

HASTANE KAYNAKLI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA PER-1 TÜRÜ GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ENZİMLERİNİN SIKLIĞI

THE FREQUENCY OF PER-1 TYPE EXTENDED SPECTRUM BETA- LACTAMASES IN NOSOCOMIAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

**Pınar ZARAKOLU¹, Gökhan METAN², Nazlı GÜRKAN AYDIN³
Belgin ALTUN¹, Gülşen HASÇELİK⁴, Murat AKOVA¹**

ÖZET: Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi'nde hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında PER-1 türü genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerinin sıklığının saptanması amaçlanmıştır. Ocak 2002-Aralık 2004 tarihleri arasında yatarak tedavi gören hastalara ait farklı klinik örneklerden izole edilen 67 *P.aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatların tür düzeyindeki tanımlamaları Sceptor (Beckton Dickinson, USA) sistemi ile yapıldıktan sonra ileri çalışmalar için -80°C'de saklanmıştır. PER-1 türü GSBL enzimlerinin varlığı, *bla*_{PER-1} genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle belirlenmesi sonucu saptanmıştır. İzolatlar arası genetik benzerlik PFGE (pulsed field gel electrophoresis) yöntemiyle belirlenmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılığı Etest (AB Biodisk, Sweden) yöntemiyle araştırılmıştır. Sonuç olarak, izolatların %22.7'sinin (15/67) PER-1 enzimine sahip olduğu saptanmış, PER-1 pozitif izolatların PFGE analizi sonucunda sekiz farklı klonu ait olduğu gösterilmiştir. Bu 15 izolatın dokuzu imipenem/meropeneme, 11'i piperasilin-tazobaktam ve tobramisine dirençli bulunmuştur. GSBL enzimleri üreten *P.aeruginosa* suşlarının yüksek oranda saptandığı bölgelerde çoklu dirençli suşlarla yapılan çalışmalar uygun ampirik tedavi seçiminde yönlendirici olacaktır.

Anahtar sözcükler: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, ESBL, PER-1, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT: The aim of this study was to determine the frequency of PER-1 type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Hacettepe University Adult Hospital. Sixty-seven non-duplicate *P.aeruginosa* isolates from patients with nosocomial infections between January 2002 and December 2004 were included in the study. The isolates were identified at species-level by Sceptor (Becton Dickinson, USA) system, and all the strains were stored at -80°C

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara. (zarakolu@hacettepe.edu.tr)

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁴ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erişkin Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Ankara.

until further testing. Polymerase chain reaction (PCR) was performed for the detection of *bla*_{PER-1} genes, and PFGE analysis was used to investigate their genetic relatedness. The antimicrobial susceptibilities of the PER-1 positive isolates were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) method. According to the results of PCR, 22.7% (15/67) of the isolates were positive for PER-1 enzyme. Those 15 *bla*_{PER-1} positive isolates showed eight different PFGE patterns, indicating the presence of multiple clones. Of the PER-1 positive *P.aeruginosa* isolates, nine were resistant to imipenem/meropenem, and 11 were resistant to piperacillin-tazobactam and tobramycin. The epidemiological investigation of multidrug resistant *P.aeruginosa* should give important clues for the initial empirical therapy, especially in certain geographic locations where ESBL-producing *P.aeruginosa* strains seemed to be highly prevalent.

Key words: Extended-spectrum beta-lactamases, ESBL, PER-1, *Pseudomonas aeruginosa*.

GİRİŞ

Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilmekte olan çoklu dirençli *P.aeruginosa*, antimikrobiyal ajanlara karşı intrensek olarak dirençli olma özelliğinde bir bakteridir^{1,2}. Beta-laktam ajanlara karşı gösterdiği dirençte beta-laktamaz yapımı, hücresel geçirgenliğin azalması ve antibiyotiğin hedef bölgesinde değişiklik gibi pek çok farklı mekanizma rol oynamaktadır^{3,4}. Plazmid aracılığıyla geçiş gösteren genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimleri, 1980'lerin başından itibaren *Enterobacteriaceae* ailesinin farklı üyelerinde rapor edilmiş, izleyen yıllarda ise başta *P.aeruginosa* olmak üzere fermentasyon yapmayan bakteri türlerinde de tespit edilmiştir⁵. PER-1 türü GSBL enzimi ilk olarak Fransa'da bir *P.aeruginosa* suşunda⁶, sonrasında ise Türkiye ve İtalya'da *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde gösterilmiştir^{7,8}. PER-2 ise Arjantin'de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da rapor edilmiştir⁹.

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi'nde hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında PER-1 türü genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerinin sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2002-Aralık 2004 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi'nde yatarak tedavi gören hastalara ait farklı klinik örneklerden hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 67 *P.aeruginosa* (17 kan, 17 idrar, 17 pü, 9 bronkoalveolar lavaj, 2 derin trakeal aspirat, 2 kateter, 1 beyin omurilik sıvısı, 1 torasentez sıvısı, 1 parasentez sıvısı) suşu çalışmaya alındı. İzolatların tür düzeyindeki tanımlaması Sceptor (Beckton Dickinson, USA) sistemi ile yapıldı. Suşlar çalışma dönemine kadar -80°C'de saklandı.

*Bla*_{PER-1} genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle saptandı¹⁰. Amplifikasyonlarda primer dizisi olarak PER-1 (5' ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC 3' ve 5' AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA 3') kullanıldı¹¹; 926 baz çift (bc)'lik bölgede bant görülmesi PER-1 için pozitif olarak değerlendirildi.

