

# Nozokomiyal Kökenli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Sıklığı

Görkem YAMAN\*, Aytekin ÇIKMAN\*\*, Mehmet PARLAK\*\*\*, Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU\*\*\*, Mustafa BERKTAŞ\*\*\*\*

\* Düzen Laboratuvarları, Mikrobiyoloji ve Tüberküloz Birimi

\*\* Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği

\*\*\* Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

\*\*\*\* Özel Lokman Hekim Van Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz (MBL) üretimi ile bu bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Laboratuvarımızda izole edilen ve CDC kriterlerine göre hastane infeksiyonu etkeni olarak tanımlanan, imipenem dirençli 62 *P. aeruginosa* izolatı çalışmanın gerecini oluşturdu. MBL varlığını belirlemek için kombine disk testi uygulandı. Çalışmaya alınan imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testlerinde BD Phoenix otomatize mikrobiyoloji sisteminde (Becton Dickinson, ABD) yararlanıldı.

**Bulgular:** Hastane infeksiyonu etkeni imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının kombine disk testi ile 53 (%85)'ünde MBL varlığı belirlendi. İmipenem dirençli izolatların diğer antibiyotiklere direnç oranları; amikasin %10, siprofloksasin %53, seftazidim %65, levofloksasin %68, aztreonam %84, gentamisin %90, piperasilin-tazobaktam %92, sefepim %97, piperasilin %100 olarak bulundu.

**Sonuç:** Nozokomiyal kökenli *P. aeruginosa* suşlarında MBL üretimi giderek artmaktadır. Dirençten sorumlu olan bu enzim, her laboratuvarında uygun bir fenotipik yöntemle rutin olarak saptanmalı ve rapor edilmelidir. Bu uygulama direnç yayılımının önlenmesinde ve infeksiyonların tedavisinde önemli yararlar sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Nozokomiyal infeksiyon, *Pseudomonas aeruginosa*, metallo-beta-laktamaz

## SUMMARY

**Metallo-Beta-Lactamases in Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Isolates**

**Objective:** The aim of this study was to investigate the frequency of metallo-beta-lactamases (MBL) and antibiotic susceptibility profiles of nosocomial *P. aeruginosa* strains.

**Material and Methods:** A total of 62 imipenem resistant *P. aeruginosa* isolates identified as hospital-acquired according to the CDC criteria, were included in the study. The combined disc test was performed to determine the presence of MBL. Phoenix automated antibiotic susceptibility testing system (Becton Dickinson, USA) was used for the antibiotic susceptibility testing of imipenem-resistant *P. aeruginosa* isolates included in the study.

**Results:** The presence of MBL was detected by combined disc test in 53 (85%) of the imipenem resistant nosocomial *P. aeruginosa* isolates. The rates of resistance to the other tested antibiotics among the imipenem resistant isolates were found to be: amikacin 10%, ciprofloxacin 53%, ceftazidime 65%, levofloxacin 68%, aztreonam 84%, gentamicin 90%, piperacillin-tazobactam 92%, cefepime 97% and piperacillin 100%.

**Conclusion:** MBL production gradually increases among the nosocomial *P. aeruginosa* isolates. This enzyme which is responsible for resistance to beta-lactam agents, including the carbapenems, should routinely be tested in every laboratory by appropriate phenotypical methods and results should be reported. This practice will be of great value in preventing the spread of resistant isolates and for treatment success.

**Key words:** Nosocomial infection, *Pseudomonas aeruginosa*, metallo-beta-lactamase

## GİRİŞ

Sağlıklı bireylerdeki doğal savunma mekaniz-

ması ile genellikle enfeksiyon oluşturamayan *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle hastanede yatan ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde

Alındığı tarih: 02.06.2015

Kabul tarihi: 23.10.2015

Yazışma adresi: Mehmet Parlak, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van

