

İmipenem Dirençli *Acinetobacter* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretimini Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması

Mehtap ULUSOY AL *, İpek MUMCUOĞLU *, Neriman AKSU *, İştah DOLAPÇI **, Zeynep Ceren KARAHAN **, İrmak BARAN *, Şenol KURŞUN *

* Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* suşlarında karbapenem direncinden sorumlu metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Otomatik tanımlama cihazı ile (VİTEK 2; bioMérieux, France) isimlendirilen ve imipenem dirençli olarak tespit edilen 79 *Acinetobacter* suşu çalışmaya alınmıştır. Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL'lerin tanımlanmasında hızlı, kolay ve güvenilir yöntemlerin saptanması amacı ile çalışmaya aldığımız suşlara; Etest MBL, kombine disk sinerji testi, çift disk sinerji testi ve modifiye Hodge testi olmak üzere dört fenotipik test uygulanmıştır. *Acinetobacter* türlerinde MBL üretiminden en sık sorumlu olan bla_{IMP-1} geninin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmış ve suşların klonal analizi pulsed field jel elektroforezi (PFGE) ile yapılmıştır.

Bulgular: İmipenem dirençli *Acinetobacter* izolatlarının Etest ile 41'inin (%51.9), kombine disk sinerji testi ile 46'sının (%58.2), çift disk sinerji testi ile 44'ünün (%55.7), modifiye Hodge Testi ile 55'inin (%69.6) MBL ürettiği saptanmıştır. Etest sonucu ile en uyumlu testin %75.9 uyum oranıyla kombine disk sinerji testi olduğu gözlemlenmiştir. PZR yöntemiyle bla_{IMP-1} geni araştırılmış, ancak pozitiflik bulunamamıştır. PFGE ile 10 farklı bant paterni görülmüş ve fenotipik testlerle MBL pozitif bulunan izolatların A ve C gruplarında yoğunlaştıkları gözlemlenmiştir.

Sonuç: Kombine disk sinerji testinin Etest ile yüksek uyum göstermesi, bu testin Etestin kullanılmadığı laboratuvarlarda MBL tayininde alternatif olabileceğini düşündürmektedir. Hastanemizde izole edilen *Acinetobacter* suşlarının MBL üretiminden bla_{IMP-1} dışı genlerin sorumlu olduğu düşünülmüştür. Direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla karbapenem direnç tiplerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmesi ve epidemiyolojik analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Metallo-beta-laktamaz, *Acinetobacter* türleri, Etest

SUMMARY

Phenotypic and Genotypic Investigation of Metallo-Beta-Lactamase Production in Imipenem Resistant *Acinetobacter* strains

Objective: The aim of this study was to investigate the presence of metallo-beta-lactamase (MBL) enzymes responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter* strains isolated from various clinical specimens, by phenotypical and genotypical methods.

Materials and Methods: Imipenem resistant 79 *Acinetobacter* spp. strains identified by automated identification system (VİTEK 2; bioMérieux, France) were included in the study. In order to determine fast, easy and reliable methods for the identification of MBLs in routine clinical microbiology laboratory, all strains in this study were subjected to four phenotypical tests which were E-test MBL, combined disc synergy test, double disc synergy test and modified Hodge test. The presence of bla_{IMP-1} gene which coded the most frequent MBL enzyme in *Acinetobacter* strains was investigated by polymerase chain reaction (PCR) and clonal analysis was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Results: Among imipenem resistant *Acinetobacter* isolates were found to produce MBL by using E-test (n=41; 51.9%), combined disc synergy test (n=46; 58.2%), double disc synergy test (n=44; 55.7%) or modified Hodge test (n=55; 69.6%). The most compatible test with E test was combined disc synergy with a 75.9% compatibility. The bla_{IMP-1} gene investigated by PCR yielded no positive result. Ten different band patterns were found by PFGE, and phenotypically MBL positive isolates were mostly clustered in A and C groups.

Conclusion: As combined disc synergy test showed highest compatibility with E-test, it can be suggested as an alternative for MBL detection in laboratories where E-test is not used. Genes other than bla_{IMP-1} might be responsible for MBL production by *Acinetobacter* strains in our hospital. In order to limit spread of resistance and guide treatment, carbapenem resistance patterns should be determined and epidemiological analysis should be done in routine microbiology laboratories.

Key words: Metallo-beta-lactamase, *Acinetobacter* species, E-test

Alındığı tarih: 13.09.2010

Kabul tarihi: 21.12.2010

Yazışma adresi: İpek Mumcuoğlu, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ülkü Mahallesi Talatpaşa Bulvarı No:5, Altındağ 06100 Ankara

e-posta: ipekmumcuoglu@hotmail.com

GİRİŞ

Acinetobacter türlerini hastane enfeksiyonları açısından önemli kılan, bilinen tüm antibiyotik sınıflarına dirençli olabilmelerinin yanı sıra yeni antibiyotik direnç determinantlarını kazanmaktaki üstün kapasiteleridir ⁽¹⁾. Buna ek olarak nozokomiyal yayılımına olanak verecek şekilde hastane ortamında uzun süre canlı kalabilme yeteneğine de sahiptirler. Bu bakteriler, 1970'lerde en çok hastaneden kazanılmış pnömonilere yol açarken, günümüzde buna ek olarak idrar yolu, santral sinir sistemi, deri-yumuşak doku ve kemik enfeksiyonlarına da yol açabilmektedirler ⁽²⁾.

