

Klinik Çalışma

# Nozokomiyal *Acinetobacter Baumannii* İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

Aytekin Çıkman\*, Mustafa Berktaş\*, Abdullah Bektaş\*, Ayşe Özkaçmaz\*, Görkem Yaman\*\*

## Özet

**Amaç:** Bu çalışmada, son yıllarda tüm dünyada ve ülkemizde sorun yaratan, metallo-beta-laktamaz (MBL) üreten ve hızla yayılan dirençli *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*) suşlarının bölgemizdeki sıklığının belirlenmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntemler:** Laboratuvarımıza Ocak 2009-Ağustos 2010 tarihleri arasında gelen imipeneme dirençli 70 *A.baumannii* suşu, MBL üretimi açısından kombine disk testi ve modifiye Hodge testi olmak üzere iki farklı fenotipik yöntemle test edildi. *A.baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ise BD Phoenix otomatize mikrobiyoloji sistemi (Becton Dickinson, ABD.) ile belirlendi.

**Bulgular:** *A.baumannii* suşlarının izole edildiği klinik örnekler; 38 trakeal aspirat, 17 kan, 13 yara ve 2 BOS numunesi idi. Çalışmaya alınan bakteriler MBL üretimi açısından kombine disk sinerji ve modifiye Hodge yöntemleriyle test edildi. Kombine disk testiyle izolatların %79'unda, modifiye Hodge testiyle %97'sinde MBL üretimi tespit edilirken, suşların %76'sında her iki test yöntemiyle de MBL üretimi saptandı.

**Sonuç:** Hastanemizdeki *A.baumannii* suşlarında MBL üretiminin dikkat çekici şekilde yüksek olduğu görülmüştür. Ancak sonuçların moleküler doğrulanmasıyla MBL sıklığı kesin olarak belirlenebilecektir.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, nozokomiyal enfeksiyon, metallo-beta-laktamaz

*Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*), yoğun bakım ünitelerinde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı olarak sık nozokomiyal enfeksiyona neden olan fırsatçı bir patojendir (1, 2). İlk olarak Beijerinck tarafından 1911 yılında tanımlanan *Acinetobacter* cinsi, insan ile ilişkili olmayan çevresel organizmalar olarak bilinirken günümüzde dünya çapında çoklu ilaç

direnci gösteren önemli bir klinik sorun olarak ortaya çıkmıştır (3, 4).

*A.baumannii* suşları, özellikle hastane yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalarda gelişen ventilatör ile ilişkili pnömonilerde, septisemide, idrar yolu enfeksiyonlarında, menenjit ile cilt ve yara enfeksiyonlarında giderek artan sayılarda etken olarak gösterilmektedir(4-6). Günümüzde *A.baumannii* suşlarının büyük kısmı tedavide sık kullanılan aminopenisilin, üreidopenisilin, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefamisin, aminoglikozidler ve kloramfenikole yüksek oranda direnç göstermektedir (8). Özellikle çoklu ilaç direnci gösterebilen bu bakterilerin yol açtığı ciddi enfeksiyonlarda karbapenemler; geniş antibakteriyel spektrumları, bakteri membranlarından hızla geçebilmeleri, AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimlerine dayanıklı olmaları gibi özellikleri nedeniyle ilk tercih olarak kullanılan antibiyotik grubudur (9). Bu antibiyotikleri hidrolize eden

Bu makale XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

\*Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Van

\*\*Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, İstanbul.

**Yazışma Adresi:** Dr. Aytekin Çıkman  
Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Van, TÜRKİYE  
Tel: 0 432 216 47 11 (6002)  
GSM: 0 505 6918200  
E-mail: draytekin65@hotmail.com  
Makalenin Geliş Tarihi: 03.02.2011  
Makalenin Kabul Tarihi: 05.04.2011

Çıkman ve ark.

karbapenemazlar aktif bölgelerinde taşıdıkları metal iyonları nedeniyle Metallo-Beta-Laktamazlar (MBL) olarak da adlandırılırlar (10). MBL üreten bakterilerin saptanması bu bakterilerin kontrolsüz yayılımlarının önlenmesine yardımcı olacaktır. Ayrıca klinisyenlerin antimikrobiyal seçimlerinde ve enfeksiyon kontrolünde uygun yaklaşımlara yönelmelerini sağlayacaktır.

