Türk Mikrobiyol Cem Derg 44(1):10-17, 2014
doi:10.5222/TMCD.2014.010

Araştırma

Non-Fermentatif Gram Negatif Basillerde Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması[§]

Zeynep ERDİL, M. Hamidullah UYANIK, Halil YAZGI, Ahmet AYYILDIZ
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: *Non-fermentatif Gram negatif basiller (NFGNB) son yıllarda hastane enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilmektedirler. Acinetobacter ve Pseudomonas türlerine ait suşlarda hızla yayılan ve geniş antibakteriyel direnç spektrumuna neden olan metallo enzimler enfeksiyonların tedavisi için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Metallo beta laktamaz (MBL) enzim üretimini saptamak için moleküler ve çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, imipeneme dirençli Acinetobacter baumannii ve Pseudomonas aeruginosa suşlarında MBL enzim üretiminin dört farklı fenotipik yöntem kullanılarak saptanması ve bu testlerin birbirleri arasındaki uyumun araştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Eylül 2012-Ekim 2013 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen farklı hastalara ait 111 A. baumannii, 140 P. aeruginosa suşundan karbapeneme direnç tespit edilen 94 A. baumannii ve 48 P. aeruginosa suşu çalışma kapsamında incelenmiştir. Tür düzeyinde tanımlanma ve bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları VITEK-2 compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistem ile yapılmıştır. MBL varlığı çift disk sinerji testi, kombine disk testi, gradient strip test yöntemi ve modifiye Hodge testi kullanılarak araştırılmıştır.*

Bulgular: *A. baumannii suşlarında MBL pozitifliği gradient strip test yöntemi, kombine disk testi, çift disk sinerji testi ve modifiye Hodge testi ile sırasıyla %97.9; 98.9, 98.9 ve 95.7 oranında saptanırken, bu oranlar P. aeruginosa suşlarında ise %100; 93.7; 89.6 ve 41.7 olarak saptanmıştır. A. baumannii suşlarında gradient strip test ile kombine disk testi, çift disk sinerji testi ve modifiye Hodge testi arasındaki uyum sırasıyla %94.7; 94.7 ve 91.5 oranında saptanmışken, P. aeruginosa suşlarında gradient strip test ile diğer testler arasındaki bu uyum oranları sırasıyla %93.7, %89.6 ve %41.7 olarak bulunmuştur.*

Sonuç: *Çalışmamızda A. baumannii ve P. aeruginosa suşlarında yüksek oranda karbapenem direnci ve MBL üretimi saptanmıştır. Tedavide kullanılabilecek bir MBL inhibitörünün bulunmaması bu durumu ciddi bir sorun hâline getirmektedir. MBL enzim varlığının saptanması, hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde epidemiyolojik verilerin elde edilmesine ve uygun antimikrobiyal ajan seçimine yardımcı olacaktır. Fenotipik testler genel olarak birbiriyle uyumlu gözükse de moleküler yöntemlerle MBL enzim varlığının saptanması testlerin gerçek özgüllük ve duyarlılığını göstermesi açısından gerekli görülmektedir.*

Anahtar kelimeler: *Fenotipik testler, karbapenem direnci, metallo-beta-laktamaz, non-fermentatif*

SUMMARY

Investigation of the Presence of Metallo-Beta-Lactamases in Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli

Objective: *Non-fermentative gram-negative bacilli (NFGNB) are frequently isolated from nosocomial infections in the recent years. Metallo-beta-lactamases (MBLs) are the enzymes that spread quickly and cause a wide spectrum of antibacterial resistance in Acinetobacter and Pseudomonas strains leading to serious problems in the treatment. Molecular and various phenotypic methods are used to determine the presence of MBLs. In this study, it was aimed to determine the production of MBLs enzyme by using four different phenotypic methods in imipenem-resistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa strains and also to compare the correlation between these methods.*

Materials and Methods: *This study was performed in Ataturk University, Research Hospital between September 2012 and October 2013. Carbapenem-resistant 94 A. baumannii and 48 P. aeruginosa strains which were obtained from 111 A. baumannii and 140 P. aeruginosa strains isolated from various clinical samples of different patients were analyzed in the study. The identification and the antimicrobial susceptibility determination of the isolates were done by VITEK-2 Compact automated system (bioMérieux, France). Phenotypic determination of the MBL production was done by double-disk synergy test, combined disc test, gradient strip test and modified Hodge test.*