Geniş spektrumlu beta-laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonları da kapsayan çoklu ilaç dirençli fenotipler nedeniyle *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisi çoğu zaman güçlüklerle yapılmaktadır. Bu durumda tercih edilecek ilaç karbapenemlerdir. Ancak, karbapenem dirençli *Acinetobacter* izolatları dünyada gittikçe artan oranlarda izole edilmektedir ^(3,4). Beta-laktamazlar, karbapenemaz üretimi, azalmış geçirgenlik ve atım pompasının artmış ekspresyonu bu türlerde görülen direnç mekanizmalarıdır ⁽⁵⁾. Özellikle IMP, VIM, SIM tipi metallo-beta-laktamazlar (MBL), OXA-23, OXA-24, ve OXA-58 tipi sınıf D karbapenemazlar, karbapenemlere azalmış duyarlılıktan artan oranda sorumludurlar. Ayrıca OXA-51 tip doğal oksasiline aşırı üretimi de kazanılmış karbapenem direncine neden olmaktadır ^(5,6).

Direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla karbapenem direnç tiplerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmesi gerekmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi en güvenilir yöntem olmakla birlikte, alternatif olabilecek ucuz ve kolay fenotipik testler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ancak, halen güvenilirliği onaylanmış ve standardize edilmiş bir fenotipik test yoktur.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* suşlarında karbapenem direncinden sorumlu MBL enziminin üretimini fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda MBL tayininde önerilen fenotipik testler karşılaştırılmış, *Acinetobacter* türlerinde MBL üretiminden en sık sorumlu olan *bla*_{IMP-1} geninin varlığı araştırılmış ve bu direncin epidemiyolojik profilinin incelenebilmesi için suşlar pulsed field jel elektrofo-

rezi (PFGE) ile değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

***Acinetobacter* izolatları:** Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde klinik örneklerden hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen karbapenem dirençli toplam 79 adet *Acinetobacter* türü değerlendirilmiştir. İzolatların tanımlama ve antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 sistemi (bioMérieux, France) kullanılarak yapılmıştır. İzolatlar diğer testler yapılncaya kadar gliserollü buyyon içinde -86°C'de saklanmıştır.

Kalp DNA'nın Hazırlanması: DNA ekstraksiyonu, Genomic DNA from Tissue, (Nucleospin Tissue/Macherey-Nagel, Almanya) hazır kit kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

PZR: İzolatların *bla*_{IMP-1} gen taşıyıcılıkları 5'CS (5' GGC ATC CAA GCA GCA AG 3') ve 3'CS (5' AAG CAG ACT TGA CCT GA 3') primerleri kullanılarak, korunmuş bölgelerle sınırlanmış değişken bölgeleri içeren kromozomal DNA bölümü amplifiye edilerek araştırılmıştır (104). PZR, 25 µl son hacimde, 1 U Taq DNA polimeraz, 30 pmol primer, 200 µM dNTP karışımı ve 1 mM MgCl₂'den oluşacak şekilde ayarlanmıştır. Üzerine 3 µl ekstrakte edilmiş DNA eklenerek, hot start PZR döngüleri ile çalışılmıştır. Bunun için 94°C'de 3 dk.'lık başlangıç denatürasyonu sonrasında; döngüler, 94°C'de 1 dk., 48°C'de 1 dk. ve 72°C'de 1.5 dk.'dan oluşan 35 siklusu takiben 72°C'de 2 dk.'lık son uzama şeklinde gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde, 100V'da 2.5 saat yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanarak UV transillüminatör ile görüntülenmiştir.

PFGE: İzolatların agaroz plaklar içerisinde hazırlanan DNA'larının kesiminde ApaI enzimi (Fermentas, Lithuania) kullanılmıştır. DNA paternleri; %1.2'lik agaroz jelde, CHEF DR II PFGE cihazında (Bio-Rad Hercules-USA) 5V/cm akım, 14°C sıcaklık ve 0.5X TBE içerisinde başlangıç ve final atım zamanları 5 ve 20 sn olacak şekilde 24 saat yürütülerek gösterilmiştir. PFGE sonrasında oluşan DNA paternleri hem gözle hem de Gene Directory programı (Syngene, UK) kullanılarak değerlendirilmiştir. Benzerlik indeksi Dice katsayısı kullanılarak %1 tolerans değerinde oluşturulmuştur. İzolatlar arası kümelenme

ilişkisi UPGMA (unweighted pair group method of arithmetic averages) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. İzolatlar arası genotipik ilişki Tenover kriterlerine göre değerlendirilmiştir⁽⁷⁾.

