

DOĞAL İZOLATLARDA İMİPENEM (TIENAM) DİRENÇLİLİĞİ VE DAĞILIMI

Sadık DİNÇER **Burhan ARIKAN** **Hatice GÜVENMEZ**

ÇÜ., Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana

ÖZET

Doğal izolatlarda imipenem (Tienam) dirençliliğinin araştırıldığı bu çalışmada toplam 1279 bakteri ile çalışılmış ve izolatlardan 168'inin (%13.13) imipeneme dirençli oldukları belirlenmiştir.

Dirençliliğin cinslere göre dağılımı ise *Pseudomonas* sp.,'de %22.98, *Acinetobacter* sp.,'de %16.6, *Klebsiella* sp.,'de %2.21, *Escherichia coli*'de (*E.coli*) %1.15 ve koliformlarda (tiplendirilemeyen) %2.83 şeklindedir. Kanalizasyon izolatlarında en yüksek sıklıkta dirençlilik *Acinetobacter* sp.,de (%100) gözlenirken *Enterobacter* sp.,de dirençlilik saptanamamıştır (%100 hassas). Toprak izolatlarında sadece *Pseudomonas* sp.,de dirençlilik (%9.55) saptanmış diğer izolatlarda ise (*Acinetobacter* sp., *Klebsiella* sp., ve *Proteus mirabilis*) dirençlilik saptanamamıştır.

İzolatlar arasında β -laktamaz üretimi en yüksek düzeyde topraktan izole edilen *Pseudomonas* sp.,de (%100) saptanırken en düşük oran kanalizasyondan izole edilen *E.coli*'de (%4.6) bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: İmipenem Dirençliliği, Dağılımı, Doğal İzolatlar, β -laktamaz Üretimi.

RESISTANCE TO IMIPENEM (TIENAM) AND DISTRIBUTION OF NATURAL ISOLATES

ABSTRACT

In this study in which the imipenem resistance in natural isolates was searched, totally 1279 bacteria were studied and among the isolates 168 of them (13.13%) were found to have imipenem resistance.

The distribution of resistance in species are 22.98% in *Pseudomonas* sp., 16.6% in *Acinetobacter* sp., 2.21% in *Klebsiella* sp., 1.15 % in *E.coli* and 2.83% coliforms (Unidentified) respectively. Among the sewage isolates; the highest resistance was found to be in *Acinetobacter* sp., (100%) and no resistance in *Enterobacter* sp., was detected.

The highest β -lactamase production was detected in *Pseudomonas* sp., (100%) isolated from soil and lowest was found to be *E.coli* (4.6%) isolated from sewage.

Key Words: Imipenem Resistance, Distributions, Natural Isolates, β -lactamase Production.

GİRİŞ

İmipenem, β -laktam antibiyotiklerin yeni grubu karbapenem sınıfı antibiyotiklerin ilki olup 1978 yılında bir toprak organizması olan *Streptomyces cattleya*'dan izole edilen Thienamycin'den sentetik olarak elde edilmiştir. İmipenem mikrobiyal β -laktamazlar tarafından hidrolize edilememelerinden dolayı aerobik veya anaerobik gram-pozitif ve gram-negatif organizmalar üzerine bakterisit etki göstermekle beraber karaciğer ve diğer dokular tarafından sentezlenen Dehidropeptidaz I (DHP-I) enzimi ile β -laktam halkası açılarak hidrolize olmaktadır (1,2). Bu hidrolizi engellemek amacıyla DHP-I enziminin özel inhibitörü olan Cilastatin ile birlikte kullanılmaktadır.

İmipenem bakterisit etkisini diğer β -laktamlar gibi hücre duvarı oluşumundaki peptidoglikan sentezinde Penisilin Bağlayan Proteinlere (PBP) bağlanarak meydana getirir ve genellikle PBP-2'ye bağlanır. Bu nedenle imipenemle karşılaşan organizmada önce sfer oluşumu sonra lizis gözlenir. Penisilin ve Sefalosporinlerde ise önce flaman oluşumu sonra lizis oluşmasından dolayı ayrılırlar.