Results: *MBL positivity of the A. baumannii strains detected by gradient strip test method, combined disk test, double-disk synergy test, and modified Hodge test were detected in 97.9, 98.9, 98.9, and 95.7% of the specimens, respectively. The corresponding rates were 100, 93.7, 89.6 and 41.7%, for the P. aeruginosa strains. The concordance of gradient strip test with combined disk test, double-disk synergy test, modified Hodge test were determined as 94.7, 94.7 and 91.5% respectively in A. baumannii strains and these concordance rates of gradient strip test between other tests were found to be 93.7, 89.6 and 41.7%, respectively in P. aeruginosa strains.*

Conclusion: *This study revealed a high carbapenem resistance and MBL production rates in A. baumannii and P. aeruginosa strains. The detection of MBLs provides epidemiological data that can be used for the selection of appropriate antimicrobial agents in the treatment of Acinetobacter and Pseudomonas infections. Although phenotypic methods used in this study to test the MBL production are generally in concordance with each other, molecular methods are necessary to determine the sensitivity and specificity of these tests.*

Key words: *Phenotypic tests, carbapenem resistance, metallo-beta-lactamase, non-fermentative*

Alındığı tarih: 21.11.2014
Kabul tarihi: 25.12.2014
Yazışma adresi: Zeynep Erdil, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum
e-posta: drzeynepb@hotmail.com
[§] Bu çalışma, Dr. Zeynep Erdil tarafından tıpta uzmanlık tez çalışması kapsamında yapılmış olup, 24-27 Eylül 2014 tarihleri arasında Belgrad'da düzenlenen 6. EACID (Eurasia Congress of Infectious Diseases) Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, hastanede yatarak tedavi gören yaklaşık her on hastadan birinde hastane enfeksiyonu ortaya çıkmaktadır[1]. Non-fermentatif Gram-negatif bakteriler (NFGNB) son yıllarda özellikle yanık ünitesi, yoğun bakım, kemoterapi ünitelerinde yatmakta olan hastalarda geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve immunsupresyona bağlı olarak enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla izole edilmektedir[2-4].

Pseudomonas aeruginosa ve *Acinetobacter baumannii*, birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilmektedir. Bu direnç mekanizmalarının başında antibiyotiği hücre dışına pompalayan eflüks sistemleri ve antibiyotikler için giriş kapısı olabilecek por proteinlerinin sentezinin azaltılması veya tamamen durdurulması bulunmaktadır. Klinikte en fazla karşılaşılan direnç beta-laktamaz enzimlerinin yol açtığı dirençtir. Bu iki Non-fermentatif bakteri türüne ait suşlarda hızla yayılan ve geniş antibakteriyel direnç spektrumuna neden olan metallo beta laktamazlar (MBL) enfeksiyonların tedavisi için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır[5,6].

MBL'ler diğer beta-laktamazlardan farklı olarak serin beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken EDTA (etilendiamintetraasetikasit) gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar. Bu enzimler monobaktamlar hariç tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilirler. Dolayısıyla, MBL üreten organizmalar söz konusu olduğunda beta-laktam antibiyotiklerin kullanılabilirliği ciddi olarak sınırlanmış olur[7-10].

MBL enzimlerinin aztreonam hariç tüm beta-laktam antibiyotiklerde yüksek düzeyde dirence neden olması yanında beraberinde taşınabilen diğer direnç genleriyle aminoglikozidlere ve florokinolonlara karşı da çoklu direnç oluşturması bu enzimi taşıyan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorundur. Bu direnç genleri sıklıkla hareketli elemanlar üzerinde taşındıklarından farklı suşlar arasında horizontal olarak yayılabilmektedirler[11].

NFGNB'de MBL enzim varlığını saptamak için, moleküler ve fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında çift disk sinerji testi, kombine disk testi, MBL gradient strip test ve modifiye Hodge testi gibi fenotipik testler bulunmaktadır. Ancak, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) bu amaçla kullanılan fenotipik yöntemlerin hiçbirini altın standart olarak kabul etmemektedir[12].