MBL Fenotipik Olarak Tanımlanması: Bugüne kadar rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL tespiti için kullanılan Etest veya disk sinerji testleri, bu enzimlerin etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ya da 2-merkaptopropionik asit (2-MPA) gibi metal şelatörler varlığında inhibe olma özelliğinden yararlanarak geliştirilmiştir.

1. Etest: Çalışmamızda kullandığımız Etest (AB Biodisk, İsveç) ticari olarak bulunan ve MBL enziminin fenotipik tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir testtir. Etest şeridinin bir tarafında imipenem (4-256 µg/ml), diğer tarafında ise imipenemle (1-64 µg/ml) birlikte EDTA bulunmaktadır. İmipenem-EDTA kısmında imipenem konsantrasyonu giderek azalırken EDTA konsantrasyonu (4 µg/ml) sabittir. İmipenem-EDTA MİK değeri ile imipenem MİK değeri arasında en az üç kat azalma saptanırsa, test MBL enzimi açısından pozitif kabul edilmektedir. Testin pozitif olmasının diğer bir ölçütü, Etest şeridinin imipenem veya EDTA içermeyen orta bölümünde hayalet bölge olarak adlandırılan görüntünün izlenmesidir⁽⁸⁾.

2. Kombine Disk Sinerji Testi (KDST): Bu test, EDTA varlığında ölçülen imipenem inhibisyon zon çapının elde edilen imipenem inhibisyon zon çapından en az 7 mm daha geniş olması temeline dayanmaktadır⁽⁹⁾. Bu amaçla *Acinetobacter* izolatlarının taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak Müller-Hinton Agara (MHA) homojen inokülasyonu yapıldı. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben aralarında en az 22 mm olacak şekilde iki imipenem diski (10µg) besiyeri yüzeyine yerleştirilerek imipenem disklerinden bir tanesinin üzerine 10 µl EDTA (0.5M, pH 8) eklendi. Plaklar 35°C'da 18 saat inkübe edildi. İmipenem-EDTA için ölçülen inhibisyon zon çapı imipenem için ölçülen inhibisyon zon çapından 7 mm daha geniş ise test sonucu pozitif olarak değerlendirildi.

3. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST): Bu test, 2-MPA varlığında seftazidim inhibisyon zonunun genişleme-

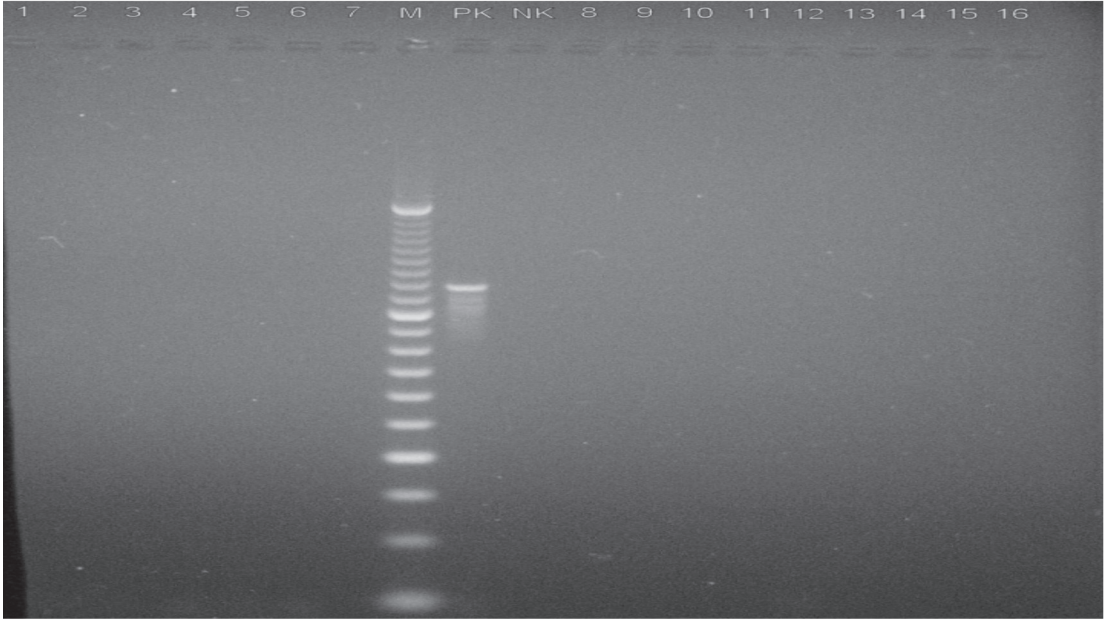
si mekanizmasına dayanmaktadır. Bu amaçla *Acinetobacter* izolatlarının taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı ve MHA üzerine homojen ekim yapıldı. Besiyerinin kurumasını takiben seftazidim diski (30 µg) besiyeri yüzeyine yerleştirildi. Seftazidim diskinin bir ucundan 10 mm uzağa boş bir kağıt disk yerleştirildi. Boş kağıt diskin üzerine 3 µl 2-MPA eklendi. Plaklar 35°C'da 18 saat inkübe edildi. Seftazidim inhibisyon zon çapının 2-MPA'ya doğru genişlemesi MBL varlığı açısından pozitif sonuç olarak değerlendirildi⁽¹⁰⁾.