Her ne kadar bu kadar etkili bir bakterisit ajan olmasına rağmen bakterilerde son yıllarda imipenem karşı bir dirençlilik problemi ortaya çıkmıştır. Bakterilerdeki imipenem dirençliliği klinik izolatlarda arasında oldukça yoğun bir şekilde araştırılmıştır (3-6). Özellikle *Pseudomonas* türlerindeki imipenem dirençliliğinin dış membran proteinlerinin (OMP), özellikle OMP-D2, eksikliğinden kaynaklandığı ortaya çıkartılmıştır (4,7-9). Diğer bir dirençlilik mekanizması ise plazmid-kodlu β -laktamaz sentezlenmesinden (metaloenzim) kaynaklanmaktadır (10). Özellikle *Pseudomonas* türleri arasında imipenem dirençlilik determinantlarının transdüksiyonla taşınabildiği (11), *Bacterioides* türleri arasında ise konjugasyonla ve transformasyonla transfer edilebildiği ortaya çıkartılmıştır (10).

Doğal ortamlardaki (yüzey suları, toprak, kanalizasyon, v.s.) bakterilerdeki imipenem dirençliliği ise henüz geniş bir şekilde araştırmalara konu olmamıştır. Bu alandaki açığı gidermek amacıyla bu araştırma yapılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Bakteri suşları

Araştırmada kullanılan bakteri suşları Ç.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi kanalizasyonundan ve Ç.Ü. kampüsü içindeki topraktan izole edilmişlerdir.

Antibiyotikler ve Besiyerleri

Bakterilerin dirençliliğinin belirlenmesinde İmipenem (Tienam) 10 μ gr/mL konsantrasyonda (Merck), β -laktamaz üretiminin belirlenmesinde Penicillin G (İ.E. Uluagay) 10.000 Ünite/mL konsantrasyonda kullanılmıştır.

Kanalizasyon ve toprak örneklerinin taşınmasında ve öninkübasyonunda Jela buyyon (12), izolatların tiplendirilmesinde MDCLS agar (13), çoğaltma ve antibiyogram testlerinde N1 agar (12) kullanılmıştır.

Metod**Bakteri İzolasyonu ve Antibiyogram Testleri**

1-10mL kanalizasyon suyu veya 5 gram toprak 10 mL'lik jela buyyona inoküle edilerek 4 saat öninkübasyona bırakılır.

2-İnkübasyon sonunda 10^{-5} - 10^{-6} oranında sulandırmalar yapılarak MDCLS agara ekilir ve 1 gece inkübe edilir.

3-İnkübasyon sonunda bakteriler çoğaltmak amacıyla N1 agara çizgi metoduyla (14) ekilir ve 1 gece inkübe edilir.

4-Çizgilerden küçük bir öze ile alınan bakteriler içerisinde $10\mu\text{gr/mL}$ konsantrasyonda imipenem içeren N1 agara çizgi metoduyla ekilir ve 1 gece inkübasyona bırakılır.

5-Çizgi boyunca üreme gösteren suşlar dirençli, göstermeyen suşlar ise hassas olarak değerlendirilir.

Not: İnkübasyon 37°C 'de yapılmıştır.

 β -laktamaz determinasyonu

β -laktamaz üretimi iyodimetrik metotla belirlenmiştir (15).

BULGULAR

İzolatların cinslere göre dağılımı ve imipenem dirençlilikleri çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 1. İzolatların Cinslere Göre Dağılımı ve Dirençlilikleri.

Organizma	İzolat sayısı	İmipenemde üreyen	% Dirençlilik
<i>Pseudomonas sp.</i>	435	100	22.98
<i>Acinetobacter sp.</i>	240	40	16.6
<i>Klebsiella sp.</i>	271	6	2.21
<i>E.coli</i>	173	2	1.15
<i>Enterobacter sp.</i>	13	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	7	0	0
Koliform	140	20	2.83
Toplam	1279	168	13.13

En yüksek dirençlilik frekansı %22.98 ile *Pseudomonas sp.*'de (100 izolat) gözlenirken, *Enterobacter sp.*, ve *Proteus mirabilis*'de imipenem dirençliliği saptanamamıştır. Çalışmada toplam 1279 bakteri test edilmiş ve bunlar arasında 168 suşun imipenem dirençliliği taşıdığı (%13.13) saptanmıştır.

