

PSEUDOMONAS AERUGINOSA VE ACINETOBACTER BAUMANNII SUŞLARINDA BD PHOENIX SİSTEMİ İLE SAPTANAN KARBAPENEM DİRENCİNİ RAPORLAYALIM MI?*

SHALL WE REPORT THE CARBAPENEM RESISTANCE IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA AND ACINETOBACTER BAUMANNII STRAINS DETECTED BY BD PHOENIX SYSTEM?

Dilara ÖĞÜNÇ¹, Gözde ÖNGÜT¹, Nevgün SEPİN ÖZEN¹, Betil ÖZHAK BAYSAN¹, Filiz GÜNSEREN², Duygu DAĞLAR¹, Hadiye DEMİRBAKAN¹, Meral GÜLTEKİN¹

¹ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya. (dogunc@akdeniz.edu.tr)

² Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya.

ÖZET

İmipenem ve meropenem *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri ile oluşan nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde etkin geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Yapılan çalışmalarda duyarlılık testlerinde yalancı imipenem direncinin olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" tarafından karbapeneme dirençli veya az duyarlı izolatlarda, sonuçların farklı bir yöntemle doğrulanması önerilmiştir. Bu çalışmada, BD Phoenix otomatize sistemiyle imipenem ve meropeneme dirençli veya az duyarlı saptanan *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının imipenem-meropenem duyarlılıklarının disk difüzyon, E-test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2006-Ocak 2007 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümünde çeşitli klinik örneklerden izole edilen, BD Phoenix sistemi (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) ile imipenem ve meropeneme dirençli veya az duyarlı saptanan 85 *A.baumannii* ve 51 *P.aeruginosa* suşu dahil edilmiştir. Tüm suşların imipenem ve meropeneme karşı duyarlılığı "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda referans sıvı mikrodilüsyon, disk difüzyon ve E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemleri ile araştırılmıştır. BD Phoenix sistemi ile imipenem ve/veya meropeneme az duyarlı veya dirençli saptanan 51 *P.aeruginosa* izolatının tümü sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile az duyarlı veya dirençli olarak saptanmış; Phoenix sistemi ile elde edilen meropenem sonuçları (%5.9) dışında tüm duyarlılık test yöntemlerinde küçük hata oranları benzer (%1.9) bulunmuştur. Her iki antibiyotik için duyarlılık test yöntemlerinin hiçbirinde büyük hata saptanmamıştır. *A.baumannii* suşlarında da, test yöntemleri arasında imipenem için küçük hata ve büyük hata tespit edilmemiş; meropenem için küçük hata oranları yöntemler arasında %2.4-3.5 arasında değişirken, büyük hata sadece bir suşta Phoenix sistemi ile elde edilmiştir. Sonuç olarak, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşların-

* Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

da BD Phoenix sistemi ile elde edilen karbapenem dirençli veya az duyarlı sonuçların, ek bir test yöntemi ile doğrulanmasına gerek olmadan raporlanabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Karbapenem direnci, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, BD Phoenix sistemi.

ABSTRACT

Imipenem and meropenem are broad spectrum antimicrobial agents that are especially useful in the treatment of nosocomially acquired *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. infections. Previous reports have noted that susceptibility tests could show false resistance to imipenem. For this reason, Centers for Disease Control and Prevention has recommended that all carbapenem resistant or intermediate resistant isolates should be tested with an additional method to verify the results. This study was aimed to evaluate the imipenem and meropenem susceptibilities by disk diffusion, E-test and broth microdilution in *P.aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains found to be resistant or intermediate to imipenem-meropenem by BD Phoenix automated susceptibility testing system. Between January 2006-January 2007, 85 non-duplicate isolates of *A.baumannii* and 51 non-duplicate isolates of *P.aeruginosa* which were determined as resistant or intermediate resistant to imipenem and/or meropenem by BD Phoenix automated identification and susceptibility system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) were collected in Akdeniz University Hospital Central Laboratory. All strains were tested by E-test (AB Biodisk, Sweden), disk diffusion and reference broth microdilution (BMD) method following CLSI recommendations. All 51 isolates of *P.aeruginosa* determined as imipenem and/or meropenem resistant or intermediate resistant by BD Phoenix, were found to be imipenem and/or meropenem resistant or intermediate resistant by the reference BMD method. Minor error rates were same for all testing systems (1.9%) except for the meropenem results of BD Phoenix system (5.9%). No major errors were produced by any system. For *A.baumannii*, only one very major error was detected for meropenem by BD Phoenix system. Number of minor errors determined for meropenem by all testing systems compared to the reference test, ranged from 2 (2.4%) to 3 (3.5%). It was concluded that carbapenem susceptibility test results obtained by BD Phoenix system for *P.aeruginosa* and *A.baumannii* isolates, could be reported without an additional susceptibility testing method unless indicated on case basis.