Bu çalışmada, hastanemizde izole edilen imipeneme dirençli *A.baumannii* suşlarında MBL üretiminin kombine disk testi ve modifiye Hodge testi ile belirlenerek hastanemizdeki izolatlarda MBL pozitifliğinin prevalansının saptanması ve antibiyotik duyarlılıklarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Laboratuvarımıza Ocak 2009-Ağustos 2010 tarihleri arasında gelen örneklerden izole edilen ve imipeneme direnç saptanan 70 *A.baumannii* suşu çalışmanın gerecini oluşturdu. Hastane enfeksiyonları tanısı CDC "Centers for Disease Control and Prevention" kriterleri kullanılarak konuldu (11). İzole edilen *A.baumannii* suşları MBL üretimi açısından kombine disk testi ve modifiye Hodge testi olmak üzere iki farklı fenotipik yöntemle test edildi.

**Kombine Disk Testi:** *A.baumannii* suşlarının 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. Plak içerisine diskler arası uzaklık 22 mm olacak şekilde iki tane imipenem (10 µg) diski yerleştirildi. İmipenem disklerinden bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanmış olan 0,5 M EDTA solüsyonundan 10 µl eklendi. 35°C'de 18-20 saat inkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçüldü. EDTA solüsyonunun eklendiği imipenem/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına imipenem diski zon çapından  $\geq 7$  mm ise MBL pozitif olarak kaydedildi (12).

**Modifiye Hodge Testi:** İmipeneme duyarlı olan *E.coli* ATCC 25922 standart suşu ile 0,5 Mc Farland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonlar Mueller-Hinton agar plaklarına yayıldı. Test edilecek *A.baumannii* plağın merkezinden periferine doğru düz çizgi şeklinde ekildi. Oda ısısında 15 dakika bekletilen plağın ortasına imipenem (10 µg) diski yerleştirildi. Plaklar etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi. İmipeneme duyarlı olan *E.coli* ATCC 25922 suşunun duyarlılık zon çapının çizgi ekimi yapılan bakteri taraflarında yonca yaprağı şeklinde bozulması ve bu bölgede *E.coli* üremesi MBL üretimi yönünde pozitif test sonucu olarak değerlendirildi (13).

İmipeneme dirençli olan *A.baumannii* suşlarının piperasilin, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, sefotaksim, sefepim, amikasin, gentamisin, siprofloksasin, levofloksasin, tetrasiklin, trimetoprim/sulfametoksazol için antibiyotik duyarlılıkları BD Phoenix otomatize mikrobiyoloji sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile belirlendi.

### Bulgular

*A.baumannii* suşlarının izole edildiği 70 klinik örnek; 38 trakeal aspirat, 17 kan, 13 yara ve 2 BOS olarak bulundu. Çalışmaya alınan bakteriler MBL üretimi açısından kombine disk ve modifiye Hodge yöntemleriyle test edildi. Kombine disk testiyle izolatların 55'inde (%79), modifiye Hodge testiyle 68'inde (%97) MBL üretimi tespit edilirken, 53'ünde (%76) ise her iki test yöntemiyle MBL üretimi saptandı (Tablo 1).

Tablo 1. *A.baumannii* suşlarında test yöntemine göre MBL üretimi.

Yöntem	n	%
Kombine Disk Testi	55	(%79)
Modifiye Hodge Testi	68	(%97)
Kombine Disk ve Modifiye Hodge Testi	53	(%76)

n: Çalışılan suş sayısı

Tablo 2. *A.baumannii* suşlarının antibiyotik direnç oranları (%).

Antibiyotik	n:70	%
Tetrasiklin	24	34
Trimetoprim/sulfametoksazol	43	61
Levofloksasin	49	70
Amikasin	53	76
Gentamisin	62	89
Siprofloksasin	66	94
Piperasilin-Tazobaktam	68	97
Piperasilin	68	97
Seftazidim	69	99
Sefotaksim	69	99
Sefepim	69	99

n: Çalışılan suş sayısı

Çalışmada, toplam 70 imipenem dirençli *A.baumannii* suşunun çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranları tablo 2'de verilmiştir.

