

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Yoğun Bakım Servisinde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci ve Metallo-Beta-Laktamaz Oranlarının Araştırılması

The Investigation of Antimicrobial Resistance and Metallo-Beta-Lactamase Production of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Intensive Care Unit Patients.

Filiz Arabacı¹, Mehmet Oldacay²

Çanakkale Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları¹ ve Mikrobiyoloji² Servisleri

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, Çanakkale Devlet Hastanesi yoğun bakım birimi hastalarından Ocak 2008-Ocak 2009 arasında izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci ve imipenem dirençli suşlarda metallo-beta-laktamaz pozitif olanların oranlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla prospektif olarak 108 *P. aeruginosa* suşunun antimikrobiyal duyarlılığına CLSI M100-S18 yöntemiyle bakılmış ve imipenem dirençli suşlarda, metallo-beta-laktamaz üretimi çift disk sinerji metodu ile araştırılmıştır.

Bulgular: İmipenem direnci 20 suşta (%18.5) saptanmış ve dirençli suşların 14'ü (%70) ise metallo-beta laktamaz pozitif olarak bulunmuştur.

Sonuç: Hastanemiz yoğun bakımında karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarında yüksek oranda metallo-beta-laktamaz yapımı bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, antimikrobiyal direnç, metallo-beta-laktamaz

SUMMARY

Objective: The aim of this study was to investigate the antimicrobial resistance and metallo-beta-lactamase production rates of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients hospitalized at intensive care unit of Çanakkale State Hospital between January 2008-January 2009.

Materials and Methods: The antimicrobial susceptibilities of 108 *P. aeruginosa* strains were evaluated prospectively according to CLSI M100-S18 guidelines and metallo-beta-lactamase production was investigated by double-disk synergy method .

Results: Imipenem resistance was found in 20 (18.5%) of the strains and 14 (70%) of imipenem resistant strains were phenotypically metallo-beta-lactamase positive.

Conclusion: These results indicated high rate of phenotypic metallo-beta-lactamase positivity in carbapenem resistant *P. aeruginosa* strains isolated in the ICU. However, this phenotypic metallo-beta-lactamase production should further be investigated to enlighten the genetic basis of carbapenem resistance in these nosocomial *P.aeruginosa* isolates.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial resistance, metallo-beta-lactamases

GİRİŞ

Beta laktam antibiyotiklerin etki mekanizması bakteri hücre duvarındaki transpeptidaz ve karboksipeptidazların inhibisyonu yoluyla, peptidoglikan sentezinin bozulmasıdır; bunun sonucunda hücre duvar yapısı bozulur, osmotik direnç kaybı ile hücre ölümü gerçekleşir. Bakteri türlerinde beta laktam antibiyotiklere direnç geliştirmenin bir yolu, beta laktamazların sentezidir. Son yıllarda farklı yeni beta laktamazlar tanımlanmış olup, bazı patojen bakterilerin çinko bağımlı beta-laktamazlar sentez ettiği gösterilmiştir. Metallo-beta-laktamazlar (MBL) adı verilen bu grup; karbapenemler dahil beta laktam antibiyotiklerin çoğunu içeren yaygın bir direnç izlenmesi, direncin horizontal geçiş potansiyelinin bulunması ve klinik kullanıma uygun inhibitörlerinin olmayışı nedeniyle tedavide sorun yaratmakta ve kaygı kaynağı oluşturmaktadır (1,2).

Bakterilerde MBL enzim genlerinin tespit edilmesi genişlemiş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) erken tespiti kadar önemlidir. Çünkü MBL pozitif bakteriler çoğu beta laktam antibiyotiklere dirençli olup, tedavi başarısızlıklarına yol açabilirler. MBL ve GSBL pozitif hastalarda, birim içi direnç yayılımını önlemek için temas izolasyonuna uyulması önerilmektedir (3-5). Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında MBL enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Uygulanan fenotipik yöntemlerin temeli EDTA'nın MBL enzimini inhibe etme özelliğine dayanmaktadır (6,7).

