

***Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması (*)**

Investigation of induced beta-lactamase activity and antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa strains

Fahriye Ekşi, Ayşen Bayram, İclal Balcı, Gönenç Özer

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, Anabilim Dalı, Gaziantep.

İletişim / Correspondence: Fahriye Ekşi Adres / Address: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Üniversite Bulvarı, 27310 Gaziantep Tel: 0342 3603910/77763 Gsm: 0532 5239620 Fax: 0342 3601617 E-mail: fahriyeeksi@hotmail.com

ÖZET

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole ettiğimiz 51 Pseudomonas aeruginosa suşunun indüklenebilir beta-laktamaz aktivitelerinin belirlenmesi ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumlarının saptanması amaçlanmıştır. Çeşitli klinik örneklerden klasik yöntemlerle izolasyonu ve identifikasyonu yapılan 51 P. aeruginosa suşu çalışma kapsamına alınmıştır. İncelenen örneklerin 13'ü idrar, 11'i trakeal aspirat, 8'i bronkoalveolar lavaj (BAL), 6'sı yara, 6'sı boğaz, 5'i balgam, 1'i plevra, 1'i drenaj sıvısı örnekleridir. İzole edilen P.aeruginosa suşlarının indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesi (İBL), güçlü indükleyici olarak imipenem, zayıf indükleyici olarak aztreonam ve sefotaksim diskleri kullanılarak disk indüksiyon yöntemi ile araştırılmıştır. İzolatların çeşitli antibiyotiklere direnç durumlarını belirlemek için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'in önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 51 P. aeruginosa suşunun 27'sinde (%52.9) İBL aktivitesi saptanmıştır. Pseudomonas aeruginosa suşları, trimetoprim/sulfametoksazole %82.3, sefotaksime %56.9, aztreonama %33.3, seftriaksone %29.4, gentamisine %27.5, seftazidime %23.5, sefepime %23.5, piperasiline %21.6, siprofloksasine %9.8, imipeneme %7.8 ve piperasilin/tazobaktama %7.8 oranlarında dirençli bulunmuştur. Bu sonuçlara göre P. aeruginosa suşlarına en etkili antibiyotiğin piperasilin/tazobaktam olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa, indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesi, antibiyotiklere direnç*

SUMMARY

The aim of this study was the determination of induced beta-lactamase activity in 51 Pseudomonas aeruginosa strains and in vitro antibiotic resistance of these strains which were isolated from various clinical specimens. The distribution of samples was as follows: urine (13), tracheal aspirate (11), bronchoalveolar lavage (8), wound swab (6), throat (6), sputum (5), pleura (1), and drainage material (1). By using imipenem discs for being strong inducer and aztreonam and cefotaxim discs for being weak inducers, induced beta-lactamase activity in P.aeruginosa isolates were screened with disc induction test. Disc diffusion method was used for determination of antibiotic resistance in clinical isolates according to suggestions of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Induced beta-lactamase activity was detected in 27 of 51 (52.9%) P.aeruginosa isolates. The resistance rates of P.aeruginosa isolates were 82.3% for trimethoprim/sulfamethoxazole, 56.9% for cefotaxime, 33.3% for aztreonam, 29.4% for ceftriaxon, 27.5% for gentamicin, 23.5% for ceftazidime, 23.5% for sefepim, 21.6% for piperacillin, 9.8% for ciprofloxacin, 7.8 % for imipenem, and 7.8% for piperacillin/tazobactam. The highest antibiotic susceptibility rate in P. aeruginosa strains were found to piperacillin/tazobactam.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa, induced beta-lactamase, antibiotic resistance*

(*) Bu çalışma "7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler" toplantısında (Nisan 2006, İstanbul-) sunulmuştur.

