

GRAM NEGATİF NONFERMENTATİF BAKTERİLERDE METALLO-BETA-LAKTAMAZ AKTİVİTESİNİN ÇEŞİTLİ FENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI*

Asiye ALTINÖZ AYTA¹, İdris ŞAHİN², C. Elif ÖZTÜRK², Şükrü ÖKSÜZ², Fatma AVCIOĞLU³,
Emel ÇALIŞKAN², Handan ANKARALI⁴

¹Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

²Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, DÜZCE

³Gaziantep Dr. Ersin Arslan Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, GAZİANTEP

⁴Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, DÜZCE

ÖZET

Nonfermentatif Gram negatif bakterilerin yol açtığı infeksiyonlarda tedavi sorun oluşturmaktadır. Karbapenemlere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma metallo-beta-laktamaz (MBL) üretimidir. Son yıllarda MBL üretimi nedeniyle ortaya çıkan karbapenem direnç sorunu klinik ve epidemiyolojik olarak önemli hale gelmiştir. Bu çalışma, hastanemizde infeksiyon etkeni olan nonfermentatif Gram negatif bakterilerde MBL oranının araştırılması ve MBL varlığını saptamada farklı fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmamıza, Düzce Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen, imipeneme dirençli veya orta duyarlı, 50'si *Pseudomonas aeruginosa*, 36'sı *Acinetobacter baumannii* olmak üzere toplam 86 izolat dahil edilmiştir. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve VITEK2 otomatize sistemi ile belirlenmiştir. MBL varlığı dört farklı fenotipik yöntem; Çift disk sinerji testi-ÇDST, kombine disk testi-KDT, Modifiye Hodge testi-MHT, E-test (bioMerieux, Fransa) ile saptanmıştır.

Çalışmaya alınan örneklerin çoğunluğunu (% 44) derin trakeal aspirat örnekleri oluşturmuştur. Ayrıca örneklerin % 46.5'inin yoğun bakım ünitelerine ait olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda MBL oranı ÇDST ile % 34, KDT ile % 55, MHT ile % 45 ve E-test ile % 48 olarak saptanmıştır. Çalışmada MBL pozitifliği en çok sırasıyla KDT ve E-test yöntemi ile gözlenmiş olup, diğer test uyumları ile karşılaştırıldığında bu iki test arasındaki istatistiksel uyum en yüksek bulunmuştur.

Tedavide karbapenem kullanımının gerekli olduğu durumlarda hızlı, uygulaması kolay, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan iyi bir fenotipik tarama metoduna gereksinim vardır. Ancak var olan tarama metodları tek başına yeterli olmamaktadır. Fenotipik testlerin tarama amaçlı kullanılabilmesi ancak enzim varlığını göstermek için moleküler çalışmaların yapılması gerektiği unutulmamalıdır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, metallo-beta-laktamaz, *Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY

Investigation of Metallo-Beta-Lactamase Activity by Various Phenotypic Methods in Non-Fermentative Gram Negative Bacteria

Treatment of infections caused by non-fermentative Gram-negative bacteria (NFGNB) is a problem. The most important mechanism for developing resistance against carbapenems is metallo-beta-lactamase (MBL) production. This study was performed to investigate the prevalence of MBL in NFGNB which cause infections in our hospital and to compare different phenotypic methods for detecting the presence of MBL.

A total of 86 isolates which are intermediately resistant or/ resistant to imipenem, consisting of 50 *Pseudomonas aeruginosa* and 36 *Acinetobacter baumannii*, which were isolated at Düzce University Hospital Microbiology Laboratory from various clinics were included the study. Antimicrobial susceptibility testing of the isolates were performed by Kirby-Bauer disk diffusion method and VITEK2 automated system. Presence of MBL was investigated by four different phenotypic methods (Double Disk Synergy Test-DDST, the Combined Disk Test-CDT, modified Hodge test-MHT, E-test (bioMerieux, France).

The majority of the samples (44%) were deep tracheal aspirate specimens. In addition, 46.5 % of the samples were sent from intensive care units. In our study, MBL positivity was detected as 34 %, 55 %, 45 %, 48 % by using DDST, CDT, MHT and E-test, respectively. MBL positivity rate was highest by CDT and E-test. When compared with other tests, these two test results were statistically more consistent.