4. Modifiye Hodge Test (MHT): Taze *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu 1:10 sulandırılarak MHA üzerine homojen olarak ekildi. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben besiyerinin merkezine imipenem diski (10 µg) yerleştirildi. Test edilecek *Acinetobacter* izolatının kanlı agardaki taze kültüründen steril eküvyon yardımıyla bakteri kolonileri toplandı ve imipenem diskinin bir ucundan başlayarak besiyeri kenarına doğru yoğun bakteri ekimi yapıldı. Bu şekilde her plakta, biri pozitif kontrol olmak üzere toplam dört izolat çalışıldı. İnokülasyonu takiben plaklar 35°C'da 18 saat inkübe edildi. *E. coli* suşuna bağlı oluşan inhibisyon zonunun *Acinetobacter* suşunun üremesinin bulunduğu bölgede azalması ve bu bölgede *E. coli* üremesinin görülmesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi⁽¹¹⁾.

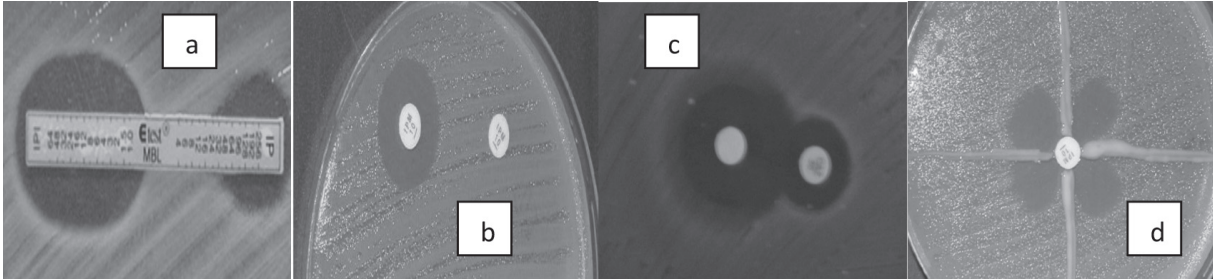
Tüm fenotipik yöntemlerde negatif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu; pozitif kontrol olarak da daha önce *bla*_{IMP-1} belirlenmiş iki adet *P. aeruginosa* suşu kullanılmıştır.

BULGULAR

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde farklı klinik örneklerden hastane enfeksiyonu etkeni olarak üretilen karbapenem dirençli 79 adet *Acinetobacter* suşu değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan 79 *Acinetobacter* izolatı; 36 trakeal aspirat (%45.6), 13 kan (%16.5), 10 yara (%12.7), 7 idrar (%8.9), 5 katater (%6.3), 3 mayı (%3.8), 2 abse (%2.5), 2 beyin omurilik sıvısı (%2.5) ve 1 balgam (%1.3) olmak üzere çeşitli klinik örnekten elde edilmiştir.



Şekil 1. PZR analizi ile bla_{IMP-1} geni: 1-16 izolat numaraları; M:Marker; PK: Pozitif kontrol (587 bç); NK: Negatif kontrol



Şekil 2. a: Etest pozitifliği; b: Kombine disk sinerji testi pozitifliği; c: Çift disk sinerji testi pozitifliği; d: “Modifiye Hodge Test” pozitifliği.

Çalışmaya alınan izolatların tamamı bla_{IMP-1} geni taşıyıcılığı açısından araştırılmıştır ve hiçbirinde bla_{IMP-1} gen taşıyıcılığı gösterilememiştir (Şekil 1).

MBL’in fenotipik tayini amacıyla Etest uygulanan 79 izolatın 41’inin (%51.9) MBL ürettiği, 38’inin (%48.1) ise MBL üretmediği saptanmıştır. Etest ile fenotipik olarak MBL ürettiği saptanan bir izolat şekil 2a’da gösterilmektedir.

KDST ile 79 *Acinetobacter* izolatınının 46’sında (%58.2) MBL üretildiği, 33’ünde (%41.8) ise üretilmediği saptanmıştır. Şekil 2b’de KDST ile pozitif bulunan bir izolatın görüntüsü verilmektedir.

ÇDST ile 79 *Acinetobacter* izolatınının 44’ünde

(%55.7) MBL fenotipik olarak pozitif bulunmuştur. ÇDST ile pozitif bulunan bir izolatın görüntüsü Şekil 2c’te verilmektedir.

MHT ile izolatların fenotipik olarak 55’i (%69.6) MBL pozitif, 24’ü (%30.4) ise negatif bulunmuştur. MHT ile fenotipik olarak MBL pozitif bulunan dört izolat Şekil 2d’de gösterilmektedir.

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan bla_{IMP-1} geni bulunan iki adet *P. aeruginosa* suşunun her ikisi de tüm fenotipik testlerle MBL pozitif olarak bulunmuşlardır.

