

Acinetobacter baumannii Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretimini ve IMP-1 ve VIM-1 Tipi Genlerin Araştırılması

Investigation of Metallo-Beta-Lactamases Production and IMP-1 and VIM-1 Type Genes in Acinetobacter baumannii Strains

Fatma MUTLU SARIGÜZEL¹, Gökhan METAN², Bülent SÜMERKAN³

¹ Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Kayseri, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Giriş: Acinetobacter baumannii suşlarında metallo-beta-laktamaz (MBL) üretimi ve genlerin belirlenmesi, direnç genlerinin hastane ortamında diğer bakteri türlerine aktarılma olasılığının önlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, hastaların kan kültürlerinden izole edilen A. baumannii suşlarında fenotipik yöntemlerle MBL üretiminin ve pozitif bulunan suşlarda IMP-1 ve VIM-1 tipi genlerin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Kan kültürlerinden izole edilen ve Microscan Walkaway (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) otomatize sistemle A. baumannii olarak tanımlanan 100 suş çalışmaya alınmıştır. Tür düzeyinde tanımlama kanlı agar da hemoliz özellikleri, "Eosin Methylene Blue" agar da laktoza etkileri, katalaz, oksidaz ve indol reaksiyonları, 44°C'de üreyebilmeyele doğrulanmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Kolistin duyarlılığını belirlemek için "British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)" kriterleri kullanılmıştır. İmipenem, meropenem, ampisilin-sulbaktam, sefoperazon-sulbaktam ve tigesiklin duyarlılıklarının belirlenmesi için E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) yöntemi kullanılmıştır. MBL enzimleri kombine disk difüzyon testi, Modifiye Hodge testi (MHT) ve E-test yöntemiyle araştırılmıştır. Fenotipik yöntemler ile MBL tespit edilen suşlarda bla_{VIM-1} ve bla_{IMP-1} genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 100 izolatin 99'unda çoklu ilaç direnci saptanırken imipeneme ve meropeneme direnç oranı sırasıyla %66 ve %76 olarak bulunmuştur. Kolistine karşı direnç saptanmazken, tigesiklin için minimum inhibitör konsantrasyonu 50 (MIK₅₀) ve minimum inhibitör konsantrasyonu 90 (MIK₉₀) değerleri sırasıyla 1 ve 2 µg/mL olarak belirlenmiştir. Suşların %54'ünün imipenem/imi-penem-EDTA, %59'unun meropenem/meropenem-EDTA kombinasyonu, %54'ünün MHT, %51'inin E-test yöntemiyle fenotipik olarak MBL ürettiği, PCR ile 15 izolatta bla_{IMP-1} geni, üç izolatta bla_{VIM-1} geni varlığı gösterilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, fenotipik yöntemlerin her üçüyle de MBL pozitifliği tespit edilen 45 A. baumannii izolatinin 18 (%40)'inde IMP-1 ve VIM-1 tipi genlerin varlığı gösterilmiştir. MBL genlerinin gösterilmesi sadece A. baumannii suşlarında karbapenemlere dirence yol açması açısından değil, aynı zamanda bu genlerin özellikle Enterobacteriaceae türlerine mobil genetik elemanlar aracılığıyla taşınma potansiyeli yönünden de büyük önem taşımaktadır. MBL enzimlerinin yaygınlığını belirlemek amacıyla sürdürülecek etkin süreyans programları dirençli bakterilerin yayılmasını önlemekte faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Acinetobacter baumannii, Metallo-beta-laktamaz, IMP-1, VIM-1

SUMMARY

Investigation of Metallo-Beta-Lactamases Production and IMP-1 and VIM-1 Type Genes in *Acinetobacter baumannii* StrainsFatma MUTLU SARIGÜZEL¹, Gökhan METAN², Bülent SÜMERKAN³¹ Clinic of Medical Microbiology, Kayseri Training and Research Hospital, Kayseri, Turkey² Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Erciyes, Kayseri, Turkey³ Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Erciyes, Kayseri, Turkey

Introduction: Detection of metallo-beta-lactamase (MBL) resistance genes in *Acinetobacter baumannii* strains is important due to transfer of resistance genes to other bacteria in the hospital environment. The aim of this study was to investigate metallo-beta-lactamases production in *A. baumannii* strains isolated from bloodstream infections and then to investigate IMP-1 and VIM-1 type genes in positive strains using phenotypic methods.