e-posta: mehmetparlak65@hotmail.com

mortalitenin en önemli nedenidir<sup>(1,2)</sup>. *P. aeruginosa* bilinen birçok bakteriyel direnç mekanizmalarını kullanabilme yeteneğine sahiptir<sup>(3)</sup>. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında karşılaşılan en sık direnç, beta-laktamaz enzimleri ile olmaktadır<sup>(4)</sup>. Bu enzim, beta-laktam grubu antibiyotiklerde bulunan beta-laktam halkasının amid bağların parçalayarak etki eder<sup>(5)</sup>. Bu direnç mekanizmalarının sınıflandırılmasında genellikle Ambler ve son dönemlerde Bush - Jacoby - Medeiros sınıflandırma yöntemleri kullanılmaktadır<sup>(6)</sup>. Beta-laktamaz enzimleri içerisinde yer alan metallo-beta-laktamazlar (MBL), Ambler sınıflamasına göre sınıf B, Bush sınıflamasına göre ise grup 3'te yer almaktadır. Son yıllarda bu enzimlerin plazmitlerle taşınmaya başlaması ve diğer bakterilere aktarılabilir hâle geldiğinin saptanması ile MBL'lerin klinik önemi artmıştır<sup>(7)</sup>.

MBL üreten *P. aeruginosa* ilk kez 1991 yılında Japonya'dan bildirildikten sonra dünya çapında prevalansı hızla artmaktadır<sup>(8,9)</sup>. Yetersiz ampirik tedavi sonucunda MBL üreten *P. aeruginosa* ile enfekte hastalarda ölüm oranı daha yüksek seyretmektedir<sup>(10)</sup>. Yaygın antibiyotik kullanımına bağlı olarak, bu enzimlerle oluşan direncin tedavi öncesi rutin laboratuvarlarda belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada, nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında MBL üretimi ile bu bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı direncinin belirlenmesi amaçlandı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Laboratuvarımızda Ekim 2008-Kasım 2009 tarihleri arasında izole edilen ve CDC kriterlerine göre hastane enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanan imipenem dirençli 62 *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya alındı. Bu izolatların amikasin, aztreonam, seftazidim, siprofloksasin, gentamisin, imipenem, meropenem, levofloksasin, piperasilin ve piperasilin-tazobaktama karşı direnç

oranları ile MBL üretimi araştırıldı.

Gönderilen klinik örnekler %5 koyun kanlı ve EMB agara (Oxoid Ltd., Basingstoke, Birleşik Krallık) ekilerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Kültürde üreme saptanan örneklerin koloni morfolojisi, aromatik koku varlığı ve oksidaz pozitifliği değerlendirildi. *P. aeruginosa* düşünlülen mikroorganizmaların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize mikrobiyoloji sistemi kullanılarak yapıldı.

MBL varlığını belirlemek için kombine disk difüzyon testi kullanıldı. Test edilecek bakteri, Mueller-Hinton Agara (Oxoid Ltd., Basingstoke, Birleşik Krallık) inoküle edildi. Yaklaşık olarak birbirinden 10 mm uzaklıkta olacak şekilde iki imipenem (10 µg) diski yerleştirildi. Disklerden birisinin üzerine 0.5 M EDTA'nın pH 8'de hazırlanmış solüsyonundan 10 µl eklendi. Yaklaşık 18-24 saatlik inkübasyondan sonra imipenem diski ile imipenem-EDTA'lı diskin zon çaplarında 7 mm veya daha fazla fark olması MBL pozitifliği olarak kabul edildi<sup>(11)</sup>.

## BULGULAR

*P. aeruginosa* izolatlarının elde edildiği örneklerin dağılımı; 51 (%82)'i trakea, 4 (%6)'ü yara, 3 (%5)'ü kan, 2 (%3)'si idrar, 1'i (%2) plevral mayi ve 1'i (%2) parasentez olarak bulundu. Çalışmaya alınan *P. aeruginosa* izolatlarının 53 (%85)'ünde kombine disk testi ile MBL üretimi saptandı. İmipenem dirençli izolatların diğer antibiyotiklere direnç oranları ise sırasıyla; amikasin %10, siprofloksasin %53, seftazidim %65, levofloksasin %68, aztreonam %84, gentamisin %90, piperasilin-tazobaktam %92, sefepim %97 ve piperasilin %100 bulundu.

## TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonu etkeni mikroorganizmaların

antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç, dünya genelinde önemli bir sorun oluşturmuştur. Son yıllarda artan oranlarda gözlenen antibakteriyel direnç nedeniyle *P. aeruginosa* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır<sup>(2)</sup>. En geniş spektrumlu beta-laktam grubu antibiyotiklerden olan karbapenemler, ampirik tedavide yaygın kullanımının sonucu olarak direnç oranları artmaktadır<sup>(7)</sup>. Türkiye’de *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem grubu antibiyotiklerden imipenem direnç oranlarının yıllar içerisinde giderek arttığı gözlenmektedir. Bu direnç oranı 1995-2001 yılları arasında %17, 2002-2005 yılları arasında %37, 2009-2012 yılları arasında %53, 2012-2013 yılları arasında ise %56 olarak bildirilmiştir<sup>(12-14)</sup>.