İzolatlar arası genetik benzerliğin belirlenmesi amacıyla PFGE (pulsed field gel electrophoresis) yöntemi kullanıldı. Elde edilen PFGE kalıpları genetik klonal yakınlık açısından Tenover ve arkadaşları¹² tarafından tanımlanan kriterlere göre değerlendirildi.

PER-1 pozitif izolatların imipenem, meropenem, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, sefotaksim, sefepim ve siprofloksasin duyarlılığı Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) yöntemi ile belirlendi. Duyarlılık sonuçları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre yorumlandı¹³. Orta duyarlı suşlar dirençli grubunda değerlendirildi.

Kalite kontrol suşu olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, PCR sonuçlarına göre izolatların %22.7'si (15/67) PER-1 varlığı yönünden pozitif bulunmuştur (Resim 1). Pozitif izolatların PFGE analizi sonucunda 8 farklı klona ait olduğu görülmüştür.

PER-1 pozitif izolatların 9'u imipenem/meropeneme, 11'i ise piperasilin-tazobaktam ve tobramisine dirençli olarak saptanmıştır (Tablo I).



Resim 1. PER-1 pozitif *P.aeruginosa* izolatları (M: Moleküler ağırlık standardı; Hat 1-15: Hasta izolatları; Hat 16: Per-1 Pozitif kontrol; Hat 17: Negatif kontrol).

Tablo I. PER-1 pozitif *P.aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlılık Durumları

Antibiyotikler	MİK aralığı (μg/ml)	Duyarlılık (n)
Seftazidim	1-256	3
Sefotaksim	16-256	0
Sefepim	1-256	2
Tobramisin	0.5-256	4
Siprofloksasin	0.25-32	6
Piperasilin-tazobaktam	2-256	4
İmipenem	0.25-32	6
Meropenem	0.25-32	6

TARTIŞMA

P. aeruginosa hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında önemli bir yere sahiptir. Nötropenik hastalar veya kanser hastaları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda gelişen enfeksiyonların seyri ağır olabilmektedir². Birçok merkezden antimikrobiyallere karşı giderek artan direnç oranları bildirilmektedir¹⁴. Ülkemizde izole edilen çoklu dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında PER-1 enzimlerinin yüksek oranda saptanması dikkat çekici bulunmaktadır⁵. Çok merkezli bir çalışmada, *P.aeruginosa* suşlarının %11'inde PER-1 türü GSBL enzimleri saptanmıştır⁸. PER-1 tipi enzim salgılayan suşlarla enfeksiyon gelişmesinin mortalite açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu, yine ülkemizde gerçekleştirilen çok merkezli bir vaka-kontrol çalışmasında ortaya konmuştur¹⁵. Bu çalışmada hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarında yüksek oranda PER-1 enzimleri saptanmıştır. Ülkemizde yakın dönemde farklı merkezlerde yapılan çeşitli çalışmalarda, PER-1 türü enzimlerin *P. aeruginosa*'da yaygın olduğu bildirilmiştir^{16,17}.

GSBL enzimlerine karşı etkinliği sınırlı olan seftazidim ve sefepim, gram negatif bakterilerin etken olduğundan şüphelenilen enfeksiyonların ampirik tedavisinde sık tercih edilen ajanlardır. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında uygunsuz ampirik antimikrobiyal tedavi, mortalite açısından önemli bir risk faktörü olarak rapor edilmiştir¹⁸. *P.aeruginosa* suşlarında in vitro duyarlılık sonuçları, GSBL enzimlerini saptamak için yeterli duyarlılıkta değildir⁵. Bu çalışmada PER-1 pozitif izolatların %20'si (3/15) seftazidime karşı duyarlı bulunmuştur. GSBL üreten *P.aeruginosa* suşları ile gelişen ciddi enfeksiyonların tedavisinde birinci seçeneği karbapenem grubu oluşturmakta ve imipenem PER-1 türü GSBL üreten *P.aeruginosa*'ya karşı en etkin ajan olarak rapor edilmektedir¹⁹. Bu çalışmada ise karbapenemlere karşı saptanan yüksek direnç oranı dikkat çekicidir. Bu suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik seçeneklerinin belirgin olarak kısıtlı olduğu gözlenmektedir.

Sonuç olarak, özellikle GSBL enzimleri üreten *P.aeruginosa* suşlarının yüksek oranda saptandığı bölgelerde, çoklu dirençli suşlarla yapılan çalışmalar uygun ampirik tedavi seçiminde yönlendirici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 229-33.
2. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*, pp: 2310-35. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed, 2000, Churchill Livingstone, UK.
3. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-84.
4. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002; 34: 634-40.
5. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2385-92.

6. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 962-9.
7. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1865-70.
8. Vahaboglu H, Öztürk R, Aygun G, 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.
9. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, et al. Characterization of beta-lactamase gene bla_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 616-62.
10. Ridley AM. Genomic fingerprinting by application of rep-PCR, pp: 103-15. In: Woodford N, Johnson AP (eds), *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. 1998, Humana Press, Totowa, NJ.
11. Poirel L, Karim A, Poriol L, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 157-65.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th Informational Supplement. CLSI/NCCLS Document M100-S15. 2005, Wayne, Pa.
14. Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (Suppl 2): 146-55.
15. Vahaboğlu H, Coşkun 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.
16. Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, Saniç A, Vahaboğlu H, Thu Study Group. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249: 241-5.
17. Aktaş Z, Poirel L, Salcıoğlu M, et al. PER-1- and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 193-8.
18. 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.
19. 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.