Fast, easily applied, highly sensitive and specific phenotypic screening methods are needed in case carbapenems are required for treatment. However, the existing screening methods are not sufficient by themselves. It should be noted that, although phenotypic tests might be used for MBL screening, molecular methods are needed to confirm existence of MBL.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, metallo-beta-laktamaz, *Pseudomonas aeruginosa*

İletişim adresi: Asiye Altınöz Aytar, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA
GSM: (0505) 878 67 35

e-posta: asiye84@yahoo.com.tr

Alındığı tarih: 22.10.2014, Yayına kabul: 02.03.2015

*2.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur. Poster No.163 (9-13 Kasım 2013, Antalya)

GİRİŞ

Nonfermentatif Gram Negatif Bakteriler (NFGNB), insan vücudunda ve doğada yaygın olarak bulunmakla birlikte yara ve yanıklı hastalarda ve immünsupresif hospitalize hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır⁽⁸⁾. Özellikle NFGNB'in neden olduğu yaşamı tehdit eden ve etkenin çoklu ilaç direnci gösterebildiği ciddi infeksiyonlarda, karbapenemler geniş antibakteriyel spektrumları, bakteri membranlarından hızla geçebilmeleri, AmpC ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) enzimlerine dayanıklı olmaları gibi özellikleri nedeniyle ilk tercih olarak kullanılan antibiyotik grubunu oluşturmaktadırlar^(5,6,10,17).

Karbapenem grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençten birçok mekanizma sorumlu olabilmektedir. Bunlar arasında ilacın hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşamaması (porin değişimleri, aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi gibi nedenler ile), karbapenemleri hidrolize eden enzimlerin varlığı (kromozomal karbapenemazlar, kazanılmış karbapenemazlar), hedef penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) değiştirilmesi gibi mekanizmalar bulunmaktadır. Son yıllarda üzerinde en çok durulan karbapenem direnç mekanizması metallo-beta-laktamazların (MBL) varlığıdır^(13,24). MBL, Bush sınıflamasında fonksiyonel grup 3 veya Ambler sınıflamasında sınıf B'de yer alan ve diğer beta-laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde Zn²⁺ iyonu bulunan enzimlerdir. Dolayısıyla bu enzimler klavulanat, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) gibi bir metal şelatörü ile inaktive olmaktadır. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar dışındaki bütün beta-laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilmeleridir⁽¹⁹⁾.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Enterobacteriaceae* için fenotipik doğrulama yöntemi olarak ertapenem veya meropenem diskinin kullanıldığı Modifiye Hodge yöntemini önermekte ancak bu yöntemin NFGNB'deki karbapenemaz üretiminin saptanmasında kullanılabilirliğine ilişkin veri bulunmamaktadır. Bu nedenle, laboratuvarlarda çift disk sinerji testi,

IPM-EDTA kombine disk testi, MBL E-test ve modifiye Hodge testi gibi fenotipik testler, NFGNB'de MBL saptanmasında kullanılmaktadır⁽²¹⁾.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL üreten izolatların erken tanısı hem dirençli izolatın yayılmasının önlenmesi, hem de klinisyenin tedavi konusunda bilgilendirilmesi açısından son derece önemlidir. Fenotipik testler hızlı, uygulaması kolay fakat moleküler yöntemlerle daha ileri araştırmalar yapıldığında daha doğru sonuçlara ulaşabileceğimiz testlerdir. Çalışmamızda Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen örneklerden izole edilen NFGNB'lerde MBL üretim oranını belirlemek ve MBL varlığını saptamak için kullanılan dört farklı fenotipik yöntem karşılaştırılarak, rutin uygulamada hangi yöntemin daha yararlı olabileceğini araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri izolatları -Antibiyotik duyarlılık testleri

Nisan 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen NFGNB suşlarından Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve VITEK 2 otomatize sistemi (BioMerieux, Fransa) ile CLSI kriterlerine göre imipenem dirençli veya orta duyarlı bulunan izolatlar alınmıştır⁽⁷⁾. Birden fazla üreme gözlenen hastalarda yalnızca ilk izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir. Bakterileri tanımlamak amacı ile standart klinik mikrobiyolojik yöntemler ve VITEK 2 otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa) kullanılmıştır.

