

Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçlarının EUCAST ve CLSI Sınır Değerlerine Göre Karşılaştırılması ve Metallo Beta Laktamaz Varlığının Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

Comparison of Antimicrobial Susceptibility of Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Isolates According to EUCAST and CLSI Breakpoints and Investigation of the Existence of Metallo Beta Lactamase by Phenotypic Methods

Sulhiye Aslan*, Gülgün Yenişehirli*, Bahise Çağla Taşkın Dalgıç**, Aydan Yenişehirli***

* Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye

** Turhal Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tokat, Türkiye

*** Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye

Atf/Cite as: Aslan S, Yenişehirli G, Taşkın Dalgıç BÇ, Yenişehirli A. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının EUCAST ve CLSI sınır değerlerine göre karşılaştırılması ve metallo beta laktamaz varlığının fenotipik yöntemlerle araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg. 2022;52(3):175-183.

Öz

Amaç: Yüksek morbidite ve mortaliteleri nedeniyle nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları ciddi sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Antimikrobiyal direnç oranlarının artması tedavi seçeneklerinin kısıtlanmasına yol açmaktadır. Bu çalışmanın amacı, hastanemizden izole edilen 250 nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatında antimikrobiyal direnç durumlarının EUCAST-2022 ve CLSI-2022 sınır değerlerine göre karşılaştırılmasının yanı sıra metallo-beta-laktamaz (MBL) aktivitesi varlığının da farklı fenotipik yöntemlerle değerlendirilmesidir.

Yöntem: *Pseudomonas aeruginosa* izolatının antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapıldı. Sonuçlar EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ve CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) standartlarına göre değerlendirildi. Karbapenem dirençli izolatlarda metallo-beta-laktamaz (MBL) üretimi, çift disk sinerji testi, kombine disk difüzyon testi ve modifiye hodge testi kullanılarak araştırıldı.

Bulgular: Çalışmamızda, nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatları en fazla solunum yolundan, ikinci sıklıkta idrardan izole edilmiştir. Test edilen antibiyotikler içinde *P. aeruginosa* izolatlarının en duyarlı olduğu antibiyotik EUCAST-2022 kriterlerine göre seftazidim-avibaktam (%96), CLSI-2022 kriterlerine göre seftolozan-tazobaktam (%95.2). EUCAST ve CLSI kriterlerine göre belirlenen duyarlılık durumları karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa* izolatlarının EUCAST kriterlerine göre amikasin'e daha duyarlı; siprofloksasin, levofloksasin, tikarsilin-klavulonik asit, sefepim, aztreonam, imipenem ve doripenem'e daha dirençli olduğu belirlendi. EUCAST kriterlerine göre belirlenen çoklu ilaç direnci (%98), CLSI kriterlerine göre belirlenen çoklu ilaç direncinden (%36) yüksek bulundu. Nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarının MBL pozitifliği kombine disk difüzyon testi ile %36.8, çift disk sinerji testi ile %38.2 ve modifiye hodge testi ile %36.8 olarak tespit edildi. Diğer yandan MBL üretimini saptayabilmeleri yönünden testler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç: EUCAST kriterlerine göre değerlendirildiğinde, nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında siprofloksasin, levofloksasin, tikarsilin-klavulonik asit, sefepim, aztreonam, imipenem ve doripenem direnç oranları daha yüksektir. MBL üretiminin ve çoklu ilaç direnci sıklığının nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında yaygın olarak görülmesi, tedavi seçeneklerinin önemli ölçüde kısıtlanmasına yol açmaktadır. Tedavide uygun antimikrobiyal ajanın seçimi, direnç gelişiminin ve yayılımının yakın takibi için antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasının yanı sıra fenotipik yöntemlerle MBL varlığının da araştırılması oldukça önemlidir.

Alındığı tarih / Received:

18.01.2022 / 18.January.2022

Kabul tarihi / Accepted:

01.06.2022 / 01.June.2022

Erken çevrimiçi / First Published:

01.09.2022 / 01.September.2022

ORCID Kayıtları

S. Aslan 0000-0003-0210-5597

G. Yenişehirli 0000-0001-7030-0752

B. Ç. Taşkın Dalgıç 0000-0002-1271-7522

A. Yenişehirli 0000-0003-0824-917X

✉ gulgun.yenisehirli@gop.edu.tr

Anahtar kelimeler: Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa*, antimikrobiyal duyarlılık, EUCAST, CLSI, metallo-beta-laktamaz aktivitesi

ABSTRACT

Objective: Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections are accepted a serious healthcare problem with a high morbidity and mortality rates. Therapeutic options are restricted increasingly due to the development of resistance. The purpose of this study was to compare the antimicrobial resistance status of 250 nosocomial

Pseudomonas aeruginosa isolates from our hospital according to EUCAST-2022 and CLSI-2022 breakpoints and also evaluate the presence of metallo-beta-lactamase (MBL) activity by different phenotypic methods.