Kanalizasyondan toplam 773 suş izole edilmiş olup *Pseudomonas sp.* 278 suş ile dominant bakteri olurken, *Enterobacter sp.* 13 suş ile en az düzeyde temsil edilmektedir. İzolatlar içerisinde en yüksek dirençlilik *Acinetobacter sp.*'de (%100) gözlenirken

Çizelge 2. Kanalizasyon İzolatlarındaki İmipenem Dirençliliği ve Cinslere Göre Dağılımı

Organizma	İzolat sayısı	İmipenemde üreyen	% Dirençlilik
<i>Pseudomonas sp.</i>	278	85	30.5
<i>E.coli</i>	173	2	1.15
<i>Klebsiella sp.</i>	129	6	4.65
<i>Acinetobacter sp.</i>	40	40	100
<i>Enterobacter sp.</i>	13	0	0
Koliform	140	20	2.83
Toplam	773	153	19.79

Çizelge 3. Toprak İzolatlarındaki İmipenem Dirençliliği ve Cinslere Göre Dağılımı

Organizma	İzolat sayısı	İmipenemde üreyen	% Dirençlilik
<i>Acinetobacter sp.</i>	200	0	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	157	15	9.55
<i>Klebsiella sp.</i>	142	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	7	0	0
Toplam	506	15	2.96

Enterobacter sp.'de dirençlilik saptanamamıştır. Kanalizasyon ortamından izole edilen diğer izolatlardaki imipenem dirençlilik dağılımı ise sırasıyla *Pseudomonas sp.* (%30.5), *Klebsiella sp.* (%4.65), koliform (%2.83) ve *E.coli* (%1.15) şeklindedir.

Toprak izolatlarında *Acinetobacter sp.* 200 suş ile en yüksek düzeyde temsil edilirken *Proteus mirabilis* 7 suş ile en düşük düzeyde temsil edilmektedir. İzolatlar arasında sadece *Pseudomonas sp.*'de imipenem dirençliliği (%9.55) gözlenirken diğer organizmaların tamamı hassas bulunmuştur.

Çizelge 4. İmipeneme Dirençli Kanalizasyon ve Toprak İzolatlarında β -Laktamaz Üretimi

Organizma	İzolasyon Ortamı	Denenen Suş Sayısı	β -Laktamaz Üreten Suş Sayısı	%Üretim
<i>Pseudomonas sp.</i>	Toprak	15	15	100
<i>Pseudomonas sp.</i>	Kanalizasyon	20	17	85
Koliform	Kanalizasyon	20	11	55
Toplam		55	43	78.18

β -Laktamaz üretimi araştırılan toplam 55 dirençli suştan 43'ünde (%78.18) β -laktamaz üretimi saptanmıştır (Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır). Toprakta izole edilen *Pseudomonas sp.*'de üretim %100 bulunurken kanalizasyondan izole edilen koliformlarda bu oran %55 olarak saptanmıştır.

İmipeneme hassas olan 423 izolat β -laktamaz üretimi yönünden araştırılmış ve 49 izolatta (%11.58) β -laktamaz üretimi gözlenmiştir (Sonuçlar üç tekrarın

ortalamasıdır). En yüksek frekans kanalizasyondan izole edilen *Klebsiella* sp.'de (%16.6) gözlenirken bunu sırasıyla toprak izolatu *Acinetobacter* sp. (%15.5), kanalizasyon izolatu *Enterobacter* sp. (%7.6) ve kanalizasyon izolatu olan *E.coli* (%4.6) izlemiştir.

Çizelge 5. İmipeneme Hassas Kanalizasyon ve Toprak İzolatlarında β -Laktamaz Üretimi

Organizma	İzolasyon Ortamı	Denenen Suş Sayısı	β -Laktamaz Üreten Suş Sayısı	%Üretim
<i>Acinetobacter</i> sp.	Toprak	200	31	15.5
<i>E.coli</i>	Kanalizasyon	150	7	4.6
<i>Klebsiella</i> sp.	Kanalizasyon	60	10	16.6
<i>Enterobacter</i> sp.	Kanalizasyon	13	1	7.6
Toplam		423	49	11.58

SONUÇ VE TARTIŞMA

İmipenem dirençliliği klinik izolatlar arasında geniş bir şekilde araştırmalara konu olmuştur (3-6). İmipenem dirençliliğinde dış membran proteinlerinin, özellikle OMP-D2, eksikliğinden kaynaklandığı bildirilmektedir (4). Diğer bir dirençlilik mekanizması ise plazmid-kodlu bir β -laktamaz (metallo-enzim) sentezlenmesinden kaynaklanmaktadır (10). Bu plazmidin *Pseudomonas* türleri arasında bakteriofajlarla (F-116) (11), koliformlar arasında konjugasyon ve elektroporasyonla transfer edilebildiği belirtilmektedir (10).