Bu çalışmada, imipeneme dirençli *A. baumanii* ve *P. aeruginosa* suşlarında dört farklı fenotipik yöntem kullanılarak MBL pozitifliğinin saptanması ve fenotipik testlerin birbirleri arasındaki uyumun araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Eylül 2012-Ekim 2013 tarihleri arasındaki bir yıllık süre içerisinde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden toplam 111 *A. baumannii*, 140 *P. aeruginosa* suşu izole edildi. Bu suşlardan farklı hastalara ait karbapeneme direnç tespit edilen 94 *A. baumannii* ve 48 *P. aeruginosa* suşu çalışma kapsamına alındı.

Bakteri türlerinin tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde VITEK-2 compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanıldı.

İmipenem direnci saptanan suşların MBL üretimi fenotipik testlerden çift disk sinerji testi, kombine disk testi, MBL gradient strip test ve modifiye Hodge testi kullanılarak incelendi.

Çift Disk Sinerji Testi

Bu test için taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen kolonilerinden 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyon steril eküvyon kullanılarak Mueller-Hinton agar plağının yüzeyine yayıldı. Daha sonra imipenem diski (10 µg) besiyeri yüzeyine yerleştirildi. İmipenem diskinin merkezinden cetvelle 10 mm mesafe ölçülerek işaretlenip boş bir kağıt disk yerleştirildi. Boş kâğıt diskin, üzerine 0.5 M EDTA solüsyonundan pipetle 10 µl eklendi. İnkübasyon sonrası imipeneme karşı oluşan inhibisyon zon çapının EDTA içeren diske doğru genişlemesi MBLvarlığı açısından pozitif olarak değerlendirildi[13,14].

Kombine Disk Testi

Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine mikroorganizmaların taze kültür pasajlarından elde edilen kolonileri McFarland 0.5 bulanıklığında steril eküvyon yardımıyla yayıldı. Plak içerisine aralarındaki mesafe 22 mm olacak şekilde iki adet 10 µg imipenem diski yerleştirildi. İmipenem disklerinden birinin üzerine 0.5 M EDTA solüsyonundan 10 µl eklendi. İnkübasyon sonrası İmipenem-EDTA'lı diskin zon çapı tek başına imipenem diski zon çapından ≥7 mm olduğunda MBL pozitif olarak değerlendirildi[13,15,16].

MBL Gradient Strip Test

Ticari olarak hazır elde edilen bir tarafında 4–256 µg/ml imipenem, diğer tarafında ise sabit konsantrasyonda EDTA ile birlikte 1–64 µg/ml imipenem içeren MBL gradient stripleri (Liofilchem® srl, İtalya) bakteri yayılmış olan Mueller-Hinton agar plağı üzerine yerleştirildi. İnkübasyon sonrası birbirine zıt yönde oluşan iki elipsin şeritle kesiştiği noktalardaki MİK değerleri kaydedildi. İmipenem MİK değeri İmipenem-EDTA MİK değerine oranlandığında 8 ve üzerinde bir değer bulunması durumunda MBL pozitif olarak değerlendirildi[17].

Modifiye Hodge Testi

Modifiye Hodge testi için imipeneme duyarlı *E. coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı. Test edilecek bakterinin McFarland 0.5'in 1/10 bulanıklığına eşdeğer süspansiyonu hazırlanarak Mueller-Hinton agar besiyerinin yüzeyine yayıldı. Plağın merkezine imipenem (10 µg) diski yerleştirildi. Test suşları, bu diskin dört bir tarafına merkezden perifere doğru çizgi ekimi şeklinde steril eküvyon ile yayıldı. İnkübasyondan sonrası diskin etrafındaki inhibisyon zonunda çizgi ekimi yapılan bakteri kısımlarında yonca yaprağı şeklinde görüntü oluşması ve bu bölgede *E. coli* üremesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi[18,16].

MBL varlığının tespiti için uygulanan testler arasındaki uyum her bir testin gradient strip test yöntemiyle karşılaştırılarak her iki testle pozitif ve her iki testle negatif bulunan suş sayısının toplam çalışılan suş sayısına bölünmesiyle saptandı.

BULGULAR

Karbapeneme dirençli *A. baumannii* suşları yoğun bakım üniteleri ağırlıkta olmak üzere en fazla kan, yara yeri ve solunum yolu örneklerinden izole edildi.

Karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* suşları en fazla yara yeri ve kan örneklerinden izole edildi. Bu suşlar sıklık sırasına göre cerrahi klinikler, dâhili klinikler ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden elde edildi.