Pozitif kontrol olarak, daha önce MBL ürettiği fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmiş, enzim tipi VIM-1 olarak tayin edilmiş olan bir *P.aeruginosa* izolatıyla, negatif kontrol olarak MBL üretmediği bilinen *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. Modifiye Hodge testi için imipeneme duyarlı *Escherichia coli* ATCC 25922 standart suşu kullanılmıştır.

Metallo-beta-laktamaz (MBL) aktivitesinin belirlenmesi

MBL varlığı fenotipik olarak; çift disk sinerji testi, kombine disk testi, modifiye hodge testi ve MBL E-test yöntemleri ile araştırılmıştır. Çift disk sinerji testi, kombine disk testi ve modifiye hodge testlerinde metallo-beta-laktamaz inhibitörü olarak EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) kullanılmıştır.

EDTA solüsyonu

0.5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için; 186.1 g disodium EDTA.2H₂O (HIMEDIA) 1000 ml distile suda çözülmüş ve NaOH kullanılarak pH 8.0'e ayarlanmıştır^(15,16).

Ayrıca bu testlerde imipenem (10 µg/ml, HIMEDIA-İndia), boş disk (HIMEDIA-Hindistan) ve ertapenem (10 µg/ml, HIMEDIA-Hindistan) diskleri kullanılmıştır.

Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST)

Test edilecek organizmaların 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine yayıldıktan sonra, besiyeri yüzeyine imipenem diski (10 µg) ve 10 mm uzağına boş disk yerleştirilmiştir. Boş diskin üzerine 10 µl EDTA (0.5 M, pH 8) eklenmiştir. Plakların 35°C'de 18 saat inkübasyonu sonrası, imipeneme karşı oluşan inhibisyon zon çapının EDTA'ya doğru genişlemesi MBL varlığı açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Kombine Disk Testi (KDT)

IMP-EDTA kombine disk testini uygularken; MHA besiyerine test edilecek organizmalar standart disk difüzyon yöntemine göre yayılmıştır. İki adet imipenem (10 µg) diski 22 mm aralıkla petriye yerleştirilmiştir. İmipenem disklerinden birinin üzerine 0.5M EDTA solüsyonundan 10 µl otomatik pipet yardımı ile konulmuştur.

Petri plağı 35°C'de bir gece inkübe edildikten sonra EDTA'lı ve EDTA'sız imipenem disklerinin zon çapları karşılaştırılmış, EDTA'lı diskin çevresindeki inhibisyon zon çapı EDTA'sız diskin çevresindeki zon çapından 7 mm veya daha büyük ise, suş MBL pozitif olarak değerlendirilmiştir^(3,15,29).

Modifiye Hodge Testi (MHT)

MHA besiyerine 0.5 McFarland yoğunlukta imipeneme duyarlı *Escherichia coli* ATCC 25922 izolatı indikatör mikroorganizma olarak steril eküvyon ile yayılmış ve 10 µg'lık ertapenem diski petrinin ortasına yerleştirilmiştir. Her petride dört izolata bakılabilecek şekilde denecek olan *P.aeruginosa* veya *A.baumannii* izolatları disk kenarından periferine doğru düz çizgi şeklinde ekilmiştir. Petriler bir gece etüvde inkübe edilmiş ve değerlendirme yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında *E.coli*'ye ait inhibisyon zonunda yonca yaprağı (cloverleaf) şeklinde görülen bozulma MBL pozitifliği olarak değerlendirilmiştir⁽¹⁴⁾.

E-test

0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları MHA besiyerine yayılmıştır. Kuruduktan sonra üzerine E-test MBL şeritleri (bioMerieux, Fransa) konulmuş, 35°C'de 16-20 saat süre ile inkübe edildikten sonra değerlendirme yapılmıştır. İPM/IPM-EDTA minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri oranı sekiz ve üzerinde ise bakteri MBL pozitif olarak değerlendirilmiştir^(22,28).

İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde PASW (ver. 18) programı kullanılmış ve istatistik anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak alınmıştır. Yöntemler arasındaki uyum Kappa uyum testi ile değerlendirilmiştir. Örneklerin özellikleri ve testler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanılmıştır.

Bu çalışma, Düzce Üniversitesi tarafından 2012.04.HD.038 numaralı BAP projesi olarak desteklenmiştir.

BULGULAR

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Nisan 2010-Aralık 2011 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden gönderilen toplam 368 nonfermentatif Gram negatif bakteri suşu izole edilmiştir. Bu suşlar içerisinde hastane infeksiyon etkeni olduğu düşünülen imipeneme dirençli veya orta

Tablo 1. Örneklerin gönderildiği servis ve örnek türlerine göre dağılımları [n (%)].

	Yara	Balgam	DTA ¹	BAL ²	İdrar	Kan	Toplam
Reanimasyon Ünitesi	1	1	9	1	-	4	16 (18.5)
DYB*	-	3	26	-	2	4	35 (40.5)
Göğüs Hastalıkları Servisi	-	6	2	2	-	3	13 (15)
CYB**	-	1	1	1	2	-	5 (6)
Diğer servisler***	8	3	-	-	5	1	17 (20)
Toplam	9 (10.5)	14 (16)	38 (44)	4 (5)	9 (10.5)	12 (14)	86 (100)

*Dahili yoğun bakım ünitesi, **Cerrahi yoğun bakım ünitesi

***Diğer servisler (Dahiliye, Cerrahi, Nöroloji, İntaniye, Üroloji, Ortopedi, Dermatoloji, Pediatri)

¹DTA: Derin trakeal aspirat²BAL: Bronkoalveolar lavaj sıvısı**Tablo 2.** Çalışmaya alınan suşlarda farklı fenotipik yöntemlerle belirlenen MBL oranları [n (%)].

	ÇDST		KDT		MHT		E-test	
	+	-	+	-	+	-	+	-
A.baumannii	15	21	28	8	28	8	27	9
P.aeruginosa	14	36	19	31	11	39	14	36
Toplam	29 (33.7)	57 (66.3)	47 (54.7)	39 (45.3)	39 (45.3)	47 (54.7)	41 (47.7)	45 (52.3)

duyarlı olduğu saptanmış 86 suş çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen 86 suşun 50 tanesi *P.aeruginosa*, 36 tanesi *A.baumannii* olarak tanımlanmıştır. Bunlardan 62'si (% 72.1) imipeneme dirençli iken 24'ü (% 27.9) imipeneme orta duyarlı bulunmuştur. Çalışmaya alınan örneklerin gönderen servislere ve örnek türlerine göre dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki farklı fenotipik yöntemlerle elde edilen MBL pozitiflikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

E-test yöntemi ile ÇDST ve E-test yöntemi ile MHT yönteminin elde edilen sonuçlar bakımından uyumu incelendiğinde, uyumun derecesinin her ikisinde de orta büyüklükte olduğu görülmüştür (Kappa değerleri sırasıyla 0.575 ve 0.533).

Ayrıca KDT yöntemi ile ÇDST ve yine KDT yöntemi ile MHT yönteminin elde edilen sonuçlar bakımından uyumu incelendiğinde, uyumun derecesinin her ikisinde de orta büyüklükte olduğu görülmüştür (Kappa değerleri sırasıyla 0.503 ve 0.493) (Tablo 3).

MBL pozitifliğinin belirlenmesi için kullanılan dört fenotipik testin birbirleri ile istatistiksel uyumu kappa uyum testi ile değerlendirilmiştir. E-test yöntemi ile KDT yöntemlerinin

Tablo 3. Fenotipik testlerin sonuçlarının karşılaştırılması.

