

KLİNİK ÖRNEKLERDEN SOYUTLANAN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA BETA LAKTAM DİRENCİ, İNDÜKLENEBİLİR BETA LAKTAMAZLAR VE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZLARIN ARAŞTIRILMASI

Masoumeh ASLANİ MEHR*, Ayşe YÜCE**

D.E.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı *
D.E.Ü. Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıklar ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

ÖZET

Son zamanlarda *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında aktivitesi klavulanik asit ile inhibe olan genişlemiş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 91 *P.aeruginosa* suşunda indüklenebilir beta laktamaz ve GSBL varlığı ile imipenem, seftriakson, sefotaksim, seftazidim, amoksisilin-klavulanik asit'e karşı direnç durumları araştırıldı. Suşların 32 (%35.2)'sinde indüklenebilir beta laktamazların varlığı saptanırken hiçbirinde aktiiteleri klavulanik asit tarafından inhibe olan GSBL'a rastlanmadı. Suşların direnç durumları sırası ile imipenem için %18.7, seftriakson için %45.1, sefotaksim için % 41.8, seftazidim için %12.1 ve amoksisilin-klavulanik asit için %92.3 olarak bulundu. Imipenem direnci en çok trakeal aspirasyon örneklerinden soyutlanan suşlar arasında görüldü (%37.1).

Anahtar sözcükler: GSBL, İndüklenebilir beta laktamazlar, direnç

SUMMARY

Recently, emergence of extended spectrum beta lactamases (ESBL) which was inhibited by clavulanic acid was reported in *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, emergence of inducible and extended spectrum beta lactamases and resistance to imipenem, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime and amoxicillin + clavulanic acid was studied in 91 strains of *P.aeruginosa* that were isolated from different clinical specimens. None of *P. aeruginosa* isolates contained ESBL which was inhibited by clavulanic acid. Thirty-two (35.2 %) of the isolates showed the existence of inducible beta lactamases. Resistance rates were 18.7 %, 45.1 %, 41.8 %,12.1 % and 92.3 % for imipenem, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime and amoxicillin + clavulanic acid respectively.

Resistance to imipenem was mostly seen in strains that were isolated from tracheal aspiration specimen (37 %).

Key words: ESBL, Inducible beta lactamases, resistance.

Gram negatif bakteri suşları arasında beta laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmalarının en önemlisi beta laktamazların üretilmesidir (12,14). Bu betalaktam direnci sıklıkla *Pseudomonas aeruginosa* gibi indüklenebilir beta laktamazlara sahip olan patojenler ile oluşan enfeksiyonlarda ve bu enfeksiyonların tedavisinde imipenem ve sefoksitin gibi indükleyici ajanların kullanımı sırasında meydana gelebilir (9,15). Bu ajanlar kromozoma bağlı indüklenebilir beta laktamazların üretimini artırır (4). Gram negatif

bakterilerde direnç durumu, kromozomal group I beta laktamazların indüklenebilir ekspresyonu ile, klinik olarak gittikçe önem taşıyan rahatsız edici bir sorun haline gelmiştir. (1). Bilindiği gibi bu direnç mekanizmalarının yanısıra mikroorganizmalarda yeni direnç mekanizmaları da gelişmektedir. 1980'lı yılların başında son derece stabil olan geniş spektrumlu sefalosporinlerin geliştirmesini takiben *Klebsiella pneumoniae*'nin nozokomial suşları arasında, transfer edilebilen bir kaç genişlemiş spektrumlu beta laktamazın (GSBL) hızla ortaya çıktığı

saptanmış, daha sonra dünyanın bir çok ülkesinde değişik hastanelerden GSBL'nin varlığı bildirilmiştir (12-14,18,19). GSBL enzimleri; sınıf A beta laktamazlarda (ör: TEM₁, TEM₂, SHV) mutasyon ile türevlenen genelde plazmide bağlı enzimlerdir (13,17). Son zamanlarda P.aeruginosa suşlarında da aktivitesi klavulanik asit tarafından inhibe olan, sefotaksim ve seftazidime karşı yüksek aktiviteye sahip olan PER1 ve OXA10-14 gibi GSBL'ların varlığı bildirilmiştir (6,11-13,17). GSBL enzimlerini içeren organizmalarla infeksiyon veya kolonizasyon için bilinen risk faktörleri arasında yoğun bakım üniteleri, yakın zamanda yapılan bir cerrahi müdahale, instrumentasyon, uzun süre hastanede kalmak ve antibiyotiklerin özellikle geniş spektrumlu beta laktamazların kullanımı sıralanabilir (14).