Karbapeneme dirençli *A. baumannii* suşlarının hepsi seftazidim, sefepim, piperasilin, piperasilin-tazobaktam ve ampisilin-sulbaktama da dirençli olarak bulundu. Bu suşlar siprofloksasine %98.9, tetrasikline %94.7, levofloksasine %92.5, gentamisine %91.5, amikasine %87.2 ve trimetoprim-sulfametaksazol (ko-trimoksazol) %40.4 oranın-

da dirençli olarak saptandı. Kolistin ise tüm suşların duyarlı olduğu tek antimikrobiyal olarak tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarının antibakteriyal direnç durumları [n(%)].

Antibiyotikler	*A. baumannii*	*P. aeruginosa*
Amikasin	82 (87.2)	28 (58.3)
Gentamisin	86 (91.5)	29 (60.4)
Seftazidim	94 (100.0)	29 (60.4)
Sefepim	94 (100.0)	39 (81.2)
Piperasilin	94 (100.0)	39 (81.2)
Levofloksasin	87 (92.5)	33 (68.7)
Siprofloksasin	93 (98.9)	32 (66.7)
Tetrasiklin	89 (94.7)	
Piperasilin-tazobaktam	94 (100.0)	31 (64.6)
Ampisilin sulbaktam	94 (100.0)	
Kolistin	-	-
Ko-trimoksazol	38 (40.4)	

n: izolat sayısı

Karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* suşları sefepim ve piperasiline %81.2, levofloksasine %68.7, siprofloksasine %66.7, piperasilin-tazobaktama %64.6, gentamisin ve seftazidime %60.4, amikasine %58.3 oranında dirençli olarak bulundu. *A. baumannii* suşlarında olduğu gibi *P. aeruginosa* suşlarında da kolistin direnci tespit edilmedi (Tablo 1).

A. baumannii suşlarında MBL pozitifliği en çok %98.9 oranı ile kombine disk testi ve çift disk sinerji testi ile saptanırken, bunu %97.9 oranı ile gradient strip test yöntemi ve %95.7 oranı ile modifiye Hodge testi takip etmiştir.

P. aeruginosa suşlarında MBL pozitifliği en yüksek oranda (%100.0) gradient strip test yöntemi ile tespit edildi. Ayrıca kombine disk testi ile %93.7 oranında, çift disk sinerji testi ile %89.6 ve modifiye Hodge testi ile %41.7 oranında MBL pozitifliği saptandı. Kullanılan dört fenotipik yöntemin tamamında MBL pozitifliği saptama oranı *A. baumannii* suşları için %88.3 iken, *P. aeruginosa* suşları için %31.2'dir (Tablo 2).

A. baumannii suşlarında gradient strip test ile kombine disk testi arasındaki uyum %94.7, çift disk sinerji testi ile aynı şekilde %94.7, modifiye Hodge testi ile %91.5 oranında bulunmuştur. *P. aeruginosa* suşlarında gradient strip test ile kombine disk testi arasındaki uyum %93.7, çift disk sinerji testi ile %89.6, modifiye Hodge testi ile %41.7 oranında bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 2. Test yöntemine göre MBL pozitifliği [n(%)].

Fenotipik yöntem	*A. baumannii*	*P. aeruginosa*
MBL gradient strip test	92 (97.9)	48 (100.0)
Kombine disk testi	93 (98.9)	45 (93.7)
Çift disk sinerji testi	93 (98.9)	43 (89.6)
Modifiye Hodge testi	90 (95.7)	20 (41.7)

n: izolat sayısı

Tablo 3. Gradient strip test yöntemi ile diğer fenotipik testlerin uyumu.

	P. aeruginosa			*A. baumannii*		
	Gradient strip test			Gradient strip test		
	Pozitif	Negatif	Uyum (%)	Pozitif	Negatif	Uyum (%)
Kombine disk testi	45	-	93.7	89	-	94.7
Çift disk sinerji testi	43	-	89.6	89	-	94.7
Modifiye Hodge testi	20	-	41.7	86	-	91.5