## Tartışma

*A.baumannii*, zor koşullarda yaşayabilmeleri ve antibiyotiklere karşı çoğul direnç kazanmaları nedeni ile önemli hastane infeksiyonu etkenleri olarak bilinmektedir (14). Ülkemizde yapılan bir çok çalışmada *A.baumannii* suşları nozokomiyal infeksiyonlardan en sık soyutlanan mikroorganizmalardan biridir (15-17).

Aztreonam dışındaki karbapenemlere direnç gelişiminde rol alan MBL enzimi *A.baumannii* suşları arasında hızla yayılmaktadır (18). MBL üreten bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde karşılaşılan güçlükler dünyada kaygıyla izlenmektedir (19). MBL üreten izolatların zaman içerisinde giderek artış göstermesi ve hızla yayılarak ağır klinik sonuçlara neden olabilmesi, laboratuvarlarda rutinde kolay uygulanabilen, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek yöntemlerin bulunmasını zorunlu hale getirmiştir (6). Klinik izolatlarda MBL enzimi üretimini belirlemek için moleküler ve fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından standardize edilmemekle birlikte, çift disk sinerji testi, IPM-EDTA kombine disk testi, MBL E-test ve modifiye Hodge testi, bu amaçla kullanılan fenotipik yöntemlerden bazılarıdır (20).

Tetik ve ark. (21) imipenem dirençli veya orta duyarlı 61 *A.baumannii* suşunda MBL üretimini dört farklı fenotipik yöntemle araştırmış; kombine disk testi, çift disk sinerji testi, modifiye Hodge testi ve MBL E-test ile MBL üretimini sırasıyla; %75, %84, %74 ve %80 oranında tespit etmişlerdir. Çetin ve ark. (9) ise yine aynı sayıda suş ile yaptığı çalışmada *A.baumannii* için MBL üretimini çift disk sinerji testi ile %84; kombine disk yöntemi ile %75; modifiye Hodge testi ile %74, MBL E-test ile %80 bulmuştur. Aktaş ve ark. (20) ise MBL üretimini E-test yöntemi ile %80 olarak belirlemişlerdir. Ülkemizdeki diğer çalışmalara karşılaştırıldığında modifiye Hodge testiyle sonuçlarımız nispeten yüksek bulunmuş, kombine disk testi verilerimiz ise uyumlu görülmüştür.

MBL üretimini saptamak için CLSI standart bir yöntem önermediği için uygulanan fenotipik yöntemlerden hangisinin daha iyi bir yöntem olduğu konusunda tam bir fikir birliğine varılamamıştır. Ancak kombine disk testi ile elde edilen veriler ülkemizdeki diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuş, modifiye Hodge testi sonuçlarımızın ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuçların gerçek MBL enzim üretimini yansıtmayı yansıtmadığı doğrulamak

amacıyla moleküler yöntemlere başvurmak uygun bir yol olabilir.

*A.baumannii* son yıllarda kullanılan birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesi nedeni ile ciddi tedavi sorunlarına neden olmaktadır (4). İmipenem dirençli suşlarda yaptığımız çalışmada en etkili antibiyotikler sırasıyla tetrasiklin, trimetoprim/sulfametoksazol ve levofloksasin olarak bulunmuştur. İmipenem dirençli *A.baumannii* suşları ile yapılan bu çalışmada diğer antibiyotiklere karşı saptanan direnç oranları da beklenildiği gibi yüksek olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; başta yoğun bakım üniteleri olmak üzere hastanelerde uygunsuz antibiyotik kullanımı nozokomiyal enfeksiyonlarla birlikte bakteriyel direnç sorununu ortaya çıkarmaktadır. Nitekim bu nedenle ülkemizdeki *A.baumannii* izolatları arasında MBL üretimi giderek artmaktadır. Direnç yayılımının önlenmesi ve infeksiyonların başarılı şekilde tedavisi için uygun fenotipik yöntemler kullanılarak bu enzimin varlığı araştırılmalı, pozitif olgular akılcı antibiyotik tedavisi ile sağaltılmalıdır.