		ÇDST (+)		ÇDST (-)	
		MHT(+)	MHT(-)	MHT+	MHT(-)
E-test(+)	KDT (+)	18	7	11	4
	KDT (-)	1	-	-	-
E-test(-)	KDT (+)	-	2	3	2
	KDT (-)	-	1	6	31

kappa uyum değeri 0.815 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu uyum değeri, önemli derecede anlamlı olarak değerlendirilmiştir (p<0.001). İstatistiksel olarak en yüksek uyum bu iki test arasında bulunmuştur. E-test ve KDT yöntemlerinin pozitiflik ve negatiflik oranlarının karşılaştırılması Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. E-test ve KDT yöntemlerinin karşılaştırılması*.

		E-test		Total
		Pozitif	Negatif	
KDT	Pozitif	40	7	47
	Negatif	1	38	39
Toplam		41	45	86

*p<0.001

TARTIŞMA

NFGNB'de karbapenem grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençten birçok mekanizma sorumlu olabilmektedir. Bakterinin ilaç atım pompası ile meropeneme, dış membran geçirgenliğinin azalması ile imipeneme, bazı OXA tipi geniş spektrumlu beta-laktamazlar ve yüksek düzeyde kromozomal AmpC enzimi sentezleyen dereprese mutantların varlığı nedeniyle de hem imipeneme hem de meropeneme direnç kazanabildiği bilinmektedir. Ancak son yıllarda üzerinde en çok durulan karbapenem direnç mekanizması MBL varlığıdır^(13,24). Tedavilerinde karbapenem antibiyotiklerin tercih edildiği infeksiyonlarda etkeni izole etmek kadar etkenin karbapenemaz ve MBL üretimini basit ve güvenilir bir laboratuvar metoduyla tespit etmek de önem kazanmaktadır. Ancak *Enterobacteriaceae* aile üyelerinde olduğu gibi, CLSI kriterlerine göre nonfermentatif suşlarda MBL üretimini tespit etmede geçerli bir fenotipik metot henüz oluşturulmamıştır⁽⁷⁾. Halen MBL tanısında standart bir test olmaması, MBL üreten izolatların zaman içerisinde giderek artış göstermeleri ve hızla yayılarak ağır klinik sonuçlara neden olabilmeleri; araştırmacıları laboratuvarlarda rutinde kolay uygulanabilen, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek yöntemler bulma çabasına yöneltmiştir^(16,17,23,29).

MBL enziminin tayininde uygulanan fenotipik testlerin büyük bir çoğunluğu, enzimin metal şelatörü tarafından inhibisyonu temelinde dayanmaktadır. Bu prensibe dayanan fenotipik testlerden bir tanesi ÇDST'dir. Tayvan'da 2001 yılında *P.aeruginosa* izolatlarında ÇDST ile yapılan MBL taramasında pozitif çıkan 21 izolatın PCR analizi ile de pozitif bulunduğu belirtilmektedir⁽³⁰⁾. Lee ve ark.⁽¹⁶⁾ da EDTA ile ÇDST'nin duyarlılığını % 100 olarak saptamışlardır. Jesudason ve ark.⁽¹⁴⁾, karbapenemaz ve MBL üretimini tespit etmede EDTA ile ÇDST'nin, Modifiye Hodge testine göre daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ÇDST ile MBL pozitifliği oranlarını Fidan ve ark.⁽¹¹⁾ *P.aeruginosa*'da % 5 (yüzde beş), Arabacı ve ark.⁽²⁾ *P.aeruginosa*'da % 70, Sesli Çetin ve ark.⁽²⁵⁾ *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* için sırasıyla % 84 ve % 73 olarak saptamışlardır. Yapılan çalışmalarda