Methods: Antibiotic susceptibility testing of 250 nosocomial *P. aeruginosa* isolates were performed using disc diffusion method. The results were evaluated according to EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) and CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) criteria. MBL production of carbapenem resistant isolates were screened by double disk synergy test, combined disk diffusion test and modified hodge test.

Results: In our study, nosocomial *P. aeruginosa* isolates were most frequently isolated from respiratory tract samples, followed by urine samples. Among the tested antibiotics, nosocomial *P. aeruginosa* isolates were most sensitive to ceftazidime-avibactam (96%) according to EUCAST-2022 criteria, and ceftolozane-tazobactam (95.2%) according to CLSI-2022 criteria. When the susceptibility profiles of *P. aeruginosa* isolates were compared according to EUCAST and CLSI criteria; the higher resistance rates for ciprofloxacin, levofloxacin, ticarcillin-clavulanic acid, ceftipime, aztreonam, imipenem and doripenem were observed according to EUCAST-2022 criteria. In contrast amikacin resistance rate was found to be lower according to CLSI-2022 criteria. MDR (98%) determined according to EUCAST-2022 criteria was found to be higher than MDR determined according to CLSI-2022 criteria (36%). MBL positivity was found to be 36.8% with the combined disc diffusion test, 38.2% with the double disc synergy test and 36.8% with the modified Hodge test. In terms of MBL production, we didn't observe any statistical significance between the phenotypic methods.

Conclusion: When evaluated according to EUCAST-2022 criteria, resistance rates of ciprofloxacin, levofloxacin, ticarcillin-clavulanic acid, ceftipime, aztreonam, imipenem and doripenem are higher in nosocomial *P. aeruginosa* isolates. Increased MBL production and multi drug resistance in nosocomial *P. aeruginosa* isolates result in significant limitation of treatment options. Besides the antimicrobial susceptibility testing, phenotypic MBL screening methods must be performed for the selection of the appropriate antimicrobial therapy and for the close monitoring the development and spread of resistance.

Keywords: Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial susceptibility, EUCAST, CLSI, metallo-beta-lactamase activity

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa doğada yaygın olarak bulunan, hastane ortamında yaşayabilen non-fermentatif bir bakteridir. Nozokomiyal enfeksiyonların %11-13.8'inden, yoğun bakım ünitesinde görülen nozokomiyal enfeksiyonların ise %13.2-22.6'sından sorumlu olduğu bildirilmektedir. Pnömoni başta olmak üzere, idrar yolu enfeksiyonu, kan dolaşımı enfeksiyonu, yara enfeksiyonu, yanıklı hastalarda deri enfeksiyonu gibi çeşitli klinik tablolara yol açabilmektedir⁽¹⁾. *P. aeruginosa* beta laktamların çoğuna, eski kinolonlara, kloramfenikole, tetrasikline, makrolidlere, trimetoprim-sülfametoksazole ve rifampine doğal olarak dirençlidir. Birçok antimikrobiyal ilaca doğal dirençli olmasının yanı sıra tedavi sırasında hızlı ve yüksek oranda direnç geliştirebilmesi etken olduğu enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. Bu nedenle *P. aeruginosa* izolatlarının antibakteriyel duyarlılık durumlarının yakın takibi gerekmektedir⁽²⁾. Antimikrobiyal direnç durumlarının yorumlanması EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ya da CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) sınır değerleri dikkate alınarak yapılmaktadır^(3,4). EUCAST ve CLSI standartlarında önerilen sınır değerlerin birbirinden farklı olması, test edilen bakterinin duyarlılık durumunun kullanılan standarda göre farklılık göstermesine neden olabilmektedir.

