

**KISA BİLDİRİ:**  
**PSEUDOMONAS AERUGINOSA VE ACINETOBACTER BAUMANNII**  
**SUŞLARINDA SERUM DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI\***

SHORT COMMUNICATION:  
 INVESTIGATION OF SERUM RESISTANCE FOR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
 AND *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS

**Nural CEVAHİR\*\***, **İlknur KALELİ\*\***, **Melek DEMİR\*\***  
**Umut YILDIRIM\*\***, **Ebru ÇEVİK\*\***, **Melahat GÜRBÜZ\*\***

**ÖZET:** Serum direnci Gram negatif bakterilerde önemli virulans faktörlerinden biridir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında serum direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Çeşitli klinik örneklerden (trakeal aspirat, idrar, kan, balgam, yara, periton sıvısı) izole edilen 48 *P.aeruginosa* ve 48 *A.baumannii* suşu çalışmaya alınmış, izolatların serum direnci Benge yöntemi ile belirlenmiştir. İnsan serumunun bakterisidal etkisine *P.aeruginosa* suşlarının 4'ü (%8.3) duyarlı, 9'u (%18.7) orta duyarlı, 35'i (%72.9) ise dirençli bulunmuştur. Bu oranlar *A.baumannii* suşları için sırasıyla %4.1 (2/48), %14.5 (7/48) ve %81.2 (39/48)'dir. Sonuç olarak, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında saptanan yüksek düzeyde serum direncinin patojenitede önemli rolü olabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, serum direnci.

**ABSTRACT:** Serum resistance is one of the major virulence factors of Gram negative bacteria. The aim of this study was to investigate the serum resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from various clinical samples (19 tracheal aspirates, 14 urine, 7 sputum, 7 wound and one peritoneal fluid specimens). Forty-eight *P.aeruginosa* and 48 *A.baumannii* strains were tested for human serum bactericidal effect by using Benge's method. Thirty-five (72.9%), 9 (18.7%), and 4 (8.3%) of *P.aeruginosa* strains were found to be resistant, intermediate sensitive and sensitive to serum, respectively. These rates were detected as 81.2% (39/48), 14.5% (7/48), and

\*Bu çalışma, XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongre'sinde (19-23 Eylül 2004 Kuşadası, Aydın) poster olarak sunulmuştur.

\*\*Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

4.1% (2/48) for *A.baumannii* strains, respectively. It can be concluded that, high serum resistance rates of *P.aeruginosa* and *A.baumannii* isolates might have an important role in the pathogenesis of infections of these bacteria.

*Key words: Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, serum resistance.*

## GİRİŞ

Bazı Gram negatif bakteriler, uygun konsantrasyonda insan veya hayvan serumu içinde canlılıklarını kaybetmektedirler. Seruma duyarlı kabul edilen bu suşlar, kompleman aktivasyonu ya da lizozim etkisiyle parçalamaktadırlar. Buna karşın serumun bakterisidal etkisine karşı direnç gösteren suşların daha virulan olduğu bilinmektedir<sup>1-3</sup>.

Nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşları, özellikle konak savunma mekanizmalarının zayıfladığı durumlarda ciddi enfeksiyonlara yol açarlar ve kullanılmakta olan birçok antibiyotiğe dirençlidirler<sup>4,5</sup>.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının insan serumuna karşı direnç durumlarının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve klasik yöntemlerle ya da API NE ile tanımlanmış 48 *P.aeruginosa* ve 48 *A.baumannii* suşu çalışmaya alındı. Suşların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle CLSI standartlarına göre değerlendirildi<sup>6</sup>. Suşların serum direnci Benge yöntemi ile belirlendi<sup>7</sup>. Kısaca; izolatların besleyici sıvı besiyeri (Nutrient broth; NB) içerisindeki 18 saatlik kültürlerinden, yaklaşık  $10^4$  cfu/ml bulanıklığında yeni bir üreme hızı verilmek amacıyla yeniden NB'a ekilip, 37°C'de 2 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra tüpler 10.000 rpm'de beş dakika süreyle santrifüj edildi. Üstteki sıvı döküldükten sonra tüpler tekrar 5 ml'lik fosfat tampon tuzu ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan mikropak çukurlarına 0.1 ml konuldu ve üzerlerine oluşturulan serum havuzundan (son 3 ay içinde antibiyotik kullanmamış sağlıklı kişilerden elde edilen serumlar ile hazırlanmıştır) 0.1 ml eklendi. Her bir suş için iki çukur hazırlandı. Birinci karışımdan kontrol amaçlı birinci dakikada, ikinci çukurdaki karışımdan ise 37°C'de 180 dakika nemli ortamda bekletildikten sonra besleyici agar (Nutrient agar) besiyerine ekimler yapıldı. Her bir suş için iki ayrı karışımdaki üreme oranları belirlendi. Kontrol ekimleri ile karşılaştırıldığında üreme oranı %1'in altına düşen suşlar seruma duyarlı, %90'nın üzerinde üreme gösterenler seruma dirençli, iki oran arasında üreme gösterenler ise seruma orta duyarlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 48 *P.aeruginosa* suşunun 19'u trakeal aspirat, 14'ü idrar, 7'si balgam, 7'si yara, biri periton sıvısı örneklerinden izole edilirken, 48 *A.baumannii* suşunun 28'i trakeal aspirat, 9'u yara, 4'ü kan, 4'ü idrar ve 3'ü

