

Endotrakeal Aspirat Örneklerinden İzole Edilen Gram Negatif Etkenler

Engin Karakeçe, Tayfur Demiray, Fergül Erdoğan, İhsan Hakkı Çiftci

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya, Türkiye

ÖZET

Amaç: Yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) meydana gelen hastane enfeksiyonları hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Bu enfeksiyonların tanısı için endotrakeal aspirat (ETA) örnekleri ile yapılan çalışmalar tedavinin düzenlenmesinde ve takibinde yol göstericidir. Bu çalışmada ETA örneklerinden izole edilen şüpheli patojenler ve antibiyotik direncinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Hastalar ve Yöntemler: Çalışmaya 2011-2012 yılları içinde Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ETA örneklerinden izole edilen 304 mikroorganizma dahil edilmiştir. Tüm veriler retrospektif olarak elde edilmiş olup; bakteriyolojik çalışmalar konvansiyonel yöntemlerle yapılmış, tanımlama ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları otomatize sistemle (Vitek2) gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Toplam 304 hasta örneğinden sıklıkla *Acinetobacter baumannii* (%42), *Pseudomonas aeruginosa* (%28) ve *Klebsiella pneumonia* (%10) izole edilmiştir. Özellikle ETA örneklerinden izole edilen *A. baumannii* suşlarının yüksek karbapenem direnç oranı (\geq % 89) dikkat çekici bulunmuş, doripenem, imipenem ve meropenem için MIC_{50} , MIC_{90} değerleri benzer olup sırasıyla otomatize sistemin üst sınırı olan $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. *P. aeruginosa* suşlarının karbapenem direnci % 80 olup, doripenem, imipenem ve meropenem MIC_{50} düzeyleri $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, MIC_{90} düzeyleri $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır.

Sonuç: Günümüzde hastanelerin endemik ve dirençli patojenleri olan *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* enfeksiyonları için kontamine ortamlar kaynak oluşturmaktadır. Bu tür dirençli mikroorganizmaların izolasyon, tanımlama ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde halen kullanılan yöntemler hem zaman hemde maddi kayıplara neden olmaktadır. Kolay, hızlı ve doğru sonuç veren ve uygun maliyetli olan yöntemlerin kullanıma girmesinin yararlı olacağı inancındayız.

Anahtar sözcükler: endotrakeal aspirat, ventilatör ilişkili pnömoni, antibiyotik direnci

GRAM NEGATIVE BACTERIA ISOLATED FROM ENDOTRACHEAL ASPIRATE SAMPLES

ABSTRACT

Objective: Nosocomial infections are major cause of morbidity and mortality at intensive care units in both developing and developed countries. Endotracheal aspiration samples (ETS) are useful for diagnosis and setting treatment schemes as well as following the answers to the antibiotics. The aim of this study is evaluation of the microorganisms and their antimicrobial resistance isolated from ETS.

Patients and Methods: Total number of 304 samples were included in this study which were sent to Clinical Microbiology Laboratory during the period of 2011-2012. All the data were evaluated retrospectively. Bacteriological studies were held conventionally. Automated system (Vitek 2, France) was used for identification and antimicrobial susceptibility.

Results: *Acinetobacter baumannii* (42%), *Pseudomonas aeruginosa* (28%) and *Klebsiella pneumonia* (10%) were found to be the most common agents in 304 patient samples. High level of resistance to carbapenems (\geq 89%) among *A. baumannii* isolates was striking. MIC_{50} and MIC_{90} levels of doripenem, imipenem and meropenem for these isolates were similar and were given as $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, respectively. Resistance to carbapenems was also high among *P. aeruginosa* (80%) isolates. MIC_{50} levels of doripenem, imipenem and meropenem for pseudomonas were calculated as $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, respectively and MIC_{90} levels were $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, respectively

Conclusion: Contaminated environments of hospitals serve as sources for endemic resistant pathogens such as *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. Methods used for isolation, identification of bacteria and determination of drug resistance are highly time consuming and expensive. Accurate, fast and cost-effective methods are needed to handle such microorganisms.

Key words: endotracheal aspirates, ventilator-associated pneumonia, antibiotic resistance

Hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) meydana gelen hastane enfeksiyonları hem gelişmiş, hemde gelişmekte olan ülkelerde önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Bu enfeksiyonlar arasında entübasyon sırasında, mekanik ventilasyon desteğinin başlangıcından en az 48 saat sonra gelişen ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP) %20-70 mortalite oranı ile en önemli olanıdır. VİP tanısında klinik değerlendirme ve radyolojik bulgular tek başına yetersiz kalmakta ayırıcı tanı için mikrobiyolojik verilere ihtiyaç duyulmaktadır (1,5).

Mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda bakteri kolonizasyonu sıklıkla karşılaşılan bir durum olduğundan kolonizasyon ile enfeksiyonu birbirinden ayırmak önem taşımaktadır. Bu ayırımında invaziv bronkoskopik yöntemlerle alınan örnekler klinik tanıya yardımcı olmakla birlikte birtakım dezavantajlar da içermektedir. Bu yüzden kolay uygulanabilen, ucuz, komplikasyonları daha az, özel eğitilmiş personel gerektirmeden alınan endotrakeal aspirat (ETA) örneklerinin mikrobiyolojik incelemesine sıklıkla başvurulmaktadır (6,11).

ETA örnekleri patojenlerin yanı sıra kolonize olan mikroorganizmaları da ihtiva etmesi nedeniyle yanlış pozitifliklere neden olmaktadır. Kalitatif kültür çalışmalarında elde edilen yanlış pozitiflikler ETA örneklerinin özgüllüğünü düşürmektedir. Ancak ETA örnekleri ile yapılan kantitatif kültür çalışmaları VİP tanısında etkilidir. Mekanik ventilasyon uygulama süresi, bakteri yükü ve kullanılan antibiyotikler gibi faktörlerle değişmekle birlikte kantitatif kültürün duyarlılığı ve özgüllüğünün %100'e ulaşabileceği bildirilmiştir (6,11).

Bu çalışmada YBÜ'lerinden gönderilen ETA örnekleri ile yapılan kültür çalışmaları sonrasında şüpheli patojen olarak izole edilen mikroorganizmaların dağılımı ve antibiyotik direnç profillerinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Hastalar ve yöntemler

Çalışmaya Sağlık Bakanlığı Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 1 Ocak 2011 ile 31 Aralık 2012 tarihleri arasında YBÜ'lerinden gönderilen toplam 856 ETA örneği dahil edilmiştir. Her örnek için direkt Gram boyalı preparat hazırlanarak mikroskopi sonuçları kaydedilmiştir. Bakteriolojik çalışmalar konvansiyonel yöntemlerle kalitatif yapılmış olup, ekimlerde %5 Koyun Kanlı, Eozin Metilen Mavis (EMB) ve Çikolatamsı agar kullanılmıştır. Ekimleri yapılan plaklar 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Kültür pozitif olan toplam 304 hasta örneği çalışmada değerlendirmeye

alınmıştır. Bakteriolojik değerlendirmede tüm ekim çizgilerinde üreme gösteren baskın koloniler patojen olarak kabul edilmiştir. Tür düzeyinde tanımlama (GN, GP tanımlama kartları, Biomerieux, Fransa) ve antibiyotik duyarlılık (GN N90 ve GN N91, GP 580 ve GP 592 antibiyogram kartları, Biomerieux, Fransa) çalışmaları Vitek2 (Biomerieux, Fransa) tam otomatize sistem ile yapılmıştır. Antibiyotikler için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda belirlenmiştir (12). Çalışmada kullanılan tüm veriler retrospektif olarak elde edilmiştir. Hastaların tekrarlayan ETA örneklerinden elde edilen üremeleri değerlendirme dışı tutulmuştur. Etken kolonizasyon ayırımı direkt Gram boyama sonuçları birlikte verilerek klinisyene bırakılmıştır. Verilerin analizinde SPSS (SPSS 17, Chicago, ABD) paket programı sıklıkların rakamsal ve yüzdelik olarak tespit edilmesi için kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışma kapsamında değerlendirmeye alınan 856 ETA örneğinin 449'unun (%52,5) erkek, 407'sinin (%47,5) kadın hastalara ait olduğu gözlemlendi. Kalitatif kültür çalışmalarını takiben gerçekleştirilen tanımlama çalışmalarında örneklerin 304'ünde (%35) patojen mikroorganizmalar tanımlandı. ETA örneklerinde en sık izole edilen Gram negatif bakteriler *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Enterobacter spp.* olduğu saptandı (Tablo 1). Daha az sıklıkta izole edilen 30 mikroorganizmanın ise Gram negatif ve pozitif olmak üzere sırasıyla *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* ve *E. faecalis* olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda izole edilen *A. baumannii* suşlarındaki karbapenem direncinin yüksekliği (%89) dikkat çekici idi. *A. baumannii* suşlarının doripenem, imipenem ve meropenem için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri benzer olup, sırasıyla otomatize sistemin üst sınırı olan $\geq 8\mu\text{g/ml}$, $\geq 16\mu\text{g/ml}$, ve $\geq 16\mu\text{g/ml}$ bulundu. *A. baumannii* suşlarının da kolistin, netilmisin, tigesiklin direncine rastlanmazken diğer antibiyotiklere direnç durumları Tablo 1'de özetlendi.