Materials and Methods: A total of 100 strains isolated from blood cultures and identified as *A. baumannii* using the Microscan Walkaway (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) automated system were included in the study. The species identification was confirmed by hemolysis features on blood agar, lactose fermentation on Eosin Methylene Blue agar, catalase, oxidase, indole reactions, and growth at 44°C. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disk diffusion. Colistin susceptibility interpretation was performed according to the British Society for Antimicrobial Chemotherapy criteria. Susceptibility test for imipenem, meropenem, ampicillin/sulbactam, cefoperazone/sulbactam, and tigecycline was performed by E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). The MBL production was investigated with combined disk test, modified Hodge test (MHT), and E-test methods. The strains that were positive for MBL based on phenotypic tests were investigated further for *bla*_{VIM-1} and *bla*_{IMP-1} by polymerase chain reaction (PCR).

Results: Multidrug resistance was found in 99 of the 100 isolates included in the study, and the resistance rates for imipenem and meropenem were found as 66% and 76%, respectively. Colistin resistance was not detected, and minimum inhibitory concentration 50 (MIC₅₀) and minimum inhibitory concentration 90 (MIC₉₀) for tigecycline were 1 and 2 µg/mL, respectively. MBL production was found to be 54% by imipenem/imipenem-EDTA combination, 59% by meropenem/meropenem-EDTA combination, 54% by MHT, and 51% by E-test. The *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-1} genes were detected in 15 and 3 of these strains by PCR, respectively.

Conclusion: In this study, IMP-1 and VIM-1 type genes were shown in 18 of 45 *A. baumannii* strains of MBL as determined with three phenotypic methods. This is a potential threat not only for causing resistance to carbapenems in *A. baumannii* strains but also for transfer resistance to Enterobacteriaceae by mobile genetic elements. Effective surveillance programs for detection of MBLs are essential to guide infection control programs in order to prevent further spread of resistant germs.

Key Words: *Acinetobacter baumannii*, metallo-beta-lactamase, IMP-1, VIM-1

GİRİŞ

Karbapenemler dirençli gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde en etkin antibiyotiklerdir. Son yıllarda bu ajanların yaygın olarak kullanılması yüksek oranda karbapenem direnciyle karşılaşılmasına neden olmaktadır^[1]. Karbapenemlere karşı direnç dışı atım pompaları, hücre duvarında yer alan kanal yapılarındaki değişiklikler ve enzimatik hidroliz gibi pek çok farklı mekanizmalarla meydana gelmektedir^[2]. Metallo-beta-laktamazlar (MBL) enzimatik direnç mekanizmalarının önemli örneklerinden biridir. Monobaktamlar (aztreonam) dışında tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı dirence neden olur. MBL'ler, Bush sınıflamasında fonksiyonel grup 3 veya Ambler sınıflamasında sınıf B'de yer alır. *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Aeromonas* türle-

rinde ve bazı *Bacteroides fragilis* izolatlarında karbapenem direncine yol açtığı uzun yıllar önce belirlenen MBL enzimleri üzerindeki çalışmalar, plazmid aracılığıyla taşınan IMP türü MBL'lerin 1990 yılında *Pseudomonas aeruginosa*'da tespit edilmesiyle yoğunlaşmıştır^[3]. Günümüzde IMP, VIM, SPM, GIM ve NDM-1 tipi MBL'ler tanımlanmıştır. MBL enzimlerinin üretiminden sorumlu genler, integron üzerindeki hareketli gen kasetlerinde yer almakta ve farklı gram-negatif bakteri türleri arasında hızla yayılabilmektedir^[4]. *A. baumannii* suşlarında MBL varlığının belirlenmesi, sadece bu suşlarla infekte hastalarda uygun tedavinin uygulanabilmesi için değil aynı sıra direnç genlerinin hastane ortamında diğer bakteri türlerine aktarılmasının önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu enzimlerin aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonu taşımaları nedeniyle tanımlanmalarında bu iyonla bağlanarak enzimi inaktive eden etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), 2- merkaptopropionik asit (MPA) ve sodyum merkaptasetik asit (SMA) gibi bileşikler kullanılır^[5,6]. MBL üretimi fenotipik olarak imipenem EDTA/meropenem EDTA disk yöntemi, modifiye Hodge testi (MHT), MBL E-test ve çift disk sinerji testiyle tespit edilebilmektedir. MBL enzimlerinin tespit edilmesi için "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"ün önerdiği fenotipik bir yöntem mevcut değildir^[7]. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa* suşlarında VIM-5, *Klebsiella pneumoniae*'de VIM-1 ve *Enterobacter cloacae*'de VIM-5 türü MBL'ler saptanmıştır. *A. baumannii* suşlarında MBL varlığını araştıran çalışmalarda ise fenotipik testlerle yüksek oranda pozitiflik saptanmasına rağmen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nun kullanıldığı çalışmalarda MBL enzimlerini kodlayan genler tespit edilmemiştir^[8-12].

