

PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENCİ VE METALLO-BETA-LAKTAMAZ SIKLIĞI*

Işıl FİDAN, Feryal ÇETİN GÜRELİK, Sevgi YÜKSEL, Nedim SULTAN

* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa hastane infeksiyonuna neden olan önemli bir etkindir ve çoklu direnç gösteren izolat sıklığı giderek artmaktadır. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 40 *P.aeruginosa* suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz üretimi araştırılmıştır. Çalışılan suşlarda % 15 siprofloksasin, % 18 amikasin, % 25 piperasilin/tazobaktam, % 23 sefoperazon/sulbaktam, % 15 imipenem, % 20 meropenem, % 25 seftriakson, % 23 seftazidim direnci belirlenmiştir. Suşlarda % 5 oranında metallo-beta-laktamaz saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: antibiyotik direnci, metallo-beta-laktamaz, *Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY

Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Strains and Frequency of Metallo-Beta-Lactamases

Pseudomonas aeruginosa is an important nosocomial pathogen and the prevalence of multiple resistant isolates has been increasing. In this study we investigated antibiotic resistance and production of metallo-beta-lactamases in 40 *P.aeruginosa* strains isolated from various clinical specimens. Resistance rates were found 15 % to ciprofloxacin, 18 % to amikacin, 25 % to piperacillin/tazobactam, 23 % to cefoperazone/sulbactam, 15 % to imipenem, 20 % to meropenem, 25 % to ceftriaxone and 23 % ceftazidime. Metallo-beta-lactamase production was detected in 5 % of these strains.

Keywords: antibiotic resistance, metallo-beta-lactamases, *Pseudomonas aeruginosa*

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, özellikle savunma mekanizmalarının zayıfladığı immün yetmezlik durumlarında, malign ve metabolik hastalığı bulunanlarda, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda ve ağır yanık durumlarında hastalık oluşturan ve daha çok hastane infeksiyonlarına neden olabilen önemli bir patojendir. *Pseudomonas* infeksiyonlarında antimikrobiyal ajanlara direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda bulunması önemli bir sorundur. Çoklu direnç gösteren izolatların sayısı uygun olmayan antibakteriyel ajanların kullanımı nedeniyle giderek artmaktadır ve oluşan

infeksiyonların tedavisi ciddi problemler oluşturmaktadır. Klinikte en sık karşılaşılan direnç beta-laktamaz enzimleri aracılığıyla olmaktadır. Bu direnç *Pseudomonas* infeksiyonlarında sık kullanılan ajanlardan olan beta-laktam antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle yaygın kullanıma bağlı olarak bu enzimlerle oluşan direncin tedavi öncesi rutin laboratuvarlarda belirlenmesi önem taşımaktadır⁽⁸⁾. Beta-laktamazlar hidrolitik spektrumları, inhibitörlere duyarlılıkları, kromozom veya plazmid kontrolünde olmaları özelliğine göre farklı şekillerde sınıflandırılmışlardır⁽⁴⁾. Bush tarafından önerilen sınıflandırmaya göre; Grup I'de kromozomal beta-laktamaz

Yazışma adresi: Işıl Fidan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Tel.: (0312) 202 46 26

e-posta: isilfidan@yahoo.com

Alındığı tarih: 10.01.2005, revizyon kabulü: 17.03.2005

* XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur (19-23 Eylül 2004, Kuşadası)

BULGULAR

grubundan 'indüklenebilir beta-laktamaz'; Grup II'de plazmid kontrolündeki 'geniş spektrumlu beta-laktamaz' ve Grup III'de 'metallo-beta-laktamazlar' yer almaktadır⁽¹⁰⁾. Bunlar arasında metallo-beta-laktamazlar son zamanlarda yayılmaya başlayarak, *Pseudomonas* ve diğer Gram negatif nozokomiyal patojenlerde geniş spektrumlu beta-laktam direncine neden olmaktadır⁽⁶⁾. Bu enzimlerin rutin laboratuvarlarda antibiyogram sonuçlarına göre değerlendirilerek klinisyene bildirilmesi ve ileri testlerin yapılacağı antibiyotiklerin belirlenmesi gerekmektedir⁽⁴⁾.

Bu çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının ve fenotipik metodlarla muhtemel direnç mekanizmalarının belirlenmesi ve metallo-beta-laktamaz direncinin belirlenmesini sağlayan yöntemlerin rutin laboratuvarlarda uygulanabilirliğinin tesbiti amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kırk *Pseudomonas aeruginosa* suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları NCCLS standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir⁽⁷⁾.

Grup III metallo-beta-laktamaz aktivitesini belirlemek için 'Modifiye Hodge testi' ve 'Double disk synergy' yöntemi uygulanmıştır⁽⁵⁾.