Bu çalışmada hastane infeksiyonlarından izole edilen P.aeruginosa suşları arasında, GSBL ve indüklenebilir beta laktamazların varlığı ile imipenem, geniş spektrumlu sefalosporinler ve amoksisilin-klavulanik aside karşı direnç durumunun araştırılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri suşları:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin değişik bölümlerinde yatan hastalardan gönderilen 35 trakeal aspirasyon, 17 idrar, 14 yara, 13 balgam, 4 kan, 2 bronkoalveoler lavaj ve 6 diğer örneklerden (katater ucu, periton sıvısı, boğaz, vs.) soyutlanan toplam 91 adet Pseudomonas aeruginosa suşu incelemeye alındı.

Antibiyotik duyarlılık testleri:

Suşların imipenem, seftriakson, sefotaksim, seftazidim ve amoksisilin/klavulanik asite karşı duyarlılıkları National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS'e uygun olarak Kirby - Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı (10).

İndüklenebilir beta laktamazların araştırılması

Antibiyotik duyarlılık plaklarına, indükleyici ajan olarak yerleştirilen imipenem diskinin yanına seftazidim diski konuldu. Seftazidim diskinin inhibisyon zonunda imipenem diskinin bakan yüzeyinde meydana gelen düzleşmeler olumlu olarak değerlendirildi (5,9).

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazların araştırılması:

Bu enzimlerin saptanmasında, çift disk sinerji yöntemi kullanıldı (4,12,18). Mc Farland 0.5 eşliğine göre ayarlanmış bakteri suşları Muller Hinton agar üzerine yayıldıktan sonra amoksisilin klavulanik asit (AMC) diski plağın orta kısmına yerleştirildi. Bu diske göre sefotaksim için 17 mm, seftazidim için 19 mm olmak üzere diğer antibiyotik diskleri konuldu. 37° C de bir gece inkübasyondan sonra sefotaksim ve seftazidim disklerinin çevresindeki inhibisyon zonlarında amoksisilin-klavulanik asit diskinin doğru meydana gelen genişlemeler GSBL için pozitif olarak kabul edildi (12,18). Deneyin tüm aşamalarında disk difüzyon yönteminin standartları uygulandı (10).

BULGULAR

Doksan bir P.aeruginosa suşunun 17 (%18.7)'si imipenem, 41 (%45.1)'i seftriakson, 38 (%41.8),

sefotaksim, 11(%12.1), seftazidim, 84 (%92.3)'ü amoksisilin/klavulanik asite karşı dirençli bulundu. İmipenem dirençli bulunan 17 suşun sadece 2'sinde seftazidime karşı direnç saptandı (%11.8). İmipenem direnci %37.1 oranı ile en fazla trakeal aspirasyon örneklerinde, seftazidim direnci ise en fazla yara örneklerinden soyutlanan suşlar arasında görüldü. P. aeruginosa suşlarının 32 (%35.2)'sinde indüklenebilir beta laktamaz varlığı saptandı. P.aeruginosa suşlarının hiçbirinde aktiviteleri klavulanik asit tarafından inhibe olan GSBL'ye rastlanmadı. Elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir.

TARTIŞMA

P.aeruginosa suşlarında kromozomal sefalosporinazların indüksiyonu veya derepresyonu, geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı direncin meydana gelmesine neden olabilir,

fakat bu enzimlerin aktiviteleri klavulanik asit tarafından inhibe olmaz (1,12,13). Bunun yanısıra son zamanlarda bazı P.aeruginosa suşlarında PER1 ve OXA10-14 gibi genişlemiş spektrumlu beta laktamazlara (GSBL) rastlandığı rapor edilmiştir (6,11-13). Bu enzimler aktiviteleri klavulanik asit ile inhibe olan ve geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama karşı aktif, fakat genelde sefamisinlere ve karbapenemlere etki etmeyen enzimlerdir (6,12,13,17,18). Bu enzimlerin prevalansı ülkeden ülkeye ve bölgeden bölgeye değişkenlik göstermektedir (12,13). Çalışmamızda hastanede yatan hastalardan izole edilen 91 P.aeruginosa suşunun %45.1 seftriakson, %41.8 sefotaksim, %12.1'i seftazidim, % 92.3'ü amoksisilin-klavulanik asite karşı dirençli olup, hiçbirinde GSBL varlığı saptanmamıştır.