Hastanemizde yapılan bir çalışmada *A. baumannii* bakteremisinde hastaların prognozunu etkileyen faktörler araştırılmış; 100 hastanın değerlendirildiği bu çalışmada karbapenem direnci mortalite ile ilişkili bulunmuştur^[13].

Bu çalışmada, hastaların kan kültürlerinden izole edilen *A. baumannii* suşlarında MBL üretiminin fenotipik yöntemlerle araştırılması ve pozitif bulunan suşlarda IMP-1 ve VIM-1 tipi genlerin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Kan Kültürü Örnekleri

Şubat 2007-Mart 2008 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Bakterioloji Laboratuvarına gönderilen kan kültürlerinden izole edilen 100 *A. baumannii* suşu çalışma zamanına kadar $-70^{\circ}C$ 'de stoklanarak mikrobankalarda saklanmıştır. Çalışmaya her bir hastadan bir izolat dahil edilmiştir.

Bakterilerin Tanımlanması

Kan kültürü örneklerinden izole edilen suşlar Microscan Walkaway (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) otomatize sistemiyle tanımlandıktan sonra katalaz, oksidaz ve indol reaksiyonları, $44^{\circ}C$ 'de üreyebilme, kanlı agarda hemoliz özellikleri, Eosin Methylene Blue (EMB) agarda laktoza etkileri değerlendirilmiştir.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Disk difüzyon yöntemi: İzole edilen suşların kolistin (10 µg) (Oxoid, UK), levofloksasin (5 µg) (Oxoid, UK), siprofloksasin (5 µg) (Becton Dickinson, USA), amikasin (30 µg) (Becton Dickinson, USA), sefepim (30 µg) (Becton Dickinson, USA), sefotaksim (30 µg) (Becton Dickinson, USA), seftriakson (30 µg) (Becton Dickinson, USA), gentamisin (10 µg) (Becton Dickinson, USA), tobramisin (10 µg) (Becton Dickinson, USA), trimetoprim-sülfametoksazol (1.25/23.75 µg) (Becton Dickinson, USA), piperasilin-tazobaktam (100 µg/10 µg) (Becton Dickinson, USA), ampisilinsulbaktam (10 µg/10 µg) (Becton Dickinson, USA), sefoperazon-sulbaktam (75 µg/30 µg) (Bioanalyse) duyarlılıkları Mueller-Hinton agarda (Acumedia, Baltimore) CLSI standartlarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Kolistin duyarlılığını belirlemek için "British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)" kriterleri kullanılmıştır^[14]. Kalite kontrol için *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanılmıştır.

E-test yöntemi: İzolatların imipenem, meropenem, tigesiklin, sefoperazon-sulbaktam ve ampisilinsulbaktam antibiyotiklerine duyarlılıkları, minimum inhibitör konsantrasyonu 50 (MİK₅₀) ve minimum inhibitör konsantrasyonu 90 (MİK₉₀) değerleri E-test (AB BIODISK, Solna, Sweden) şeritleri kullanılarak araştırılmıştır. MİK değerleri kriter alınarak CLSI'nin standartlarına göre suşların duyarlılık durumları yorumlanmıştır. CLSI'da sefoperazon/sulbaktam MİK değeri belirtilmediği için sefoperazon MİK değeri, tigesiklin için "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından önerilen MİK değeri kullanılmıştır^[5,15].