Beta-laktam antibiyotikler tüm dünyada hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için en yaygın kullanılan ve en güvenilir kabul edilen antimikrobiyal ajanlardır⁽⁵⁾. Beta-laktam antibiyotiklerden olan karbapenemler çoklu dirençli *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkili antibiyotikler olarak kabul edilmektedirler. Beta-laktamaz üretimi beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminden sorumlu antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu en yaygın mekanizmadır. Metallo beta laktamazlar (MBL), karbapenemleri ve diğer beta-laktamları (monobaktamlar hariç) hidrolize ederek inaktive ederler⁽⁶⁾. Metallo beta laktamazlar (MBL), plazmidler aracılığıyla taşınarak diğer bakterilere aktarılabilmesinden dolayı klinik açıdan önem taşımaktadır⁽⁷⁾. MBL üreten *P. aeruginosa* izolatları tüm dünyada tedavisi güç nozokomiyal enfeksiyonlara yol açmakta ve salgınlara neden olmaktadır⁽⁸⁾. *P. aeruginosa* izolatlarında direnç yayılımını önlemek ve dirençli izolatların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde yeni tedavi stratejilerini belirleyebilmek için, antibiyotik direnç durumunun takibi ve direnç mekanizmalarının aydınlatılması önemlidir. MBL aktivitesinin saptanmasında en güvenilir ve en etkin yöntem MBL üretimine yol açan genlerin moleküler yöntemlerle saptanmasıdır. Bununla birlikte, fenotipik yöntemlere göre daha pahalı ve daha az pratik olmaları nedeniyle kullanımları kısıtlıdır⁽⁹⁾.

Bu çalışmada, hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının antimikrobiyal direnç durumlarının EUCAST-2022 ve CLSI-2022 sınır değerlerine göre karşılaştırılmasının yanı sıra metallo-beta-laktamaz (MBL) aktivitesi varlığının da farklı fenotipik yöntemlerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlığı, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (17.02.2022 tarih ve 22-KAEK-030 Karar No.) onaylanmıştır.

Çalışmaya Ekim 2019-Şubat 2022 yılları arasında hastanemiz Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 250 *P. aeruginosa* izolatu dâhil edilmiştir. Nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak çeşitli klinik örneklerden izole edilen 250 *P. aeruginosa* izolatının tanımlanması için koloni morfolojisinin değerlendirilmesi, Gram

boyama ve oksidaz testinin yanı sıra VITEK-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistem kullanılmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri Disk Difüzyon Yöntemi kullanılarak yapıldı ve EUCAST-2022 ve CLSI-2022 standartlarına göre değerlendirildi^(3,4) (Tablo 1). Kontrol suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı.

Karbapenem dirençli izolatlarda MBL üretimi, çift disk sinerji testi, kombine disk difüzyon testi ve modifiye hodge testi kullanılarak araştırıldı. EUCAST önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile imipenem (10 µg) veya meropenem (10 µg) diskleri etrafındaki inhibisyon zon çapları imipenem için < 20 mm ise meropenem için < 14 mm ise dirençli kabul edildi.

Çift Disk Sinerji Testi: Taze kültürden alınan bakteri kolonileri steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanarak Mueller-Hinton Agar besiyeri yüzeyine plağın her tarafına eşit olacak şekilde ekim yapıldı. Birer adet imipenem (10 µg) ve boş disk (blank) aralarında 15 mm olacak

Tablo 1. *Pseudomonas aeruginosa* izolatları için kullanılan EUCAST 2022 ve CLSI 2022 sınır değerleri (mm)

Antibiyotik	EUCAST		CLSI	
	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Amikasin	≥ 15	< 15	≥ 17	≤14
Tobramisin	≥ 18	< 18	≥ 15	≤12
Siprofloksasin	≥ 50	< 26	≥ 25	≤18
Levofloksasin	≥ 50	< 18	≥ 22	≤14
Piperasilin	≥ 50	< 18	-	-
Tikarsilin	≥ 50	< 18	-	-
Piperasilin-tazobaktam	≥ 50	< 18	-	-
Tikarsilin-klavulonikisit	≥ 50	< 18	≥ 24	≤15
Sefepim	≥ 50	< 21	≥ 18	≤14
Seftazidim	≥ 50	< 17	-	-
Seftazidim-avibaktam	≥ 17	< 17	-	-
Seftolozan-tazobaktam	≥ 23	< 23	≥ 21	≤16
Aztreonam	≥ 50	< 18	≥ 22	≤15
İmipenem	≥ 50	< 20	≥ 19	≤15
Meropenem	≥ 20	< 14	≥ 19	≤15
Doripenem	≥ 50	< 22	≥ 19	≤15

şekilde besiyerine yerleştirildi. Daha sonra boş disk üzerine 10 µL 0.5 M EDTA eklendi. 36±1°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında imipenem diskinden boş diske doğru inhibisyon zonunda düzensizleşme var ise MBL pozitif kabul edildi⁽¹⁰⁾.

