

**FENOTİPİK OLARAK GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU
BETA-LAKTAMAZ ÜRETTİĞİ BELİRLENEN *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* VE *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARININ
ÇEŞİTLİ ANTİMİKROBİYALLERE DUYARLILIK DURUMU**

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF PHENOTYPICALLY EXTENDED
SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
AND *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLATES

Gökhan METAN*, Pınar ZARAKOLU
Gülşen HASÇELİK***, Murat AKOVA****

ÖZET: Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi'nde 2002-2004 yılları arasında hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen ve fenotipik olarak genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) ürettiği saptanan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli antimikrobiyallere duyarlılık durumlarının araştırılması amaçlanmıştır. Kırksekiz *P.aeruginosa* ve 53 *A.baumannii* izolatının seftazidim, sefotaksim, sefepim, tobramisin, siprofloksasin, piperasilin-tazobaktam, imipenem ve meropenem duyarlılıkları Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) yöntemiyle saptanmıştır. *A.baumannii* izolatlarının tobramisin duyarlılığı %54.7, karbapenem duyarlılığı %49.1 iken, diğer ajanlara karşı duyarlılık %25'in altında bulunmuştur. *P.aeruginosa* izolatlarının siprofloksasin, karbapenem grubu, piperasilin-tazobaktam ve tobramisine karşı duyarlılık oranı ise %35-38 arasında değişmektedir. *P.aeruginosa* izolatlarının %37.5'inin, *A.baumannii* izolatlarının ise %37.7'sinin eş zamanlı olarak imipenem/meropenem, piperasilin-tazobaktam, siprofloksasin ve tobramisine karşı dirençli olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, fenotipik olarak GSBL üreten *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının, sadece üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere karşı değil, karbapenem grubu dahil tedavide kullanılan diğer antibiyotiklere karşı da yüksek oranda dirençli oldukları dikkati çekmiştir.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, antibiyotik direnci.

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the antimicrobial susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains

* Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

*** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

that were identified as producers of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) phenotypically. Fifty three *P.aeruginosa* and 53 *A.baumannii* strains that were isolated from patients with hospital infections followed-up by Infectious Diseases Unit of Hacettepe University Adult Hospital in 2002-2004, were included in the study. The susceptibilities of the isolates to ceftazidime, cefotaxime, cefepime, tobramycin, ciprofloxacin, piperacillin-tazobactam, imipenem and meropenem were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) method. The susceptibility rates of *A.baumannii* isolates against tobramycin and carbapenem group were 54.7% and 49.1%, respectively; whereas for the rest of the antimicrobial agents tested, these rates were lower than 25 percent. The susceptibility rates of *P.aeruginosa* isolates against ciprofloxacin, carbapenem group, piperacillin-tazobactam and tobramycin differed between 35-38 percent. Of the *P.aeruginosa* isolates, 37.5%, and of the *A.baumannii* isolates 37.7% were resistant against imipenem/meropenem, piperacillin-tazobactam, ciprofloxacin and tobramycin simultaneously. As a result, phenotypically ESBL producing *P.aeruginosa* and *A.baumannii* isolates were found highly resistant not only against the third and fourth generation cephalosporins, but also to the antibiotics currently used in the therapy including carbapenemes.

Key words: Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, extended spectrum beta-lactamases, antibiotic resistance.

G İ R İ Ő

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ilk olarak 1980'lerin başında *Enterobacteriaceae* ailesinin farklı üyelerinde tanımlanmıştır. Daha sonra *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında da sıklıkta rapor edilmeye bařlanmıřtır¹. *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesinde; kromozomal beta-laktamazlar, bakterilerin dış zar geçirgenliğinde azalma ve atım pompaları gibi pek çok farklı mekanizma bir arada rol oynamaktadır². GSBL'ın bu bakteri türlerinin antibiyotiklere karşı direncinde oynadıkları rolün önemi, gerek ölkemizin gerekse Avrupa'nın farklı merkezlerinden artan sıklıkta bildirilmektedir³⁻⁷.

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Erişkin Hastanesi'nde 2002-2004 yıllarında hastane enfeksiyonu etkeni olarak çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve fenotipik olarak GSBL ürettiğı saptanan *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılığı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Erişkin Hastanesi'nde 2002-2004 yıllarında Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi tarafından takip edilmekte olan hastalardan, Hastalık Kontrol ve Önlem Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)^{8,9} tanımlarına göre hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen ve fenotipik olarak GSBL ürettiğı saptanan 48 *P.aeruginosa* ve 53 *A.baumannii* suřu çalışmaya dahil edildi. *A.baumannii* suşları 19 kan, 16 pü, 6 idrar, 4 derin trakeal aspirat,

5 beyin omurilik sıvısı (BOS), 3 bronkoalveolar lavaj (BAL); *P.aeruginosa* suşları ise 20 kan, 3 BAL, 15 pü, 9 idrar ve bir BOS örneğinden konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemlerle izole edildi. Sceptor sistemi (Becton Dickinson, USA) ile tür düzeyinde tanımlanan izolatlar -80°C 'de saklandı. Çalışmanın kalite kontrol suşları *K.pneumoniae* ATCC 700603, *E.coli* ATCC 25922 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 idi.