Çoklu İlaç Direnci

Çoklu ilaç direnci, kısa süre önce yayınlanan uzlaşılı raporuna göre belirlenmiştir. *A. baumannii* suşlarının üç veya daha fazla antimikrobiyal grubundan bir veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olanları, çoklu ilaca dirençli suş olarak tanımlanmıştır^[16].

MBL Enzim Üretiminin Gösterilmesi

İmipenem/imipenem-EDTA, meropenem/meropenem-EDTA içeren kombine disk yöntemi: İzolatlarda MBL enzimi varlığı imipenem/imipenem-EDTA, meropenem/meropenem-EDTA içeren disk yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bakteri süspan-

siyonu 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanarak Mueller-Hinton agar içeren plak yüzeyine steril pamuklu çubukla yayılmış ve ikişer adet imipenem (10 µg) ve meropenem (10 µg) diski agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Disklerin birer tanesine 5 µL (930 µg) 0.5 M EDTA solüsyonu eklenerek kombine diskler (10 µg/930 µg) oluşturulmuştur. EDTA içeren diskin oluşturduğu inhibisyon zonunun genişliğinin EDTA içermeyen diskin genişliğinden 7 mm veya daha fazla olması MBL enzim varlığı açısından pozitif kabul edilmiştir.

MBL E-test yöntemi: İzolatların MBL enzimi üretip üretmediği imipenem (4-256 µg/mL)/imipenem-EDTA (1-64 µg/mL) içeren E-test şeritleri kullanılarak araştırıldı. İmipenemin EDTA ile birlikte test edildiğindeki MİK değerinin, tek başına test edildiğindeki MİK değerine göre ≥ 3 dilüsyon azalması MBL enzim varlığı açısından pozitif kabul edildi^[17].

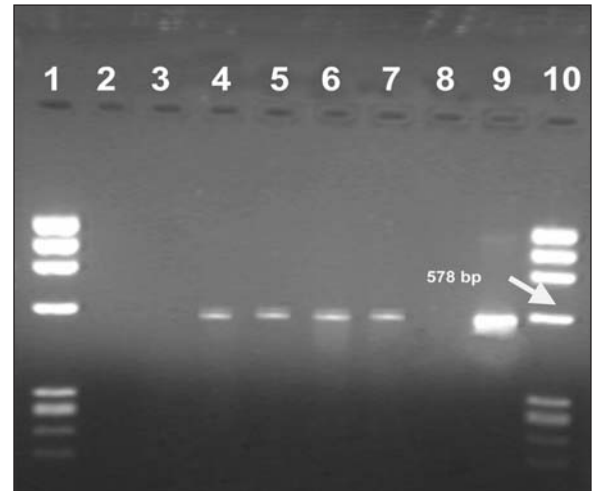
Modifiye Hodge Testi: *E. coli* ATCC 25922 suşunun McFarland 0.5'in 1/10 bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlanarak Mueller-Hinton agar plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekilmiştir. Plağın merkezine imipenem diski (10 µg) yerleştirilmiştir. Test suşları, bu diskin dört bir kenarından periferine doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekilmiştir. 35°C'de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunda çarpıklık veya yonca görünümü MBL enzim varlığı açısından pozitif kabul edilmiştir^[5].

A. baumannii'nin *bla*_{VIM-1} ve *bla*_{IMP-1} Genlerinin PCR ile Araştırılması

DNA izolasyonu için izolatlar 37°C'de 18 Mueller-Hinton buyyonda üretilmiştir. Suşların nükleik asit izolasyonu Qıamp DNA Mini Kiti (QIAGEN) kullanılarak, önerilen prosedüre uygun çalışılmıştır. İzolatlarda *bla*_{VIM} ve *bla*_{IMP} genleri belirlenmesi için "inhouse" PCR uygulanmıştır. PCR testinde *bla*_{VIM-1} geninin belirlenmesinde primer çifti (5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3' ve 5'-ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3') ve *bla*_{IMP-1} geninin belirlenmesi için primer çifti (5'-CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG-3' ve 5'-AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT-3') kullanılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Örnekler 261 baz çifti (bç) uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiğinde *bla*_{VIM-1} geni, 578 bç uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiğinde ise *bla*_{IMP-1} geni için pozitif kabul edilmiştir^[18-20] (Resim 1,2).