GİRİŞ

Kromozomal Bush Grup I β -laktamazları (Amp C tipi enzimler) yüksek oranda üreten bazı Gram negatif bakterilerde geniş spektrumlu penisilinlere ve sefalosporinlere direnç görülmektedir. Bu durumun görüldüğü mikroorganizmalardan biri de *Pseudomonas aeruginosa*'dır (1). Grup I β -laktamazlar indüklenebilir özelliktedir. Yani normalde bakteri tarafından az miktarda sentezlenen enzim ortamda bulunan bir indükleyicinin etkisi ile yüksek miktarlarda sentezlenmeye başlar. Normalde indüksiyon etkisi geçici olup indükleyicinin etkisi kalkınca tekrar bazal düzeye dönlür. Ancak bu tip β -laktamazları üreten türlerde esas sorun indüksiyona gerek olmaksızın yüksek oranda β -laktamaz üreten (dereprese) mutantların bulunmasıdır. Bu dereprese mutantlar β -laktamazlara dirençli olarak saptanırlar (2,3).

Antibiyotik yokken çok düşük düzeyde olan enzim sentezi beta-laktam bir antibiyotiğin varlığında yükselmektedir. İndüksiyonun geçici bir olay olmasına karşın, klinikte önemli olan suşlar, mutasyon sonucu devamlı yüksek düzeyde enzim sentezi olanlardır. Bu mutantlar, geniş spektrumlu sefalosporinler, üredopenisilinler ve karboksipenisilinler gibi, zayıf indüksiyon yapıp bu beta-laktamazlara duyarlı olan beta-laktam antibiyotikler ile tedavi sırasında ortaya çıkabilir, çünkü, sözkonusu antibiyotikler indüksiyon yapmadığından düşük düzeyde enzim sentezleyen bakterileri öldürmekte, buna karşın dereprese mutantların seleksiyonuna yol açmaktadır. Dereprese mutantların indüklenebilir beta-laktamaz sentezleyen bakteri popülasyonlarında 10^{-5} - 10^{-7} sıklıkta ortaya çıkabildiği bildirilmektedir. Bu olay, infeksiyonun yeri, ilacın ulaşabildiği düzey ve kullanılan beta-laktam antibiyotiği ile ilişkilidir. Pnömoni ve bakteremi gibi infeksiyonlarda seleksiyon olasılığının yüksek olmasına karşın, üriner sistem infeksiyonlarında düşüktür, çünkü bu infeksiyonlarda ulaşılabilen ilaç düzeyleri dereprese organizmalar için minimal inhibitör konsantrasyonu değerlerinin üzerindedir(4).

Nonfermenter grup içinde en sık rastlanan hastane infeksiyonu etkeni *P.aeruginosa*'dır. Bu mikroorganizma içsel olarak birçok beta-laktam antibiyotiğe dirençlidir. *P.aeruginosa* yüksek mortalite ile seyreden infeksiyonlara sebep olmaktadır ve mortalite ile ilişkili bağımsız bir risk faktörüdür (5).

Bu çalışmada, direnç mekanizmaları çeşitli olan *P.aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin araştırılması, hem indüklenebilen, hem de indüklenemeyen suşların çeşitli antibiyotiklere karşı direnç durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Eylül 2005- Şubat 2006 tarihleri arasında yatan ve ayaktan takip edilen hastalara ait çeşitli klinik örneklerden klasik yöntemlerle izolasyonu ve identifikasyonu yapılan 51 *P.aeruginosa* suşu incelenmiştir. Suşların izole edildiği örneklerin 13'ü idrar, 11'i trakeal aspirat, 8'i bronkoalveolar lavaj (BAL), 6'sı yara, 6'sı boğaz, 5'i balgam, 1'i plevra, 1'i de dren sıvısı örnekleridir. İzole edilen *P.aeruginosa* suşlarının indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesi, güçlü indükleyici olarak imipenem, zayıf indükleyici olarak da aztreonam ve sefotaksim diskleri kullanılarak disk indüksiyon testi ile araştırılmıştır (2,3). Bu yöntemde, *P.aeruginosa* kökenlerinin 18-20 saatlik kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlanarak Mueller-Hinton agar besiyerine ekimleri yapılmıştır. Daha sonra plağın ortasına güçlü bir beta-laktamaz indükleyicisi olan imipenem, bunun yanına merkezden merkeze 2 cm uzaklıkla aztreonam ve sefotaksim diskleri yerleştirilmiştir. Aztreonam ve sefotaksim imipeneme bakan yüzlerinde inhibisyon zonları belirgin olarak daraldığında bakterinin indüklenebilir beta-laktamaz ürettiği kabul edilmiştir.

