

## GRAM NEGATİF NON-FERMENTATİF ÇOMAKLARDA KARBAPENEMLERE ETKİLİ BETA-LAKTAMAZLAR\*

Zeynep GÜLAY, Tuba ATAY, Nuran YULUĞ

### ÖZET

Karbapenem grubu ajanlar, yüksek etkinlikleri nedeniyle ciddi nozokomiyal infeksiyonların sağaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, son yıllarda özellikle yoğun bakım ünitelerinde karbapenemler de dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe dirençli Gram negatif bakteri türlerinin sayıca arttığı gözlenmektedir. Bu bakterilerde karbapenem dirençli porin mutasyonlarından veya karbapenemaz üretiminden kaynaklanabilmektedir. Çalışmamızda, Eylül 1997 - Ocak 1998 tarihleri arasında klinik örneklerden izole edilen ve disk difüzyon testi ile imipenem dirençli veya orta duyarlı bulunan 12 *Acinetobacter baumannii*, 10 *Pseudomonas aeruginosa* ve 8 *Stenotrophomonas maltophilia* suşunda karbapenemlere etkili beta-laktamazların varlığı *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 suşunun kullanıldığı mikrobiyolojik bir yöntem ile araştırılmıştır. Bu amaçla, öncelikle *S.aureus* suşu Mueller Hinton besiyerine yayılarak imipenem ile disk difüzyon testi uygulanmış ve imipenem diskinin oluşturduğu inhibisyon alanının çapı ölçülmüştür. İkinci aşamada, benzer şekilde plaklar hazırlanarak besiyeri yüzeyine beklenen inhibisyon alanının kenarlarına gelecek şekilde steril diskler yerleştirilmiş ve çalışmaya alınan suşlardan elde edilen sonikatlardan diskler üzerine damlatılmıştır. Antibiyotik inaktivasyonu, imipenem inhibisyon zonu içerisinde indikatör suşun üremesi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntem ile, *S.maltophilia* suşlarının tümünde, *Acinetobacter baumannii* suşlarının % 92'sinde (11/12) ve *P.aeruginosa* suşlarının % 60'ında (6/10) imipenem etkili enzim aktivitesi saptanmıştır.

Çalışmamızda görüldüğü gibi, imipenem dirençli Gram negatif non-fermentatif bakteri suşlarının çoğunda karbapenem grubu antibiyotiklere etkili beta-laktamaz aktivitesinin bulunması, bu ajanların dikkatle kullanılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır.

### SUMMARY

*Beta-lactamases active on carbapenems from non-fermentative Gram-negative bacilli.*

Carbapenems are widely used for the treatment of severe nosocomial infections. In recent years, however Gram negative bacteria that are resistant to several antibacterial agents including carbapenems have emerged. Carbapenem resistance in these bacteria can be caused by porin mutations or carbapenemase production. In this study, we evaluated the occurrence of carbapenemase in 12 *Acinetobacter baumannii*, 10 *Pseudomonas aeruginosa* and 8 *Stenotrophomonas maltophilia* isolates that were found to be imipenem resistant or intermediate, by a microbiological assay in which *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 is used as the indicator strain. Briefly, a Mueller Hinton agar plate is seeded with *S.aureus*. Inhibition zones to imipenem are determined and the radius measured. Filter disks containing undiluted or diluted bacterial sonicates are then applied to the seeded plates at the expected periphery of the zone of sensitivity. Inactivation of the antibiotic is shown by the

\* 13. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresinde sunulmuştur (1-5 Haziran 1998, Antalya).

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı, İzmir.

growth of the indicator within the expected zone of inhibition. Beta-lactamase activity that affects imipenem efficiency were detected in all of *S.maltophilia*, 92 % (11/12) of *Acinetobacter baumannii* and 60 % (6/10) of *Pseudomonas aeruginosa* strains.

The high incidence of carbapenemase activity among imipenem resistant isolates in this study shows the necessity for a more limited usage of carbapenems.