Kombine Disk Difüzyon Testi: Taze kültürden alınan bakteri kolonileri steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanarak Mueller-Hinton Agar besiyeri yüzeyine plağın her tarafına eşit olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra iki adet imipenem (10 µg) diski yerleştirildi. Disklerin bir tanesine 0.5 M EDTA solüsyonundan 10 µL pipetle damlatıldı. 36±1°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. EDTA damlatılan imipenem diskinin çevresindeki zon çapı, EDTA'sız imipenem diskinin zon çapından en az 7 mm daha büyük ise MBL pozitif kabul edildi⁽¹⁰⁾.

Modifiye Hodge Testi: Taze kültürden alınan *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu hazırlandı. Steril plastik tüp içerisinde 100 µl bakteri süspansiyonu ve 900 µl SF olacak şekilde 1/10 bulanıklığında yeni bir süspansiyon hazırlandı ve hazırlanan bu süspansiyon Mueller-Hinton Agar besiyeri yüzeyine her tarafta eşit olacak şekilde yayıldı. Plağın ortasına imipenem (10 µg) diski yerleştirildi. Test izolatları bu diskin dört bir kenarından periferine doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekildi. 36±1°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında diskin etrafındaki zon çapı yonca yaprağı görünümünde ise MBL pozitif olarak değerlendirildi⁽¹¹⁾.

Sonuçların istatistiksel analizi Student's t test kullanılarak yapılmıştır. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada, nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatları en fazla solunum yolundan, ikinci sıklıkta idrardan izole edilmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Nozokomiyal enfeksiyon etkeni *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı

Klinik Örnek	Sayı	%
Solunum yolu	107	42.8
İdrar	57	22.8
Yara yeri	52	20.8
Kan	31	12.4
Steril vücut sıvısı	3	1.2
Toplam	250	100.0

Nozokomiyal enfeksiyon etkeni *P. aeruginosa* izolatlarının EUCAST-2022 ve CLSI-2022 sınır değerlerine göre belirlenen antibiyotik direnç durumları Tablo 2'de sunulmuştur. Elde ettiğimiz sonuçları EUCAST-2022 kriterlerine göre değerlendirdiğimizde, test edilen antibiyotikler içinde *P. aeruginosa* izolatlarının en duyarlı olduğu antibiyotik seftazidim-avibaktam, en az duyarlı olduğu antibiyotik piperasilin ve sefepim olarak saptandı. CLSI-2022 kriterlerine göre değerlendirildiğinde ise, en yüksek duyarlılık oranı seftozolan-tazobaktamda gözlemlendi. EUCAST-2022 ve CLSI-2022 kriterlerine göre belirlenen duyarlılık durumları karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa* izolatlarının EUCAST kriterlerine göre amikasine daha duyarlı; siprofloksasin, levofloksasin, tikarsilin-klavulonik asit, sefepim, aztreonam ve imipeneme daha dirençli olduğu belirlendi ($p<0.005$) (Tablo 3).

İzolatların penisilin, sefalosporin, monobaktam, karbapenem, florokinolon ve aminoglikozid grubu antibiyotiklerden en az üç veya daha fazla grup antibiyotiğe orta düzey dirençli veya dirençli olması "çoklu ilaç direnci (MDR)" olarak kabul edildi. Çalışmamızda, 2022-EUCAST kriterlerine göre belirlenen çoklu ilaç direnci (%98), CLSI kriterlerine göre belirlenen çoklu ilaç direncinden (%36) yüksek bulundu ($p<0.005$).