Tablo1: Değişik klinik örneklerden soyutlanan P.aeruginosa suşlarının İmipenem, Seftriakson, Seftazidim ve Amoksisilin/Klavulanik asite karşı direnç durumları

	İMİPENEM		SEFTRIAKSON		SEFOTAKSİM		SEFTAZİDİM		AMOKSİSİLİN KLAVULANİK ASİT	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
TRAKEAL ASPIRASYON n=35	13	37.1	19	54.3	19	54.3	2	5.7	34	97.1
IDRAR n=17	1	5.9	5	29.5	4	23.5	0	0	14	82.3
YARA n=14	1	7.1	7	50	6	42.9	5	35.7	14	100
BALGAM n=13	0	0	8	61.5	7	53.8	2	15.4	12	92.3
KAN n=4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	75
BRONKOALVE OLAR LAVAJ n=2	0	0	1	50	1	50	1	50	2	100
DIĞER ÖRNEKLER n=6	1	16.7	1	1.67	1	1.67	1	1.67	5	83.3
TOPLAM n=91	17	18.7	41	45.1	38	41.8	11	12.1	84	92.3

Bilindiği gibi bu enzimlerin ortaya çıkmasını sağlayan faktörlerden bazıları uzun süre hastanede kalma ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımınıdır (13,14). Bizim suşlarımızın tümü hastanede yatan hastalardan izole edilmekle birlikte şimdilik GSBL varlığı saptanmamış olup geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı dirençten sorumlu değildir.

Gülay ve ark. (2,3): 44 *K.pneumoniae* suşu ile yaptıkları çalışmada %88.6 oranında, 120 *P.aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada ise % 3.3 oranında GSBL saptadıklarını bildirmektedir.

Çalışmamızda; *P.aeruginosa* suşlarının yaklaşık yarısının 3.kuşak sefalosporinlere dirençli olduğu, ancak anti-pseudomonal etkisi bilinen bir 3.kuşak sefalosporin olan seftazidime ise oldukça duyarlı bulunduğu dikkati çekmektedir (%87.9). Ancak indüklenebilir beta laktamazlar araştırıldığında 32 (%35.2) *P.aeruginosa* suşunda indüklenebilir beta laktamaz varlığı gözlenmiştir. Bilindiği gibi *P.aeruginosa* ve Enterobacteriaceae Familyasının belli suşlarında indüklenebilir beta laktamaz enzimleri bulunmaktadır. Bu organizmalar ayrıca stabil derepresiyon durumuna geçip, indükleyici ajanın yokluğunda da yüksek seviyede beta laktamaz üretimine devam edebilirler (1,8,20). İndüklenebilir beta laktamazlara sahip organizmalarda induksiyon geri dönüşümlü olduğu halde *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda beta laktamlara karşı direncin bildirilmesi için yeterlidir (20). Bu nedenle beta laktam direnç durumu bildirilirken indüklenebilir beta laktamazların varlığı göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir.

Colom ve Ark. (1) 29 hastadan soyutlanan 74 *P.aeruginosa* suşunun 70'inde kromozomal grup I enzimlerinin bulunduğunu ve 3.Kuşak sefalosporinler zayıf ve labil indükleyici olduklarından tedavi sırasında dereprese mutantların seçilmesine yardımcı olduklarını ve imipenem dışında multiple beta laktamlara karşı direnç gelişmesine neden olduklarını açıklamışlardır. Jacobson ve Ark. (8) prospektif bir çalışmada bir eğitim hastanesinde kontrol altında alınan vakalardan soyutlanan 155 *P.aeruginosa* suşunda geniş spektrumlu beta laktamlara karşı direnç saptadıklarını ve daha önceden geniş spektrumlu sefalosporin antibiyotiklerin kullanılması, grup I beta laktamaz üreten dirençli suşların soyutlanması ile ilişkili olduğunu açıklamışlardır. Skoutarı ve Ark. (16) bir yıl zarfında 53 yoğun bakım hastasından 178 suş izole edildiklerini ve en sık görülen izolatlardan *P.aeruginosa* (% 34.3) ve *Acinetobacter* (%22.5) olduğunu ve en düşük direnç oranının % 26 ile imipenemde saptandığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *P.aeruginosa* suşlarında imipenem direnci ortalama %18.7 oranında saptanmış olup bu oran en fazla trakeal aspirasyon örneklerinden soyutlanan suşlarda gözlenmiştir (% 37.1).

