

Mehmet Ali YALÇIN
H. Hakan ER
Nükhet KURULTAY
Nurten BARAN
Gamze ŞENER

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Laboratuvarı

Anahtar sözcükler: İndüklenebilir
beta-laktamaz, *Pseudomonas*
aeruginosa, sefepim.

Keywords: Inductionable beta-
laktamases *Pseudomonas aeruginosa*,
cefepim.

İNDÜKLENEBİLİR BETA LAKTAMAZ ÜRETEEN VE HASTANE İNFEKSİYONU OLUŞTURAN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA E TEST YÖNTEMİ İLE SEFEPİM'İN İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Investigation Of *Pseudomonas Aeruginosa* That Produce
Inductionable Beta Laktamase And Nosocomial Infections, In
Vitro Effect Of Sefepim, With E Test Method

ÖZET

İndüklenebilir beta-laktamaz salgıladığı nitrosefin disk ve çift disk sinerji yöntemi ile belirlenen 100 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda; sefepim duyarlılığı CLSI standart disk difüzyon yöntemi ile ve minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) in-vitro E test yöntemi ile araştırıldı. Bunlara göre 5 dirençli (%5), 2 orta duyarlı (%2), 93 duyarlı (%93) suş tespit edildi. sefepim dirençli 5 suşun MİK değeri ≥ 32 µg/ml, 2 orta duyarlı suşun MİK değerleri 14 ve 16 µg/ml olarak saptandı. Bu çalışmada; indüklenebilir beta-laktamaz üreten *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına sefepim'inin etkin bir antibiyotik olduğu görülmüştür.

SUMMARY

In this study antimicrobial susceptibility of cefepim against 100 *Pseudomonas aeruginosa* isolates, which were detected to produce inducible beta laktamase by nitrocephin disk and double disk synergy methods and was determined by the CLSI disk diffusion and E test methods in vitro. 93 (93%) Isolates were showed to be susceptible while 2 (2%) were intermediate and 5 (5%) were resistant. MIC values of the resistant five and intermediate two strains were ≥ 32 µg/ml and 14 and 16 µg/ml, respectively. In this study we observed that cefepim is active against *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

GİRİŞ

Hastane enfeksiyonlarına yol açan etkenler, hastanede uygulanan antibiyotik politikalarına ve zamana göre değişiklik gösterirler. En sık rastlanan etkenler metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus* türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* türleri, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* türleri, *Acinetobacter* türleri ve son yıllarda *Candida* türlerinde de artış tespit edilmiştir (1, 2). Beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişmesinde; mikroorganizmaların beta-laktamaz enzim üretimleri en önemli etkidir. Bu enzimler kromozom, plazmid, transpozonlar ile kodlanan enzimlerdir (3). Beta-laktamaz enzimleri kromozom, plazmid, transpozonlarla taşınır ve genellikle Ambler ve Bush-Jacoby-Medeiros sistemi ile şemalandırılırlar (4, 5). Bu enzimler; başta Sefalosporinler olmak üzere, penisilinleri ve beta-laktam antibiyotikleri parçalarlar. *Acinetobacter*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Providencia*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia marcescens* suşları indüklenebilir beta-laktamazlar üretmektedir (6). Bu enzimler ortamda; beta-laktamaz indükleyici antibiyotik olduğunda daha çok üretilmektedir. İndükleyici antibiyotik yokluğunda düşük düzeyde kalmaktadır. AmpC beta-laktamaz üretiminin indüklenmesi: Değişik antibiyotiklere göre farklılıklar göstermektedir. Örneğin; İmipenem güçlü indükleyici ve oluşan enzimin etkisine dirençli bir antibiyotiktir. Sefoksitin de güçlü indükleyicidir; fakat oluşturduğu enzimle hızla parçalanır (7). Çalışmaya alınan klinik örneklerdeki indüklenebilir beta-laktamaz oluşturan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarındaki Cefepim duyarlılığı E test yöntemi ile araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için; 01 Şubat 2007–31 Aralık 2007 tarihleri arasında İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinin değişik servislerinden örnekler toplandı (Tablo 1 ve Tablo 2).