## Investigation of Metallo-Beta-Lactamase Production in Nosocomial *Acinetobacter Baumannii* Isolates With Phenotypic Methods

### Abstract

**Objective:** In this study, we aimed to determine the frequency of metallo-beta-lactamase (MBL) producing resistant *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*) strains in our region that have spread quickly and caused a threat in our country as well as all over the world in recent years.

**Materials and Methods:** 70 imipenem-resistant strains of *A.baumannii* identified between January 2009 and August 2010 were tested for MBL production with two different phenotypic methods; combined disk test and modified Hodge. Antibiotic susceptibility of *A.baumannii* strains were determined with the BD Phoenix automated microbiology system (Becton Dickinson, USA).

**Results:** Clinical specimens that *A.baumannii* strains were isolated from included 38 tracheal aspirates, 17 blood, 13 wounds and 2 CSF specimens. Strains were tested with combined disk synergy and the modified Hodge methods for MBL production. While MBL production was detected in 79% with only combined disk test and in 97% with only modified Hodge test, 76% strains were found with both of the test methods.

**Conclusion:** MBL production of *A.baumannii* strains were found to be remarkably high in our hospital, however exact frequency of MBL production could

Çıkman ve ark.

*only be determined with confirmation of these results by molecular methods.*

**Key words:** *Acinetobacter baumannii, nosocomial infections, metallo-beta-lactamase*

### Kaynaklar

1. Towner KJ. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect 2009; 73:355-363.
2. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12:826-836.
3. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents 2010; 35:219-226.
4. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. Başustaoğlu A (Çeviren) 9.baskı, Nobel Yayınevi, Ankara 2009; 770-794.
5. Lim SM, Webb SAR. Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. Anaesthesia 2005; 60:887-902.
6. Peleg AY, Seifert H, Paterson D. Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21:538-582.
7. Balcı M, Bitirgen M, Kandemir B, Türk Arıbaş E, Erayman İ. Nozokomiyal Acinetobacter baumannii suşlarının antibiyotik duyarlılığı. Ankem Derg 2010; 24:28-33.
8. Çetin ES, Tetik T, Kaya S, Arıdoğan BC. Acinetobacter baumannii ve Pseudomonas aeruginosa izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. İnfeksiyon Derg 2009; 23:51-55.
9. Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. Pseudomonas ve Acinetobacter suşlarında metallo beta-laktamaz araştırılması. İnfeksiyon Derg 2005; 19:101-105.
10. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. Am J Infect Control 1988; 16:128-140.
11. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HS, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of Metallo-Lactamase-Producing clinical isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. J Clin Microbiol 2002; 40:3798-3801.
12. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-lactamase-producing isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. J Clin Microbiol 2003; 41:4623-4629.
13. Yurtsever SG, Altiner NN, El S, Çetin FL, Pişmişoğlu E, Uzun S. Hastane infeksiyonu etkeni olarak çeşitli klinik örneklerden izole edilen Acinetobacter baumannii izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2008; 22:148-152.
14. Özdemir M, Erayman İ, Gündem NS, Baykan M, Baysal B. Hastane infeksiyonu etkeni Acinetobacter suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. ANKEM Derg 2009; 23:127-132.
15. Gazi H, Tünger Ö, Vural Ş, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S. Çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının çoğul dirençli Acinetobacter baumannii suşlarına in-vitro etkileri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2007; 37:11-14.
16. Yavuz MT, Şahin İ, Behçet M, Öztürk E, Kaya D. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Acinetobacter baumannii suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2006; 20:107-110.
17. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global Challenge of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:3471-3484.
18. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2006; 44:3139-3144.
19. Aktaş AE, Yiğit N, Kayserili F, Ayyıldız A. Pseudomonas ve Acinetobacter suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması İnfeksiyon Derg 2009; 23:57-62.
20. Tetik T. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde İzole Edilen Gram Negatif Nonfermenter Bakterilerde Metallo Betalaktamaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Isparta 2008.