

Toplumda kazanılmış çoklu ilaç dirençli nonfermentatif gram negatif bakterilerde duyarlılık sonuçları

Results of sensitivity in community acquired multidrug-resistant nonfermentative gram negative bacteria

Esra Şahin*, Zehra Yürüken*, Jülide Sedef Göçmen**

*Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Kırıkkale

**Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

Özet

Amaç: Çalışmada toplumdan kazanılmış nonfermentatif Gram negatif bakterilerde çeşitli antibiyotiklere duyarlılığın ve biyofilm oluşturmanın belirlenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve yöntem:Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında balgam, idrar ve yaradan izole edilen 20'si *Pseudomonas aeruginosa*, 20'si *Acinetobacter baumannii* olan 40 nonfermenter Gram-negatif bakteri test edilmiştir. Konvensiyonel yöntemlerle identifikasyon yapılmış ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: En etkili antibiyotik veya antibiyotiklerden biri olan kolistine iki bakteride de yedişer (% 35) suşta direnç saptanmıştır. *P.aeruginosa* suşlarına gentamisin, seftazidim ve amikasin; *A.baumannii* suşlarına tigesiklin, gentamisin ve amikasin diğer antibiyotiklerden daha etkili olarak bulunmuştur.

Sonuç: Biyofilm oluşumu yalnız bir suşta saptandığı için antibiyotik direnci ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişkisi belirlenmemiştir.

Pam Tıp Derg 2012;5(1):15-19

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, çoklu ilaç direnci, nonfermentatif bakteriler, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Aim: It is aimed to establish the susceptibility antibiotics and biofilm formation in community acquired nonfermentative Gram negative bacteria.

Materials and method:Forty nonfermentative-Gram negative (Twenty from each of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*) strains isolated from sputum, urine and wound samples were used. Identification made of conventional methods. Disk diffusion method was used to determine sensitivity to antibiotics.

Results: One of the most effective antibiotics was colistin, and only seven strains from each bacteria were found resistant. Gentamicin, ceftazidime and amikacin were other antibiotics more effective for *P.aeruginosa*, and tygecycline, gentamicin and amikacin for *A.baumannii* strains.

Conclusion: Biofilm formation was found only in one strain and so, any relation between biofilm formation and antibiotics resistance could not be established.

Pam Med J 2012;5(1):15-19

Key words: *Acinetobacter baumannii*, multidrug resistance, nonfermentative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*

Esra Şahin

Yazışma Adresi: Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale
e-mail: esrakekul@hotmail.com

Giriş

Nonfermentatif Gram negatif bakterilerin (NFGNB) immün sistemi baskılanmış ve özellikle ilaç tedavisi alan hastalarda, artan oranlarda, fırsatçı patojenler olarak infeksiyonlara neden oldukları bilinmektedir. Bu bakteriler çevresel olarak toprakta, suda, hastane ortamı florasında, kısaca doğada yaygın olarak; insanlarda ise derinin normal florasında, solunum yolu ve oral florada bulunabilmektedir [1]. NFGNB'den özellikle dört türü, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia* önemli hastane infeksiyonlarına neden olmaktadır [2].

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur [3]. Bu tanım çok önemlidir çünkü bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan bazı mikroorganizmaların oluşturdukları her tabakaya 'biyofilm' denilmemelidir. Gerçekte biyofilm olmayan bu topluluklar, buldukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam ederler. Hiçbirinde biyofilm içerisindeki bakterilerde izlenen direnç ve geri dönüşümsüz yapışma gibi özellikler izlenmez. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki hücrelerin zamanla matriksten koparak ayrıldıkları ve dolaşıma geçtikleri unutulmamalıdır. Dolaşıma geçen bu hücreler, planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm direnç karakterlerini taşımaktadırlar [4].

