metoduyla MBL pozitif bulunmuştur. Suşların 20'si (%74) CAZ, 20'si (%74) ATM,16'sı (%59)TZP'ye dirençli bulunmuştur.

3 suş (no:1,5,25) imipeneme orta duyarlı iken, meropeneme dirençli; 2 suş (no: 20,22) meropeneme orta duyarlı iken, imipeneme dirençli; 2 suş (no:15,16) imipeneme dirençli iken meropeneme duyarlı bulunmuştur.

TARTIŞMA

Son yıllarda birçok ülkeden edinsel MBL'ların yo-laçtığı karbapenem direncinin sıklığında artış bildirilmiştir(4,10). Metallobetalaktamazlar IMP veya VIM serisinden enzimler olup, özellikle Akdeniz ülkelerinde VIM serisi enzimlere daha sık rastlanmaktadır(1,4). İlk tanımlanan IMP-1 Japonya'da *S. marcescens* suşunda saptanmıştır(4).Daha sonra 1999 yılında İtalya'da *P.aeruginosa* suşlarında yine integron üzerinde kodlu, transfer olabilen ikinci bir metallobetalaktamaz VIM-1 tanımlanmıştır(8). En sık Güney Doğu Asya ve Avrupa olmakla birlikte tüm dünyadan bildirilmiş MBL üreten izolatlar mevcuttur.Yakın zamanda IMP-1'e benzeyen MBL üreten Gram negatif bakteriler İngiltere, İtalya, Singapur'dan bildirilmiştir(5,10).

MBL'ların sefalosporinlere, sefamisinlere ve karbapenemlere karşı dirence yol açması ve MBL genlerinin integron üzerinde mobil gen kasetlerinde yer alması nedeniyle farklı Gram negatif bakteri türlerine hızla yayılabilme potansiyeli taşıması, metallobetalaktamaz üreten *Pseudomonas*'ları klinik bir tehdit haline getirmiştir(5,6,7,8,9). MBL pozitif bakterilerin hızla tanımlanması infeksiyon kontrolü ve yayılımının önlenmesi açısından önemlidir(5, 8,10).

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılmak üzere MBL'ların EDTA,ağır metal tuzları ve thiol bileşikleriyle inhibe olmasından yararlanılarak fenotipik

Tablo1. Karbapenem dirençli 27 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun özellikleri.

İzolot no:	Etest MBL sonuçları	MIK değerleri		Beta-laktam direnç fenotipi		
		MP	IP	CAZ	ATM	TZP
1	+	24	12	Di	Di	Du
2	+	≥32	≥32	Di	Di	Du
3	+	≥32	≥32	Du	Du	Di
4	NEG	≥32	24	Di	Di	O
5	+	≥32	12	Di	Di	Du
6	NEG	≥32	≥32	Di	Di	Du
7	+	≥32	≥32	Du	Du	Di
8	NEG	≥32	≥32	Di	Di	Di
9	NEG	≥32	≥32	Di	Di	Du
10	+	≥32	24	Di	Di	Di
11	+	≥32	≥32	Di	Di	Du
12	+	≥32	≥32	Di	Di	Di
13	NEG	≥32	≥32	Du	Du	Di
14	+	≥32	≥32	Du	O	Di
15	NEG	3	≥32	Di	Di	Di
16	NEG	3	≥32	Du	Di	Du
17	NEG	≥32	≥32	Di	Di	Du
18	+	≥32	≥32	Di	Di	Di
19	+	≥32	≥32	Di	Di	Du
20	+	8	≥32	Di	O	Di
21	NEG	≥32	≥32	Di	Di	Di
22	NEG	8	24	Du	Du	Du
23	+	12	≥32	Di	Di	Di
24	+	≥32	≥32	Du	Di	Di
25	+	16	12	Di	Di	Di
26	+	≥32	≥32	Di	O	Di
27	+	≥32	≥32	Di	Di	Di

*NEG:negatif, +: pozitif,Du:duyarlı,O:orta,Di:dirençli.