Metallo-beta-laktamaz varlığını belirlemek için ilk olarak, 'Modifiye Hodge testi' yapılmıştır. Bu teste göre, önce Mueller-Hinton agar besiyerine McFarland 0.5'e göre ayarlanmış imipeneme duyarlı *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu indikatör mikroorganizma olarak tüm yüzeye ekilmiştir. Besiyeri yüzeyi kurduktan sonra imipenem (10 µg) diski plak ortasına yerleştirilmiş, 15 dakika oda ısısında beklenmiş ve test edilecek *Pseudomonas* suşu disk kenarından periferine doğru düz çizgi halinde ekilmiştir. Bir gecelik inkübasyon sonrası *Pseudomonas* suşunun bulunduğu kısımda *E.coli*'ye ait inhibisyon zonunda görülen en küçük bir bozulma metallo-beta-laktamaz enzimi üretimi yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Metallo-beta-laktamaz varlığını belirlemek için ayrıca 'Double disk synergy' yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde imipenem-EDTA disk metodu kullanılmıştır. Mueller-Hinton agar besiyerine McFarland 0.5'e göre ayarlanmış test edilecek *Pseudomonas* suşu ekilmiştir. 0.5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için 186.1 g disodium EDTA.2H₂O 1000 ml distile suda çözülmüş ve pH 8.0'e ayarlanmıştır. 2 adet 10 µg imipenem diski yaklaşık olarak birbirinden 10 mm uzaklıkta konmuştur. Disklerin birinin üzerine 10 µl 0.5 M EDTA solüsyonu eklenmiş ve plak 24 saat 37°C'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası küçük bir sinerjistik inhibisyon zonu bulunması metallo-beta-laktamaz varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışılan 40 *P.aeruginosa* suşunda % 15 siprofloksasin, % 18 amikasin, % 25 piperasilin/tazobaktam, % 23 sefoperazon/sulbaktam, % 15 imipenem, % 20 meropenem, % 25 seftriakson, % 23 seftazidim direnci belirlenmiştir (Tablo).

Tablo: 40 *P.aeruginosa* suşunda çeşitli antibiyotiklere direnç.

Antibiyotik	Direnç [n (%)]
Siprofloksasin	6 (15)
Amikasin	7 (18)
Piperasilin-tazobaktam	10 (25)
Sefoperazon-sulbaktam	9 (23)
İmipenem	6 (15)
Meropenem	8 (20)
Seftriakson	10 (25)
Seftazidim	9 (23)

Çalışılan 40 suşun 2'sinde (% 5) hem 'Modifiye Hodge testi', hem 'Double disk synergy' metodu ile metallo-beta-laktamaz varlığı tespit edilmiştir. İki yöntemin sonuçları arasında uygunsuzluk görülmemiştir.

TARTIŞMA

Antibakteriyel ajanların uygunsuz kullanımı mikroorganizmalara karşı direnç oluşumunun hızla artmasına neden olmaktadır. Özellikle hastane infeksiyonlarında önemli bir etken olan *Pseudomonas* suşları ile oluşan infeksiyonların tedavisi her geçen gün daha önemli bir sorun oluşturmaktadır. *Pseudomonas* pek çok antibiyotik grubuna intrinsik olarak dirençlidir⁽¹⁾. *Pseudomonas* suşlarında antibiyotiklere karşı farklı mekanizmalarla direnç gelişmektedir. Beta-laktamaz enzimleri ile antibiyotiklerin hidrolize edilmesi, antimikrobiyal ajanlara karşı hücre duvar permeabilitesinin azalması gibi nedenler direnç gelişiminde etkili olmaktadır⁽¹⁰⁾. *Pseudomonas* suşlarında beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminde klinikte sıklıkla beta-laktamaz enzimleriyle karşılaşmaktadır⁽⁶⁾. Bunlar arasında metallo-beta-laktamaz enzim üretimine bağlı direnç artış göstermektedir. Metallo-beta-laktamaz, in-vitro olarak aztreonam dışında tüm beta-laktamları hidrolize eder, bu nedenle bu enzimi üreten suşların belirlenmesi ve yayılımının önlenmesi önem taşımaktadır⁽⁵⁾.

Çalışmamızda öncelikle suşlarda antibiyotik direnci araştırılmıştır. Buna göre, 40 *P.aeruginosa* suşunda çeşitli antibiyotiklere % 15-25 oranında direnç saptanmıştır (Tablo). Cevahir ve ark.⁽²⁾ *Pseudomonas* suşları için amikasin direncini % 53, seftazidim direncini % 63, siprofloksasin direncini % 37, imipenem direncini % 36, meropenem direncini % 42 olarak bildirmişlerdir. Ayyıldız ve ark.⁽¹⁾ ise siprofloksasin

direncini % 10, imipenem ve amikasin direncini % 3, seftazidim direncini % 15 olarak bildirmişlerdir. Direnç paternlerindeki farklılık, antibiyotik kullanım politikalarına ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklikler göstermektedir.