Karbapenem dirençli olarak bulunan 68 *P. aeruginosa* izolatının çift disk sinerji testine göre 26'sı (%38.2), kombine disk difüzyon testine göre 25'i (%36.8), modifiye hodge testine göre 25'i (%36.8) MBL

Tablo 3. Nozokomiyal enfeksiyon etkeni *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının EUCAST 2022 ve CLSI 2022 sınır değerlerine göre antimikrobiyal duyarlılık durumları

Antibiyotik	EUCAST						CLSI						p
	Duyarlı (Standart Doz)		Duyarlı (Yüksek Doz)		Dirençli		Duyarlı		Orta Dirençli		Dirençli		
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Amikasin	229	91.6	-	-	21	8.4	203	81.2	26	10.4	21	8.4	<0.001
Tobramisin	199	79.6	-	-	51	20.4	214	85.6	-	-	36	14.4	>0.05
Siprofloksasin	45	18	135	54	70	28	191	76.4	9	3.6	50	20	<0.001
Levofloksasin	24	9.6	171	68.4	55	22	169	67.6	36	14.4	45	18	<0.001
Piperasilin	2	0.8	124	49.6	124	49.6	-	-	-	-	-	-	-
Tikarsilin	16	6.4	156	62.4	78	31.2	-	-	-	-	-	-	-
Piperasilin-tazobaktam	15	6	161	64.4	74	29.6	-	-	-	-	-	-	-
Tikarsilin-klavulonikası	20	8	160	64	70	28	68	27.2	111	44.4	71	28.4	<0.001
Sefepim	2	0.8	123	49.2	125	50	166	66.4	29	11.6	55	22	<0.001
Seftazidim	5	2	171	68.4	74	29.6	-	-	-	-	-	-	-
Seftazidim-avibaktam	240	96	-	-	10	4	-	-	-	-	-	-	-
Seftolozan-tazobaktam	227	90.8	-	-	23	8.2	238	95.2	5	2	7	2.8	>0.05
Aztreonam	22	8.8	206	82.4	22	8.8	198	79.2	37	14.8	15	6	<0.001
İmipenem	17	6.8	165	66	68	27.2	188	75.2	10	4	52	20.8	<0.001
Meropenem	193	77.2	37	14.8	20	8	195	78	16	6.4	39	15.6	>0.05
Doripenem	34	6.8	148	66	68	27.2	193	77.2	19	7.6	38	15.2	<0.001

Tablo 4. MBL Test Sonuçları

Yöntem	Pozitif		Negatif		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Çift Disk Sinerji	26	38.2	42	61.8	68	100
Kombine Disk Difüzyon	25	36.8	43	63.2	68	100
Modifiye Hodge	25	36.8	43	63.2	68	100

pozitif olarak saptandı. En fazla pozitiflik oranı çift disk sinerji testi (%38.2) ile bulunurken, MBL üretimin saptayabilmeleri yönünden testler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. ($p>0.05$) (Tablo 4).

TARTIŞMA

Çalışmamızda, nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatları en fazla solunum yolu örneklerinden (%42.8), ikinci sıklıkta idrar örneklerinden (%22.8) izole edildi. Benzer şekilde ülkemizden Erdoğan ve ark.⁽¹²⁾ çalışmalarına dâhil ettikleri 468 nozokomiyal

P. aeruginosa izolatının %51.7'si solunum yolu örneğidir. İnce ve ark.⁽¹³⁾ hastane enfeksiyonu olarak bildirdikleri *P. aeruginosa* suşlarının %49.1'ini solunum yolu örneklerinden izole etmişlerdir. 1997-2016 yıllarını arasında yapılan Avrupa, Latin ve Kuzey Amerika ile Asya-Pasifik bölgelerini kapsayan sörveyans araştırmasında, hastane enfeksiyonu olarak izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının en sık pnömoni olgularından izole edildiği bildirilmiştir⁽¹⁴⁾.

Çalışmamızda, EUCAST-2022 ve CLSI-2022 kriterlerine göre belirlenen duyarlılık durumları karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa* izolatlarının EUCAST kriterlerine göre amikasinine daha duyarlı;