n: izolat sayısı

TARTIŞMA

Doğada yaygın olarak bulunan NFGNB türleri, özellikle nemli ortamlarda uzun süre canlı kalarak hastane ekipmanında ve çalışanların ellerinde kolonize olarak yayılmaktadır. Fırsatçı bir patojen olan *Acinetobacter* türleri özellikle bakteremi, üriner sistem enfeksiyonları, sekonder menenjit, ventilatör ilişkili nasokomiyal pnömoni gibi hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır[19]. Amerikan Ulusal Nazokomiyal İnfeksiyon Sürveyans Sistemi (NNIS) verilerine göre *Acinetobacter* türleri ile gelişen hastane Enfeksiyonu insidansında önemli artış olduğu görülmektedir. 1975 yılında *Acinetobacter* türleri Gram negatif hastane enfeksiyonlarının %1.4'ünü oluştururken, 2003'te bu oran %6.2'ye çıkmıştır[20]. *P. aeruginosa* da özellikle hastane enfeksiyonlarından izole edilen fırsatçı

non-fermentatif Gram negatif patojenlerden olup, özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan immünsupressif hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadırlar[6,16].

Gram negatif bakteriler arasında MBL üretimi giderek artmaktadır. Hızla yayılan ve geniş antibakteriyel direnç spektrumuna neden olan metallo enzimler enfeksiyonların tedavisi için ciddi bir sorun oluşturmaktadır[6,21].

Tetik ve ark.[12] 61 *A. baumannii* suşunda MBL enzim üretimini kombine disk testi ile %75, çift disk sinerji testi ile %84, modifiye Hodge testi ile %74 ve MBL gradient strip test ile %80 oranında saptamışlardır. Sesli-Çetin ve ark.[22] *A. baumannii* için MBL üretimini MBL gradient strip test ile %80 oranında bulmuşlardır. Aynı şekilde Aktaş ve ark.[23] da *A. baumannii* için MBL üretimini gradient strip test yöntemi ile %80 olarak tespit etmişlerdir.

Jesudason ve ark.[24] karbapenemaz ve MBL üretiminin tespitinde çift disk sinerji testini, modifiye Hodge testine göre daha duyarlı bulmuşlardır. Lee ve ark.[25]'da *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında çift disk sinerji testinin özgüllük ve duyarlılığını %100, modifiye Hodge testinin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %88 olarak saptamışlardır.

Ülkemizde imipenem dirençli 79 *Acinetobacter* izolatıyla yapılan bir çalışmada, MBL üretimi gradient strip test ile %51.9, kombine disk testi ile %58.2, çift disk sinerji testi ile %55.7, modifiye Hodge testi ile %69.6 oranında saptanmış, PCR yöntemiyle *blaIMP-1* geni araştırılmış, ancak pozitiflik bulunamamıştır. Bu suşlardaki MBL üretiminden *blaIMP-1* dışı genlerin sorumlu olduğu düşünülmüştür[26].

Altoparlak ve ark.[27] karbapenemlere dirençli 40 *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşunda MBL pozitifliğini kombine disk yöntemi ile %55 oranında saptamışlardır. Bayraktar ve ark.[28] *P. aeruginosa* suşlarında gradient strip test yöntemi ile %66.6 oranında MBL pozitifliği belirlemişlerdir.

Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada, 45 NFGNB izolatının %89'u modifiye Hodge testi ile %96'sı imipenem-EDTA disk yöntemi ile MBL pozitif saptanmıştır. *Pseudomonas* dışı NFGNB'lerdeki pozitiflik oranı *Pseudomonas* suşlarına göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Yine bu çalışmada, *Pseudomonas* suşlarının %12'sinde modifiye Hodge testi ile, %52'sinde imipenem-EDTA disk testi ile pozitiflik tespit edilmiştir[29].

Aşık'ın[30] 2006 yılında yaptığı çalışmada, *Acinetobacter* suşlarında modifiye Hodge testi ile %27 oranında MBL üretimi saptanmış, ancak *Pseudomonas* suşlarının hiçbirinde bu yöntem ile pozitiflik belirlenememiştir.

Çalışmamızda, tümü imipeneme dirençli olan *A. baumannii* suşlarında MBL varlığı en çok %98.9 oranı ile kombine disk testi ve çift disk sinerji testi ile saptanırken, bunu %97.9 oranı ile gradient strip test yöntemi ve %95.7 oranı ile modifiye Hodge testi takip etmiştir. *P. aeruginosa* suşlarında tespit edilen en yüksek MBL pozitiflik oranı %100 ile gradient strip test yönteminden elde edilmiştir. Kombine disk testi ile %93.7 oranında, çift disk sinerji testi ile %89.6 oranında ve modifiye Hodge testi ile %41.7 oranında MBL pozitifliği saptanmıştır. *A. baumannii* suşlarında dört fenotipik yöntemin tamamında MBL pozitifliği tespit edilme oranı %88.3 iken, *P. aeruginosa* suşlarında bu oran %31.2 olarak bulunmuştur.