Bilindiği gibi imipenem gerek gram olumlu, gerekse gram olumsuz bakteri infeksiyonlarında, özellikle de alt solunum yolu infeksiyonlarında en sık tercih edilen antibiyotiklerden birisidir. Ancak bu infeksiyonların sağlığı sırasında direnç geliştiği de bildirilmektedir (2,9,15). Bunun yanısıra imipenem; kromozomal

indüklenebilir beta laktamazlar için çok kuvvetli bir indükleyici olup *P.aeruginosa*'nın dereprese mutantlarında seftazidimin antagonisti olup ona karşı duyarlılığı azaltabilir (7). Yapılan bazı çalışmalar da imipenemin, bazı beta laktam antibiyotiklerle antagonistik etki oluşturduğu bildirilmektedir (2,5,9,15). Bu durum, olguların sağaltımı sırasında sağaltımın başarısı açısından mutlaka göz önünde tutulmalıdır.

Sonuç olarak tüm infeksiyon hastalıklarının sağaltımında olduğu gibi *P.aeruginosa* infeksiyonlarında da rutin antibiyotik duyarlılık testlerinin yanısıra indüklenebilir beta laktamazlar ve GSBL'lerin varlığını ortaya koyan deneylerin yapılmasının ve kombinasyonların oluşturulmasında özenli davranılması gerektiğini vurgulamak istiyoruz.

KAYNAKLAR

1. Colom K, Fdz-Araguiz A, Suinaga E, Cisterna R: Emergence of resistance to beta lactam agents in *Pseudomonas aeruginosa* with group I beta lactamases in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 964.
2. Gia Cometti A, Siquini FM, Cirioni O, Ciniti B, Scalisa G: Quantitative analysis of the imipenem-induced resistance to beta lactams. 18 th ICC, 1993 ;Abstract no: 981.
3. Gülay Z, Abacıoğlu YH, Yuluğ N: Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi. *Infeksiyon Dergisi* 1995 ; 9: 89.
4. Gülay Z, Biçmen C, Yuluğ N: *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında geniş spektrumlu beta laktamazların araştırılması. 5.Ulusal Infeksiyon Hastalıkları Kongresi, kongre özet kitabı, 1995; Bildiri no: 2:08.
5. Gülay Z, Biçmen C, Yuluğ N: *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir seftazidimazların araştırılması. 5.Ulusal Infeksiyon Hastalıkları Kongresi, kongre özet kitabı,1995;Bildiri no: 2:07
6. Hall LM, Livermor DM, Gür D, Akova M, Akalin HE: OXA-10 (PSE-2) beta lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob agents Chemother* 1993 ; 37: 1637.
7. Hupkova M, Kromery U: Induction of the resistance to ceftazidime and aztronam. 7th ECCMID 1995 ; Abstract no: 242.
8. Jacobson KL, Cohen SH, Inciardi JF, King JH, Lippert WE , Iglesias T, Van Coumenberghe CJ: The relationship between antecedent antibiotic use and resistance to extended-spectrum cephalosporins in group I beta-lactamase-producing organisms. *CID* 1995; 11094.
9. Mikamo H, Izumi K, Satohm and Tamaya T: Imipenem- induced resistance to antibacterial beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. 18th ICC 1993; Abstract no: 978.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. NCCLS. Document M2 -A4 ,Villanova 1990.
11. Nordmann P : Novel beta lactamases in gram negative 27. Türk Mikrobiyoloji kongresi. kongre özet kitabı, 1996 ; 4. konferans.
12. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Dupont C, Braiand YM and Labia R: Characterization of a novel extended spectrum beta lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 962.
13. Philippon A, Arilet G, Lagrange PH: Origine and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta lactamses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*

- 1994;13 (suppl.1): 17.
14. Quinn JP: Clinical significance of Extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 (suppl.1) :34.
15. Quinn JP, Studemeister AE: Resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical experience and biochemical mechanisms. *Rev Infect Dis* 1988 ; 10:892.
16. Skoutari M, Dimitracopoulos G, Anastassiou ED, Papageorgiou E : Surveillance of multi resistant gram negative aerobes in an intensive care unit. 7th ECCMID 1995; Abstract no : 266.
17. Sougakoff W: Genetic classification of beta lactamase. 7th. ECCMID 1995 ; Abstract no : 62.
18. Thomason KS, Sanders CC and Washington II JA: High-level resistance to cefotaxime and ceftazidime in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Cleveland , Ohio. *Antimicrob Agents Chemother* 1991 ;35: 1001.
19. Çağatay AA, Uzel S, Özüt H, Eraksoy H, Dilmener M. Hastanemizdeki *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının grup 1 betalaktamaz yapımının saptanması ve antibiyotik duyarlıkları (Özet). In: Ağaçfıdan A, Badur S, Külekçi G, eds. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-10 Mayıs 1996, Antalya). Program ve Özet Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti ve Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, 1996:233.
20. Weber DA, Sanders CC: Diverse potential of beta lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 1990 ; 34: 156.