

Nozokomiyal *Pseudomonas* Suşlarında Metallo- β -Laktamaz Üretiminin Fenotipik Olarak Araştırılması

Phenotypic Determination of Metallo- β -Lactamase Production in Nosocomial Pseudomonas Strains

Semra Özgümüş¹, Özlem Altuntaş-Aydın², Nuray Kuvat², Mehmet Emirhan Işık², Gönül Şengöz²

¹Hakkari Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Hakkari, Türkiye

²Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Özet

Amaç: Hastanemizde yatan hastalardan izole edilen hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarında, karbapenemlerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi ve dirençli bulunan suşlardaki metallo- β -laktamaz (MBL) üretiminin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Centers for Disease Control and Prevention tanımlarına göre hastane enfeksiyonu kriterlerini karşılayan hastaların klinik örneklerinden 100 *Pseudomonas* suşu izole edildi. Suşların identifikasyonu konvansiyonel yöntemler ve VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak yapıldı. Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanılarak Clinical and Laboratory Standards Institute ölçütlerine göre karbapeneme dirençli veya orta duyarlı bulunan suşlara Etest® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) uygulanarak karbapenemlerin bu suşlara karşı MİK değerleri araştırıldı. Karbapeneme dirençli olduğu saptanan suşlardaki MBL yapımını belirlemek üzere, imipenem (4-256 µg/ml) ve EDTA ile birlikte imipenem (1-64 µg/ml) içeren MIC Test Strip® (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, İtalya) MBL şeritleri, üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı.

Bulgular: İzolasyon bölgelerine göre toplam 100 *Pseudomonas* suşundan 37'si trakeal aspirat, 34'ü idrar, 17'si yara sürüntüsü ve apse materyali, 9'u kan, 2'si göz sürüntüsü ve 1'i plevra sıvısı kültüründen izole edildi. Suşların 99'u *Pseudomonas aeruginosa*, 1'i *P. putida* olarak adlandırıldı. İzole edilen 100 suşun 65'i üç antibiyotiğe birden duyarlıydı. Suşların, 32'si imipeneme, 20'si meropeneme ve 16'si doripeneme dirençli; 2'si meropeneme, 13'ü imipeneme ve 7'si doripeneme orta duyarlı olarak bulundu. En az bir karbapeneme direnç saptanan 33 suştan 29 (%88)'unda, MBL üretimi saptandı.

Sonuçlar: Çalışmamız sonucunda karbapenemlere dirençli yüksek olduğu ve bunun yüksek oranda (%88) MBL üretimiyle ilişkili olduğu görülmektedir. Karbapenemler arasında en düşük direnç oranı doripenem için saptanmış olup, bunun nedeni doripenemin klinik kullanımda olmaması olabilir. *Klinik Dergisi 2014; 27(2): 57-61.*

Anahtar Sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, karbapenemler, metallo- β -laktamaz, hastane enfeksiyonu, karbapenemaz.

Abstract

Objective: In this study, carbapenem minimum inhibitory concentrations (MICs) of *Pseudomonas* strains isolated from hospitalized patients with healthcare-associated infections, and metallo- β -lactamase (MBL) production in carbapenem-resistant strains were investigated.

Methods: 100 *Pseudomonas* isolates from patients with healthcare-associated infection, according to Centers for Disease Control and Prevention criteria were included in the study. Strains were identified by standard methods and VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). The antibiotic susceptibilities were investigated by Kirby-Bauer disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute criteria. Carbapenems' MICs were determined using Etest® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) for strains detected as carbapenem-resistant or intermediate by disk diffusion. MIC Test Strip® (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) MBL strips containing imipenem (4-256 µg/mL) and EDTA together with imipenem (1-64 µg/mL) were used in accordance with manufacturer's recommendations for MBL detection in carbapenem-resistant strains.

Results: Isolation sites of 100 *Pseudomonas* strains were as follows: 37 from tracheal aspirate, 34 from urine, 17 from wound swab or abscess, 9 from blood, 2 from eye swab and 1 from pleural fluid. 99 of the strains were *Pseudomonas aeruginosa*, and 1 was *P. putida*. 65 of the strains were susceptible to all three antibiotics. 32, 20 and 16 of the strains were resistant to imipenem, meropenem, and doripenem and 2, 13, and 7 of them were intermediate to meropenem, imipenem and doripenem, respectively. 33 of the strains found resistant to at least one carbapenem were investigated for MBL existence. 29 (88%) of these 33 strains were MBL-positive.