P. aeruginosa suşlarında karbapenem direnci ≥ 80 olup, doripenem, imipenem ve meropenem için MİK₅₀ değerleri sırasıyla $\geq 8\mu\text{g/ml}$, $8\mu\text{g/ml}$, $\geq 16\mu\text{g/ml}$, MİK₉₀ düzeyleri de sırasıyla $\geq 8\mu\text{g/ml}$, $\geq 16\mu\text{g/ml}$, $\geq 16\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

E. coli, *K. pneumoniae* ve *Enterobacter spp.* suşlarında geniş spektrumlu beta laktamaz oranının sırasıyla %61, %47 ve %30 olduğu tespit edildi. İzole edilen *S. aureus*

Tablo 1. ETA örneklerinden en sık izole edilen bakterilerin antibiyotik direnç oranları.

Mikroorganizma	n	İM n (%)	MEM n (%)	AK n (%)	GN n (%)	CAZ n (%)	SAM n (%)	CIP n (%)	CES n (%)	SXT n (%)
<i>A. baumannii</i>	128	115 (90)	115 (90)	58 (45)	82 (64)	114 (92)	118 (92)	109 (85)	95 (74)	117 (91)
<i>P. aeruginosa</i>	88	52 (59)	50 (56)	38 (43)	19 (21)	35 (40)	84 (95)	35 (39)	34 (38)	85 (96)
<i>K. pneumoniae</i>	31	5 (16)	5 (16)	0	6 (19)	16 (51)	14 (45)	0	12 (38)	19 (61)
<i>E. coli</i>	17	0	0	0	7 (41)	10 (59)	11 (64)	15 (88)	7 (41)	14 (82)
Enterobacter spp.	10	0	0	0	1 (10)	3 (30)	5 (50)	0	2 (20)	3 (30)

ETA: Endotrakeal aspirat, İM: İmipenem, MEM: Meropenem, AK: Amikasin, GN: Gentamisin, CAZ: Seftazidim, SAM: Ampisilin-Sulbaktam, CIP: Siprofloksasin, SXT: Sulbaktam-Sefeperezon, Trimetoprim/Sulfametoksazol.

suşlarında metisilin direnci % 30 olarak saptandı. En sık izole edilen mikroorganizmaların ayrıntılı antibiyotik direnç profilleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tartışma

Entübe edilmiş yoğun bakım hastalarının yüksek mortalite ile seyreden hastane kaynaklı pnömonilerinde etken mikroorganizmanın erken izole edilerek tedaviye başlanması prognozu belirleyen önemli bir faktördür. Hastane enfeksiyonları içinde hastane kaynaklı pnömoniler ortalama %15 oranında bildirilirken, ülkemizde yapılan çalışmalarda bu oran %11-30 arasında değişmektedir. YBÜ'de entübe hastalarda VİP görülme oranı da %9-24 arasında değişmektedir (6,13). VİP tanısı, benzer klinik bulgulara sahip hastalıklar nedeniyle oldukça zordur ancak erken tanı koyarak uygun antibiyotik kullanılması mortalite ve morbidite açısından elbette çok önemlidir. İnvaziv bronkoskopik yöntemlerin avantajları bilinmektedir. Ancak bu yöntemleri uygulamak her zaman mümkün olmamakta bu nedenle ETA ile başlangıç kültürünün yapılması ve ampirik tedaviye buna göre başlanması 48-72 saat sonra hastanın tekrar değerlendirilerek klinik duruma göre bronkoalveoler lavaj (BAL), korunmalı fırçalama gibi invaziv yöntemlere başvurulması önerilmektedir (10,12,14).