Resim 1. Jel elektroforez sisteminde *bla*_{VIM-1} geninin incelenmesi. 10. Moleküler büyüklük belirteci (Fermentas, USA); 9. Pozitif kontrol; 8. Negatif kontrol; 4, 6, 7. Pozitif izolat; 5. Negatif izolat.



Resim 2. Jel elektroforez sisteminde *bla*_{IMP-1} geninin incelenmesi. 1, 10. Moleküler büyüklük belirteci (Fermentas, USA); 9. Pozitif kontrol; 8. Negatif kontrol; 4, 5, 6, 7. Pozitif izolat; 2, 3. Negatif izolat.

BULGULAR

Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemiyle %100 ve %41 duyarlılık oranları ile kolistin ve tobramisinin en etkili antibiyotikler olduğu belirlenmiştir. İncelenen *A. baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları sırasıyla; imipenem %38, meropenem %24, ampicilin-sulbaktam %17, sefoperazon-sulbaktam %31, piperasilin-tazobaktam %1, sefepim %15, sefotaksim %1, seftriakson %1, gentamisin %11, amikasin %14, levofloksa-

Tablo 1. Suşların imipenem, meropenem, ampisilin-sulbaktam, sefoperazon-sulbaktam, tigesiklin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile MİK aralıkları ve duyarlılık oranları

Antibiyotik	MİK (µg/mL)			Duyarlılık oranları (%)	
	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı	Dirençli*
İmipenem	0.006-> 32	32	> 32	34	66
Meropenem	0.125-> 32	32	> 32	24	76
Tigesiklin	0.125-2	1	2	100	0
Ampisilin-sulbaktam	0.25-> 256	32	256	17	83
Sefoperazon-sulbaktam	0.25-256	32	256	31	69

* Orta duyarlı olan suşlar dirençli kabul edildi.

sin %8, siprofloksasin %3 ve trimetoprim-sülfame-toksazol %12 olarak bulunmuştur.

E-test Yöntemi

İzole edilen *A. baumannii* suşlarının imipenem, meropenem, ampisilin-sulbaktam, sefoperazon-sulbaktam, tigesiklin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile MİK aralıkları ve duyarlılık oranları Tablo 1'de gösterilmiştir. E-test yöntemiyle suşların %34'ünün imipeneme, %24'ünün meropeneme, %100'ünün tigesikline, %31'inin sefoperazon-sulbaktama, %17'sinin ampisilin-sulbaktama duyarlı olduğu belirlenmiştir. Suşların 40'ında tigesiklin MİK'i ≤ 0.5 µg/mL, 45'inde MİK 1 µg/mL ve 15'inde MİK 2 µg/mL olarak bulunmuştur. Suşların imipenem, meropenem, ampisilin-sulbaktam, sefoperazon-sulbaktama duyarlılık sonuçları disk difüzyon ve E-test yöntemleriyle uyumlu bulunmuştur.

Çoklu İlaç Direnci

Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılığı çalşılan 100 *A. baumannii* suşunun 99'unun çoklu ilaç direncine sahip olduğu saptanmıştır.

MBL Enzim Üretiminin Gösterilmesi

Fenotipik testlerle ve genotipik yöntemle MBL enzim üretiminin gösterilmesi: Fenotipik yöntemlerden imipenem/imipenem EDTA içeren kombine disk yöntemi ile 54 suşun, meropenem/meropenem EDTA içeren kombine disk yöntemi ile 59 suşun, MBL E-test yöntemi ile 51 suşun, MHT ile 54 suşun MBL ürettiği gösterilmiştir. Suşların 45'inin kullanılan her üç fenotipik yöntemle MBL ürettiği bulunmuştur ve bu suşlar PCR ile test edilmiştir. Suşların

15'inde *bla*_{IMP-1} geni, üçünde *bla*_{VIM-1} geni varlığı PCR ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA

A. baumannii suşlarında MBL üretiminin belirlenmesi, hem hastalara doğru tedavinin uygulanabilmesi hem de direnç genlerinin hastane ortamında diğer bakteri türlerine aktarılma olasılığının önlenmesi açısından önemlidir^[2]. Rutin laboratuvarlarda MBL enzimine sahip *A. baumannii* suşlarında bu enzimlerin gösterilebilmesi için hem duyarlılığı hem de özgülüğü yüksek, uygulaması kolay olan fenotipik yöntemlerin bulunması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla kombine disk difüzyon testi, MBL E-test ve MHT yönteminin tarama testleri olarak kullanılmak üzere özgülük ve duyarlılıkları sürekli araştırılmaktadır ve sonuçlar PCR sonuçlarıyla karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmaların bazıları olumlu sonuçlar vermiş, bazıları da yalnızca pozitifliğin yüksek olduğunu vurgulamışlardır^[12,21-24].

Oh ve arkadaşları 2003 yılında imipeneme ve/veya seftazidime dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında MBL enzimini göstermek için kombine disk difüzyon testini uygulamışlar ve sonuçları PCR analiziyle doğrulamışlardır^[21]. Bu araştırmacılar, kombine disk difüzyon testinin VIM benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısındaki duyarlılığının %93.9 olduğunu belirtirken, IMP benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısında başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Young ve arkadaşları 0.5 M EDTA solüsyonundan 750 ve 1000 µg ekleyerek imipenem diskiyle yaptıkları kombine disk difüzyon testinde 750 µg eklenen diskin, MBL üreten suşları belirlemede daha duyarlı olduğunu, *Pseudomonas* spp. suşlarında özgülüğün mükemmel, *Acinetobacter* spp. suşlarının

da ise özgüllüğün iyi olduğunu bulmuşlardır^[22]. Ülkemizde Aktaş ve arkadaşları imipenem ve meropeneme dirençli 28 *P. aeruginosa* ve 11 *A. baumannii* izolatlarında 0.5 ve 0.1 M EDTA solüsyonu eklenerek hazırlanan imipenem kombine disklerle MBL üretimini araştırmışlar, 0.5 M EDTA eklenmiş kombine disklerle suşların %63.6-100' nde, 0.1 M EDTA eklenmiş kombine disklerle suşların %0-7.7'sinde fenotipik olarak MBL üretildiğini göstermişler, fakat PCR ile suşların MBL genlerini g sterememişlerdir^[12].

MBL E-test, MBL'lerin fenotipik olarak belirlenmesinde kullanılan diğer bir testtir. E-test şeridinin üzerinde, bir tarafta imipenem diğer tarafta ise imipenemle birlikte EDTA bulunmaktadır. En büyük dezavantajı, imipeneme orta dirençli ve duyarlı izolatlarda MBL belirlenmesinde uygun olmamasıdır. Walsh ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, daha önce MBL enzimine sahip olduğu belirlenmiş ve imipenem MİK değeri > 4  g/mL olan izolatların büyük bir çoğunluğunun E-test ile pozitif sonuç verdiğini rapor etmişler ve MBL E-test duyarlılığını %94, özgüllüğünü %95 olarak bildirmişlerdir^[17]. Yan ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada, MBL ürettiği bilinen *Pseudomonas* spp. ve *A. baumannii* suşlarında MBL E-testin duyarlılığını %87, özgüllüğünü %100 olarak belirlemişlerdir^[23]. Lee ve arkadaşları 2005 yılında *bla*_{VIM} ve *bla*_{IMP} genlere sahip olan *Acinetobacter* spp. izolatlarında bu testin duyarlılığının %100 olduğunu bildirmişlerdir^[24]. Aktaş ve arkadaşları imipenem ve meropeneme dirençli 28 *P. aeruginosa* ve 11 *A. baumannii* izolatının hepsinin E-test yöntemiyle MBL enzimine sahip olduğunu göstermişler, fakat PCR ile suşların MBL genlerini g sterememişlerdir^[12].

MBL enzimlerinin fenotipik olarak belirlenmesinde diğer bir test ise MHT'dir. Bu testin prensibi, imipeneme duyarlı olan bir *E. coli* izolatının MBL üreten bir bakterinin varlığında, enzim tarafından imipenemin hidrolize olması nedeniyle üreme kabiliyetini tekrar kazanmasına dayanmaktadır. Lee ve arkadaşları imipeneme dirençli *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. izolatlarında bu yöntemi uygulamışlar ve PCR sonuçları ile karşılaştırdıklarında testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %88 olarak bulmuşlardır^[5].