Conclusions: In this study, we found an increased rate of carbapenem resistance and MBL enzyme activity is responsible in most (88%) of cases. Doripenem resistance was lowest and it may be due to doripenem's nonavailability for clinical usage. *Klinik Dergisi 2014; 27(2): 57-61.*

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenems, metallo- β -lactamase, hospital infection, carbapenemase.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence:

Semra Özgümüş, Hakkari Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Hakkari, Türkiye

Tel./Phone: +90 438 211 60 67 Faks/Fax: +90 438 211 71 92 E-posta/E-mail: semrasandickci@hotmail.com

(Geliş / Received: 3 Şubat / February 2014; Kabul / Accepted: 12 Mart / March 2014)

DOI: 10.5152/kd.2014.14



Giriş

Hastane infeksiyonları, 19. yüzyıldan itibaren önemli bir sağlık sorunudur. Altı milyar olan dünya nüfusunun her yıl %5'i hastaneye yatmakta, bu hastaların %5'indeyse hastane infeksiyonu gelişmektedir (1). Hastane infeksiyonlarının en sık etkenleri, aralarında *Pseudomonas aeruginosa*'nın da olduğu antibiyotiklere çoklu direnç gösteren mikroorganizmalardır. Ciddi *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde yeğlenen bir antibiyotik sınıfı olarak karbapenemler, birçok β -laktamaza nispeten dayanıklıdır (2). Bush-Jacoby-Medeiros'un işlevsel sınıflandırmasında grup 3 olarak gösterilen metallo- β -laktamaz (MBL)'lar ise aztreonam dışında tüm β -laktamlara direnç sağlar ve en belirgin özellikleri karbapenemleri hidrolize edebilmeleridir. MBL'lerin aktarılabildiği genetik elemanlar üzerinde belirmeye başlaması ve gittikçe yaygınlaşarak *P. aeruginosa* gibi bakterilerce de edinilmesi kaygı verici bir durumdur (3).

Bu çalışmada, hastanemizde yatan hastalardan izole edilen hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarında karbapenemlerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi ve dirençli bulunan suşlardaki MBL üretiminin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Hastanemizin çeşitli kliniklerinde yatan ve Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tanımlarına göre hastane infeksiyonu kriterlerini karşılayan hastaların materyallerden izole edilen 100 *Pseudomonas* suşu çalışmaya alındı ve deneylere alınincaya kadar -20°C'de saklama besiyerinde muhafaza edildi.

İzole edilen suşlar konvansiyonel yöntemler ve VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) kullanılarak adlandırıldı. Kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Meropenem, imipenem ve doripeneme duyarlılıkları araştırılacak suşlar, buyyonla 0.5 McFarland standardı bulanıklığına denk gelecek şekilde süspansiyonları hazırlandıktan sonra Mueller-Hinton agarına yayıldı. Meropenem (10 µg), imipenem (10 µg) ve doripenem (10 µg) diskleri (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD), aralarında 20 mm olacak şekilde besiyeri

üzerine yerleştirildi. 35°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanılarak dirençli ve orta duyarlı bulunan suşlara Etest® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) uygulanarak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri araştırıldı. Meropenem ve imipenemin duyarlılıkları, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından belirlenen sınır değerleri baz alınarak değerlendirildi (4). Doripenemin duyarlılık sonuçları için FDA'nın yorumlama ölçütleri kullanıldı (5).

Dirençli olduğu saptanan suşlara, imipenem (4-256 µg/ml) ve EDTA ile birlikte imipenem (1-64 µg/ml) içeren (IMI/IMD) MIC Test Strip® (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, İtalya) MBL şeritleri, üreticinin önerileri doğrultusunda uygulandı. Birbirine zıt yönde oluşan iki elipsin şeritle kesiştiği noktadaki sayısal değerler birbirine oranlandığında, IMI/IMD oranı ≥ 8 olarak saptananlar, MBL üretimi açısından pozitif; < 8 olarak saptananlar ise negatif olarak kabul edildi (Resim 1).