Bu çalışmada Çanakkale Devlet Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde (YBÜ) tedavi edilen hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antimikrobiyal direnç ve MBL yapım oranının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çanakkale Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2008-Ocak 2009 tarihleri arasında YBÜ ve Reanimasyon birimlerinden gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve klasik ve otomatize sistemle (Sensititre, ABD) tanımlanan 108 *P. aeruginosa* suşunun antibakteriyellere direnç durumu ve metallo-beta laktamaz yapımı aranmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri, CLSI M100-S18 rehberine uygun olarak otomatize sistem tarafından yapılmıştır. Kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır (8). İmipenem için MIC değeri $>32 \mu\text{g/ml}$ olan 20 adet suшта MBL araştırılmıştır.

MBL araştırılması için EDTA varlığında MBL enziminin inhibisyonu temeline dayanan bir test olan çift disk sinerji metodu kullanılmıştır. Çift disk sinerji testinde amaç imipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tespit ederek MBL pozitif bakteri izolatlarını tanımlamaktır. Bunun için saf olarak elde edilen bakterilerin 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu hazırlanmış, steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller-Hinton agar besiyerine yayılmış ve yayma üzerine imipenem (10 μg) diski yerleştirilmiştir. Ardından imipenem diskinin merkezinden 10mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirilmiştir. Boş disk üzerine 0,5 M EDTA solüsyonundan 10 μl eklenip, plaklar 35-37°C lik etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirmeye alınmıştır. İnkübasyon sonrasında imipenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilmiş ve bu genişlemenin görüldüğü bakteri izolatları MBL pozitif olarak kaydedilmiştir (7,9).

BULGULAR

İzole edilen 108 *P. aeruginosa* suşunun klinik örnekler göre dağılımı Tablo 1’de verilmiştir. Bu izolatların antibiyotik direnç oranları tablo 2’de verilmiştir. Bu tabloda da görüldüğü gibi imipenem direnci %18.5 meropenem direnci ise %22.2 olarak saptanmıştır. İmipeneme dirençli olarak saptanan 20 izolatın 14’ü (%70) çift disk sinerji metodu ile MBL pozitif bulunmuştur. MBL pozitif olan *P. aeruginosa* suşlarının 12’si balgamdan, 2’si ise kandan izole edilmiştir.

Tablo 1. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının izole edildiği klinik örnekler

Klinik örnek	Sayı
Balgam	36
İdrar	4
Katater	2
Kan kültürü	16
Trakeal aspirat	40
Yara	10
Toplam	108

Tablo 2. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç oranları

Antibiyotik	Sayı	(%)
Ampisilin	108	100
Ampisilin-Sulbaktam	103	95.4
Aztreonam	56	51.8
Amikasin	26	24.1
Seftriakson	72	66.7
Seftazidim	44	40.7
Sefotaksim	64	59.2
Sefepim	44	40.7
Gentamisin	36	33.3
Siprofloksasin	30	27.8
İmipenem	20	18.5
Meropenem	24	22.2
Piperasilin-Tazobaktam	22	20.4
Tikarsilin-Klavunat	20	18.5
Trimetoprim-Sulfometoksazol	22	20.4

TARTIŞMA

Son yıllarda artış gözlenen antibakteriyel direnç nedeniyle bakterilerin neden olduğu enfeksi-

yonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Özellikle yaşamı tehdit eden çoklu ilaç direnci gösteren gram negatif bakterilerin yol açtığı ciddi enfeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotikler son seçenek durumunda olduğu için karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır.

Dünyadaki imipenem direnç oranlarına baktığımızda *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türü bakterilerde giderek artan miktarlarda antibiyotik direnci görülmektedir. Yapılan araştırmalara göre *Pseudomonas* türleri için % 6 ile % 70 arasında değişen oranlarda imipenem direnci görülürken bu oran *Acinetobacter* türlerinde % 13 ile % 58 arasında değişmektedir (9,10).