ÇDST ile MBL pozitifliği çok değişken aralıklarda bulunmaktadır^(2,11,14,16,25,30). Fidan ve ark.⁽¹¹⁾ yaptığı çalışmadaki MBL oranı diğer çalışmalara göre düşük görülmekte ancak bu durum çalışmalarında imipeneme duyarlı suşlarında dahil edilmesi neden olabilir. Çalışmamızda ÇDST yöntemi ile MBL pozitiflik oranı % 33.7 olarak bulunmuştur (Tablo 2). ÇDST'nin değerlendirilmesinde dikkat edilmesi gereken nokta, imipenem inhibisyon zonunun EDTA'ya doğru genişlemesidir. Bu durum subjektif değerlendirmelere neden olabilmektedir. Ayrıca ÇDST yönteminde diğer önemli nokta test edilecek izolatın imipenem direncidir. İmipenem dirençli izolatlarda, imipenem diskinden EDTA diskine doğru genişleyen inhibisyon zonu rahatlıkla gözlemlenirken, imipeneme orta duyarlı veya duyarlı izolatlarda imipenem diski etrafında var olan inhibisyon zonu testin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu gibi durumlarda yanlış negatif sonuçlar elde etmek mümkündür.

MBL varlığını tespit etmekte kullanılan diğer bir yöntemde KDT'dir. Oh ve ark.⁽²⁰⁾ 2003 yılında *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarında MBL enzimini göstermek için kombine disk testini uygulamış ve sonuçları PCR analizi ile doğrulamışlar, VIM benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısındaki duyarlılığının % 93.9 olduğunu belirtirken, IMP benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısında başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Yan ve ark.⁽²⁹⁾ 2004 yılında yayınladıkları raporda ise, kombine disk diffüzyon testinin *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarında MBL'nin fenotipik tanısındaki duyarlılığının % 87, özgüllüğünün ise % 96.7 olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda kombine disk metodu ile MBL pozitifliğini Fidan ve ark.⁽¹¹⁾ *P.aeruginosa*'da % 5 (yüzde beş), Altıparlak ve ark.⁽¹⁾ *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* için % 55, Türk Dağı ve ark.⁽²⁶⁾ % 69, Gayyurhan ve ark.⁽¹²⁾ *P.aeruginosa*'da % 72 olarak bulmuşlardır^(1,11,12,26). Çalışmamızda KDT yöntemi ile % 54.7 oranında MBL pozitifliği bulunmuştur (Tablo 2). Çalışmamızda MBL pozitifliği en yüksek oranda KDT yöntemi ile bulunmuştur.

MBL enzimlerinin fenotipik olarak belirlenmesinde diğer bir test ise MHT'dir. Jesudason ve ark.⁽¹⁴⁾ MHT ile imipenem dirençli NFGNB'lerde % 56 oranında MBL varlığı pozitif bulmuşlar-

dır. Lee ve ark.⁽¹⁷⁾ MHT için nadir yalancı pozitiflikler rapor etmiş ve bunun imipenem diskinde veya MHA besiyerine çinko sülfat ilavesi ile engellenebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca MHT'nin MBL üreten izolatların hepsini tanımlayamadığını, yanlış negatif sonuçlar alınabildiğini belirtmişlerdir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda MHT ile MBL pozitifliğini Demirdağ ve ark.⁽⁹⁾ *Pseudomonas* spp. suşlarında % 37, Sesli Çetin ve ark.⁽²⁵⁾ *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında sırasıyla % 74 ve % 58, Fidan ve ark.⁽¹¹⁾ *P.aeruginosa* suşlarında % 5 (yüzde beş) olarak saptamışlardır^(9,11,25). Fidan ve ark.⁽¹¹⁾ yaptığı çalışmadaki MBL oranı diğer çalışmalara göre düşük görülmekte ancak bu durum çalışmalarında imipeneme duyarlı suşlarında dahil edilmesi neden olabilir. Çalışmamızda MHT yöntemi ile MBL varlığı % 45.3 olarak bulunmuştur (Tablo 2). Suşlarda ayrı ayrı değerlendirme yapıldığında MHT yöntemi ile MBL varlığı *A.baumannii* % 77.7 ve *P.aeruginosa* suşlarında % 22 olarak bulunmuştur.