Yazışma adresi:
Mehmet Ali YALÇIN
Basın Sitesi Mah. 168.Sok.
No: 36 D.13 Özsit Apt.
KONAK / İZMİR
Tel: 0 505 246 73 80
Ev tel: 0 232 243 27 14

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışıldı. Çalışmada izole edilen 100 *P. aeruginosa* suşu araştırmaya dahil edildi.

Tablo 1: *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği servislere göre dağılımı

Klinik birim	Sayı
Beyin Cerrahi Servisi	4
Dahiliye Servisi	18
Dermatoloji Servisi	4
İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Serv.	2
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi	2
Hematoloji Servisi	3
Cerrahi Servisi	11
Kadın Doğum Servisi	5
Kalp Damar Cerrahi Servisi	1
Kulak Burun Boğaz Servisi	5
Nefroloji Servisi	3
Nöroloji Servisi	10
Ortopedi Servisi	7
Plastik Cerrahi Servisi	5
Psikiyatri Servisi	1
Üroloji Servisi	1
Yoğun Bakım Servisi	18

Tablo 2: *P. aeruginosa* suşunun klinik örneklerle göre dağılımı

Klinik örnek	Sayı
Balgam	12
Boğaz	1
Beyin Omurilik Sıvısı	2
Burun sürüntüsü	1
İdrar	14
Kan kültürü	13
Kulak sürüntüsü	3
Trakeal aspirat sıvısı	2
Yara yeri sürüntüsü	52
Toplam	100

Çalışılan örneklerdeki *P. aeruginosa* suşların identifikasyonu geleneksel yöntemlerle ve yarı otomatik (*BBL Crystal Autoreader*, *B.D.*) sistemi ile yapıldı. Nitrosefin disk testi (*BBL cefinase*, *B.D.*) ile de beta-laktamaz testi yapıldı.

Bu çalışmada indüklenebilir beta-laktamaz varlığını göstermek için çift disk sinerji yöntemi yapıldı.

Bunun için: 0,5 *Mc Farland* bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları *Mueller-Hinton* agar plak besiyeri yüzeyine yayıldı. Ortaya güçlü beta-laktamaz indükleyici etkisi olan imipenem (IMP 10µg) diski kondu. Bundan 25 mm uzaklığa seftazidim (CAZ 30µg) diski konuldu. Bunun tam karşısına yine IMP' den 25 mm uzağına sefotaksim (CTX 30µg) diski konuldu. Plaklar 37°C'de etüvde 24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi.

Sefotaksim ve seftazidimin imipeneme bakan yüzlerinde, inhibisyon zonlarında belirgin olarak daralma görüldü, bu durum bakteri suşunda İBL pozitifliği lehine olarak değerlendirildi (8). İzole edilen bakterilerin sefepime karşı kantitatif duyarlılığını ölçmek için E test kullanıldı.

Bunun için: 0,5 *Mc Farland* bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları *Mueller-Hinton* agar plak besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra sefepimin E test stripleri (inert plastik şeritleri) (*AB Biodis, Sweden*) plak üzerine yerleştirildi.

24 saat 37°C'de etüvde inkübe edilerek suşların sefepime duyarlılıkları stripler üzerinden okunarak değerlendirildi.

Sonuçlar; **Clinical and Laboratory Standards Institute** (CLSI) kriterlerine göre yorumlandı.

Buna göre minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri ≤ 8 µg/ml bulunan suşlar duyarlı, 8–32 µg/ml arasında bulunan suşlar orta duyarlı ve ≥ 32 µg/ml bulunan suşlar ise dirençli olarak kabul edildi (9). Kontrol suşu olarak *ATCC 27853 P.aeruginosa* kullanıldı. Çıkan sonuçlar ile uyumlu olduğu görüldü.