balgam örneklerinden izole edilmiştir. *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları Tablo I'de, insan serumunun bakterisidal etkisine direnç durumları ise Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo I: *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları

Antibiyotikler	<i>P.aeruginosa</i> Sayı (%)	<i>A.baumannii</i> Sayı (%)
Seftazidim	30 (62.5)	44 (91.7)
Sefotaksim	41 (85.4)	46 (95.8)
Seftriakson	–	46 (95.8)
Sefoperazon	27 (56.2)	45 (93.7)
Sefepim	17 (35.4)	38 (79.2)
Aztreonam	27 (56.2)	46 (95.8)
Piperasilin	12 (25.0)	45 (93.7)
Piperasilin/Tazobaktam	–	40 (83.3)
Ampisilin/Sulbaktam	–	46 (95.8)
Trimetoprim/sulfametoksazol	–	40 (83.3)
Amikasin	17 (35.4)	38 (79.2)
Netilmisin	19 (39.6)	9 (18.7)
Gentamisin	20 (41.6)	44 (91.7)
Tobramisin	17 (35.4)	40 (83.3)
Tetrasiklin	–	41 (85.4)
Siprofloksasin	4 (8.3)	39 (81.2)
İmipenem	13 (27.1)	30 (62.5)

Tablo II: *P.aerugi* ve *A.baumannii* Suşlarının Serum Dirençlilik Durumları

	<i>P.aeruginosa</i> Sayı (%)	<i>A.baumannii</i> Sayı (%)
Seruma duyarlı	4 (8.3)	2 (4.2)
Seruma orta duyarlı	9 (18.8)	7 (14.6)
Seruma dirençli	35 (72.9)	39 (81.2)

## TARTIŞMA

Serumun bakterisidal etkisi bakteriyel enfeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli rol oynamaktadır<sup>2</sup>. Komplemanın klasik veya alternatif yoldan aktivasyonu sonucu oluşan membran atak kompleksi, bakteri hücre membranında porlar açarak hücrelerin erimesine neden olmaktadır<sup>8</sup>. Serumun bakterisidal aktivitesine direncin olması birçok Gram negatif bakterinin virulans özelliğidir. Bakterilerin dış membran proteinlerinin, kapsüler polisakkaritlerinin ya da lipopolisakkarit yapısının serum dirençliliği üzerinde etkili olduğu bildirilmiş, *E.coli*'de K1 kapsüler proteinlerin serum direncinde rol oynadığı gösterilmiştir<sup>1,2,8</sup>.

Doğal bir direnç bilinmediği halde, kan, yara, idrar ve yanıktan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının çoğunda serum direnci gösterilmiş, mukoid koloni yapan suşlarının yapmayanlara oranla seruma daha duyarlı oldukları bildirilmiştir<sup>3</sup>. Kistik

fibrozisli hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının çoğu ise seruma duyarlı bulunmuştur<sup>9</sup>. Pajdak ve arkadaşları<sup>10</sup> yaptıkları çalışmada, *P.aeruginosa*'da serum direncini %73 oranında tespit etmişler ve serum direncinin proteolitik aktiviteyle paralellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Shirahige<sup>11</sup> fare osteomyelit modelinde, serum duyarlı *P.aeruginosa* suşlarının osteomyelite neden olmadığını tespit etmiş ve serum direncinin *P.aeruginosa* için önemli bir virulans faktörü olduğunu belirtmiştir. Mete ve arkadaşlarının<sup>12</sup> çalışmasında, *P.aeruginosa* suşlarının %83.7'si seruma dirençli, %9'u seruma orta duyarlı ve %6.9'u seruma duyarlı olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise *P.aeruginosa* suşları için bu oranlar sırasıyla %72.9, %18.8 ve %8.3 olarak saptanmıştır.