MBL enzim varlığının tespiti için kullanılan fenotipik testler içinde en yüksek duyarlılık ve özgüllük gradient strip test yöntemi için bildirilmiştir. Kore'de 2004 yılında yapılan karşılaştırmalı MBL enzim tayininde, *blaIMP-1* geni

pozitif bulunan *A. baumannii* izolatlarının hepsi, *blaIMP-2* geni pozitif *A. baumannii* izolatlarının ise %95'i gradient strip test ile MBL pozitif olarak tespit edilmiştir. OXA-23 pozitif MBL negatif izolatların biri gradient strip test ile yanlış pozitif sonuç vermiştir[31]. Walsh ve ark.[32] gradient strip testin MBL enzim tayinindeki duyarlılığını %94 ve özgüllüğünü %95 olarak bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda, gradient strip testin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle *A. baumannii* suşlarında diğer testlerle gradient strip test arasındaki uyumluluğu hesapladığımızda kombine disk testi ile %94.7, çift disk sinerji testi ile %94.7, modifiye Hodge testi ile %91.5 oranında bulunmuştur. *P. aeruginosa* suşlarında ise kombine disk testi ile %93.7, çift disk sinerji testi ile %89.6, modifiye Hodge testi ile %41.7 oranında gradient strip test ile uyumluluk tespit edilmiştir.

Çoğul dirençli türlerin yayılımının önlenmesi ve bu türlerin neden olduğu enfeksiyonların başarılı şekilde tedavisi için MBL enzim varlığı basit ve güvenilir bir laboratuvar metoduyla araştırılmalıdır. Ancak CLSI kriterlerine göre MBL üretimini tespit etmede geçerli bir fenotipik yöntem henüz önerilmemektedir. Gradient strip test yöntemi MBL üretimi tayininde kullanımı ve yorumlaması kolay bir test olarak öne çıkmaktadır. MİK değeri tespitine dayanması daha rasyonel bir sonuç vermektedir. Yapılan çalışmalardada yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir fenotipik test olduğu bildirilmektedir[32].

Modifiye Hodge testinin ise OXA ve MBL gibi enzimlerin varlığını birlikte tespit edebilmesi ve uygulaması kolay bir test olması nedeniyle kullanışlı bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Ancak, bu enzimlerin ayırımını ortaya koyamaması nedeniyle epidemiyolojik olarak kullanışlı bir test olarak görülmemekle birlikte, AmpC üreten suşlarla azalmış ya da kaybolmuş porin salınımı yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedir[33-36]. Yine modifiye Hodge testinin değerlendirilmesinin diğer testlere göre subjektif olması testin sonuçlarını etkilemektedir. Çalışmamızda, modifiye Hodge testi *A. baumannii* suşlarında diğer testlerle paralellik gösterirken, *P. aeruginosa* suşlarında pozitiflik oranının düşük olması yorum farkı kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Çift disk sinerji testide yapılan çalışmalarda duyarlılığı yüksek bir test olmasına karşın bu testin en önemli sorunu diskler arasındaki mesafe imipenem disk çapının yarısı kadar uzatıldığında sonuçların negatif olarak değerlendirilebilmesine neden olmasıdır. Bu nedenle birçok çalışmada kombine disk yöntemi çift disk sinerji testine tercih edilmektedir[37].

Moleküler testler MBL tayini için en güvenilir yöntem olmakla birlikte, bu testlerin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılması iş gücü ve maddi olanaklar açısından her zaman olası değildir. Uyguladığımız fenotipik yöntemler arasında farklar olmasına rağmen, hepsinde pozitiflik oranı yüksek bulunmuştur. MBL enziminin Gram negatif bakteriler arasında hızla yayılması ve tedavide kullanılabilecek bir MBL inhibitörünün bulunmaması nedeniyle uygun antimikrobiyal ajan seçimine yardımcı olması ve hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde epidemiyolojik veriler sağlaması amacıyla MBL varlığının saptanması oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

1. **Çalangu S.** Hastane enfeksiyonlarının önemi. In: Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H. (Eds). Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları. Samsun: Kaya Basım, 2002:189-94.
2. **Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA.** Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3471-83. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01464-06
3. **Akalın H.** Dirençli bakterilerin neden olduğu nazokomiyal enfeksiyonlar ve enfeksiyon kontrolü, *Turkiye Klinikleri Mikrobiyol Derg* 2003;2:104-7.