BULGULAR

Hastane infeksiyonu yapan ve indüklenebilir beta-laktamaz salgılayan *P. aeruginosa* suşlarında sefepimin in vitro etkinliği E test yöntemi ile araştırıldı.

Buna göre çalışmamızda izole edilen 100 *P. aeruginosa* suşunun 93'nün (% 93) duyarlı, 2'nin (% 2) orta duyarlı ve 5'nin (% 5) sefepime dirençli olduğu tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 3. Duvarlı, orta duvarlı ve dirençli *P. aeruginosa* E test

MİK değerleri µg/ml	Adet
≥ 32 µg/ml	5
8– ≥ 32 µg/ml	2
≤ 8 µg/ml	93
TOPLAM	100

İzole edilen 100 tane *P. aeruginosa* suşlarına disk difüzyon yöntemi ile antibiyogram yapıldı.

Antibiyotik disklerinin zon çaplarına göre; duyarlılık, orta duyarlılık ve dirençlilik durumları sayısal olarak aşağıda belirtildi (Tablo 4).

Tablo 4. Antibiyotik disklerinin zon çaplarına göre; duyarlılık,

Antibiyotik diskleri	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Seftriakson (30µg)	84	1	15
Seftazidim (30µg)	100	-	-
Imipenem (10 µg)	99	-	1
Aztreonam (30 µg)	100	-	-
Sefepim (30 µg)	93	2	5
Piperasilin/Tazobaktam (100/10 µg)	100	-	-
Amikasin (30 µg)	100	-	-
Ciprofloksasin (5 µ)	79	-	21
Ampisilin/Klavulanik asit (100/10 µg)	-	-	100
Kloramfenikol (30 µg)	-	-	100
Sefotaksim (30 µg)	70	-	30

TARTIŞMA

Çalışmamızda kullandığımız yöntemle İBL salgıladığı gösterilebilen *P. aeruginosa* suşlarının 93'ü (% 93) sefepime duyarlı, 2'i (% 2) orta duyarlı, 5'i (% 5) dirençli bulunmuştur. Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa, İsrail ve Türkiye'nin de içinde bulunduğu SENTRY antimikrobiyal araştırma programı dahilinde 1997-1999 yıllarında tespiti yapılan 6631 *P. aeruginosa* suşlarının değişik antibiyotiklere duyarlılık oranları tespit edilmiştir. Suşların sefepime duyarlılık oranları % 66.2 ile % 91.2 arasında olduğu görülmüştür (10).

Yapılan antibiyotiklere dirençlilik çalışmalarında *P. aeruginosa* suşlarının coğrafik bölgelere, hastaneden hastaneye, hatta servislere göre duyarlılıklarının değişebilmekte olduğu görülmüştür. Her zaman açıklanmasa da ülkelerin ve hastaneden hastaneye değişebilen antibiyotik kullanım politikaların, alınan enfeksiyon kontrol önlemlerinin farklı uygulanmasından oluşabileceği bildirilmektedir (10).

Öngüt ve arkadaşları çalışmalarında *P. aeruginosa* suşlarının sefepime duyarlılığının % 100 (11), Zer ve arkadaşları çalışmalarında % 81 (12), Kizirgil ve arkadaşları çalışmalarında % 84 (13). Erdem ve arkadaşları çalışmalarında % 80.7 duyarlı olduğunu saptamışlardır (14).

Çalışmamızda sefepim duyarlılığının % 2'si orta duyarlı, % 93'ü duyarlı olduğunu gördük. Bu çalışmalar sonucu sefepimin *P. aeruginosa*'nın tedavisinde kullanılabilecek bir antibiyotik olabilir. Dördüncü kuşak sefalosporinler geniş spektrumlu gruptur. Bakteriyemi, deri, yumuşak doku, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonlarında etkileri kanıtlanmıştır (15). Sefepim ve sefpirom bu grupta yer alan antibiyotikler olup ülkemizde sadece sefepimin ticari preparatı satılmaktadır.