Suşların imipenem (IPM), aztreonam (ATM), gentamisin (CN), piperasilin (PRL), seftriakson (CRO), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), siprofloksasin (CIP), piperasilin/tazobaktam (TPZ), seftazidim (CAZ), sefepim (FEP), sefotaksime

(CTX)'e (Bioanalys, Ankara) duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute'ın (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer standart disk difüzyon yöntemi ile saptanmıştır (6). Standart köken olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları dirençli, orta duyarlı ve duyarlı olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 51 *P.aeruginosa* suşunun 27'sinde (%52.9) İBL aktivitesi pozitif olarak belirlenmiş, 24 (% 47.1) suşta ise İBL aktivitesi saptanmamıştır. *P.aeruginosa* suşlarının elde edildikleri kliniklere göre dağılımları Tablo 1'de, çeşitli antibiyotiklere direnç durumları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Bu sonuçlara göre *P.aeruginosa* suşlarına en etkili antibiyotiğin piperasilin/tazobaktam (%92.2) olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre orta duyarlı olarak tespit edilen imipenem (%9.8), siprofloksasin (%9.8), seftriakson (%23.5), aztreonam (%21.6), sefotaksim (%37.2) sonuçları dikkat çekici olarak değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

Pseudomonas aeruginosa çevre koşullarına kolay adaptasyonu, değişik virülans faktörleri ve antimikrobiallere karşı gelişen hızlı direnç durumu nedeniyle tüm dünyada en fazla görülen fırsatçı patojen olma özelliğini devam ettirmektedir (1). Özellikle hastanede kazanılmış, ventilatörle ilişki-

Tablo 1. İzole edilen *P.aeruginosa* suşlarının kliniklere göre dağılımları

Klinik	Sayı
Göğüs Hastalıkları	10
Reanimasyon	7
Ortopedi	7
Üroloji	7
Kulak Burun Boğaz	5
Genel Cerrahi	4
Nöroloji	3
Pediyatri	3
Acil	2
Kalp Damar Cerrahisi	2
Dermatoloji	1
Toplam	51

li pnömoni etkenlerindedir. *Pseudomonas* infeksiyonlarının karakteristiği, yüksek ölüm oranıyla birlikte olmasıdır (7).

Beta-laktamazlara bağlı direnç oranları, antibiyotik kullanım özelliklerine bağlı olarak ülkelere ve çeşitli hastanelere göre farklılıklar göstermektedir. Çalışmamızda 51 *P.aeruginosa* suşunun 27'sinde (%52.9) İBL aktivitesi pozitif olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda Özgenç ve ark.'ları (8), 199 *P.aeruginosa* suşunun 153'ünde (%77), Fincancı ve ark. (9) 73 *P.aeruginosa* suşunun %59'unda, Oldacay ve ark. (10) 150 *P.aeruginosa* suşunun %60'unda, Şener ve ark. (11) 58 *P.aeruginosa*'nın %55.1'inde, Akata ve ark. (12) 51 *Pseudomonas spp.*'nin %41'inde İBL aktivitesi saptamışlardır. Çeşitli ülkelerde yapılan araştırmalardan, Rokosz ve ark. (13) yaptıkları çalışmada 200 Gram negatif bakterinin %22.5'inde İBL aktivitesini pozitif bulmuşlardır. Sonuçlarımızın ülkemizde yapılan birçok çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Bazı Gram-negatif bakterilerde indüklenebilir beta-laktamazların artması klinik problemlere neden olmaktadır. Yeni beta-laktam antibiyotiklerle tedavi sırasında çoklu beta-laktam direnci hızla