Çalışmamızda özellikle karbapenem direncinden sorumlu olabilecek metallo-beta-laktamaz enzim oranı % 5 olarak bulunmuştur. Gençler ve ark.⁽³⁾ indüklenebilir beta-laktamazı % 53, geniş spektrumlu beta-laktamazı % 4 olarak bildirirken, çalıştıkları suşlarda metallo-beta-laktamaz belirlememişlerdir. Migliavacca ve ark.⁽⁶⁾ çalışmalarında *Pseudomonas* suşlarında metallo-beta-laktamaz oranını % 15 olarak belirlemişlerdir. Oh ve ark.⁽⁹⁾ metallo-beta-laktamaz üreten *Pseudomonas* oranını % 31 olarak bildirmişlerdir. Yurtdışı kaynaklı çalışmalarda daha yüksek metallo-beta-laktamaz üretimi olduğu görülmektedir. Bu nedenle ülkemizde *Pseudomonas* suşlarında tedaviye başlamadan önce bu noktanın gözönünde tutularak, metallo-beta-laktamaz enzim üretiminin tespitinin rutin olarak yapılması ve enzim üreten suşların uygun tedavisi ile yayılımının önlenmesi uygun olacaktır.

NCCLS'in metallo-beta-laktamaz enzimi üreten suşların belirlenmesine ait önerdiği bir metod yoktur⁽⁵⁾. Bu nedenle çalışmamızda 'Modifiye Hodge testi' ve 'Double disk synergy' yöntemi olmak üzere 2 yöntemin etkinliği ve kullanım kolaylığı araştırılmıştır. İki yöntemin etkinliği eşit bulunmuş ve iki yöntem de uygulanması kolay yöntemler olarak belirlenmiştir.

Beta-laktam antibiyotiklerden aztreonam dışında tümüne direnç oluşumunda önemli bir faktör olan metallo-beta-laktamaz enzimlerinin tanımlanması ve direnç yayılımının kontrol edilmesi büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda metallo-beta-laktamazların tespiti amacıyla kullandığımız yöntemler çok basit ve pratik olarak uygulanabilecek, etkili yöntemlerdir. Bu nedenle rutin çalışan laboratuvarlarda bu basit yöntemlerden kendilerine uygun olanını belirleyerek, uygulamaya sokulması ve rutin hale getirilmesi dirençli suşların kontrolünde fayda sağlayacaktır. Beta-laktam antibiyotiklerin sık kullanımı hem mevcut direnç mekanizmalarının artmasına hem de yeni mekanizmaların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Ayrıca, *Pseudomonas* suşlarıyla oluşan infeksiyonların tedavisinde seçilecek ajanlar açısından, çalışmamızda görüldüğü gibi siprofloksasin iyi bir etkinlik göstermektedir.

Bu nedenle *Pseudomonas*'a bağlı ciddi infeksiyonlarda amikasin ile kombinasyonunun beta-laktam antibiyotiklere göre daha kullanışlı olabileceği düşünülmektedir. Bu tür infeksiyonlarla başedebilmek için herşeyden önce kısıtlı antibiyotik kullanımının ve infeksiyon kontrol komitelerinin her hastanede kurularak etkin olarak çalışmasının sağlanması, başta beta-laktamaz enzimlerine bağlı olmak üzere diğer direnç gelişim mekanizmalarının önlenmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ayyıldız A, Kocazeybek B, Arıtürk S: Değişik klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, ANKEM Derg 2002;16(1):1-3.
2. Cevahir N, Kaleli İ, Demir M, Öztürk S, Mete E: Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direncinin belirlenmesi, ANKEM Derg 2003;17(1):16-9.
3. Genç S, Ak Ö, Benzonana N, Baturel A, Özer S: Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital of Turkey, Ann Clin Microb Antimicrob 2002;1:1-4.
4. Gür D: β -laktamazlar, Flora 1997;2(Ek 3):1-18.
5. Lee K, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH: Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species, Clin Microbiol Infect 2001;7(2):88-91.
6. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C et al: Simple microdilution test for detection of metallo- β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*, J Clin Microbiol 2002;40(11):4388-90.
7. NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Sixth edition, Approved Standards Document M2-A6, NCCLS, Wayne, PA (1997).
8. Nordmann P, Guibert M: Extended spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, J Antimicrob Chemother 1998;42(2):128-32.
9. Oh EJ, Lee S, Park YJ et al: Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase, J Microbiol Methods 2003;54(3):411-8.
10. Yorgancıgil B: Beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları, Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1999;6(2):176-82.