## GİRİŞ

Karbapenemler, yüksek etkinlikleri ve pek çok beta-laktamaz ile parçalanmaya dirençli olmaları nedeniyle ciddi nozokomiyal infeksiyonların sağaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda özellikle yoğun bakım ünitelerinde karbapenemler de dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe dirençli Gram negatif bakteri türlerinin sayıca arttığı gözlenmektedir (9). Bu bakterilerde karbapenem direnci porin mutasyonlarından ve indüklenebilir pompa sistemlerinden ve/veya karbapenem grubu ajanlara da etkili  $\beta$ -laktamazların üretiminden kaynaklanabilmektedir (1,4,7).

Çalışmamızda, disk difüzyon testi ile imipeneme dirençli veya orta duyarlı bulunan, çeşitli türlerden 30 Gram negatif non-fermentatif bakteri suşunda karbapenemlere etkili  $\beta$ -laktamazların varlığı mikrobiyolojik bir yöntem ile araştırılmıştır. Böylelikle bu türlerde karbapenem direncinde etkili olan enzimlerin sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Çalışmamızda Eylül 1997 - Ocak 1998 arasında klinik örneklerden izole edilen ve disk difüzyon testi ile imipeneme dirençli veya "ortada" (intermediate) bulunan 12 *Acinetobacter baumannii*, 10 *Pseudomonas aeruginosa* ve 8 *Stenotrophomonas maltophilia* suşu alınmıştır. Suşların tür tayininde Vitek bakteri identifikasyon sistemi (bioMérieux) kullanılmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testleri: Çalışmaya alınan suşların imipenem minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) önerilerine uyularak makrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir (2). Plazmid kurtarma deneyinden sonra suşların imipenem duyarlılığının saptanması için agar-tarama yöntemi kullanılmıştır.

Beta-laktamaz eldesi: Bakterilerin nutrient agardaki (Oxoid) kültürleri ile mililitre 50 mM fosfat tamponu ile yıkanarak toplanmış, sonikatörde (Soniprep 150) parçalanmıştır. Sonikat, 4°C'de, 10,000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilerek beta-laktamazları içeren üst sıvı toplanmış ve -20°C'de saklanmıştır. Sonik ekstrede beta-laktamaz varlığı nitrosefin yöntemi ile saptanmıştır. Bu amaçla 30  $\mu$ l sonik ekstre 100  $\mu$ l nitrosefin çözeltisi (50  $\mu$ g/ml) ile karşılaştırılarak substratın renginin sarıdan kırmızıya dönüşümü izlenmiştir (6).

Karbapenemlere etkili beta-laktamazların araştırılması: Karbapenemlere etkili beta-laktamazların varlığı *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 suşunun kullanıldığı mikrobiyolojik bir yöntem ile araştırılmıştır (3). Bu amaçla öncelikle *S.aureus* suşu Mueller Hinton besiyerine yayılarak imipenem ile disk difüzyon testi uygulanmış ve imipenem diskinin oluşturduğu inhibisyon alanının çapı ölçülmüştür. İkinci aşamada benzer şekilde plaklar hazırlanarak besiyeri yüzeyine beklenen inhibisyon alanının kenarlarına gelecek şekilde steril diskler yerleştirilmiştir. Çalışmaya alınan bakterilerden elde edilen sonikatlar ve bunların 50 mM fosfat tamponu içerisindeki 1:2, 1:4 ve 1:8 dilüsyonları diskler üzerine damlatılmıştır. Antibiyotik inaktivasyonu imipenem inhibisyon zonu içerisinde indikatör *S.au-*

*reus* suşunun üremesi ile değerlendirilmiştir.