Günümüzde hastanelerin endemik dirençli patojenleri olan *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* ortam kolonizasyonu ile enfeksiyonlar için kaynak oluşturmaktadır. Dikmen ve arkadaşları 2004 de *A. baumannii* için mortaliteyi %59,4 olarak bulmuşlardır (6). Uygun olmayan antibiyotik seçimi ve etkeninin *Pseudomonas spp.* veya *Acinetobacter spp.* olması durumunda mortalitenin %91'e kadar çıktığı bildirilmektedir (4).

VİP etkenlerinin dağılımı hastanelere göre değişmekle birlikte genel olarak Gram negatif bakteriler izole edilmektedir. Uzel ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada %27 *P. aeruginosa*, %23 *K. pneumoniae* %20 *Acinetobacter spp.* ve

%12 MRSA; Dikmen ve arkadaşları en sık VİP etkeni olarak %37,8 *A. baumannii*, %13,5 *P. aeruginosa*, %10,8 MRSA (%10,8); Yılmaz ve arkadaşları geç VİP etkeni olarak %31,9 *P. aeruginosa* ve %21,3 *Acinetobacter spp.*, Şafak ve arkadaşları da ETA örneklerinin kalitatif kültürlerinde %29 *P. aeruginosa* ve %20 MRSA saptadıklarını, Uluğ ve arkadaşları ise en sık etkenler sırasıyla %27,3 *P. aeruginosa*, %14,3 *S. aureus* ve %13,1 *Acinetobacter spp.* olarak bildirmişlerdir. (6,13,15,16,17). Ülkemizde olduğu gibi yurtdışında yapılan çalışmalarda da *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* en sık izole edilen mikroorganizmalar olarak bildirilmiştir (18,19).

Tüm dünyada olduğu gibi hastanemiz YBÜ'lerinde de çoğul dirençli bakteriler sıklıkla izole edilmektedir. Çalışmamızda YBÜ'lerinden gönderilen ETA örneklerinde en sık izole edilen patojenler Gram negatif bakterilerdir. Tüm izolatlar arasında nonfermantatif Gram negatif oranımız ise % 72,4 (220/304) olarak hesaplanmıştır. Bu oran önceki çalışmalara göre yüksek olup, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için saptanan %42,1 ve %28,9 oranları düşündürücüdür. Ayrıca karbapenem direncinin *A. baumannii* %90 ve *P. aeruginosa* %55,9 için yüksek olması YBÜ'sinde yatan ve mekanik ventilasyona bağlı hastalar için önemli bir risk gibi görünmektedir. *A. baumannii* suşları için kolistin, tigesiklin ve netilmisin en etkili antibiyotikler olduğu; *P. aeruginosa* suşları için ise sulbaktam-sefeperezon, siprofloksasin, seftazidim, gentamisin ve amikasinin en etkili antibiyotikler olduğu saptanmıştır. Bu durum *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'nın tedavi alternatifleri açısından anlamlıdır. Gram negatif enterik bakterilerde en etkin antibiyotiklerin ise imipenem, meropenem, amikasin olduğu görülmüştür. *S. aureus* suşlarında metisilin direnci %30 olarak saptanırken vankomisin ve teikoplanin direncine rastlanmamıştır.

Demirağ ve arkadaşları Gram negatif bakterilerde GSBL oranını %42,8, Uluğ ve arkadaşları %92 olarak farklı

oranlarda bulunmuştur. Literatürle uyumlu olarak GSBL oranımız %43 olarak hesaplanmıştır (9,20).

Amerikan Toraks Derneği ve Türk Toraks Derneği çalışma gruplarının VİP de ilk olarak ampirik tedaviyi önermektedir (4,11). Erken başlanan tedavi VİP'lerde mortaliteyi azaltmakta ancak uygun olmayan antibiyotik tedavileri mortalitesi yüksek dirençli bakterilerle kolonizasyona ve dirençli bakterilerle oluşan enfeksiyon olasılığını arttırmaktadır.

(21,22). VİP enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar; hastaların kişisel özelliklerine, yattıkları YBÜ'lerin mikrobiyal florasına ve hastanelere göre değişiklik göstermektedir (2).

Bu nedenle çalışmamız hastanemiz YBÜ'sinin mikrobiyal florasının tespiti, enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmaların direnç profillerinin belirlenmesi ve ampirik tedavinin planlanması hususunda yol gösterici olacaktır.