Çalışılacağı zaman, %5 koyun kanlı agara pasajlanan bakteriler bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Taze kültürlerden, Mueller-Hinton Broth (Oxoid, UK) besiyerinde 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri inokulumu hazırlandı. Bu inokulum steril eküvyon ile Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) içeren plağa homojen olarak sürüldü. Suşların seftazidim, sefotaksim, seftazidim-klavulanat, sefotaksim-klavulanat, sefepim, imipenem, meropenem, piperasilin-tazobaktam, tobramisin ve siprofloksasin MİK değerleri Etest yöntemiyle belirlendi. Sonuçlar CLSI önerilerine göre değerlendirildi¹⁰. Bakterilerin sırasıyla seftazidim veya sefotaksim ile test edildiğinde elde edilen MİK değerinin, sırasıyla seftazidim-klavulanat veya sefotaksim-klavulanat ile test edildiğinde elde edilen MİK değerinin 8 katı veya üzerinde olması fenotipik olarak GSBL üretimi ile uyumlu kabul edildi¹¹. Orta duyarlı suşlar dirençli grupta değerlendirildi.

BULGULAR

Fenotipik olarak GSBL ürettiği saptanan *A.baumannii* suşlarının Tablo I'de, *P.aeruginosa* suşlarının ise Tablo II'de test edilen antibiyotiklere karşı duyarlılıkları sunulmuştur.

Tablo I. Fenotipik Olarak GSBL Pozitif *A.baumannii* Suşlarının Farklı Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları ve MİK Değerleri

Antibiyotik	MİK aralığı ($\mu\text{g/ml}$)	MİK ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MİK ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Duyarlılık n (%)
Seftazidim	0.5-256	32	256	8 (15.9)
Sefotaksim	0.5-256	32	256	7 (13.2)
Sefepim	0.5-256	16	64	12 (22.6)
Tobramisin	0.5-256	8	32	29 (54.7)
Siprofloksasin	0.25-32	32	64	10 (18.8)
Piperasilin-tazobaktam	0.5-256	256	256	12 (22.6)
İmipenem	0.25-32	8	32	26 (49.1)
Meropenem	0.25-32	8	32	26 (49.1)

P.aeruginosa izolatlarının %37.5'i (18/48), *A.baumannii* izolatlarının ise %37.7'sinin (20/53) karbapenem (imipenem veya meropenem), siprofloksasin, piperasilin-tazobaktam ve siprofloksasine karşı eş zamanlı olarak dirençli olduğu belirlendi.

Tablo II. Fenotipik Olarak GSBL Pozitif *P.aeruginosa* Suşlarının Farklı Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları ve MİK Değerleri

Antibiyotik	MİK aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)	Duyarlılık n (%)
Seftazidim	2-256	32	256	12 (25.0)
Sefotaksim	4-256	32	256	1 (2.1)
Sefepim	0.5-256	32	256	11 (22.9)
Tobramisin	0.5-256	128	256	17 (35.4)
Siprofloksasin	0.25-32	32	64	18 (37.5)
Piperasilin-tazobaktam	0.5-256	32	256	17 (35.4)
İmipenem	0.25-32	16	64	17 (35.4)
Meropenem	0.25-32	16	64	17 (35.4)

TARTIŞMA

P.aeruginosa ve *A.baumannii* günümüzün başta gelen, önemli hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasındadır. Bu bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlarda en önemli sorun, kullanılan antimikrobiyallere karşı yüksek oranda dirençli olmalarıdır. Kang ve arkadaşlarının¹² yaptığı çalışmada, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında uygunsuz antibiyotik tedavisi, mortalite açısından bağımsız bir risk faktörü olarak ortaya konmuştur. GSBL üreten *P.aeruginosa* suşlarıyla oluşan bir salgında mortalite %62.5 olarak rapor edilmiştir³. GSBL üreten *A.baumannii* suşlarıyla gelişen bir salgın ise ancak salgının meydana geldiği yoğun bakım ünitesinin kapatılmasıyla kontrol altına alınabilmıştır⁴. *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarında üçüncü kuşak sefalosporinlerine karşı saptanmış olan antibiyotik duyarlılık sonuçları her zaman yol gösterici olmamaktadır. Bu çalışmada test edilen *P.aeruginosa* suşlarının %25'i (12/48), *A.baumannii* suşlarının ise %15.9'u (8/53) in vitro olarak seftazidime duyarlı bulunmuştur. GSBL üreten bakteriler in vitro duyarlı olsa dahi üçüncü veya dördüncü kuşak sefalosporinlerin tedavide kullanımının başarısızlığına yol açtığı bilinmektedir^{13,14}.