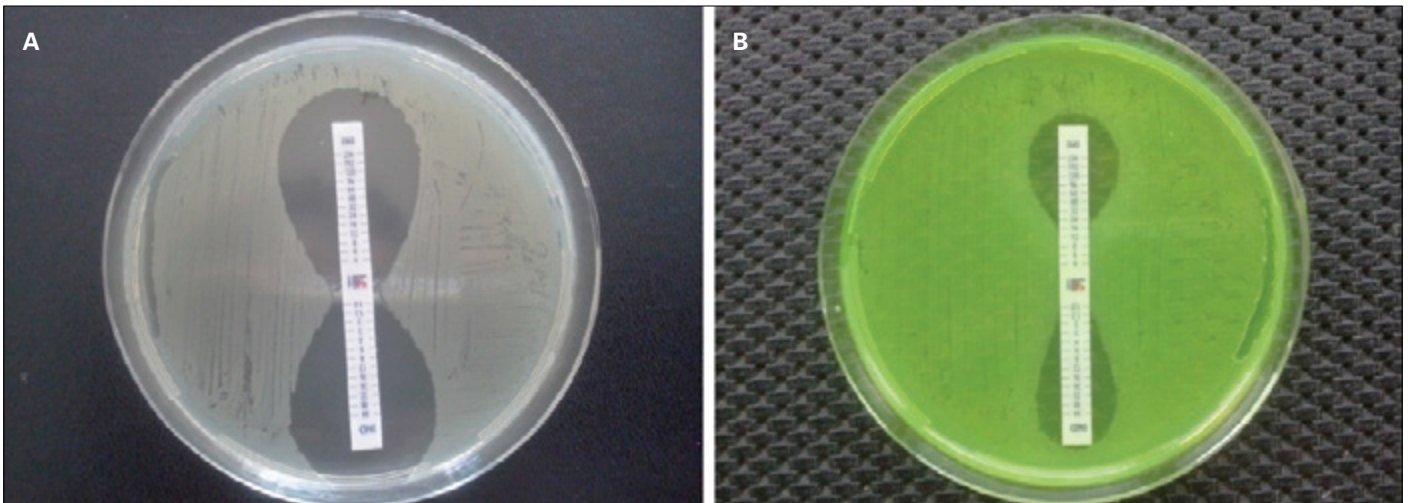
Bulgular

Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 100 *Pseudomonas* suşundan 99'u *P. aeruginosa*, 1 tanesi *P. putida* olarak tanımlandı. Suşların izole edildiği materyallerin servislere göre dağılımı Tablo 1'de gösterildi.

İzole edilen 100 suşun 65'i üç antibiyotiğe birden duyarlıydı. Suşların, 32'si imipeneme, 20'si meropeneme ve 16'sı doripeneme dirençli; 2'si meropeneme, 13'ü imipeneme ve 7'si doripeneme orta duyarlı olarak bulundu.

Meropenem, imipenem ve doripeneme dirençli veya orta duyarlı bulunarak MİK değerleri tespit edilmek üzere Etest® yapılan suşların, biri dışında tümü, üç karbapeneme de dirençli olarak bulundu. Bir suş ise disk difüzyon yöntemiyle meropeneme dirençli ve imipeneme orta duyarlı olarak saptanmasına rağmen, Etest® ile her ikisine de duyarlıydı (Tablo 2).

Etest® ile en az bir karbapeneme dirençli olduğu doğrulanan 33 suştan 29 (%88)'unda MBL üretimi saptandı. Bu suşların 17 (%58.6)'si trakeal aspirat, 6 (%20.6)'sı idrar, 1 (%3.4)'i göz sürüntüsü, 3 (%10.3)'ü kan, 1 (%3.4)'i plevra sıvısı, 1 (%3.4)'i yara sürüntüsü ve apse materyalinden üretilmişti (Tablo 3).



Resim 1. A. Metallo- β -laktamaz (MBL)-negatif bir suş. B. MBL-pozitif bir suş.

Tablo 1. *Pseudomonas* Suşlarının İzole Edildiği Materyallerin Servislere Göre Dağılımı

Servisler	Trakeal	İdrar	Yara Sürüntüsü ve Apse Materyali	Plevra Sıvısı	Göz Sürüntüsü	Kan	Toplam
Yetişkin YBÜ	28	10	2	1	0	3	44
Çocuk YBÜ	9	0	0	0	2	0	11
Üroloji	0	14	2	0	0	0	16
Dahiliye	0	6	2	0	0	4	12
Ortopedi	0	0	2	0	0	0	2
Nöroşirürji	0	0	1	0	0	0	1
Cildiye	0	0	3	0	0	0	3
Genel Cerrahi	0	0	2	0	0	1	3
Çocuk Hastalıkları	0	2	0	0	0	0	2
İnfeksiyon Hastalıkları	0	1	3	0	0	1	5
Nefroloji	0	1	0	0	0	0	1
Toplam	37	34	17	1	2	9	100