A.baumannii ve *P.aeruginosa* birçok antibiyotiklere doğal olarak dirençli olmalarının yanı sıra mutasyon ile tüm tedavilere dirençli hale gelmeleri ve son yıllarda tedavide kullanılabilecek tüm antibiyotiklere dirençli kökenlerin ortaya çıkmaya başlaması önemlerini gün geçtikçe artırmaktadır. Bu da eskiden kullanılan ama yan etkileri yüzünden terk edilen kolistin önemi artırmaktadır. Kolistin kullanımı ile başarılı sonuçlar bildirilmekle birlikte bu ilaçla klinik deneyim sınırlıdır. Ayrıca, kolistin ciddi yan etkileri, nefrotoksisite, nörotoksisite ve nöromüsküler blokaj nedeni ile kullanımı sorunlu bir antimikrobiyaldir [5].

Çok ilaca dirençli (CİD) bakteri ≥ 3 sınıf antibiyotiğe direnci; son zamanlarda kullanımı artan "extensively" (genişlemiş) ilaç direnci (XDR) bir-iki antibiyotik dışında tüm antibiyotiklere direnci; son olarak "panresistant" ilaç direnci (PDR) ise tüm antibiyotiklere direnci tanımlamaktadır [6-10]. Örneğin CİD için *P.aeruginosa*'da üçten daha fazla

antibiyotik sınıfına (karbapenemler, piperasilin, aminoglikozit veya kinolonlar vb.) dirençten bahsedilir. *A.baumannii*'nin sadece bir veya iki antibiyotiğe duyarlı kalması (karbapenemler ve kolistin) çok ilaca direnç olarak tanımlanır [6-10].

Bu çalışmada amacımız çok ilaca dirençli ve toplumdaki kazanılmış nonfermentatif bakterilerde kolistin duyarlılığını ve biyofilm oluşturma oranını belirlemek ve direnç ile biyofilm oluşturma arasında bir bağlantılı olup olmadığını saptamaktır.

Gereç ve yöntem

Çalışmada Kırıkkale üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına 1 Ocak 2009–30 Nisan 2010 tarihleri arasında gelen ve poliklinik hastalarından alınan balgam, idrar, yara örnekleri rutin besiyerlerine ekilmiş, floraya hakim olarak üreyen, hastalık etkeni olduğu düşünülen saf örnekler değerlendirilmiş ve konvansiyonel tiplendirme yöntemleri ile *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. olarak tanımlanmıştır. Tam identifikasyon için API 20NE (bioMerieux) kiti kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) antimikrobial duyarlılık test standartları M2-A9 and M7-A7 kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılarak değerlendirilmiştir. İçeriği; amikasin (30 µg), amoksisillin/klavulonik asid (30 µg), seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), siprofloksasin (5 µg), gentamisin (10 µg), imipenem (10 µg), tigesiklin (15 µg), sefepim (30 µg), piperasilin/tazobaktam (100/10 µg), meropenem (10 µg) ve kolistin (10 µg) olan antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanıldı. Kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