4. **Bergogne-Bérézin E, Towner KJ.** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemilogical features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:148-65.
5. **Toraman ZA, Yakupoğulları Y, Kızırgil A.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz araştırılması. *İnfeks Derg* 2005; 19:101-5.
6. **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. *İnfeks Derg* 2008; 22:49-52.
7. **Rasmussen BA, Bush K.** Carbapenem-hydrolizing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:223-32.
8. **Massidda O, Rossolini GM, Satta G.** The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-β-lactamases. *J Bacteriol* 1991; 173:4611-7.
9. **Bush K.** Metallo-beta-lactamases: A Class apart. *Clin Infect Dis* 1998; (Suppl 1):S48-53. http://dx.doi.org/10.1086/514922
10. **Bennett PM.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:1-4. http://dx.doi.org/10.1093/jac/43.1.1
11. **Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, et al.** Prevalance and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48:131-5. http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.09.005
12. **Tetik T.** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen gram negatif Non-fermenter bakterilerde metallo betalaktamaz enzim aktivitesinin araştırılması [Uzmanlık Tezi] Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2008.
13. **Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL.** Comparison of the double-disk, combined disk and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:5-11. http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.01.002
14. **Franklin C, Liolios L, Peleg AY.** Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-β-lactamase producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3139-44. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00879-06
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement M100-S22, CLSI, Wayne, PA, 2012.
16. **Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M.** Yoğun bakımda izole edilen *Pseudomonas* spp. suşlarında metallo-beta-laktamaz sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg* 2011; 25:150-6.
17. **Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A.** Evaluation of new E-test 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
18. **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; 41:4623-9. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003
19. **Aktas O, Ozbek A.** Prevalence and in-vitro antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter* strains isolated from patients in intensive care units. *J Int Med Res* 2003; 31:272-80. http://dx.doi.org/10.1177/147323000303100404
20. **Seifert H, Dolzani L, Bressan R, et al.** Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4328-35. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005
21. **Aşçı-Toraman Z, Yakupoğulları Y, Kızırgil A.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz araştırılması. *İnfeks Derg* 2005; 19: 101-5.
22. **Sesli-Çetin E, Tetik T, Kaya S, Cicioğlu-Arıdoğan B.** *Acinetobacter baumanii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin dört farklı fenotipik yöntemle araştırılması. *İnfeks Derg* 2009; 23:51-5.
23. **Aktaş AE, Yiğit N, Kayserili F, Ayyıldız A.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *İnfeks Derg* 2009; 23:57-62.
24. **Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V.** Comparison of two methods to detect carbapenemase and metallo-beta-lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res* 2005; 121:780-3.
25. **Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH.** Modified hodge test and EDTA disk synergy test to screen metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbial Infect* 2001; 7:88-91. http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00204.x
26. **Ulusoy-Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N, ve ark.** İmipenem dirençli *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2011; 41:29-36.
27. **Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Özkurt 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; 31:707-10. http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2005.02.017
28. **Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E.** Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* şuşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34:248-52.
29. **Sarı H.** Karbapenemlere dirençli gram negatif basil izolatlarında İmipenem-EDTA/Meropenem EDTA disk yöntemi ve Modifiye Hodge testi ile Metallo-Beta-Laktamaz (MBL) varlığının araştırılması. [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2005.
30. **Aşık L.** *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* klinik izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2006.

31. **Lee K, Yong D, Yum JH et al.** Evaluation of E test MBL for detection of *blaIMP-1* and *blaVIM-2* allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43:942-4. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.2.942-944.2005
32. **Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A.** Evaluation of new E-test 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
33. **Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B.** Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. *Clin Microbiol Newsletter* 2009; 31:55-62. http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2009.03.005
34. **Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, et al.** Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3881-9. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.12.3881-3889.2003
35. **Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al.** Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2723-5. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00015-07
36. **Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA.** Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36:205-10. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.05.014
37. **Mükerrem A.** Rutin laboratuvarımızda etken olarak izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde, metallo-beta-laktamaz varlığının fenotipik ve genotipik yöntemlerle saptanması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması. [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: Marmara Üniversitesi, 2005.