Karbapenemler GSBL üreten bakterilerin tedavisinde ilk seçenek antibiyotikler arasında yer almaktadır¹³. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, farklı türlerde GSBL enzimleri üreten *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarına karşı en etkili ajan olarak imipenem rapor edilmiştir¹⁵. Bu çalışmada imipenem/meropenem duyarlılığı; *A.baumannii* izolatlarında %49.1, *P.aeruginosa* izolatlarında %35.4 olarak saptanmıştır. *A.baumannii* izolatlarında piperasilin-tazobaktam'a yüksek oranda direnç saptanmasına rağmen, *P.aeruginosa* izolatlarının piperasilin-tazobaktam duyarlılığı imipenem ve meropenem ile aynı oranda bulunmuştur. Ancak piperasilin-tazobaktamın GSBL üreten bakterilerin etken olduğu ağır enfeksiyonların tedavisinde etkinliği tartışma konusudur. Piperasilin-tazobaktam duyarlılığının inokulum miktarından belirgin derecede etkilendiği gösterilmiştir^{16,17}.

Siprofloksasin ve tobramisinine karşı da yüksek oranda dirençli olmaları (*P.aeruginosa* suşlarında siprofloksasin ve tobramisin direnci sırasıyla %72.5 ve

%64.9; *A.baumannii* suşlarında %81.2 ve %45.3), bu antibiyotiklerin tedavide kullanımını kısıtlamaktadır. Gerek ülkemizde gerekse Avrupa'nın çeşitli merkezlerinde yapılan çalışmalarda, bu bakteri türlerinde artan florokinolon ve aminoglikozid direnç oranları dikkat çekmektedir¹⁸⁻²². Bu çalışmada test edilen antibiyotiklerden hiçbirinin Mik_{50} ve Mik_{90} değerleri, in vitro testlerde referans kabul edilen duyarlılık sınırları içerisinde saptanmamıştır. GSBL üreten *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* ile enfekte hastaların tedavi alternatiflerini değerlendiren az sayıda klinik çalışma bulunması, in vitro sonuçların klinikteki pratik değerinin tartışılmasını zorlaştırmaktadır²³. Sonuç olarak GSBL üreten *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarının, sadece üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere karşı değil, karbapenem grubu dahil tedavide kullanılan diğer antibiyotiklere karşı da yüksek oranda dirençli oldukları gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bradford PA. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
2. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995, 8: 557-84.
3. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 561-5.
4. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol 2003; 41: 3542-7.
5. Vahaboglu H, Ozturk R, Tansel O, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2265-9.
6. Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, Saniç A, Vahaboglu H; The Study Group. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* FEMS Microbiol Lett 2005; 249: 241-5.
7. Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Med Microbiol 2001; 50: 642-5.
8. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control 1988; 16: 128-40.
9. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, et al. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. Am J Infect Control 1992; 20: 271-4.
10. CLSI/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 15th Informational Supplement. CLSI/NCCLS Document M100-S15. 2005, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania.
11. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum beta-lactamases producing strains by the E-test ESBL screen. J Clin Microbiol 1996; 34: 1880-4.
12. Kang CI, Kim SH, Park WB, et al. Bloodstream infections caused by antibiotic resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 760-6.

13. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 657-86.
14. Zanetti G, Bally F, Greub G, et al. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3442-7.
15. Vahapoğlu H, Sarıbaş S, Akbal H, Ozturk R, Yücel A. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* J Antimicrob Chemother 1998; 42: 269-70.
16. Ambrose PG, Bhavnani SM, Jones RN. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of cefepime and piperacillin-tazobactam against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases: report from the ARREST program. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1643-6.
17. Mimos O, Elhelali N, Léotard S, et al. Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 91-7.
18. Akan OA. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates: data from İbni Sina Hospital for the year 2002. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates: data from İbni Sina Hospital for the year 2002. Mikrobiyol Bul 2003; 37: 241-6.
19. Aksaray S, Dokuzoğuz B, Güvener E, et al. Surveillance of antimicrobial resistance of Gram negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 695-9.
20. Turner PJ. Trends in antimicrobial susceptibilities among bacterial pathogens isolated from patients hospitalized in European medical centers: 6-year report of the MYSTIC Surveillance Study (1997-2002). Diagn Microbiol Inf Dis 2005; 51: 281-9.
21. Masterton RG. Ciprofloxacin resistance 'early-warning' signs from the MYSTIC surveillance program. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 218-9.
22. Över U, Gür D, Ünal S, Miller GH, the Aminoglycoside Resistance Study Group. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 470-8.
23. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2385-92.