Toprak izolatlarında düşük düzeyde (%2.96) dirençlilik saptanmış olması bu organizmaların herhangi bir şekilde bu ajanla karşılaşmamasından kaynaklanacağını, zira imipenem dirençliliğinin bakterilerin bu antibiyotikle muamele edilmesi ile oluşabildiği ortaya çıkartılmıştır (16). Toprak izolatlarında sadece *Pseudomonas* sp.'de dirençliliğin saptanmış olması bu ajanların organizmaya dış membran proteinleri üzerinden giriş yapması ve *Pseudomonas* 'ların bazılarında doğal olarak OMP-D2 proteinin eksikliğinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (9).

Kanalizasyon izolatlarında dirençlilik açısından en dikkati çeken bakteri *Acinetobacter* sp., olup izole edilen 40 izolatın tamamında (%100) dirençlilik saptanmış olması hayli ilginçtir. Dirençliliğin bu kadar yüksek oranda tesbit edilmesi bu bakterilerin β -laktam ve Aminoglikozitlere karşı çok çeşitli dirençlilik mekanizmasından kaynaklanacağı şeklinde belirlenmiştir (17). Çeşitli ortamlardan izole edilen 576 *Acinetobacter* 'lerle yapılan bir araştırmada izolatların %99'unun imipeneme hassas oldukları, dirençli izolatların ise hastane çevresinden izole edilen bakterilerden kaynaklandığı ve bunlarında *Acinetobacter baumannii* ve *A.junii* olduğu belirlenmiştir (5). Diğer bir araştırmada ise uluslararası enterik izolatların %16'sının imipeneme dirençli oldukları, enterik olmayan organizmaların ise (*Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., ve *Acinetobacter* sp.) %72 oranında dirençli olmaları (3) bulgularımızı doğrular niteliktedir. *Acinetobacter* sp., dışındaki organizmalar arasında en yüksek oranda dirençlilik *Pseudomonas* sp.'de %30.5 oranında saptanmıştır. Bu bulgu organizmaların dış membran proteinlerinin eksikliğinden ve bu ajan ile karşılaşma olasılığının

yüksekliğinden ve aynı ortamda bulunan ve antibiyotiklere karşı ekstrakromozomal dirençlilik determinantları taşıyan diğer organizmalarla ve bu organizmalardan herhangi bir şekilde dış ortama verilen genetik determinantlarla karşılaşma sıklıklarının yüksek olması neticesinde yeni genetik materyal kazanımından (Konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon) kaynaklanabileceği düşünülmektedir (16). Diğer organizmalarda ki, *E.coli* (%1.15), *Klebsiella* sp. (%4.65), *Enterobacter* sp. (%0) ve koliform (%2.83), düşük düzeydeki dirençlilik diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir (18,19).

İmipenem dirençli izolatların (Topak ve kanalizasyon) büyük bir kısmında (%78.18) β -laktamaz üretimi gözlenmiştir. Bu bulgu diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir (20). İmipenem hassas olan organizmalar arasında da β -laktamaz sentezleme oranları *Klebsiella* sp. (%16.6), *Acinetobacter* sp. (%15.5), *Enterobacter* sp. (%7.6) ve *E.coli* (%4.6) şeklinde belirlenmiş olup diğer araştırmacıların bulgularına oranla daha düşük bir seviyede olup (20) özellikleri çalışılmamıştır.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, bakteriler arasındaki antibiyotiklere karşı direnç probleminin ortaya çıkmasında birincil rolü toprak bakterilerinin oynadığı (21) ve bu mikroorganizmalardan diğer mikroorganizmalara çeşitli gen transfer yollarıyla aktarıldığı fikrini desteklemektedir.