Tablo 2. İzole edilen *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları

Antibiyotik	Dirençli n(%)	Orta duyarlı n(%)	Duyarlı n(%)
TPZ	4 (%7.8)	0 (%0.0)	47 (%92.2)
IPM	4 (%7.8)	5 (%9.8)	42 (%82.4)
CIP	5 (%9.8)	5 (%9.8)	41 (%80.4)
PRL	11 (%21.6)	0 (%0.0)	40 (%78.4)
CAZ	12 (%23.5)	2 (%3.9)	37 (%72.6)
FEP	12 (%23.5)	1 (%2)	38 (%74.5)
CN	14 (%27.5)	2 (%3.9)	35 (%68.6)
CRO	15 (%29.4)	12 (%23.5)	24 (%47.1)
ATM	17 (%33.3)	11 (%21.6)	23 (%45.1)
CTX	29 (%56.9)	19 (%37.2)	3 (%5.9)
SXT	42 (%82.3)	3 (%5.9)	6 (%11.8)

TPZ:Piperasilin/tazobaktam, IPM:İmipenem, CIP:Siprofloksasin, PRL:Piperasilin, CAZ:Seftazidim, FEP:Sefepim, CN:Gentamisin, CRO:Seftriakson, ATM:Aztreonam, CTX:Sefotaksim, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol

oluşmaktadır. Böyle çoklu direnç gösteren mikroorganizmalar hastane içinde yayılmakta ve önemli bir nozokomiyal patojen olmaktadır. Özellikle indüklenebilir beta-laktamaz sentezleyen *P. aeruginosa*, *Enterobacter* ve *Serratia* türleri gibi mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlara yüksek derecede duyarlı olan yoğun bakım üniteleri, kistik fibroz merkezleri ve yanık ünitelerindeki hastalar için önemli bir problemdir (14-17). İndüklenebilir beta-laktamazı olan bakteri ancak *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter* spp., *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* gibi bakterilerden biri olabileceği için identifikasyonda bu test bir ayırıcı tanı kriteri olarak kullanılabilir. Özenli bir identifikasyon sonrasında *P. aeruginosa*'nın da yer aldığı bir grup bakteri için İBL testine gerek olmadan sefoksitin gibi güçlü bir indükleyici kullanıldığında kesin olarak, diğer sefalosporinler kullanıldığında da olasılıkla karbapenemler, IV kuşak sefalosporinler ve temosilin dışında tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişeceği klinisyene iletilebilir (3).

Çalışmamızda izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının bir antipseudomonal antibiyotik olan piperasilin/tazobaktam (%92.2) yüksek olarak duyarlı olduğu saptanmıştır. Orta duyarlı *P. aeruginosa* suşları dirençli olarak kabul edildiği zaman imipeneme %17.6, siprofloksasine %19.6, piperasiline %21.6, seftazidime %27.4, sefepime %25.5, gentamisine %31.4, seftriaksona %52.9, aztreonama %54.9, sefotaksime %94.1, trimetoprim / sulfametoksazole %88.2 gibi yüksek oranlarda dirençli oldukları görülmektedir. Çalışmamızda imipeneme direnç düşük olmamakla beraber, yine de karbapenemler en etkili antibiyotiklerden biridir ve bunu siprofloksasin takip etmektedir. Son yıllarda karbapenemlere ve siprofloksasine karşı da direnç oranlarında artış saptanmaktadır. Karbapeneme direnç çoğunlukla D2 porin kaybına bağlı dış membran geçirgenliğinin bozulması ile ilgilidir (18). Son yıllarda özellikle *P. aeruginosa* ve *E. coli* suşlarında ilacın dışarı pompalanması (ef-

luks) ve Opr'lerdeki değişimler sonucu oluşan çoğul direnç bildirilmektedir. MexAB-OprM eflüks pompası nalB mutasyonu sonunda ortaya çıkmaktadır ve çoğunlukla lipofilik beta-laktamlara ve karbapenemlerden meropeneme karşı direnç ile birlikte eritromisin, novobiyosin, fusidik asit, tetrasiklin, kloramfenikol ve kinolon direncine yol açmaktadır. nalB mutantları florokinolonlar, penisilinler veya sefalosporinler ile tedavi sırasında ortaya çıkabilmektedir (4). Gram negatif bakterilerde üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı indüklenen, kromozomal beta-laktamazlar aracılığıyla gelişen direnç tedavi rejimini %30 oranında etkileyebilen, bu olgularda tedavi başarısızlıkları veya relaplara yol açabilen önemli bir klinik sorundur(19).