Pek çok fenotipik testin temeli MBL enziminin EDTA gibi bir metal şelatörle inhibe olmasına dayanmakta iken MHT bu prensibe uymayan bir testtir. MBL dışında bazı enzimler de imipenem hidrolizine neden olmaktadır. Eğer izolatta OXA-23 ile OXA-28 enzimlerinden biri varsa ya da izolat dereprese bir mutant sa, sürekli yüksek düzeyde sentezlenen kromozomal AmpC enzimleri imipenemin hidrolizine yol açabilmektedir. Çalışmamızda MHT yönteminin diğer testler ile uyumunun düşük bulunması nedeniyle, MHT yönteminin, MBL'in fenotipik tayininde yanıltıcı sonuçlara yol açabileceği düşünülmüştür. Besiyerine EDTA eklenerek geliştirilecek yeni bir yöntem bu testi MBL tayinine daha özgül bir yöntem haline getirebilir.

MBL'ların tayininde sıklıkla kullanılan diğer bir fenotipik test ise E-test'tir. Walsh ve ark.⁽²⁸⁾ PCR ile enzim geninin saptandığı suşlarda MBL E-test yönteminin duyarlılığını % 94, özgüllüğünü ise % 95 olarak bulmuşlardır. E-test için duyarlılık ve özgüllük değerlendirmesi yapılan diğer çalışmalarda sırasıyla Yan ve ark.⁽²⁹⁾ % 87 ve % 100, Lee ve ark.⁽¹⁸⁾ % 99 ve % 97.3 olarak bildirmişlerdir^(18,29). Ülkemizde yapılan çalışmalarda MBL pozitifliği oranları-

nı Aşçı Toraman ve ark.⁽⁴⁾ % 24, Sesli Çetin ve ark.⁽²⁵⁾ % 80 olarak bildirmişlerdir. Hastanemizde 2010 yılında yapılan çalışmada, *P.aeruginosa* suşlarında MBL E-test yöntemiyle MBL pozitifliği oranı % 28 olarak tespit edilmiş, aynı yöntemle çalışmamızda MBL varlığı imipeneme dirençli ve orta duyarlı *P.aeruginosa* (% 28) ve *A.baumannii* (% 75) suşlarında toplamda % 47.7 oranında saptanmıştır⁽²¹⁾ (Tablo 2).

MBL varlığını saptamak amacıyla yapılan fenotipik testlerin uyumu da araştırılmıştır. Ulusoy ve ark.'nın⁽²⁷⁾ çalışmasında E-test'in KDT testi ile uyumu % 75.9, ÇDST ile uyumu % 70.9, MHT ile uyumu % 64.6 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda MBL pozitifliği araştırdığımız dört fenotip testinin birbirleri ile istatistiksel uyumu kappa uyum testi ile değerlendirilmiştir. E-test yöntemi ile KDT yöntemlerinin istatistiksel uyumu karşılaştırıldığında kappa uyum değeri 0.815 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu uyum değeri, önemli derecede anlamlı olarak değerlendirilebilir (Tablo 4). En yüksek uyum bu iki test arasında bulunmuştur.

Metallo-beta-laktamaz üreten izolatlarla gelişen infeksiyonların tedavisinin sınırlı olması nedeniyle, bu enzimi üreten izolatların özellikle hastane ortamında yayılmasını önlemek çok önemlidir. Bu amaçla metallo-beta-laktamaz enziminin erken tanısı büyük önem kazanmaktadır. Ayrıca özellikle yoğun bakım ünitelerine kabul edilen hastaların metallo-beta-laktamaz üreten bir izolatla kolonize olup olmadığının belirlenmesi metallo-beta-laktamaza bağlı direncin yayılımının engellenmesinde alınacak önlemlerin başında gelmektedir.