yöntemler geliştirilmiştir (5,9,10,11). Arakawa ve ark.ları (5) çift disk sinerji yöntemiyle, seftazidim ve 2 merkaptopropiyonik asit içeren diskleri yakınlaştırarak IMP-1 üreten suşların inhibisyon zonunda bir genişleme göstermişler ve bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün blaIMP spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR ile karşılaştırılabilir olduğu ve günlük laboratuvar çalışmalarında kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Yong ve arkadaşları (10), çoğu VIM-2 MBL üreten 102 *P.aeruginosa*, 14 *P.putida*, 20 *A.baumannii* ve 3 *Acinetobacter* spp. suşu ile çalışmışlar; disk difüzyonla imipenem ve imipenem artı 750 mikrogram EDTA içeren disklerin inhibisyon zon çapları arasındaki farkın 7 mm üzerinde olmasını MBL pozitifliği lehine kabul etmişlerdir. Yöntemin *Pseudomonas*lar için mükemmel, *Acinetobacter*'ler için iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Migliavacca ve arkadaşları (9), *P.aeruginosa* suşlarında mikrodilüsyon metoduyla imipenem MIC değerlerini; tekbaşına ve EDTA/ 1,10-phenanthroline karışımı ile saptamışlar, MIC değerinde 4 kat üzerinde düşüşü MBL pozitifliği lehine değerlendirmişlerdir. Testin disk diffüzyon testine göre daha standardize olduğu ve otomasyona uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Senda ve arkadaşları (2)1992-1994 yılları arasında 17 hastaneden izole edilen 3700 *P.aeruginosa* suşunun 132'sinde blaIMP geni varlığını göstermişlerdir. blaIMP genlerinin integron veya benzer bir elementle çeşitli plasmid ve kromozomlara translokasyonunun olası olduğu, böylece farklı genetik geçmişe sahip *Pseudomonas* suşları arasında yayıldığı ve bu suşların Japonya'da multifokal çoğalma gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Yunanistan'da1996-1998 yılları arasında izole edilen her iki karbapeneme dirençli *P.aeruginosa* suşları arasından rastgele seçilen 6 izolatin serotip O:12'ye ait olduğu ve pulse field jel elektroforez paternlerinin aynı olduğu gösterilmiştir. Bu suşların hepsinin blaVIM pozitif olduğu ve direnç geninin yayılmasındansa, O:12 suşunun yayılmasının söz konusu olduğu bildirilmiştir. Suşun yayılmasındaki başarının karbapenemlerin çok kullanılıyor olması ve/veya suşun patojen bakteri olarak kalıtsal taşıdığı özelliklerine bağlanabileceği sonucuna varılmıştır(7).

Yunanistan'dan 2001 yılında 15 merkezden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının 36'sında blaVIM pozitif bulunmuş. Bunlardan 26'sında 2-mercaptoacetic acid ve imipenem kullanılarak sinerji testi ile MBL varlığı gösterilebilmiştir. Diğer çalışmanın aksine, random amplified polymorphic DNA tiplemesi suşların birbirinden farklı kökenlerden kaynaklandığını düşündürmüştür(1). Lee ve arkadaşları da (6) Kore'de VIM-2 aracılı direncin hem klonal hem de horizontal olarak yayıldığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, yoğun bakım ünitesinden izole edilen 27 *Pseudomonas aeruginosa* suşundan 17'sinde Etest IP/IPI şeritleri ile MBL pozitif olarak bulunmuştur. Suşların çoğunlukla diğer antipseudomonal beta laktamlara dirençli olduğu saptanmıştır.

Diğer betalaktamlara direnç fenotipi ile MBL pozitifliği arasında bir bağlantı gözlenmemiştir.Yalnızca imipenem dirençli olup meropenem'e duyarlı iki suшта MBL varlığı saptanmamıştır. Walsh ve arkadaşları (11) IP ve IP-EDTA E testleri ve Mueller-Hinton agar kullanıldığında MBL saptama duyarlılığın %94, özgüllüğünün %95 olduğunu;MBL Etest şeritlerinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL saptanmasında kullanılmasının kabul edilebilir olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak;karbapenem kullanımının gerekli olduğu ünitelerde hızlı, basit, sonuçları tekrarlanabilir, sensitivite ve spesifitesi iyi bir fenotipik tarama metoduna gereksinim vardır. Birden çok mekanizma karbapenem direncine yol açabildiğinden sonuçların moleküler yöntemlerle doğrulanmasının gerekliliği açıktır. Epidemiyolojik açıdan bakıldığında bu izolatların kökenlerinin belirlenerek tek bir klonun yayılmasıyla mı , yoksa direnç geninin suşlar arasında geçişiyle mi direncin ortaya çıktığı netleştirilmelidir. Karbapenemlerin artan kullanımının, karbapenemaz üreten suşların seleksiyonuna yol açacağı unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

- 1. Giakkoupi P, Petrikos G, Tzouveleki LS, Tsonas S, the WHONET GREECE study group, Legakis NJ, Vatopoulos AC:** Spread of integron associated VIM-type metallo-B-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. J Clin Microbiol 41:822(2003).
- 2. Senda K, Arakawa Y, Naashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Otha M:** Multifocal outbreaks of metallo-B-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. resistant to broad-spectrum b-lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 40:349 (1996).
- 3. Livermore DM:** *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother 47:247 (2001).
- 4. Nordman P, Poirel L:** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 8:321 (2002).
- 5. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M:** Convenient test for screening metallo-B-lactamase-producing Gram negative bacte-

ria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 38:40 (2000).

6. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, Livermore DM: blaVIM-2 cassette-containing novel integrons in metallo-B-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in Korean Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1053 (2002).

7. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MFI, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM: Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 38:1290 (2000).

8. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM: Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-

B-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1584 (1999).

9. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi R, Lee K, Rossolini GM, Pagani L: Simple microdilution test for detection of metallo-B-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 40:4388 (2002).

10. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y: Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-B-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 38:3798 (2002).

11. Walsh TR, Bolmström A, Qvarnström A, Gales A: Evaluation of a new Etest for detecting metallo-B-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 40:2755 (2002).