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

Tablo 2. Karbapeneme Dirençli Suşların Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri

Suş No.	Meropenem MİK	İmipenem MİK	Doripenem MİK	Suş No.	Meropenem MİK	İmipenem MİK	Doripenem MİK
2	>32	>32	>32	59	>32	>32	8
5	>32	>32	>32	61	1.5	>32	-
6	6	>32	3	62	12	>32	6
7	6	>32	.*	66	>32	>32	6
12	>32	>32	>32	67	8	>32	-
13	>32	>32	>32	69	12	>32	-
14	8	>32	3	72	6	>32	4
16	8	>32	3	75	>32	3	1.5
18	8	>32	3	76	12	>32	-
20	6	>32	2	77	8	>32	-
21	1.5	-	-	87	2	>32	-
24	8	>32	-	90	2	>32	1.5
26	>32	>32	16	92	>32	>32	>32
28	8	>32	1.5	95	6	>32	4
31	4	>32	-	96	12	>32	4
52	>32	>32	4	97	-	>32	4
53	12	-	3	100	0.094	3	-

*Disk difüzyon testinde duyarlı olarak saptandığı için Etest® yapılmadı.

İrdeleme

Çalışmamızda hastane infeksiyonu etkeni olarak izole ettiğimiz 100 *Pseudomonas* suşundan 99'u *P. aeruginosa*'dır. Topçu-Albayrak (6)'ın çalışmasında, çalışmamızla benzer olarak hastane infeksiyon etkeni olan *P. aeruginosa* suşlarının çoğunluğu YBÜ, cerrahi ve dahili servislerden izole edilmiş olup, en sık izole edilen materyal trakeal aspirat olmuştur. Çalışmamızda izolasyon sıklığı bakımından ikinci sırada idrar, Topçu-Albayrak (6)'ın çalışmasında ise yara yeri örnekleri gel-

mektedir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da, YBÜ ve cerrahi servisler *Pseudomonas* türlerinin en fazla izole edildiği kliniklerdir (7,8).

İzole ettiğimiz suşlarda imipenem ve meropeneme direnç oranlarının yanı sıra bu iki karbapenemin MİK değerlerinin de doripeneminkinden yüksek olması dikkat çekicidir. Nitekim COMPACT çalışmasının Türkiye verisine göre doripenem, MİK 2 µg/ml düzeyinde *P. aeruginosa* izolatlarından %64'ünü inhibe ederken; meropenem %56.2'sini, imipenem

Tablo 3. Metallo- β -Laktamaz Üreten *Pseudomonas* Suşlarının İzole Edildiği Materyallerin Servislere Göre Dağılımı

	Trakeal Aspirat	İdrar	Göz Sürüntüsü	Kan	Plevra Sıvısı	Yara Sürüntüsü ve Apse Materyali	Toplam	
							Sayı	(%)
Yetişkin YBÜ	13	3	0	2	1	0	19	(66)
Çocuk YBÜ	4	0	1	0	0	0	5	(17)
Üroloji	0	2	0	0	0	0	2	(7)
Dahiliye	0	1	0	0	0	0	1	(3)
Genel Cerrahi	0	0	0	1	0	1	2	(7)
Toplam (%)	17 (58.6)	6 (20.6)	1 (3.4)	3 (10.3)	1 (3.4)	1 (3.4)	29	(100)

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

ise %48.2'sini inhibe etmiştir (5). Valenza ve arkadaşları (9) da Almanya'da %45.2'si *P. aeruginosa* olmak üzere 363 Gram-negatif suşla yaptıkları çalışmada, *P. aeruginosa* için doripenem, meropenem ve imipenemin MİK değerlerini 4, 6 ve 32 µg/ml olarak bulmuşlar ve duyarlılıklarını da sırasıyla %81.1, %75.6 ve %79.3 olarak bildirmişlerdir.

MBL saptadığımız suşların çoğu, erişkin ve çocuk YBÜ hastalarının trakeal aspirat ve idrar örneklerinden izole edilmiştir. Dünyada farklı oranlarda saptanmakla birlikte *P. aeruginosa* suşlarında dikkat çeken bir MBL üretimi söz konusudur. Shahcheraghi ve arkadaşları (10)'nın çalışmasında, *P. aeruginosa* sıklık sırasına göre idrar, kan, yara yeri, balgam, beyin-omurilik sıvısı, kulak, göz ve dışkı kültürlerinden üretilmiştir. En yüksek direnç imipeneme karşı bulunurken, çift disk sinerji yöntemiyle MBL üretimi %72 olarak saptanmıştır. Franco ve arkadaşları (11) ise Etest® ile MBL üretimini %76.8 bulmuşlardır. Çin'de 16 farklı bölgedeki hastanelerden izole edilen imipeneme dirençli 264 *P. aeruginosa* suşunun 24'ü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile MBL-pozitif bulunmuş; meropenem ve imipenemin MİK değerleriyle MBL üretimi arasında bir korelasyon saptanmamıştır (12).