Kaynaklar

1. Chastre J. Ventilator-associated pneumonia. *Respir. Care.* 2005;50:975-983.
2. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:867-903.
3. Bonten MJ, Kollef MH, Hall JB. Risk factor for ventilator-associated pneumonia: From epidemiology to patient management. *Clin Infect Dis* 2004 ;38:1141-9.
4. Karaca S, Çırak K, Halilçolar H. Ventilator ilişkili pnömoni tanısında derin trakeal aspirat ve bronkoalveolar lavaj örneklerinin kantitatif kültürlerinin sonuçları ve karşılaştırılması *Ankem Derg.* 2004;7:13-7.
5. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care unit in europe. Result of the European prevalence of infection in intensive care (EPIC) study. *EPIC International Advisory Committee. JAMA* 1995;274:639-44.
6. Dikmen Y, Aygün G, Öztürk R. Yoğun bakım ünitesinde ventilatörle ilişkili pnömonilerin değerlendirilmesi. *Klimik Derg* 2004;17:117-119.
7. Sevinç Can. Ventilator ilişkili pnömoninin non-invasiv yöntemlerle mikrobiyolojik tanısı. *Yoğun bakım dergisi* 2007;7:287-91.
8. Bayraktar B, Arslan Karabulut N, Bulut E, Şahin N. Yoğun bakım ünitesi hastalarından mini-BAL kültürü ile izole edilen ventilatörle ilişkili pnömoni etkenleri ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg* 2007;37:15-8.
9. Demirdağ K, Cihangiroğlu M, Yüce P, Özden M, Kalkan A. Mekanik ventilasyon desteği alan hastaların trakeal aspirat örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. *Klimik Derg* 2003; 16:68-72.
10. Yahyaoğlu M. Ventilator ilişkili pnömoni tanısında endotrakeal aspirat kantitatif kültürü ile mini BAL kantitatif kültürü arasındaki uyum. *Uzmanlık Tezi. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul* 2006;4-56.
11. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. guidelines for management of adult with hospital acquired, ventilator-associated and healthcare associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(4 suppl 2):388-416.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performans Standart for antimicrobial Susceptibility Testig. Twentieth Informational Supplement, M100- S20, Wayne, PA (2010).
13. Şafak B, Çiftçi İH, Kıyıldı N et al. Ventilator ilişkili pnömoni tanısında endotrakeal aspirat kültürleri: 2004-2006 yılları sonuçları. *ANKEM Derg* 2007;21:81-5.
14. Cook D, Mandell L. Endotrakeal aspiration in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000;117:195-197.
15. Yılmaz G, Çaylan R, Ulusoy H, Aydın K, Erciyes N, Köksal İ. Yoğun bakım ünitesinde izlenen ventilatör ilişkili pnömonilerin değerlendirilmesi. *Yoğun Bakım Dergisi* 2004;4:131-7.
16. Bodur H, Erbay A, Akıncı E, Balaban N, Çolpan A. Ventilatörle ilişkili pnömoni olgularının değerlendirilmesi. *Has Inf Derg* 2005;9:212-7.
17. Uzel S, Özsüt H, Eraksoy H, Dilmener M, Çalangu S. Yoğun bakım biriminde ventilatör ilişkili pnömoni etkeni olabilecek bakterilerin dağılımı ve antibiyotiklere duyarlılıklar. *Klimik Derg* 1996;9:6-9.
18. Stefanov C, Uchhikov A, Rosen D. A comparison of the efficiency of treatment with imipenem/cilastatin, ceftazidime and piperacillin/tazobactam in patients with ventilator-associated pneumonia. *Turkish Respira* 2005;6:67-72.
19. Woske HJ, Röding T, Schulz I, Lode H. Ventilator-associated pneumonia in a surgical intensive care unit: epidemiology, etiology and comparison of three bronchoscopic methods for microbiological specimen sampling. *Critical Care* 2001;5:167-173.
20. Uluğ M, Çelen MK, Geyik MF, Hoşoğlu S, Ayaz C. Ventilatör ilişkili pnömoni tanısında endotrakeal aspirat kültürünün ve izole edilen bakterilerin değerlendirilmesi. *Düzce Tıp Derg* 2011;13:21-25.
21. Chastre J, Fagon JY, Trouillet JL. Diagnosis and treatment of nosocomial pneumonia in patients in intensive care units. *Clin Infect Dis* 1995;21(suppl 3):S226-37.
22. Waterer GW, Wunderink RG. Controversies in the diagnosis of ventilator-acquired pneumonia. *Med Clin North Am* 2001;85:1565-81.