siprofloksasin, levofloksasin, tikarsilin-klavulonik asit, sefepim, aztreonam, imipenem ve doripenem daha dirençliydi. Genç-Bahçe ve ark.⁽¹⁵⁾ kan kültürlerinden izole ettikleri *P. aeruginosa* izolatlarında aztreonam direncinin EUCAST kriterlerine göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Maçin ve ark.⁽¹⁶⁾ klinik örneklerden izole ettikleri bakterilerin antibiyotik duyarlılık durumlarını EUCAST ve CLSI kriterlerine göre değerlendirmiş, *P. aeruginosa* izolatlarında gentamisin, seftazidim, sefepim, meropenem sonuçları arasında fark saptamamışlardır. Çalışmamızda, EUCAST kriterlerine göre direnç oranlarımızın daha yüksek olması, EUCAST-2022 kriterlerinde antibiyotik diski zon çapı aralıklarının genişletilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sefepim ve seftazidimin, *P. aeruginosa* izolatlarının etken olduğu nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde etkin bir antibiyotik olduğu bilinmektedir⁽¹⁷⁾. Çalışmamızda, CLSI ve EUCAST kriterlerine göre sırasıyla sefepim direncini %22 ve %50, seftazidim direncini EUCAST sınır değerine göre %29.6 olarak belirledik. Solunum yolundan izole ettiğimiz *P. aeruginosa* izolatlarında sefepim direncini EUCAST (%54.2) ve CLSI (%22.4) kriterlerine göre değerlendirdiğimizde, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptadık ($p<0.005$). Çeken ve ark.⁽¹⁸⁾ yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole ettikleri *P. aeruginosa* izolatlarında sefepim direncini %28.1, seftazidim direncini %29.4 olarak bildirmişlerdir. 1997-2016 yıllarını kapsayan, çok merkezli sürveyans çalışmasında, hastanede yatan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında; sefepim ve seftazidim için en düşük direnç oranları Kuzey Amerika, en yüksek direnç oranları da Latin Amerika'dan bildirilmiştir⁽¹⁴⁾. Son yıllarda çoklu dirençli Gram negatif bakterilerin tedavisinde iki yeni seçenek ortaya çıkmıştır. Bunlardan biri beta laktamaz inhibitörü avibaktamın geniş spektrumlu bir sefalosporin olan seftazidime eklenmesiyle seftazidim-avibaktam kombinasyonu, diğeri de seftolozan-tazobaktam kombinasyonudur^(19,20). Seftolozan yeni bir sefalosporindir ve tazobaktam ile kombine edildiğinde *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkili betalaktam antibiyotik olduğu bildirilmiştir⁽¹⁾. Çalışmamızda, antibiyotik disk zon çaplarını EUCAST-2022 kriterlerine göre değerlendirdiğimizde, *P. aeruginosa* izolatlarının en duyarlı olduğu

antibiyotik seftazidim-avibaktam (%96), CLSI kriterlerine göre en duyarlı olduğu antibiyotik seftolozan-tazobaktam (%95.2). Solunum yolundan izole edilen 107 izolatın 10'u (%9.3) EUCAST kriterlerine göre seftolozan-tazobaktama dirençli bulunurken, CLSI kriterlerine göre yalnızca iki (%1.9) izolat seftolozan-tazobaktam dirençli olarak saptandı.

Bu çalışmada, nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında CLSI-2022 ve EUCAST-2022 kriterlerine göre sırasıyla amikasin direnci %8.4 ve %8.4, tobramisin direnci %14.4 ve %20.4 olarak bulundu. Ülkemizden yapılan çeşitli çalışmalarda, Mansur ve ark. nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında amikasin direncini %6, tobramisin direncini %10 olarak bildirmişlerdir⁽²¹⁾. Uludağ Altun ve ark.⁽²²⁾ çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *P. aeruginosa* izolatlarında amikasin direncinin %9, tobramisin direncinin %11 olduğunu açıklamışlardır. Çok merkezli sürveyans çalışmasında amikasin duyarlılığı %90.5 olarak bulunmuştur⁽¹⁴⁾.

Geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklerden olan karbapenemler, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan etkin ilaçlardandır⁽¹⁾. Bununla birlikte, karbapenemlerin yaygın kullanımı karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının görülmesine ve tedavi seçeneklerinin kısıtlanmasına yol açmaktadır^(1,20). Çalışmamızda, EUCAST-2022 kriterlerine göre imipenem ve doripenem direncini %27.2, meropenem direncini %8 olarak bulduk. Hastane enfeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* izolatlarında imipenem ve meropenem direncini İnce ve ark. sırasıyla %48 ve %56 olarak bildirmişlerdir⁽¹³⁾. Hazirolan ve ark.⁽²³⁾ nozokomiyal enfeksiyon etkeni *Pseudomonas* türlerinde imipenem direncini %61.8 bulmuşlardır. Latin Amerika'da 2002-2013 yılları arasında nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatları üzerine yapılan tüm çalışmaların toplandığı bir derlemede, *P. aeruginosa* izolatlarında imipenem direncinin %57, meropenem direncinin %52'ye ulaştığı rapor edilmiştir⁽²⁴⁾. *P. aeruginosa* izolatlarında meropenem direncinin Kuzey Amerika'da en düşük, Latin Amerika'da en yüksek olduğu bildirilmiştir⁽¹⁴⁾.