Her ne kadar kanalizasyon izolatlarındaki İmipenem dirençliliği yüksek olsa da bu yüksek dirençlilik, orijini toprak olarak bilinen *Acinetobacter* sp., ve *Pseudomonas* sp.'den kaynaklanmaktadır. Enterik olan bakterilerdeki İmipenem dirençliliği ise son derece düşük düzeyde (< %2) saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. SHIMADA, J. AND KAWAHARA, Y., 1994. Overview of a new carbapenem, panipenem/betamipron. *Drugs. Exp. Clin. Res.* 20 (6):241-5.
2. ÜNAL, S., 1994. Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Mikrobiyal İlaçlar. Akalın, H.E., I. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti. ANKARA. 132-43.
3. JONER, R.N., AND MARSHALL, S.A., 1994. Antimicrobial activity of cefepime tested against Bush group I beta-lactamase-producing strains resistant to ceftazidime. A Multilaboratory National and International Clinical Isolate Study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 19(1):33-38.
4. NGUYEN, V.J.C. AND GUTMANN, L., 1994. Resistance to antibiotics caused by decrease of the permeability in gram-negative bacteria. *Pres. Med.* 19:23(11):522, 527-31.
5. GOSPODAREK, M., 1993. Susceptibility to antibiotics and biochemical activity of strains of *Acinetobacter* sp., isolated from various sources. *Med. Dosw. Microbiol.* 45 (3): 331-7.
6. KUCZKOWSKA, J. AND DOLNA, I., 1992. Sensitivity of multiresistant bacterial strains to imipenem (Tienam). *Przeg. Lek.* 49(5):151-3.
7. LEE, E.H., NICOLAS, M.H., KİTZİS, M.D., PIALOUX, G., COLLATZ, E. AND GUTMANN, L., 1991. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 35(6):1093-98.

8. RAIMONDI,A., TRAVERSO,A. AND NIKAIIDO,H., 1991. Imipenem- and Meropenem-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Proteus rettgeri* lack porins. Antimicrob. Agents and Chemother. 35(6):1174-80.
9. QUINN, J.P., DARZINS, A., MIYASHIRO, D., RIPP, S. AND MILLER, R.V., 1991. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO:Mapping of the OprD2 gene. Antimicrob. Agents and Chemother. 35(4): 753-5.
10. ARAKAWA, Y., MURAKAMI, M., SUZIKI, K., ITO, H., WAKHAROTAYAN-KUN, R., OHSUKA, S., KATO, N. AND OHTA, M., 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. Antimicrob. Agents and Chemother. 39(7):1612-5.
11. BLAHOVA,J., HUBKOVA, M. AND KRČMERY, V.SR., 1994 Phage F-116 transduction of antibiotic resistance from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Chemother. 6(3):184-8.
12. ANONYMOUS., 1978. Mikrobiologischen Handbuch, E. Merck, Darmstadt.
13. ÇOLAK, Ö. VE ARIKAN,B., 1990. Laktöz pozitif *Enterobacteriaceae* üyelerinin teşhisi için geliştirilmiş yeni bir selektif agar besiyeri. KÜKEM Dergisi, 13 (12):15-21.
14. KILBEY,B.J., LEGATOR,M., NICOLAS,W., AND RAMEL,C., 1984. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Second Edition., Amsterdam. Page 15-21.
15. ELMER, W.K., ALLEN, S.D., DOWEL, V.R. JR., JANDA, W.M., SOMMERS, H.M. AND WINN, W.L., 1988. Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology . Third Edition.
16. GIAMARELLUS, B.E.J., GRECKA,P. AND GIAMARELLOU,H., 1995.Comparative in vitro killing activity of meropenem versus imipenem against multiresistant nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*. J. Chemother. 7(3):179-83.
17. BERGOGNE, B.E., 1995. The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp. : The need for control and new agents. J. Hosp. Infect. 30 suppl:441-52.
18. IAKOVLEV, V.P., BLATUN, L.A., KHLEBNIKOV, E.P., SAMYKINA, T.D. AND ELAGINA, L.V., 1995. Use of imipenem in treatment of patients with surgical infection. Antibioth. Chemother. 40 (4):40-4.
19. FASS, R.J., BARNISHAN, J. AND AYERS, L.W., 1995. Emergence of bacterial resistance to imipenem and Ciprofloxacin in a university hospital. J. Antimicrob. Chemother. 36 (2): 343-353.
20. RAMADAN, M.A., TAWFIK, A.F. AND SHIBL, A.M., 1995. Effect of beta-lactamase expression on susceptibility of local isolates of *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. Chemotherapy. 41 (3):193-9.
21. GÜR,D., 1994. Antibiyotiklere Direnç Gelişmesi; Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar., Akalın,H.E., 1. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd.Şti., Ankara, 19-37.