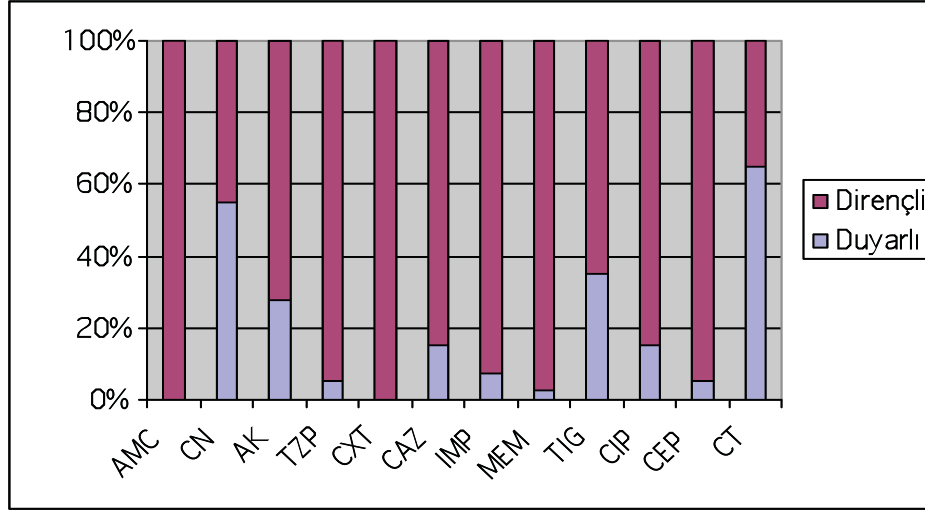
P.aeruginosa ve *A.baumannii* suşlarında biyofilm oluşumu kantitatif yöntemle incelenmiştir. Suşlar taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilmiş ve %0.25 glukoz içeren beyin kalp infüzyon buyyonu içinde bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Taze olarak hazırlanmış ve önceden ısıtılmış % 0.25 glukozlu beyin-kalp infüzyon buyyonu ile 1:20 oranında sulandırılmıştır. Bu süspansiyondan 200 µl alınarak steril 96 kuyucuklu polistren plaklara aktarılmış, 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklar boşaltılmıştır. Kuyucuklar fosfat tamponlu su (PBS) ile 3 kez yıkanmıştır. Ters çevrilerek kurutulmuş ve % 1'lik kristal viyole ile 15 dakika boyanmıştır. Plaklar PBS ile tekrar yıkandıktan sonra her kuyucuğa 200 µl (160 µl etanol-40 µl aseton karışımı) aktarılmıştır. Kuyucuklar 200 µl

posfat tamponla doldurularak mikropletyler 590 nm'de okutulmuştur. Optik yoğunlukları (OD) bulunmuş, optik yoğunluklarına göre biyofilm oluşumu pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir [11].

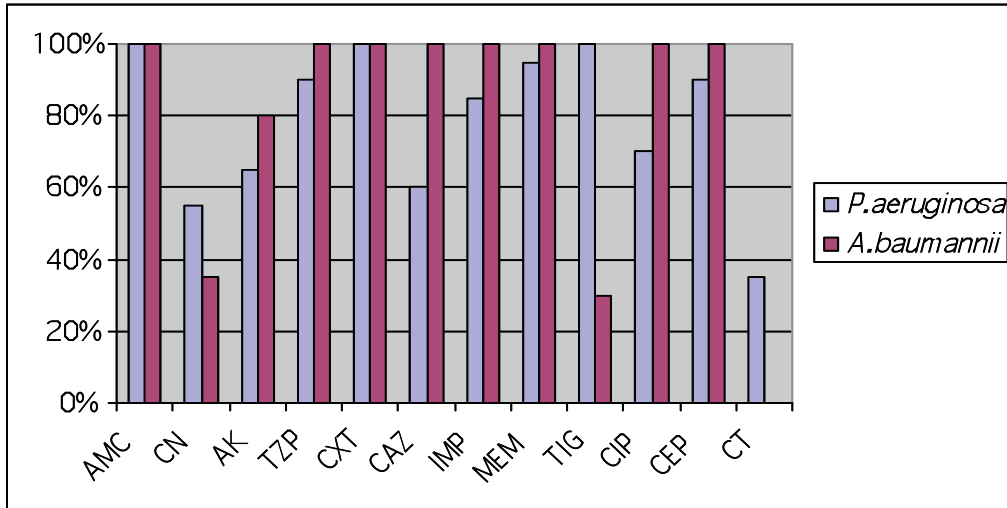
Bulgular

Çalışmada Kırıkkale üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına 1 Ocak 2009–30 Nisan 2010 tarihleri arasında izole

edilen 20 *P.aeruginosa* ve 20 *A.baumannii* olmak üzere toplam 40 suş kullanılmıştır. *P.aeruginosa* suşlarına kolistin, gentamisin, seftazidim ve amikasin; *A.baumannii* suşlarına tigesiklin, kolistin ve gentamisin en etkili antibiyotikler olarak bulunmuştur. Grafik 1 de nonfermenter basillerin ilaçlara direnç yüzdeleri ve Grafik 2 de *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* nin direnç paterninin test edilen ilaçlara göre değişimi gösterilmiştir. *Biyofilm oluşumu* sadece bir suşta belirlenmiştir.