Bakterilerin plazmid DNA'sından "kurtarılması": Bu deneylerde DNA'ya bağlanarak plazmid sentezini öncelikli olarak inhibe eden etidyum bromür (EB) kullanılmıştır. Bu amaçla, suşlar, nutrient broth (Oxoid) içerisinde 37°C'de bir gece bekletilmiş, inkübasyon süresi sonunda bakteri kültürü 10<sup>6</sup> bakteri/ml olacak şekilde sulandırılmış ve bu süspansiyondan 20 µl alınarak 0.06-64 ml/L arasında değişen konsantrasyonlarda EB içeren nutrient broth besiyeri içerisine aktarılmıştır. 37°C'de bir gece inkübasyondan sonra üremenin görüldüğü en yüksek EB konsantrasyonu içeren tüpten tek koloni düşecek şekilde nutrient agar besiyerine pasaj yapılmıştır. Nutrient agarda üreyen kolonilerden 40-50 kadarı alınarak 5 ml steril % 0.85 NaCl solüsyonu içerisinde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan 10 µl, 0.5-16 µg/ml arasında değişen konsantrasyonda imipenem içeren Mueller Hinton agar yüzeyine aktarılmıştır. Karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla parental suşların imipenem duyarlılıkları da eş zamanlı olarak aynı yöntem ile değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan suşların tür dağılımları ve imipenem MİK değerleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Mikrobiyolojik yöntem ile *S.maltophilia* suşlarının tümünde, *A.baumannii* suşlarının % 92'sinde (11/12), *P.aeruginosa* suşlarının % 60'ında (6/10) imipeneme etkili enzim aktivitesi saptanmıştır. Karbapenemlere etkili enzim aktivitesi saptanan dokuz *Acinetobacter* ve altı *P.aeruginosa* suşunun etidyum bromür ile plazmid çoğalması engellendiğinde, üç *Acinetobacter* suşunun imipenem direncini yitirdiği görülmüştür. Bunların ve elde edildikleri parental suşların üredikleri imipenem konsantrasyonları tablo 2'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Karbapenem grubu ajanlara etkili β-laktamazlar genetik ve biyokimyasal olarak birbirinden farklı, çoğu yalnız karbapenemlere değil diğer β-laktam ajanlara da etkili enzimlerdir (4). Bu nedenle, sadece, karbapenem grubu β-laktam ajanlara afinitesi diğer β-laktamlara kıyasla daha fazla olan metallo-enzimler "karbapenemaz" olarak adlandırılmaktadır. Karbapenemlere etkili enzimler, moleküler yapı açısından sınıf A serin β-laktamazlar veya sınıf B metallo-enzimler arasında yer almaktadır (1,4). Ayrıca sınıf C sefalosporinazların da karbapenem grubundaki ajanlara kısmen etkili olabildiği ve bu enzimlerin aşırı üretildiği dereprese mutantlarda yüksek düzeyde imipenem direncine yol açabildiği bildirilmektedir (1,4,8). Bu durum özellikle β-laktamazları indüklenebilir türlerde önem kazanmaktadır.

Karbapenemlere etkili β-laktamazlara Gram negatif non-fermentatif çomaklarda oldukça sık rastlanmaktadır. Bunlara örnek olarak *S.maltophilia*'nın L1 ve L2 metallo-enzimleri, *A.baumannii*'nin ARI-1 ve ARI-2 sınıf A β-laktamazları, *P.aeruginosa*'nın plazmid ile yayılabilen IMP-1 metallo-beta-laktamazı sayılabilir (1,4,5). Bu türler karbapenemlerin yanı sıra birçok antibiyotiğe de doğal olarak dirençli oldukları için etken oldukları enfeksiyonların sağaltımını sorun yaratmaktadır.

Çalışmamızda da görüldüğü gibi, imipeneme dirençli Gram negatif non-fermentatif bakteri suşlarının çoğunda karbapenem grubu antibiyotiklere etkili β-laktamaz aktivitesi bulunmaktadır. Ayrıca, *A.baumannii* suşlarında imipenem direncinin plazmid ile ilişkili olabileceği görülmektedir. Paton ve arkadaşları da (3), *A.baumannii*'deki ARI-1 β-laktamazının 40 kDa'luk bir plazmidde yer aldığını saptamışlardır. Bu veri de bulgularımızı doğrulamaktadır.

Tablo 1. Gram negatif non-fermentatif çomaklar için belirlenen imipenem MİK değerleri ve mikrobiyolojik yöntem sonuçları.