Beta-laktam antibiyotiklerin etkinliği, beta-laktamaz enzimlerini indüklemesine, beta-laktamaz enzimi hidrolizine dayanma ve penetrasyon gücü ile ölçülür (15). Sefepimin zwitterion iyon yapısı Gram negatif bakterilerin dış membranından hızlı geçmesi, periplazmik aralıkta yüksek konsantrasyonlara ulaşması ayrıca beta-laktamaz enzimleri indükleme gücünün düşük olması ile bu enzimi üreten suşlara etki gücünün diğer sefalosporinden daha fazla olduğu saptamıştır (16).

Beta-laktamaz enzimleri aracılığı ile bakterilerin antibiyotikleri etkisiz kılmaları bugün en yaygın fakat hala en iyi bilinmeyen bir mekanizma olarak önümüzde durmakta en çok da gram olumsuz bakteri enfeksiyonlarında karşımıza çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1) Speller DCE, Humphreys H: Hospital-Acquired Infection. In: Collier L, Balows A, Susman M, (Eds.) Topley&Wilson's Microbiology and Infection. 9 th ed. London: Arnold,1998: 187-229.
- 2) Töreci K. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları ve Hastane Enfeksiyonları açısından önemi. Aktüel Tıp Dergisi; 1996; 1.(6): 441-447.
- 3) Bilgehan H: Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 2000, s. 175-188.
- 4) Rice LB, Sahm D, Bonomo RA: Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8. baskı" kitabında s.1074-101, ASM Pres, Washington, DC (2003).
- 5) Livermore DM: Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol. Rev. 1995; 8: 557-84.
- 6) Swenson JM, Hindler JF, Jorgensen JH: Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8. baskı" kitabında s. 1178-95, ASM Pres, Washington, DC (2003).

- 7) Gülay Z: indüklebilir beta-laktamazlar: Özellikleri, epidemiyolojisi ve klinik önemi, "Ulusoy S (ed): Mezuniyet Sonrası Eğitim Dizisi 2: Beta-laktamazlar ve Klinik Önemi" kitabında s.45-69, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (2005).
- 8) Vahaboğlu M.H. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. Klimik Dergisi cilt 6, Sayı 1: 1993: s.6-8.
- 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for antimicrobial susceptibility testings: Fourteenth Informational Supplement M100-S14, NCCLS, .Villanova, PA, (2004).
- 10) Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R: Characterization of *P.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): S146-55.
- 11) Öngüt G, Ögünç D, Mutlu D, Demirbakan H, Dağlar D, Çolak D, Gültekin M. ANKEM Dergisi 2006;20(1): 1-3.
- 12) Zer Y, Balcı İ, Karşıl T, Bayram A, Ekşi F: Çeşitli örneklerden izole edilen *Pseudomonas*ların tiplendirilmesi, antibiyotik duyarlılıkları ve sefepimin anti-*Pseudomonas* etkinliği, Klimik Derg.2000;13(1): 33-35.
- 13) Kizirgil A, Tatar S, Yılmaz M: Gram-negatif bakterilerin sefepim duyarlılıklarının araştırılması, Fırat Tıp Fak Derg 2001;2(3): 271-3.
- 14) Erdem H, Kılıç S, Pahsa A, Beşirbellioğlu B: Gram-negative bacterial resistance to cephalosporins in community-acquired infections in turkey, J Chemother 2005;17(1): 61-5.
- 15) Eliopoulos GM, Gold HS: Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs,"Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR(eds): Infectious Diseases, 3. baskı. s. 289-299, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2004).
- 16) Andes DR, Craig WA: Cephalosporins, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. baskı. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia (2005). s. 294-311.