Mevcut en güvenilir fenotipik test Etest olduğu için diğer fenotipik test sonuçları bu yöntemle karşılaştı-

Tablo 1. Etest ile KDST, ÇDST ve MHT'nin karşılaştırılması.

	KDST (+) n (%)	KDST (-) n (%)	ÇDST (+) n (%)	ÇDST (-) n (%)	MHT (+) n (%)	MHT (-) n (%)
Etest (+) n (%)	34 (43)	7 (8.9)	31 (39.2)	10 (12.7)	34 (43)	7 (8.9)
Etest (-) n (%)	12 (15.2)	26 (32.9)	13 (16.5)	25 (31.6)	21 (26.6)	17 (21.5)

KDST: Kombine disk sinerji testi, ÇDST: Çift disk sinerji testi, MHT: Modifiye Hodge testi

Tablo 2. Tüm fenotipik testlerin karşılaştırılması.

E Test	KDST	ÇDST	MHT	Adet	%
+	+	+	+	25	31.6
-	-	-	-	13	16.5
-	-	-	+	8	10.1
-	+	+	+	6	7.6
+	+	-	+	5	6.3
+	-	+	+	4	5.1
-	-	+	+	4	5.1
+	+	-	-	3	3.8
-	+	-	+	3	3.8
+	-	-	-	2	2.5
-	+	+	-	2	2.5
+	+	+	-	1	1.3
+	-	+	-	1	1.3
-	+	-	-	1	1.3
-	-	+	-	1	1.3

KDST: Kombine disk sinerji testi, ÇDST: Çift disk sinerji testi, MHT: Modifiye Hodge testi

rilmiştir (Tablo 1). Tüm fenotipik test sonuçlarının karşılaştırılması ise Tablo 2'de yapılmıştır.

Uygulanan iki test arasında sonuçların uyum oranı her iki testle pozitif ve her iki testle negatif bulunan izolat sayısının toplamının, toplam çalışılan izolat sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Buna göre; Etestin KDST testi ile uyumu %75.9, ÇDST ile uyumu %70.9, MHT ile uyumu %64.6 olarak bulunmuştur.

İzolatların PFGE yöntemi ile tiplendirilmeleri sonucunda 10 farklı gruba ayrıldıkları ve A ve C grubunda yoğunlaşma olduğu izlenmiştir. İzolatların gruplara göre dağılımı şöyledir; grup A: 29 izolat, grup B: 8 izolat, grup C: 21 izolat, grup D: 8 izolat, grup E: 4 izolat, grup F: 1 izolat, grup G: 2 izolat, grup I: 2 izolat, grup J: 1 izolat, grup K: 1 izolat bulunmaktadır. İki izolat tiplendirilememiştir.

Fenotipik testlerle MBL ürettiği saptanan izolatların PFGE paternleri tüm suşların genelinde olduğu gibi

iki grupta toplanmıştır. Örneğin, tüm fenotipik testleri pozitif olan 25 izolatın 10 tanesi grup A, 10 tanesi grup C'de, Etest pozitif olan 41 izolatın 14 tanesi grup A, 16 tanesi grup C'de toplanmıştır. Tüm fenotipik testleri negatif olan izolatların PFGE paternleri dağınık bulunmuştur.

TARTIŞMA

Acinetobacter türleri hastane enfeksiyonlarına yol açan önemli patojenlerdir. *Acinetobacter* enfeksiyonlarında en önemli sorun, antibiyotiklere direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda olmasıdır. Çoklu ilaç dirençli fenotipler tedavide güçlükler neden olmaktadır ⁽²⁾.

Ülkemizin farklı hastanelerinde yapılan çalışmalarda karbapenemlere karşı direnç oranları %8.2-53.6 olarak bildirilmiştir ^(8,10,12).

Bugüne kadar dünyanın çeşitli ülkelerinde yapılan araştırmalarda MBL enziminin tespitine yönelik çeşitli fenotipik testler uygulanmıştır. Halen MBL tanısında standart bir test olmaması, araştırmacıları duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek testi bulma çabasına yöneltmiştir.

Etest, MBL'lerin fenotipik tayininde sıklıkla kullanılan bir testtir. Ticari olarak bulunabilen Etest aynı zamanda kolay uygulanma özelliğine de sahiptir. İmipenem MİK değerinin EDTA varlığında üç kat düşmesi fenotipik olarak MBL varlığına işaret etmektedir. Etestin en büyük dezavantajı, imipenem orta dirençli ve duyarlı izolatlarda MBL tayinine uygun olmamasıdır. Etest şeridinde imipenem kısmında ilaç konsantrasyonu 4-256 µg/ml arasında, imipenem ve EDTA kısmında ise 1-64 µg/ml arasında değişmektedir. İmipeneme orta dirençli suşlarda (MİK değeri 8

µg/ml), sonuçların yanlış değerlendirilmesi görülebilmektedir.