Grafik 1 : Nonfermenter basillerin ilaçlara direnç yüzdeleri (AMC:Amoksisillin/klavulonik asid, CN:Gentamisin, AK:Amikasin, TZP:Piperasillin/Tazobaktam, CXT:Sefotaksim, CAZ:Seftazidim, IMP:İmipenem, MEM:Meropenem, TIG:Tigesiklin, CIP: Siprofloksasin, CEP:Sefepim, CT:Kolistin)



Grafik 2: *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* nin direnç paterninin test edilen ilaçlara göre değişim yüzdeleri (AMC:Amoksisillin/klavulonik asid, CN:Gentamisin, AK:Amikasin, TZP:Piperasillin/Tazobaktam, CXT:Sefotaksim, CAZ:Seftazidim, IMP:İmipenem, MEM:Meropenem, TIG:Tigesiklin, CIP: Siprofloksasin, CEP:Sefepim, CT:Kolistin)

Tartışma

Son zamanlarda artan oranlarda gözlenen antimikrobiyal ilaç direnci nedeniyle bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Karbapenemler, genişlemiş spektrumlu betalaktamaz (GSBL) enzimlerine ve AmpC enzimlerine dayanıklı olmaları, etki spektrumlarının oldukça geniş olması, bakteriyel membrandan hızla geçebilmesi gibi özellikleri nedeniyle özellikle çoklu dirençli gram negatif (GN) bakteri infeksiyonlarında ilk sırada kullanılan antibiyotik grubudur. Bu önemli özellikleri nedeniyle karbapenemlerin özellikle ampirik tedavide yaygın olarak kullanılması, bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının artmasıyla sonlanmıştır. *Pseudomonas* sp. için %6 ile %70 arasında değişen oranlarda imipenem direnci görülürken bu oran *Acinetobacter* sp. kökenlerinde %13 ile % 58 arasında değişmektedir [2]. Ülkemizde de *Pseudomonas* sp. ve *Acinetobacter* sp. türü bakterilerde imipenem direnci coğrafik bölgelere göre farklılık göstermekte ve *Pseudomonas* sp.'lerde yaklaşık %4 ile %85, *Acinetobacter* sp.'lerde ise %8 ile %70 arasında değişmektedir [12-16]. Çalışmamızda bu oran *Pseudomonas* sp. için % 85 bulunmuştur. Çalışmalar arasındaki bu fark kapsadığı dönemlerden ve bakterilerin giderek direnç kazanmasından ileri gelebilir. Öte yandan 2006 yılında 12 ülkeden 40 merkezin katıldığı verilere göre direnç oranları meropenem için % 43.4 ve imipenem için %42.5 olarak verilmiştir [17]. European Antimicrobial Resistance Surveillance System" (EARSS)'nin 2007 verileri *P.aeruginosa*'da karbapenem direncinin Avrupa'da artmakta olduğunu göstermiştir ve Danimarka, Hollanda, Finlandiya, İsveç ve İsviçre gibi ülkelerde %10 iken Türkiye, Hırvatistan, Almanya, İtalya, Çek Cumhuriyeti ve Yunanistan'da %25 civarındadır. Türkiye'ye ait diğer antibiyotik direnç oranları ise aminoglikozit %28.2, karbapenem %31, kinolon %29.6, seftazidim %31,3 ve piperasilin %32,4 olarak bildirilmiştir. MYSTIC 2006'da ise 40 Avrupa merkezinden 1012 *P.aeruginosa* suşunun verilere göre piperasilin/tazobaktam direnci %15 ile en düşük olarak bulunmuştur. Bunu meropenem (%22), amikasin (%23), seftazidim (%25), gentamisin (%29), imipenem (%32), siprofloksasin (%33) ve tobramisin (%35) izlemiştir [17]. Çalışmamızda direnç oranları biraz yüksek bulunmuştur ancak sonuçlarımız MİK yöntemi ile doğrulanmamıştır.