*P. aeruginosa* karbapenemlere karşı yüksek direnç kazanma potansiyeline sahiptir. Bu bakteriye bağlı enfeksiyonların tedavisinde doğru antibiyotik seçimi ve uygun kombinasyonda yeterli süre kullanımı önemlidir. Bu nedenle nozokomiyal *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında direnç profilinin saptanması amacıyla antibiyotik duyarlılık testi uygulanması gereklidir. Ülkemizde bu amaçla yapılan çalışmalarda Üstün ve ark.<sup>(15)</sup> karbapenem dirençli 75 *P. aeruginosa* izolatındaki direnç oranlarını; siprofloksasin %60, amikasin %61, seftazidim %89, gentamisin ve sefepim %93, piperasilin %96 ve aztreonam %100 olarak tespit etmişlerdir. İmipenem dirençli izolatlar ile yapılan başka bir çalışmada ise direnç oranları; seftazidim %16, amikasin %56, piperasilin-tazobaktam %81, aztreonam %84, sefepim %92 ve siprofloksasin ile gentamisin %97 olarak saptanmıştır<sup>(16)</sup>. Çalışmada elde ettiğimiz direnç oranları ülkemiz verileri ile benzerlik göstermektedir. Ancak, düşük saptadığımız amikasin direnci bölgemizde daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu bulunmuştur<sup>(17)</sup>. Bu farklılığın hastanelerdeki antibiyotik kullanım politikaları ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Birçok çalışmada olduğu gibi

seftazidim direnç oranımız yüksek bulunmuştur. Ancak, bölgesel antibiyotik kullanımına bağlı olarak düşük oranlarda seftazidim direnci bildirilen çalışmalar da bulunmaktadır.

*P. aeruginosa* birçok antibiyotiğe doğal dirençli olmakla birlikte, uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlı çoklu dirençli izolatlar ortaya çıkabilmektedir. Bu direnç mekanizmalarının en önemlilerinden birisi beta-laktamazların salınmasıdır<sup>(16)</sup>. Bunlar arasında MBL enzim üretimine bağlı direnç artmaktadır. MBL, diğer beta-laktamazlardan farklı olarak karbapenem grubu antibiyotikler üzerine etkili olmakla birlikte, monobaktamları hidrolize edememektedir. EDTA ve dipikolinik asit gibi şelasyon yapan ajanlarla inhibe olan MBL, aktiviteleri için çinko iyonlarına gereksinim duyarlar<sup>(18)</sup>. MBL üreten izolatlar son birkaç yılda dünya genelinde hızla artmaktadır. Bu nedenle MBL üreten *P. aeruginosa* izolatların belirlenmesi ve yayılımının önlenmesi önem taşımaktadır<sup>(19)</sup>. Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatlarında özellikle karbapenem direncinden sorumlu olabilecek MBL enzim oranı kombine disk testi ile %85 olarak bulunmuştur. Kombine disk yöntemiyle Albayrak ve ark.<sup>(18)</sup> %77, Bucak ve ark.<sup>(20)</sup> %80, Gayyurhan ve ark.<sup>(21)</sup> %72 Tetik ve ark.<sup>(22)</sup> %62 ve Altöparlak ve ark.<sup>(23)</sup> %55 oranında MBL pozitifliği tespit etmişlerdir. Yurt dışı kaynaklı çalışmalarda karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatları için yüksek oranda MBL üretimi bildirilmektedir<sup>(24-27)</sup>. Bogiel ve ark.<sup>(25)</sup> %72.9, Scheffer ve ark.<sup>(26)</sup> %62 ve Mereută ve ark.<sup>(27)</sup> ise %41.3 oranında MBL pozitifliği saptamışlardır. Kombine disk yöntemiyle elde ettiğimiz MBL pozitifliği son zamanlarda yapılan çalışmalara benzer şekilde yüksek bulunmuştur.