Walsh ve ark.'nın ⁽¹³⁾, 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, Etestin MBL'in fenotipik tayinindeki duyarlılığı %94 ve özgüllüğü %95 olarak belirlenmiştir. 2004 yılında Kore'de yapılan bir çalışmada, 56 adet *bla*_{IMP-1} geni pozitif *A. baumannii* izolatının hepsi Etest ile pozitif, 21 adet *bla*_{IMP-2} geni pozitif *A. baumannii* izolatının 20'si pozitif 44 adet MBL negatif (OXA-23 gen pozitif) izolatın bir tanesi yanlış pozitif sonuç vermiştir ⁽¹⁴⁾. İtalya'da yapılan bir çalışmada, 21 imipenem dirençli *A. baumannii* izolatında referans yöntemlerle MBL pozitifliği saptanamazken Etest ile dört tane yanlış pozitiflik saptanmıştır ⁽¹⁵⁾.

Ülkemizde Bayraktar ve ark. ⁽¹⁶⁾, karbapenem dirençli 27 *P. aeruginosa* izolatının 17'sinin (%66.6) Etest ile MBL ürettiğini belirlemiştir. Toraman ve ark.'nın ⁽¹⁷⁾ çalışmasında ise Etest ile 42 *Pseudomonas* suşunun 10'unda (%24) ve 14 *Acinetobacter* suşunun 3'ünde (%21) MBL üretimi saptanmıştır. Her iki çalışmada da MBL varlığı yalnızca Etest ile gösterilmiş olup, diğer fenotipik testler kullanılmamış, PZR analizi ile sonuç doğrulanmamıştır.

Çalışmamızda, MBL'in fenotipik tayininde imipenem dirençli izolatlara Etest uygulanmıştır, ancak Etestin özgüllük ve duyarlılık yorumları direnç genlerinin gösterilememiş olması nedeniyle yapılamamıştır. Literatürde MBL tayininde en yüksek özgüllük ve duyarlılık Etest yöntemi ile bildirilmiştir ^(13,14).

MBL'lerin fenotipik tayininde uyguladığımız diğer bir test KDST'dir. Oh ve ark. ⁽¹⁸⁾ 2003 yılında yayınlanan raporlarında, disk difüzyon yöntemiyle imipenem ve/veya seftazidim dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarına KDST'i uygulamış ve sonuçları PZR analizi ile doğrulamıştır. Bu araştırmacılar, KDST'nin VIM benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısındaki duyarlılığının %93.9 olduğunu belirtirken, IMP benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısında başarısız olduğunu bildirmiştir. Yan ve ark.'nın ⁽¹⁹⁾ 2004 yılında yayınladıkları raporda ise, KDST'nin *P. aeruginosa* izolatlarında MBL'in fenotipik tanısındaki duyarlılığının %87, özgüllüğünün ise %96.7 olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda Etest ile en uyumlu test KDST'dir

(%75.9). KDST, Etestin uygulanmadığı laboratuvarlarda MBL'in fenotipik tayininde kullanılabilir alternatif ucuz bir test olarak gözükmemektedir.

Japonya'da 2003 yılında yapılan bir çalışmada, seftazidim ve seftaperazon/sulbaktam dirençli gram-negatif izolatlara ÇDST uygulanmış, fenotipik olarak pozitif olduğu saptanan izolatların hepsinin PZR analizi ile IMP-1 ürettikleri saptanmıştır ⁽²⁰⁾.

ÇDST'de yanlış pozitif sonuç elde edilmesinin en önemli nedeni, metal şelatör olarak kullanılan EDTA ve 2-MPA'in tek başına da özgül olmayan geniş inhibisyon zonu oluşturabilmesidir. Yapılan bir çalışmada, EDTA diski üzerine eklenen sodyum merkaptopasetik asitin, istenmeyen geniş ve özgül olmayan inhibisyon zonunun oluşmasını engellediği gösterilmiştir ⁽²¹⁾.

Çalışmamızda toplam 79 imipenem ve seftazidim dirençli *A. baumannii* izolatı 2-MPA ve seftazidim ile yapılan ÇDST ile 44'ünde (%55.7) pozitif, 35'inde (%44.3) negatif sonuç vermiştir.

Lee ve ark. ⁽²²⁾, 1995-1999 yılları arasında imipenem dirençli *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* izolatlarına MHT'ni uygulamışlar ve PZR analizi sonucu testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %88 olarak bulmuştur. Oh ve ark. ise ⁽¹⁸⁾, 2003 yılında yayınlanan raporlarında MHT'nin MBL üreten izolatların hepsini tanımlayamadığını, yanlış negatif sonuçlar alılabildiğini belirtmektedir. Aynı yıl yayınlanan bir başka raporda bu çalışmanın bulguları desteklenmiş, MHT duyarlılığını yükseltmek amacıyla, çinko sülfat ile zenginleştirilmiş MHT uygulanmış ve yanlış negatif sonuçların bu şekilde önüne geçilebildiği belirtilmiştir ⁽²¹⁾.