Almanya'dan gelen son verilerde *A.baumannii* için tigesiklin direnci %6 iken kolistin direnci %2.8 olarak gösterilmiştir [18]. Türkiye'den Dizbay ve ark. *Acinetobacter*

kökenlerinde tigesiklin direncini %25 olarak bulmuşlardır [19]. Çalışmamızda *A.baumannii* için tigesiklin direnci %30, kolistin direnci %35 bulunmuştur. Ancak bu direnç durumu kullanılan metoda bağlı faktörler nedeni ile dikkatle yorumlanmalıdır. Kolistin dirençli *A.baumannii* için tek önemli risk faktörü olarak önceden kolistin kullanımı tanımlanmıştır [20]. Ancak bizim hastalarımız poliklinik hastalarıdır ve ne yazık ki bu yönden ayrıntılı bir anamnez bilgisi elimizde mevcut değildir. Ayrıca polikliniğe başvuran hastaların yakın geçmişlerinde hastaneye yatma ve tedavi görüp görmediği konusunda da elimizde sağlıklı veriler bulunmamaktadır.

Son dönemde tıp dünyasındaki gelişmeler yaşam kalitesini ve süresini artırırken, uygulanan tıbbi girişimler, yoğun antibiyotik kullanımı veya antibiyotiklerin gereksiz kullanımları dirençli bakterilerde ve hastane infeksiyonlarında artışa neden olmuştur. Bunların yanı sıra bakteriler oluşturdukları biyofilm sayesinde hem immun sistemden hem de antimikrobiyal maddelerden korunurlar. Bu durum işimizi daha da zorlaştırmaktadır. Biyofilm oluşturan bakteriler antibiyotiklere çeşitli yollarla direnç gösterirler. Bu yolların başlıcaları antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonunun kısıtlı olması, biyofilm içindeki bakterilerin farklı büyüme hızları ve mikroçevre değişikliklerinin antibiyotiklere olumsuz etkisidir. Son yıllarda tedavi seçimlerinde yenilikler yapılmasına yönelik fikirler gündemdedir. Çünkü ideal tedavi stratejisi biyofilm matriksindeki ekstrasellüler polimerik maddelerden en az etkilenecek, çok hızlı bakterisidal etki gösterebilecek ve etki mekanizması biyofilm hücrelerinin büyüme hızından etkilenmeyecek antimikrobiyal ajanlar içermelidir [21]. Schaber ve ark. *P.aeruginosa* suşlarının polikarbonat membranda biyofilm oluşumunu sağlayarak, planktonik form ile biyofilm formunun; *P.aeruginosa* infeksiyonlarında sıklıkla kullanılan imipenem (karbapenem, β -laktam), gentamisin (aminoglikozid) ve piperasilin-tazobaktam (β -laktamaz inhibitörü) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarını araştırmışlar ve biyofilm formunun planktonik forma göre yaklaşık 10 kat daha dirençli hâle geldiğini göstermişlerdir [22]. Yeni yapılan çalışmalarda genelde bakterinin biyofilm oluşturmaya antibiyotik etkisiyle bakılmıştır bu sebeple bizim çalışmamızı karşılaştırabileceğimiz yayın bulunmamaktadır.