Izolot no	Tür	IPM MİK değeri (µg/ml)	Mikrobiyolojik yöntem sonucu
976	A. baumannii	>32	+
1395	S. maltophilia	>32	+
1455	A. baumannii	>32	+
1460	P. aeruginosa	>32	+
1652	A. baumannii	16	+
1833	A. baumannii	16	+
1851	A. baumannii	>32	+
19288	P. aeruginosa	8	+
20249	P. aeruginosa	32	+
20680	P. aeruginosa	>32	-
20996	P. aeruginosa	16	+
21255	A. baumannii	16	+
21624	P. aeruginosa	>32	+
22245	A. baumannii	32	+
23662	S. maltophilia	>32	+
24474	S. maltophilia	>32	+
24506	P. aeruginosa	32	-
25276	S. maltophilia	>32	+
25303	P. aeruginosa	32	+
25741	A. baumannii	>32	+
25823	A. baumannii	16	-
25827	S. maltophilia	16	+
25992	A. baumannii	16	+
26456	A. baumannii	>32	+
26547	S. maltophilia	32	+
26650	P. aeruginosa	8	-
26754	P. aeruginosa	16	-
26886	S. maltophilia	>32	+
27715	A. baumannii	16	+
44265	S. maltophilia	>32	+

\* Karbapenemaz varlığı.

Tablo 2. Plazmid DNA'sının replikasyonu engellenmiş mutantlarda imipenem toleransındaki değişim.

Suş no	Ürettiği son imipenem konsantrasyonu (µg/ml)
1833	8
1833 EB*	2
1851	16
1851 EB	1
25741	16
25741 EB	< 0.5

\* Etüdyum bromür ile plazmid replikasyonunun engellenmesinden sonra.

*P.aeruginosa*'da ise kurtarma deneylerine rağmen imipenem direncinin sürmesi, bunun kromozomal  $\beta$ -laktamazlara bağlı olduğunu düşündürmektedir. Nitekim, Sınıf C  $\beta$ -laktamazların aşırı olarak üretildiği *Enterobacter aerogenes* mutantlarında imipenem direncinin gelişebildiği gösterilmiştir (8). Benzer şekilde, Japonya'da izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında IMP-1 dışında kromozomal  $\beta$ -laktamazların da imipenem direncine yol açtığı bildirilmektedir (1).

Sonuç olarak, imipeneme dirençli Gram negatif non-fermentatif bakteri suşlarında karbapenem grubu antibiyotiklere etkili  $\beta$ -laktamaz aktivitesinin bulunması bu ajanların kısıtlı kullanımının gerekli olduğunu vurgulamaktadır.

#### KAYNAKLAR

- 1- Amyes SGB: Carbapenemases, *ANKEM Derg 11*: 221 (1997).
- 2- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 4th ed, Approved Standard, Wayne Pa (1997).
- 3- Paton RH, Miles RS, Amyes SGB: ARI-1;  $\beta$ -lactamase mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, *Int J Antimicrob Agents 2*: 81 (1993).
- 4- Rasmussen BA, Bush K: Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother 41*: 223 (1997).
- 5- Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Ohta M: Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad spectrum beta-lactams, including carbapenems, *Antimicrob Agents Chemother 40*: 349 (1996).
- 6- Shanahan PMA, Thomson CJ, Amyes SGB: Beta-lactam resistance in aerobic commensal faecal flora, *Int J Antimicrob Agents 3*: 59 (1994).
- 7- Srikumar R, Kon T, Gotoh N, Poole K: Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps Mex A- Mex B-OprM and Mex C-Mex D-OprJ in an multidrug sensitive *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother 42*: 65 (1998).
- 8- Tzouveleki LS, Tzelepi E, Mentis AF, Vatopoulos AC, Tsakris A: Imipenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is associated with derepression of chromosomal cephalosporinases and impaired permeability, *FEMS Microbiol Lett 95*: 195 (1992).
- 9- Wolff M, Brun-Buisson C, Lode H, Mathai D, Lewi D, Pittet D: The changing epidemiology of severe infections in the ICU, *Clin Microbiol Infect 3 (Suppl 1)*: 37 (1997).