Key words: Carbapenem resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, BD Phoenix system.

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa ve *Acinetobacter* türleri hastane enfeksiyonlarının en sık etkeni olan nonfermentatif gram-negatif mikroorganizmalardır^{1,2}. Çoklu antibiyotik direnci kazanma yetenekleri, çevresel yüzeylerde uzun süre yaşayabilme özellikleri ve salgınlar oluşturabilmeleri ile önemleri giderek artmaktadır^{3,4}. Karbapenem grubu antibiyotikler geniş etki spektrumları ile bu mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde halen en etkili antibiyotikler olmasına karşın, karbapenemlere karşı gelişen direnç, tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır^{3,5}. Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antimikrobiyal duyarlılık testlerinin hızlı ve doğru olarak yapılması, tedaviyi yönlendirme ve enfeksiyon kontrolü açısından önemlidir^{6,7}.

P.aeruginosa ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında bulunan çok sayıda farklı direnç mekanizmaları nedeniyle duyarlılık test sonuçlarının değerlendirilmesinde zorluklarla karşılaşmaktadır³. Bunun yanında test edilen antibiyotiğin özellikleri de duyarlılık test sonuçlarını etkilemektedir. Örneğin; imipenem, stabil olmaması nedeniyle kolayca parça-

lanabilmektedir. Meropenem ise imipeneme göre daha stabil olmasına karşın, her iki antimikrobiyal için de duyarlılık panelleri, disklerin monitörizasyonu ve saklama koşullarının takibi gereklidir. Bu nedenle "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" tüm karbapenemlere dirençli ve az duyarlı izolatların farklı bir yöntemle doğrulanmasını önermektedir⁸.

Bu çalışmada, BD Phoenix otomatize tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık sistemiyle imipenem ve meropeneme dirençli veya az duyarlı saptanan *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının imipenem-meropenem duyarlılıklarının disk difüzyon, E-test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak 2006-Ocak 2007 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümünde çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve BD Phoenix sistemi (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) ile imipenem ve meropeneme dirençli veya az duyarlı olarak saptanan 85'i *A.baumannii* ve 51'i *P.aeruginosa* olmak üzere toplam 136 suş alındı. Bakterilerin tanımlanması, konvansiyonel yöntemler⁹ ve BD Phoenix sistemi ile yapıldı.

Tüm suşların imipenem ve meropenem duyarlılığı disk difüzyon, E-test ve referans sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırıldı¹⁰⁻¹². Sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerilerine göre uygulandı. Besiyeri olarak katyon eklenmiş Mueller-Hinton sıvı besiyeri ve Mueller-Hinton agar besiyerleri kullanıldı. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan imipenem (Merck Research Laboratories, Rahway, N.J) ve meropenem (Zeneca Pharmaceuticals, Wilmington, Del.) içeren mikrodilüsyon plakları, 0.06-32 µg/ml konsantrasyon aralığında olacak şekilde hazırlandı. E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. Kontrol suşu olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı.

Uygulanan duyarlılık yöntemlerinin karşılaştırılmasında; bir suşun referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlı, test yöntemi ile dirençli bulunması büyük hata; sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlı ya da dirençli, test yöntemi ile az duyarlı bulunması ise küçük hata olarak değerlendirilmektedir. Büyük hata oranının %3, küçük hata oranının %10'un altında olması, sistem için kabul edilebilir performans kriteri olarak belirlenmektedir¹³. BD Phoenix sistemi ile duyarlı olarak saptanan izolatlar çalışmaya alınmadığından çok büyük hata oranları tartışılmadı.