Nozokomiyal enfeksiyonların bir diğer önemli etkeni *A.baumannii* ise, bakteriyemi, pnömoni, menenjit, endokardit, cilt ve yara enfeksiyonları gibi hayatı tehdit eden hastalıklara neden olmaktadır. *A.baumannii* sıklıkla çoklu ilaç direnci gösterir ve bu da hastanelerde tedaviyi zorlaştıran önemli bir problemdir<sup>5,13</sup>. *Acinetobacter* türlerinin patogeneğinde rol alan virulans faktörleri çok iyi bilinmemektedir<sup>14</sup>. *Acinetobacter* türlerinde diğer Gram negatif basillerdekine benzer lipopolisakkaritler bulunmaktadır. Lipopolisakkaritlerin insan serumundaki komplemana karşı dirençte rol oynadığı öncelikle Gram negatif bakterilerde gösterilmiştir. Lipopolisakkarit O ve kapsüler polisakkaritlerin her ikisi de burada rol oynamaktadır. Kapsüler polisakkarit mikrobiyal hücre duvarından komplemanın geçişini bloke eder ve komplemanın alternatif yoldan aktivasyonunu önler<sup>15</sup>. Garcia ve arkadaşları<sup>14</sup>, 18 *A.baumannii* suşundan 16'sının seruma dirençli olduğu göstermişler ve serum direncinden lipopolisakkaritin sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda *A.baumannii* suşlarının %81.2'si seruma dirençli, %14.6'sı seruma orta duyarlı ve %4.2'si seruma duyarlı olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının yüksek oranda serum direnci gösterdiği belirlenmiş ve bu durumun patojeniteyi artırıcı önemli bir faktör olduğu kanısına varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Sharma SK, Fatma T, Thukral SS. A simple and rapid serum bactericidal assay and its evaluation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Microbiol Methods 1999; 39: 45-8.
2. Mielnik G, Gamian A, Doroszkiewicz W. Bactericidal activity of normal cord serum against Gram-negative rods with sialic acid-containing lipopolysaccharides. FEMS Immunol Med Microbiol 2001; 31: 169-73.
3. Schiller NL, Alazard MJ, Borowski RS. Serum sensitivity of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strain. Infect Immun 1984; 45: 748-55.
4. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*, pp: 1980-2003. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 1995, 4<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, New York.
5. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species, pp: 2009-13. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 1995, 4<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, New York.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standard M100 S15, 2005. CLSI/NCCLS, Pa.
7. Benge GR. Bactericidal activity of human serum against strains of *Klebsiella* from different sources. J Med Microbiol 1998; 27: 11-5.

8. Leying H, Suerbaum S, Kroll HP, et al. The capsular polysaccharide is major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1990; 58: 222-7.
9. Schiller NL, Joiner KA. Interaction of complement with serum-sensitive and serum-resistant strains of *P.aeruginosa*. *Infect Immun* 1986; 54: 689-94.
10. Pajdak E, Szkarlat A, Kobylarz K. Characteristics of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* I. Resistance to serum bactericidal effect and production of proteolytic enzymes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1990; 38: 309-14.
11. Shirahige A. Study on serum-sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1991; 65: 909-17.
12. Mete M, Atmaca S, Gül K, Elçi S. Serumun *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına antibakteriyel etkisi. *Infeksi Derg* 1998; 12: 385-7.
13. Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, et al. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. *J Hosp Infect* 2004; 58: 170-9.
14. Garcia A, Solar H, Gonzalez C, Zemelman R. Effect of EDTA on the resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to the bactericidal activity of normal human serum. *J Med Microbiol* 2000; 11: 1047-50.
15. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 868-73.