Sonuç olarak, karbapenem kullanımının gerekli olduğu durumlarda hızlı, uygulaması kolay, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan iyi bir fenotipik tarama metoduna gereksinim vardır. Ancak var olan tarama metodları tek başına yeterli olmamaktadır. Bu sebeple tarama sonuçlarının moleküler yöntemlerle doğrulanması gereklidir. Çalışmamızda moleküler yöntemlerle doğrulama yapılmadığı için bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde olup, daha ileri araştırmaların yapılması gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates, *Burns* 2005;31(6):707-10.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2005.02.017>
2. Arabacı F, Oldaçay M. Yoğun bakım servisinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz oranlarının araştırılması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2010;40(1):37-40.
3. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K. Convenient test for screening metallo beta-lactamase producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds, *Clin Microbiol* 2000;38(1):40-3.
4. Aşçı Toraman Z, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 2005;19(1):101-5.
5. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*, *Indian J Med Microbiol* 2008;26(3):233-7.
<http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.39587>
6. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems, *Expert Opin Invest Drugs* 2002;11(4):529-44.
<http://dx.doi.org/10.1517/13543784.11.4.529>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları; yirmibirinci bilgi eki, CLSI dokümanı M100-S21, Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute, Çeviri editörü: Deniz Gür, (2011).
8. Çöpçü N, Demirer A, Dalkılıç İ, Levent B, Güvener E. Non-Fermentatif Gram negatif bakterilerin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlerle API 20 NE sisteminin karşılaştırılması, *Mikrobiyol Bul* 1997;31(2):141-8.
9. Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M. Yoğun bakımda izole edilen *Pseudomonas* spp. suşlarında metallo-beta-laktamaz sıklığının araştırılması, *ANKEM Derg* 2011;25(3):150-6.
10. Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria, *Int J Antimicrob Agents* 2007;29(3):33-41.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(07\)72176-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(07)72176-3)
11. Fidan I, Çetin Gürelık F, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı, *ANKEM Derg* 2005;19(2):69-70.
12. Gayyurhan E, Zer Y, Mehli M, Akgün S. Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz oranlarının belirlenmesi, *İnfeksiyon Derg* 2008;22(1):49-52.
13. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç, *Hastane İnfeksiyonları Derg* 2001;5(3): 210-29.
14. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase&metallo-beta-lactamase production in clinical isolates, *Indian J Med Res* 2005;121(6):780-3.
15. Koneman EW, Ailen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas And Test Book of Diagnostic Microbiology, p.171 Philadelphia, JB Lippincott (1997).
16. Lee K, Chong Y, Shin HB et al. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species, *Clin Microbiol Infect* 2001;7(2):88-91.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00204.x>
17. 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-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4623-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003>
18. Lee K, Yong D, Yum JH et al. Evaluation of Etest MBL for detection bla_{IMP-1} and bla_{IMP-2} allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., *J Clin Microbiol* 2005;43(2): 942-4.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.2.942-944.2005>
19. Murray R, Baron EJ, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology, Klinik Mikrobiyoloji 9.baskı, Cilt1 s.1114-37, Rice LB ve Bonomo R USA (2009).
20. Oh EJ, Lee S, Park YJ et al. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase, *J Microbiol Methods* 2003;54(3):411-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00090-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00090-3)
21. Öztürk E, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı, *ANKEM Derg* 2011;25(1): 42-7.

22. Payne DJ, Cramp R, Bateson JH, Neale J, Knowles D. Rapid identification of metallo- and serine β -lactamase, *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(5):991-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.38.5.991>
23. Peleg AY, Seifert H, Paterson D. Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen, *Clin Microbiol Rev* 2008;21(3):538-82.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
24. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E et al. Hospital outbreak of multiple clones of Pseudomonas aeruginosa carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4, *J Antimicrob Chemother* 2003;51(6):1409-14.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg239>
25. Sesli Çetin E, Tetik T, Kaya S, Cicioğlu Arıdoğan B. Acinetobacter baumannii ve Pseudomonas aeruginosa izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 2009;23(2):51-5.
26. Türk Dağı H, Kuş H, Keyik Ş, Arslan U, Tuncer İ, Fındık D. Karbapenemlere dirençli Acinetobacter baumannii suşlarında metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması, *ANKEM Derg* 2012;26(4):187-92.
27. Ulusoy Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N et al. İmipenem dirençli Acinetobacter suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2011;41(1):29-36.
28. Walsh TR, Balmström A, Owarnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing, *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2755-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.2755-2759.2002>
29. Yan JJ, Wub JJ, Tsaia TS, Chuang LC. Comparison of the double-disk, combined disk, and E-test methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49(1):5-11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.01.002>
30. Yan J, Hsueh P, Ko W et al. Metallo-beta-lactamases in clinical Pseudomonas isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(8):2224-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.8.2224-2228.2001>