BULGULAR

Phoenix sistemi ile imipenem ve/veya meropeneme az duyarlı veya dirençli saptanan 51 *P.aeruginosa* izolatının tümü sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile az duyarlı veya dirençli olarak saptanmıştır. Phoenix sistemi ile elde edilen meropenem sonuçları dışında, tüm duyarlılık test yöntemlerinde küçük hata oranları benzer bulunmuştur. Her iki antibiyotik için duyarlılık test yöntemlerinin hiçbirinde büyük hata saptanmamıştır. *P.aeruginosa* suşlarında test yöntemlerinin her iki antibiyotik için CLSI yorumlama kriterlerine uyum

Tablo I. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Karbapenem Direnci Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Değerlendirilmesi*

Test yöntemi	Küçük hata oranları n (%) İMP/MER	Büyük hata oranları n (%) İMP/MER	CLSI kriterlerine göre uyum % İMP/MER
Phoenix	1 (1.9)/3 (5.9)	-/-	98.1/94.1
Disk difüzyon	1 (1.9)/1 (1.9)	-/-	98.1/98.1
E-test	1 (1.9)/1 (1.9)	-/-	98.1/98.1

* Sıvı mikrodilüsyon testi referans yöntem olarak alınmıştır.

İMP: İmipenem, MER: Meropenem, CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Tablo II. *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Karbapenem Direnci Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Değerlendirilmesi*

Test yöntemi	Küçük hata oranları n (%) İMP/MER	Büyük hata oranları n (%) İMP/MER	CLSI kriterlerine göre uyum % İMP/MER
Phoenix	-/3 (3.5)	-/1 (1.2)	100/95.3
Disk difüzyon	-/3 (3.5)	-/-	100/96.5
E-test	-/2 (2.4)	-/-	100/97.6

* Sıvı mikrodilüsyon testi referans yöntem olarak alınmıştır.

İMP: İmipenem, MER: Meropenem, CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

oranlarının %94.1-98.1 arasında olduğu belirlenmiştir. *P.aeruginosa* suşlarında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılan duyarlılık testlerinde imipenem ve meropenem için elde edilen hata ve CLSI yorumlama kriterlerine göre uyum oranları Tablo I'de gösterilmiştir.

A.baumannii suşları dikkate alındığında; test yöntemleri arasında imipenem için küçük hata ve büyük hata saptanmamıştır. Meropenem için küçük hata oranları yöntemler arasında %2.4-3.5 arasında değişirken, büyük hata sadece bir suşta Phoenix sistemi ile elde edilmiştir. *A.baumannii* suşlarında test yöntemlerinin her iki antibiyotik için CLSI yorumlama kriterlerine uyum oranlarının %95.3-100 arasında olduğu belirlenmiştir. *A.baumannii* suşlarında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılan duyarlılık testlerinde imipenem ve meropenem için elde edilen hata ve CLSI yorumlama kriterlerine göre uyum oranları Tablo II'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin antibakteriyel duyarlılık testleri için CLSI tarafından önerilen konvansiyonel yöntemlerin yanında otomatize sistemler ve E-test gibi ticari yöntemler de kullanılabilir¹⁴. Otomatize sistemlerle, antibakteriyel duyarlılık testlerinin yanı sıra bakteri tanımlanmasının da yapılabilmesi ve konvansiyonel yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç verilebilmesi nedeniyle, bu sistemler yoğun iş akışı olan laboratuvarlarda daha yaygın kullanım alanı bulmuştur. Otomatize sistemler iş

gücü tasarrufu ile birlikte hasta bakımının iyileşmesine de katkı sağlar. Ancak avantajlarının yanında, sistemlerin sınırlılıklarının da kullanıcılar tarafından bilinmesi gereklidir¹⁴.

Steward ve arkadaşları⁵ *Enterobacteriaceae* ve *P.aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin saptanmasında farklı test yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, tekrarlanabilirlik oranının düşük olduğunu ve tek bir yöntemle saptanan karbapenem direncinin ikinci bir yöntemle doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar, hatalı sonuçların, test panellerindeki imipenem parçalanması, otomatize cihazların duyarlılık testlerini değerlendirmelerindeki hatalar, antibiyotik plak, kart veya disklerinin uygun olmayan koşullarda saklanması ve yüksek inokulum kullanılması gibi teknik sorunlara bağlı olabileceğini belirtmişlerdir⁵. Menozzi ve arkadaşları⁶ BD Phoenix otomatize sisteminin performansını araştırdıkları çalışmalarında, 77 *P.aeruginosa* suşunda imipenem ve meropenem için büyük ve çok büyük hata saptamamışlar, küçük hata oranlarını imipenem için %5.2 meropenem için %1.3 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, *Acinetobacter* suşlarını da içeren nonfermentatif gram-negatif bakterilerde imipenem için hata bulunmazken, meropenem için sadece %3.5 oranında küçük hata bildirilmiştir⁶.