Çalışmaya alınan 79 *Acinetobacter* izolatının MHT ile 55'i (%69.6) MBL pozitif, 24'ü (%30.4) ise olarak negatif bulunmuştur. Etest ile MHT testi uyumu ise %64.6 olarak bulunmuştur. Diğer iki teste oranla Etest ile uyumu en düşük olan test olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, CLSI de bu testi *Enterobacteriaceae* için önerirken, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşları için güvenilir bulunmuştur ⁽²³⁾.

Yaptığımız tüm fenotipik testlere bakacak olursak, bulduğumuz MBL pozitiflik oranı moleküler yön-

temlerle doğrulanmış verilere göre oldukça yüksektir. Test edilen izolatlarda geniş spektrumlu beta-laktamaz veya kromozomal AmpC beta-laktamaz enzimi varsa seftazidimin yanlış pozitif sonuç verebildiği, imipenemin ise bu enzimlerden etkilenmediği belirtilmektedir⁽²⁴⁾. EDTA'nın da özgün bakterisidal etkisini göz önüne alırsak yanlış pozitiflik varlığından söz edilmektedir.

PZR analizi ile MBL varlığını saptamak en güvenilir yöntemdir. Gram negatif organizmalarda MBL enzimi günümüzde beş ana grupta toplanmaktadır: IMP, VIM, SPM, GIM ve SIM. Yeni bir MBL- *bla*_{IMP-1} ilk defa Avustralya'dan bir *P. aeruginosa* izolatında rapor edilmiştir, ancak farklı bakterilerde tespiti için CLSI tarafından henüz bir standart yönerge oluşturulmamıştır⁽²⁵⁾. Çalışmamızda 79 *Acinetobacter* izolatının tümü *bla*_{IMP-1} gen taşıyıcılığı açısından PZR analizi ile araştırılmıştır, ancak pozitiflik saptanamamıştır.

Fenotipik test pozitif bulunan ancak PZR ile *bla*_{IMP-1} geni saptanamayan izolatlarda MBL geninin olmadığını söylemek doğru değildir. Bundan sonraki hedeflerimiz şimdiye kadar tanımlanmış MBL enzimlerinin mümkün olduğunca çoğuna özgü primer setleri kullanılarak PZR analizinin yinelenmesidir.

MBL genleri açısından ülkemizde sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Özgümüş ve ark.⁽²⁶⁾, 2007 yılında 100 *P. aeruginosa* izolatından bir tanesinde VİM tipi, 9 tanesinde IMP-1 tipi MBL geni saptamıştır. Hacettepe Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada 110 *P. aeruginosa* izolatından 11 tanesi *blavim* geni açısından pozitif bulunmuştur. İzolatlar *bla*_{IMP-1} geni açısından da araştırılmış, ancak pozitiflik bulunamamıştır⁽²⁷⁾. Aktaş ve ark.⁽²⁸⁾, çalışmamıza benzer olarak Etest ile MBL pozitif bulunan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında *bla*_{IMP-1} ve *blavim* geni açısından pozitiflik bulamamıştır.

Klonal yayılımın incelenmesi için *Acinetobacter* izolatlarında PFGE tiplendirmesi altın standart olma özelliğini korumaktadır. Çalışmamızda izolatların PFGE yöntemi ile tiplendirilmeleri sonucunda 10 farklı gruba ayrıldıkları ve grup A ve C'de yığılma olduğu izlenmiştir. Bu iki gruptaki izolatların çoğunluğu yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir ve MBL üreten suşlarımızın da çoğunlukla bu iki grupta

toplandığı izlenmiştir.

Fenotipik testlerle MBL ürettiği saptanan izolatların PFGE paternleri tüm suşların genelinde olduğu gibi iki grupta toplanmıştır. Örneğin, tüm fenotipik testleri pozitif olan 25 izolatın 10 tanesi grup A, 10 tanesi grup C'de, Etest pozitif olan 41 izolatın 14 tanesi grup A, 16 tanesi grup C'de toplanmıştır. Tüm fenotipik testleri negatif olan izolatların PFGE paternlerinin farklı gruplara dağıldığı gözlenmiştir.

Ülkemizde Ayan ve ark.⁽²⁹⁾ 38 *A. baumannii* izolatı ile yaptıkları epidemiyolojik çalışmada izolatların PFGE ile dokuz farklı grupta toplandıkları, PFGE analiz sonuçlarının epidemiyolojik ve klinik verilerle en iyi korelasyonu gösterdiğini saptamıştır. Gür ve ark.'nın⁽³⁰⁾, 2008 yılında karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatları ile yaptıkları çalışma ile *bla*_{OXA-23-like} gen taşıyan 26 izolatın identik veya benzer PFGE paterni gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, yaptığımız fenotipik testler, literatürde özgüllük ve duyarlılığı en yüksek olarak bildirilmesi ve standart olması nedeniyle Etest sonuçları ile karşılaştırılmıştır ve en uyumlu test KDST olarak belirlenmiştir. KDST'nin Etest ile yüksek uyum göstermesi, bu testin Etest'in kullanılmadığı laboratuvarlarda MBL tayininde alternatif olabileceğini düşündürmektedir. İzolatlarımızın MBL pozitifliğinden IMP 1 harici genlerin sorumlu olduğu düşünülmüştür. Bundan sonraki hedefimiz şimdiye kadar tanımlanmış MBL enzimlerinin mümkün olduğunca çoğuna özgü primer setleri kullanılarak PZR analizinin tek-rarlanmasıdır.

Direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla karbapenem direnç tiplerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmesi ve epidemiyolojik analizlerinin yapılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda kullandığımız *bla*_{IMP-1} geni belirlenmiş iki adet *P. aeruginosa* suşunu sağlayan Dr. Aslı Çakar'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Bergogne-Berezin E, Towner KJ.** *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:148-65. PMID:8964033 PMCID:172888
2. **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:538-82. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00058-07> PMID:18625687 PMCID:2493088
3. **Dy ME, Nord JA, LaBombardi VJ, Kislak JW.** The emergence of resistant strains of *Acinetobacter baumannii*: clinical and infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20:5657. <http://dx.doi.org/10.1086/501673> PMID:10466561
4. **Coelho J, Woodford N, Turton J, Livermore DM.** Multiresistant acinetobacter in the UK: how big a threat? *J Hosp Infect* 2004; 58:167-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2003.12.019> PMID:15501329
5. **Poirel L, Nordmann P.** Carbenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:826-36. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x> PMID:16882287
6. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:306-25. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005> PMID:15831827 PMCID:1082798
7. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9. PMID:7494007 PMCID:228385
8. **Yaylı G, Aksoy S.** Hastane enfeksiyonlarından izole edilen *Acinetobacter* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33:61-3.
9. **Palabıykoğlu İ, Bengisun JS.** Yoğun bakım ünitesi ve diğer ünitelerde yatan hastalardan izole edilen nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* suşlarının in vitro antibiyotik duyarlılıkları. *Hast Infek Derg* 1999; 3:107-10.
10. **Akan OA.** Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates: data from İbni Sina Hospital for the year 2002. *Mikrobiyol Bult* 2003; 37:241-6. PMID:14748260
11. **Siemann S, Brewer D, Clarke A, Dmitrienko I, Lajoie G, Viswanatha T.** IMP-1 metallo- β -lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1571:190-200. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00258-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00258-1)
12. **Gazi H, Sürrüoğlu S, Kurutepe S, İnmez E, Dinç G, Özbakkaloğlu B.** Yoğun bakım ünitesi ve diğer ünitelerde yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında in-vitro antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2005; 19:115-8.
13. **Walsh T, Bolmström A, Qvarnström A, Gales A.** Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2755-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.2755-2759.2002> PMID:12149325 PMCID:120685
14. **Lee K, Yong D, Yum JH et al.** Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* species and *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 2005; 43:942-4. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.2.942-944.2005> PMID:15695713 PMCID:548058
15. **Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R et al.** First country-wide survey of acquired metallo-beta-lactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:4023-9. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00707-08> PMID:18809945 PMCID:2573113
16. **Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E.** Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo- β -laktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34:248-52.
17. **Toroman ZA, Yakupoğulları Y, Kizirgil A.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo β -laktamaz araştırılması. *İnfek Derg* 2005; 19:101-5.
18. **Oh EJ, Lee S, Park YJ et al.** Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. *J Microbiol Methods* 2003; 54:411-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00090-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00090-3)
19. **Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL.** Comparison of the double disk, combined disk and Etest methods for detecting metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli. *Diag Microbiol Infect Dis* 2004; 49:5-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.01.002> PMID:15135493
20. **Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T et al.** Production of CTX-M-3 extended spectrum β -lactamase and IMP-1 metallo- β -lactamase by five gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:631-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg103> PMID:12615865
21. **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- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* species and *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4623-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003> PMID:14532193 PMCID:254300
22. **Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH.** Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 7:88-102. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00204.x> PMID:11298149
23. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S19. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
24. **Nishio H, Komatsu M, Shibata N et al.** Metallo- β -lactamase producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5256-63. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.11.5256-5263.2004> PMID:15528723 PMCID:525181
25. **Gupta V.** Metallo β lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17:131-43. <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.17.2.131> PMID:18230049
26. **Özgümüş OB, Ceylan R, Tosun I, Sandallı C, Aydın K, Köksal İ.** Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 Metallo- β -Lactamase gene in a university hospital in Turkey. *Microbial Drug Resistance* 2007; 13:191-8. PMID:17949306
27. **Çakar A.** Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri'nde ayrıştırılan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo- β -laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması (Doktora tezi). Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2005.
28. **Aktaş Z, Kayacan CB.** Investigation of metallo- β -lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by Etest, disk synergy and PCR. *Scand J Infect Dis* 2008; 40:320-5. <http://dx.doi.org/10.1080/00365540701704698> PMID:17934980
29. **Ayan M, Durmaz R, Aktaş E, Durmaz B.** Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2003; 54:39-45. [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-6701\(03\)00076-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-6701(03)00076-8)
30. **Gür D, Korten V, Ünal S, Deshpande LM, Castanheira M.** Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. *J Med Microbiol* 2008; 57:1529-32. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002469-0> PMID:19018025