Ülkemizde gram negatif çomaklarda direnç oranlarını irdeleyen bir derlemede çok merkezli Mystic 2003 çalışması sonuçlarına göre pseudomonaslarda meropenem direnci %39.4, Hitit 2004 çalışmasına göre imipenem direnci %27 olarak bildirilmiştir (11). Ülkemizde pseudomonaslarda MBL yapımını araştıran çalışmalar incelendiğinde, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen pseudomonaslarda imipeneme direnç %20.22 bulunmuş, dirençli suşlarda %72.2, tüm pseudomonaslarda ise %14.6 MBL pozitifliği saptanmıştır (12). Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde 2005 yılında pseudomonaslarda %15 imipenem direnci saptanmış, tüm suşlarda %5 MBL pozitifliği bildirilmiştir (13). İstanbul Şişli Etfal Hastanesinde yoğun bakımlardan izole edilen imipeneme dirençli *P. aeruginosa* suşlarında Etest ile %62.9 MBL pozitifliği bildirilmiştir (14). Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde yapılan çalışmada ise imipenem direnci %10.3 bulunmuş, imipeneme dirençli pseudomonasların %24’ünde MBL pozitifliği saptanmıştır. (15).

Dünyada MBL pozitifliği en çok uzak doğudan bildirilmekte olup, Kore’den bildirilen %60.7 oranı ve Brezilya’dan bildirilen %20 oranı dik-

kat çekicidir (16). Bir Akdeniz ülkesi olan İtalya'dan yapılan çok merkezli bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının %12.6'sında E-test ile MBL pozitifliği bulunmuştur (17).

Çalışmamızda izole edilen 108 adet *P. aeruginosa* suşunun 20'si imipeneme dirençli bulundu (%18.5 direnç). Bu dirençli suşların 14'ünde (%70) çift disk sinerji testi ile MBL pozitifliği saptandı. Tüm pseudomonas suşlarında MBL yapımı ise %13.2 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar hastanemizde yoğun bakım hastalarından izole edilen pseudomonaslarda MBL pozitifliğinin yüksek oranda olduğunu göstermektedir. En çok MBL yapımı ise balgamdan elde edilen izolatlarda izlenmiştir. Özellikle ventilatöre bağlı pnömonilerde MBL pozitifliği, hastanın tedavisini neredeyse imkânsız hale getirmektedir. Bu nedenle MBL pozitif olguların aynı metisilin dirençli stafilkoklar ve vankomisine dirençli enterokoklar gibi temas izolasyonu programına alınmaları önerilmektedir. Günlük tıp pratiğinde tarama amaçlı MBL bakılmamakta olup, antibiyotik duyarlılık testleri ile imipenem dirençli veya MIC değeri sınırdaki suşlarla karşılaşıldığında dikkatli olma zorunluluğu vardır.

İletişim / Correspondence

Dr. Filiz Arabacı
Çanakkale Devlet Hastanesi
İntaniye Servisi 17200 Çanakkale
Tel: 0505 216 87 78
e-mail: farabaci@hotmail.com

Kaynaklar

1. Bebrone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 2007; 74:1686-701.
2. Opal SM, Medeiros AA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc 2005:253-70.
3. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.
4. Payne DJ, Hueso-Rodriguez JA, Boyd H, et al. Identification of a series of, tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo-β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1880-6.
5. Yana JJ, Wub JJ, Tsaia TS, Chuang LC. Comparison of the double-disk, combined disk, and E-test methods for detecting metallo B-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2004; 49:5-11.
6. Yorgancıgil B. Beta laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1999; 6:176-82.
7. Lee KY, Chong HB, Shin YA, Yong KD, Yum JH. Modified Hodge test and EDTA disc synergy tests to screen metallo beta lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *CMI* 2001; 7:88-91.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th informational supplement: M100-S19. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
9. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic Detection of Carbapenem-susceptible Metallo B lactamase producing Gram-Negative Bacilli in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3139-44.
10. Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-Fermentative Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agent* 2007; 29 (supp3): S33-41.
11. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. *ANKEM Derg* 2005; 19(ek 2): E66-77.
12. 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. *İnfeksiyon Dergisi* 2008; 22:49-52.
13. Fidan I, Gürelık FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *ANKEM Derg* 2005; 19:68-70.
14. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli pseudomonas suşlarında metallobetalaktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34:248-52.
15. Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. *Pseudomonas* ve *acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2005; 19:101-5.
16. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 4:306-25.
17. Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R, et al. First countrywide survey of metallo-beta-lactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 10:4023-29.