Kulah ve arkadaşları⁴ çalışmalarında, *A.baumannii* suşlarında imipenem direncinin saptanmasında otomatize sistemlerin performansını sıvı mikrodilüsyon, disk difüzyon ve E-test yöntemleri ile karşılaştırmışlardır. BD Phoenix otomatize sistemi ile çok büyük ve küçük hata saptamamışlar, büyük hata oranını %2.8 olarak bildirmişlerdir⁴. Aynı çalışmada E-test yöntemi ile çok büyük ve büyük hata saptanmazken, küçük hata oranı %1.8 olarak bildirilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle ise çok büyük hata oranı %1.8, büyük hata oranı %2.7 bulunurken küçük hata saptanmamıştır⁴. *P.aeruginosa* suşlarında dört farklı otomatize sistemle beta-laktam duyarlılık test sonuçlarının doğruluğunun araştırıldığı bir başka çalışmada, BD Phoenix sistemi ile imipenem duyarlılığının saptanmasında çok büyük ve küçük hata saptanmamış, büyük hata oranı ise %3.3 olarak bildirilmiştir¹⁶. Donay ve arkadaşları¹⁷ da, *P.aeruginosa* suşlarında imipenem duyarlılığını saptamada BD Phoenix sistemi ile disk difüzyon yönteminin %100 uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

BD Phoenix sistemi ile yapılan çalışmalara benzer şekilde, bizim çalışmamızda da *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem direncinin saptanmasında sistemin performansının kabul edilebilir düzeyde olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, BD Phoenix otomatize sistemi ile *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında karbapenem direnci saptandığında rutin uygulamada bu sonucun rapor edilebileceği; ancak klinik-laboratuvar değerlendirmesi sonucunda olgu bazında referans yöntem uygulamasının gerekebileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Pier GB, Ramhal R. *Pseudomonas aeruginosa*, pp: 2587-615. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Lortholary O, Fagon JY, Hoi AB, et al. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. Clin Infect Dis 1995; 20: 790-6.

3. Blondel-Hill E, Henry DA, Speert D. *Pseudomonas*, pp: 734-48. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. ASM, Washington DC.
4. Kulah C, Aktas E, Comert F, Ozlu N, Akyar I, Ankarali H. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan Walkaway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. BMC Infect Dis 2009; 9: 30.
5. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other non-fermentative gram-negative rods, pp:770-802. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. ASM, Washington DC.
6. Menozzi MG, Eigner U, Covan S, et al. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. J Clin Microbiol 2006; 44: 4085-94.
7. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid invitro susceptibility testing and bacterial identification. J Clin Microbiol 1994; 32: 1757-62.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Control of Infections with Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Acute Care Facilities. Available at: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5810a4.htm>
9. Winn W, Allen S, Janda W (eds). The nonfermentative gram-negative bacilli, pp: 303-91. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standard M100-S16. 2006, Sixteenth Informational Supplement. CLSI, Wayne, PA.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved Standard M2-A9. 2006, 6th ed. CLSI, Wayne, PA.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A7. 2006, 6th ed. CLSI, Wayne, PA.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved Guideline M23-A2. 2001, 2nd ed. NCCLS/CLSI, Wayne, PA.
14. Evangelista AT, Truant AL. Rapid systems and instruments for antimicrobial susceptibility testing of bacteria, pp: 413-28. In: Truant AL (ed), Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology. 2002, 1st ed. ASM Press, Washington DC.
15. Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, et al. Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J Clin Microbiol 2003; 41: 351-8.
16. Juretschko S, LaBombardi VJ, Lerner SA, Schreckenberger PC, and the Pseudomonas AST Study Group. Accuracies of β -lactam susceptibility test results for *Pseudomonas aeruginosa* with four automated systems (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek, and Vitek 2). J Clin Microbiol 2007; 45: 1339-42.
17. Donay JL, Mathieu D, Fernandes P, et al. Evaluation of the automated Phoenix system for potential routine use in the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2004; 42: 1542-6.