Çalışmamızda en az bir karbapeneme dirençli suşlardaki MBL pozitifliğinin %88 olarak bulunması, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de MBL üretiminde bir artış olduğunun göstergesidir. Ülkemizdeki *P. aeruginosa* suşlarındaki MBL üretimine ilişkin çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmalarda MBL üretimi değişik oranlarda izlenmekle beraber %66.6 değerine kadar ulaşmıştır. MBL üreten suşlar en çok YBÜ hastalarının örneklerinde saptanmıştır (13-16).

MBL üreten suşların en çok erişkin ve çocuk YBÜ hastalarının trakeal aspirat ve idrar örneklerinden izole edilmesi de göstermektedir ki, ventilatörle ilişkili pnömoni ve idrar yolu infeksiyonlarının önlenmesi için, yoğun bakım uzmanlarının, infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji uzmanlarıyla işbirliği içinde çalışmaları son derece önemlidir.

Çalışmamızda disk difüzyon testiyle karbapeneme orta duyarlı bulunan suşların biri hariç, hepsinin Etest® ile dirençli olduklarının bulunması, karbapenemlere orta duyarlı suşlarla oluşan *P. aeruginosa* infeksiyonlarında bu ajanlara güvenilmemesi gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* suşları saptandığında, özellikle MBL üretiminin araştırılması için basit, özgülüğü ve duyarlılığı yüksek fenotipik testlerin kullanılması ve gerekli durumlarda bunun PCR ve moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Yüce A. Hastane infeksiyonlarının önemi. In: Yüce A, Çakır N, eds. *Hastane İnfeksiyonları*. 2. baskı. İzmir: İzmir Güven Kitabevi, 2009: 3-6.
2. Eraksoy H, Başustaoğlu A, Korten V, et al. Susceptibility of bacterial isolates from Turkey--a report from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program. *J Chemother*. 2007; 19(6): 650-7. [CrossRef]
3. Eraksoy H. Antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Enfeksiyon Hastalıkları Özel Dergisi*. 2011; 4(1): 1-14.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Twentieth Informational Supplement M100-S20. Wayne, PA: CLSI, 2010.
5. Başaran S, Korten V. Doripenem: klinik uygulamada yeni bir karbapenem. *Klimik Derg*. 2010; 23(1): 2-5.
6. Topçu Albayrak G. *Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan Pseudomonas aeruginosa Kökenlerinde Çift Disk Sinerji Testi ve Kombine Çift Disk Sinerji ile Metallo-Betalaktamaz Varlığının Araştırılması* [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, 2008.
7. Ersöz G, Otağ F, Bayındır İ, Kandemir Ö, Aslan G, Kaya A. Nozokomial *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci ve karbapenemlere dirençli suşlar için meropenemin MİK değerleri. *Ankem Derg*. 2004; 18(1): 28-31.
8. Öztürk CE, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg*. 2011; 25(1): 42-7.
9. Valenza G, Seifert H, Decker-Burgard S, Laeuffer J, Morrissey I, Mutters R; COMPACT Germany Study Group. Comparative Activity of Carbapenem Testing (COMPACT) study in Germany. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39(3): 255-8. [CrossRef]
10. Shahcheraghi F, Nikbin VS, Feizabadi MM. Identification and genetic characterization of metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. *New Microbiol*. 2010; 33(3): 243-8.
11. Franco MR, Caiiffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010; 65(9): 825-9. [CrossRef]
12. 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(4): 1136-42. [CrossRef]

13. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallobetalaktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2004; 34(4): 248-52.
14. Aşçı Toraman Z, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo beta-laktamaz araştırılması. *İnfeks Derg.* 2005; 19(1): 101-5.
15. Aktaş AE, Yiğit N, Kayserili F, Ayyıldız A. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta laktamaz üretiminin araştırılması. *İnfeks Derg.* 2009; 23(2): 57-62.
16. Fidan I, Çetin Gürelik F, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg.* 2005; 19(2): 68-70.