Çalışmamızda, nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında EUCAST-2022 kriterlerine göre çoklu ilaç direnci (%98) olarak belirlendi. Çoklu direnç

oranımızın yüksek bulunması temel aldığımız EUCAST-2022 kriterlerindeki antibiyotik diski zon çapı aralıklarının genişletilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

MBL üreten bakterilerin erken tanısı ve yayılmasının kontrol altına alınması önemlidir. MBL üretiminin saptanmasında altın standart yöntem MBL üretiminden sorumlu genlerin polimeraz zincir reaksiyonu ve sekans analizi gibi moleküler tekniklerle tespit edilmesidir. Fakat bu yöntemlerin özel ekipman gerektirmeleri, pahalı ve zaman alıcı olmaları nedeniyle laboratuvarların rutin işlemleri içinde yer almaları çoğu zaman mümkün olamamaktadır⁽²⁵⁾. Bunun için mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan basit birçok fenotipik yöntem vardır. IMP-EDTA çift disk sinerji testi, IMP-EDTA kombine disk testi, modifiye hodge testi, E-Test metallo beta-laktamaz saptanmasında kullanılan tarama testleridir⁽⁸⁾. Çalışmamızda, disk difüzyon yöntemiyle karbapenem direnci tespit edilen 68 *P. aeruginosa* izolatında çift disk sinerji testi ile %38.2, kombine disk difüzyon testi ile %36.8 ve modifiye hodge testi ile %36.8 oranında MBL varlığı saptandı ve üç yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Ülkemizden Aksoy ve Tuğrul⁽²⁶⁾; 35 *P. aeruginosa* izolatında çift disk sinerji testi ile %42.8, kombine disk difüzyon testi ile %94.2, E-Test ile %54.2 oranında MBL pozitifliği saptarken, Modifiye hodge testi ve genotipik yöntem ile MBL direnci saptamamışlardır. Yaman ve ark.⁽²⁷⁾ hastane enfeksiyonu etkeni imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının kombine disk testi ile 53 (%85)'ünde MBL varlığı belirlemişlerdi. Ülkemizde 2020 yılında yapılan bir başka çalışmada, karbapenem dirençli 57 *P. aeruginosa* suşunda kombine disk difüzyon testi ile %63.7, E-Test ile %27 MBL pozitifliği bildirilmiştir⁽²⁸⁾.

Bu araştırmanın kısıtlılığı, fenotipik yöntemlerle saptadığımız MBL aktivitesi genotipik yöntemlerle doğrulanamamasıdır. Ayrıca çalışmamız tek merkezli bir çalışma olup, ülke/dünya verileri ile karşılaştırabilmek için daha geniş kapsamlı çok merkezli çalışmaların gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde ettiğimiz veriler; EUCAST kriterlerine göre değerlendirildiğinde, nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında

siprofloksasin, levofloksasin, tikarsilin-klavulonik asit, sefepim, aztreonam ve imipenem direncinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ek olarak MBL üretiminin ve çoklu ilaç direnci sıklığının nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında yaygın olarak görülmesi, tedavi seçeneklerinin önemli ölçüde kısıtlanmasına yol açmaktadır. Tedavide uygun antimikrobiyal ajanın seçimi, direnç gelişimin ve yayılımın yakın takibi için; antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasının yanı sıra fenotipik yöntemlerle MBL varlığının da araştırılması oldukça önemlidir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlığı, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (17.02.2022 tarih ve 22-KAEK-030 Karar No.) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Bu çalışma kısmi olarak Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No. 2020/43) tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Tokat Gaziosmanpaşa University, Faculty of Medicine, Clinical Research Ethics Committee (02.17.2019; 22-KAEK-030).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: The research particularly financed by Tokat Gaziosmanpaşa University, Scientific Research Project (Project No. 2020/43).

KAYNAKLAR

1. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007;67(3):351-68. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>
2. Rossolini GM, Montengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(Suppl 4):17-32. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01161.x>
3. EUCAST. Breakpoint tables for 2022. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/] (Erişim tarihi: Ocak 2022).

4. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100- Ed32. Clinical and Laboratory Standards Institute.
5. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001;14(4):933-51.
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
6. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8(1):71-93.
<https://doi.org/10.1586/eri.09.108>
7. Dortet L, Boulanger A, Poirel L, Nordmann P. Bloodstream infections caused by *Pseudomonas* spp.: How to detect carbapenemase producers directly from blood cultures. J Clin Microbiol. 2014;52(4):1269-73.
<https://doi.org/10.1128/JCM.03346-13>
8. Baumgart AM, Molinari MA, Silveira AC. Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. Braz J Infect Dis. 2010;14(5):433-6.
<https://doi.org/10.1590/s1413-86702010000500002>
9. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J Med Microbiol. 2008;26(3):233-7.
<https://doi.org/10.4103/0255-0857.39587>
10. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2006;44(9):3139-44.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00879-06>
11. CLSI. Screening and Confirmatory Tests for Suspected Carbapenemases Production. Vol: 20 Supplemental Table 2A-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
12. Erdoğan MM, Acun Delen L, Erdoğan E. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılığı. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi. 2021;9(1):230-7.
<https://doi.org/10.33715/inonusaglik.826224>
13. İnce N, Geyik MF, Özdemir D, Daniş A. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılması. ANKEM Derg. 2014;28(3):94-9.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2014.094>
14. Shortridge D, Gales AC, Streit JM, Huband MD, Tsakris A, Jones RN. Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2016. Open Forum Infect Dis. 2019;15;6(Suppl 1):63-8.
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofy343>
15. Genç-Bahçe Y, Baran I, Aksoy A. Kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılmasında CLSI ve EUCAST standartlarının karşılaştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020;77(1):3-14.
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.32549>
16. Maçın S, Akyön-Yılmaz Y, Özden Ö, Gür D. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Escherichia coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının EUCAST ve CLSI'ya göre yorumlanması: Hacettepe deneyimi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2017;47(1):21-5.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2017.021>
17. Yüce A, Yapar N, Eren Kutsoylu O. İzmir Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi yoğun bakım hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. suşlarının 2000-2002 ve 2003-2006 yıllarında saptanan antibiyotik duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2009;43(2):195-202.
18. Ceken N, Duran H, Atik B. The profile of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from intensive care units over a four-year span. Pam Med J. 2021;14(2):306-11.
<https://doi.org/10.31362/patd.789332>
19. Sader HS, Castanheira M, Shortridge D, Mendes RE, Flamm RK. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam tested against multidrug-resistant enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. Medical Centers, 2013 to 2016. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(11):e01045-17.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01045-17>
20. Shortridge D, Pfaller MA, Castanheira M, Flamm RK. Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam tested against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* collected from patients with bloodstream infections isolated in United States hospitals (2013-2015) as part of the Program to Assess Ceftolozane-Tazobactam Susceptibility (PACTS) surveillance program. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018;92(2):158-63.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.011>
21. Mansur A, Ay S, Ersoy Y. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik duyarlılık oranları. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi. 2013;20(2):138-42.

22. Uludağ Altun H, Ak S. İkinci basamak bir hastanede izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Ege Tıp Dergisi. 2012;51(4):249-52.
23. Hazırolan G, Kanyılmaz D, Mumcuoğlu İ, Bodur H, Yetkin MA, Aksu N. Nozokomiyal infeksiyon etkeni gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı direnç durumu: Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sürveyans Verisi (2011-2015). ANKEM Derg. 2016;30(1):24-30.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2016.024>
24. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. Crit Rev Microbiol. 2016;42(2):276-92.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940494>
25. Guzel M, Afsar Y, Akdogan D, Moncheva P, Hristova P, Erdem G. Evaluation of metallo-beta-lactamase production in multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter baumannii* strains. Biotechnol Biotechnol Equip. 2018;32(5):1285-90.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1500146>
26. Aksoy MD, Tuğrul HM. Karbapenemlere dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde metallo-beta-laktamaz enzimlerinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. Flora. 2020;25(3):301-7.
<https://doi.org/10.5578/flora.68921>
27. Yaman G, Çıkman A, Parlak M, Gündüçoğlu H, Berktaş M. Nozokomiyal kökenli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz sıklığı. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2014;44(4):139-43.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2014.139>
28. Vural E, Delialioğlu N, Tezcan Ulger S, Emekdas G, Serin M S. Phenotypic and molecular detection of the metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical samples. Jundishapur J Microbiol. 2020;13(2):e90034.
<https://doi.org/10.5812/jjm.90034>