Tedavilerinde karbapenem antibiyotiklerin tercih edildiği enfeksiyonlarda etkeni izole etmek kadar etkenin karbapenemaz ve MBL üretimini basit ve güvenilir bir laboratuvar metoduyla

tespit etmek de önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak, nozokomiyal kökenli *P. aeruginosa* izolatlarında MBL üretimi giderek artmaktadır. Direnç profilinden sorumlu ve epidemiyolojik açıdan önemli olan bu enzim, her laboratuvarında uygun bir fenotipik yöntemle rutin olarak saptanmalı ve rapor edilmelidir. Bu uygulama direnç yayılımının önlenmesinde ve enfeksiyonların tedavisinde önemli yararlar sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. **Blondel-Hill E, Henry DA, Speert DP.** Pseudomonas. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH: Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> edition. Washington, DC: ASM Press, 2007:734-48.
2. **Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND.** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:582-610. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
3. **Strateva T, Yordanov D.** *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 2009; 58:1133-48. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
4. **Aktaş AE, Yiğit N, Kayserili F, Ayyıldız A.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo beta laktamaz üretiminin araştırılması. *Infeks Derg* 2009; 23:57-62.
5. **Er H, Altunış M, Aşık G, Demir C.** Seftazidime dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında beta-laktamazların moleküler epidemiyolojisi. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:156-65. <http://dx.doi.org/10.5578/mb.8901>
6. **Rice LB, Sahm D, Bonomo RA.** Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology, 8<sup>th</sup> edition. Washington, DC: ASM Press, 2003: 1074-101.
7. **Nordmann P, Poirel L.** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8:321-31. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x>
8. **Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL.** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3129-35. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005>
9. **Samuelsen O, Buaro L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A.** Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:827-30. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn016>
10. **Qu TT, Zhang JL, Wang J, et al.** Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1136-42. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01592-08>
11. **Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HS, Rossolini GM, Chong Y.** Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3798-801. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.10.3798-3801.2002>
12. **Willke-Topçu A.** Çoklu dirençli Gram negatif basiller ve enfeksiyonlar: Ülkemizde direnç durumu. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongre kitabı, Antalya: Türkiye. 2007; 201-3.
13. **İnce N, Geyik MF, Özdemir D, Öksüz Ş, Danış A.** Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılması. *ANKEM Derg* 2014; 28:94-9. <http://dx.doi.org/10.5222/ankem.2014.094>
14. **Köse Ş, Atalay S, Ödemiş İ, Adar P.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2014; 28:100-4.
15. **Üstün C.** Hastane kökenli karbapenem dirençli ve duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları. *ANKEM Derg* 2010; 24:1-6
16. **Yücesoy-Dede B.** Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıkları [Tıpta Uzmanlık Tezi] İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2006.
17. **Berktaş M, Çıkman A, Parlak M, Yaman G, Güdücüoğlu H.** Nozokomiyal kökenli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotiklere direnç. *Van Tıp Derg* 2011; 18:192-6.
18. **Albayrak GT.** Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde çift disk sinerji testi ve kombine çift disk sinerji ile metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması [Tıpta Uzmanlık Tezi]. İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2008.
19. **Fidan I, Çetin Gürelik F, Yüksel S, Sultan N.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *ANKEM Derg* 2005; 19:68-70.
20. **Bucak Ö, Taş T, Koçoğlu E, Karabörk Ş.** *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2014; 44:23-7.
21. **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. *Infeks Derg* 2008; 22:49-52.
22. **Tetik T.** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen gram negatif nonfermenter bakterilerde metallo beta laktamaz enzim aktivitesinin araştırılması [Tıpta Uzmanlık Tesi]. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2008.
23. **Altöparlak U, Aktaş F, Çelebi D, Özkurt Z, Akçay MN.** Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns*

2005;31:707-10.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2005.02.017>

24. **Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF, Elkhizzi NA, Livermore DM.** Extended-spectrum and metallo-beta-lactamases among ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Riyadh, Saudi Arabia. *J Chemother* 2012; 24:97-100.  
<http://dx.doi.org/10.1179/1120009X12Z.00000000015>
25. **Bogiel T, Deptuła A, Gospodarek E.** Evaluation of different methods for detection of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Pol J Microbiol* 2010; 59:45-8.

26. **Scheffer MC, Bazzo ML, Steindel M, Darini AL, Clímaco E, Dalla-Costa LM.** Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:367-71.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000400006>
27. **Mereuță AI, Tuchiluş C, Bădescu AC, Iancu LS.** Metallo-beta-lactamase-mediated resistance among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2011; 115:1208-13.