Çalışmamızda suşlarımızın dirençli olmasına rağmen idrar, balgam ve yara örneklerinden izole edilmiş olmaları ve genel olarak risk faktörü az olan poliklinik hastalarına ait olmasından ötürü, biyofilm oluşturma oranı

beklenenden daha az olduğunu düşünüyoruz. Biyofilm oluşumunun antibiyotiklerden yararlanımı azalttığı düşünülecek olursa bu sevindirici bir durumdur.

Sonuç olarak nonfermenter bakterilerde kolistin duyarlılığı yüksek bulunurken, biyofilm oranı beklediğimiz gibi yüksek bulunmamıştır ve bu nedenle bu bakterilerin direnç mekanizmasıyla biyofilm oluşumu arasında bir bağlantı tespit edilememiştir. Bu sonuçta çalışmadaki suş sayımızın az olmasının etkisi olduğu ve daha fazla suşla sonuçlarımızın daha farklı çıkabileceği düşünülebilir.

Çıkar ilişkisi: Yazarlar çıkar ilişkilerinin olmadığını beyan etmiştir.

3. EKMUD Kongresi'nde sunulmuştur. Poster No. 149 (12-16 Mayıs 2010, Ankara)

Kaynaklar

1. Winn WAS, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The nonfermentative Gram-negative bacilli, "Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6.ed." Lippincott Williams and Wilkins, Washington, 2006;390-475.
2. Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 2007;29:33-41.
3. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004;12:185-190.
4. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002;15:167-193.
5. Saltoğlu N. *Acinetobacter baumannii* infeksiyonları ve tedavisi. Klimik Derg 2007;20:204-207.
6. Cohen AL, Calfee D, Fridkin SK et al. Recommendations for metrics for multidrug-resistant organisms in healthcare settings: SHEA/HICPAC Position paper. Infect Control Hosp Epidemiol 2008;29:901-913.
7. European Academies Science Advisory Council (EASAC). Tackling antibacterial resistance in Europe, The Royal Society (2007). <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EEV13N47/art19045.pdf>
8. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Med 2004;10:S122-129.
9. Lin M, Weinstein RA, Hayden MK. Multiply drug-resistant pathogens: epidemiology and control, "Jarvis WR (ed). Bennet and Bachman's Hospital Infections, 5th ed" kitabında Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007;191-222,
10. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant pandrug resistant Gram negative bacilli in Europe. Euro Surveill 2008;13:1-11.
11. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2001;67:4538-4545.
12. Akan OA. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında antibiyotik direnci: 2002 yılı İbni Sina Hastanesi verileri. Mikrobiyol Bül 2003;37:241-246.
13. Cesur S, Albayrak F, Birengel S, Kolcu Z, Tekeli E. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının karbapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002;33:203-206.
14. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. ANKEM Derg 2005; 19:66-77.
15. Tatman-Otkun M, Gurcan S, Ozer B, Shokrylanbaran N. Annual trends in antibiotic resistance of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains and the effect of synergistic antibiotic combinations. New Microbiol 2004;27:21-28.
16. Yücel M, Gündüz E, Yağcı S, Karakoç AE, Önde U, Acar N. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi, XXX. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Kongresi Kitabı (P01-28), 2002; Antalya, Türkiye.
17. Turner PJ. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. Diagn Microbiol Infect Dis 2008;60:185- 92.
18. Seifert H, Stefanik D, Wisplinghoff H. Comparative in vitro activities of tigecycline and 11 other antimicrobial agents against 215 epidemiologically defined multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. J Antimicrob Chemother 2006;58:1099-1100.
19. Dizbay M, Altunçekic A, Sezer BE, Özdemir K, Arman D. Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia, Int J Antimicrob Agents 2008;32:29-32.
20. Matthaïou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI et al. Risk factors associated with the isolation of colistin resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study. Crit Care Med 2008;36:807-811.
21. Donlan RM. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? Curr Top Microbiol Immunol 2008;322:133-161.
22. Schaber JA, Hammond A, Carty NL et al. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2007;56:738-748.