P. aeruginosa suşlarında direncin yaygınlığı, birden fazla direnç paterninin bir arada bulunabilmesi ve kinolon ve karbapenemler de dahil olmak üzere tedavi sırasında direnç geliştirebilme özelliği belirli bir tedavi rejimi sunulmasını güçleştirmektedir (20). Elde edilen sonuçlar, *Pseudomonas* kökenlerinde doğru tedavi politikalarının oluşturulabilmesi ve antibiyotik direncinin artmasını engellemek amacıyla, uygun antibiyotik kullanım kurallarının uygulanması ve etkili önlemlerin alınmasının önemli olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Livermore D M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8:557-584.
- 2- Gülay Z. Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu. Toraks Dergisi 2002; 3:75-88.
- 3- Bal Ç. β -laktamaz testleri ve rutinde kullanımları. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:33, 11-12 Nisan 1997, İstanbul.
- 4- Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (ed), Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. 1.Baskı, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003, 31-41.
- 5- Vahaboğlu H. Çoğul Dirençli Nonfermentatif Gram-Negatif Basiller. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2000; 4:222-225.
- 6- Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onbeşinci Bilgi Eki. M100-S15 2005; 25.

- 7- Pollack M: *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York, 1995:1980-2003.
- 8- Özgenç O, Urbanlı A, Erdenizmenli M, Fidan N, Arı A. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç oranlarının araştırılması. İnfek Derg 2002; 16:179-182.
- 9- Fincancı M, Ulutürk R, Eren G, Konuksal C, Sander S, Soysal F, Boztaş Z. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde kromozomal beta-laktamazların araştırılması. İnfek Derg 2000; 14: 499-505.
- 10- Oldacay M, Oldacay S, Erdem G. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında kromozomal beta-laktamaz yapımı. İnfek Derg 2003; 17:197-199.
- 11- Şener AG, Karadağ H M, Güngör S, Türker M. Yoğun bakım ünitesinden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta laktamaz üretiminin araştırılması. İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi 2001; 39:15-18.
- 12- Akata F, Oktun M, Teker B, Karabay O, Öğütü A, Tuğrul M, Dündar V. Nozokomiyal Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz sıklığı. İnfek Derg 1997; 11:255-259.
- 13- Rokosz A, Sawicka-Grzelak A. Occurrence of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) and inducible beta-lactamases (IBL) in clinical strains of gram-negative rods. Med Dosw Mikrobiol 1998; 50:31-9.
- 14- Sanders CC, Sanders WE Jr. Clinical importance of inducible beta-lactamases in Gram negative bacteria. Eur J Clin Microbiol 1987; 6:435-8.
- 15- Sanders WE Jr, Sanders CC. Inducible beta-lactamases: Clinical and epidemiologic implications for use of newer cephalosporins. Rev Infect Dis 1988; 10:830-8.
- 16- Givercman B, Lambert PA, Rosdahl VT, Shand GH, Hoiby N. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed beta-lactamase producing strains. J Antimicrob Chemother 1990; 26:247-59.
- 17- Sanders CC. Inducible beta-lactamases and non-hydrolytic resistance mechanisms. J Antimicrob Chemother 1984; 13:1-3.
- 18- Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. J Med Microbiol 1995; 43:300-9.
- 19- Karakoç AE. Hastane infeksiyonu etkeni Gram-negatif bakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri ve yorumlama kriterleri. In: Arman D, Leblebicioğlu H (eds) "İnfeksiyon Hastalıklarında Tedavi Dizisi-9: Hastane İnfeksiyonu Etkeni Gram-Negatif Mikroorganizmalar ve Direnç Sorunu" Sayısı. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004: 33-48.
- 20- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare. Clin Infect Dis 2002; 34:634-40.