Çalışmamızda suşların imipenem/imipenem-EDTA kombinasyonu ile %54' nde, meropenem/meropenem-EDTA kombinasyonu ile %59'unda MBL

 rettiği gösterilmiştir. İzolatların %51'inde MBL E-test yöntemiyle, %54' nde ise MHT yöntemiyle MBL  retimi fenotipik olarak gösterilmiştir ve her iki yöntemle de pozitif olan suşların hepsi karbapenemlere dirençli bulunmuştur. Her üç fenotipik yöntemle MBL  retimi gösterilen 45 izolatın 15'inde *bla*_{IMP} geni,  nde *bla*_{VIM} geni PCR ile belirlenmiştir. Bu çalışmayı izleyen yıllarda Erciyes Üniversitesi Hastanesi Yoğun Bakım  nitelerinde yapılan çalışmada karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında *bla*_{IMP-1} geni tespit edilmiştir^[25]. *Acinetobacter* spp. izolatlarının karbapenem direnç genleri açısından kaynak rolü oynaması *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan bakterilerde karbapenem direncinin artması açısından endişe uyandırmaktadır.

Son yıllarda pek çok ülkede olduğu gibi ülkemizde de karbapenem direncinin artması, uzun yıllar önce yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlanan kolistin önemli bir tedavi seçeneği haline getirmektedir. Kolistin, gram-negatif bakterilerin dış membranlarındaki anyonik lipopolisakkarid moleküllerle elektrostatik ilişkiye girmek suretiyle hücre membranını bozarak etki gösterir. Koomanachai ve arkadaşları çoklu dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu infeksiyonlarda kolistin kullanan hastalarda mortalite oranının %46.2, kullanmayan hasta grubunda ise %80 olduğunu g stermişlerdir^[26]. Bakteremi ile seyreden infeksiyonlarda %66-88 arasında klinik yanıt alınmıştır. Yapılan çalışmalarda kolistin tek başına kullanılamayacağı, mutlaka başka bir antibiyotikle birlikte kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Ülkemizde bu ilaca karşı direnç henüz yüksek seviyede görülmemektedir. Kolistin Türkiye'de kullanımına izin verilmeden önce, 2008 yılında Dizbay ve arkadaşlarının çalışmasında 66 çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* suşunda kolistin direnci saptanmamıştır^[27]. Fakat, Eser ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter* izolatlarında kolistin direncini %27.5 olarak saptamaları dikkat ekicidir^[11]. Aynı merkezde kısa süre önce yapılan bir diğer çalışmada ise, 2004-2010 yılları arasında kan kültüründen izole edilen 100 *A. baumannii* suşunda kolistin duyarlılığı %98 olarak bildirilmiştir^[28]. Bu çalışmada tüm suşlar kolistine duyarlı bulunmuştur, fakat bu sonuç değerlendirilirken çalışmanın kolistin ülkemizde rutin kullanıma girmeden önceki dönemi kapsadığı göz önüne alınmalıdır.

Glisilsiklin derivesi olan tigesiklin, çoklu dirençli *A. baumannii* kökenlerine in vitro etkili bir antibiyotik

tiktir. "Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial" çalışmasında 2902 *A. baumannii* suşunun tigesiklin için MİK₉₀ değeri 1 µg/mL olarak bulunmuştur^[29]. Ülkemizde yapılan bir çalışmada E-test yöntemiyle 100 *A. baumannii* suşunun %93'ünde MİK değeri ≤ 2 µg/mL, %7'sinde ise 3 µg/mL olarak, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 1.5 ve 2 µg/mL olarak saptanmıştır^[30]. Tigesiklinin ülkemizde kullanımına izin verilmeden önce Dizbay ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada 66 çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* suşunda E-test yöntemiyle %25.8 oranında direnç saptamışlardır^[27]. Suşların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini sırasıyla 2 ve 12 µg/mL olarak bulmuşlardır. Ülkemizde yapılan *A. baumannii* izolatlarının tigesiklin direncinin E-test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığı çalışmada, E-testin duyarlılık oranlarını daha düşük tespit ettiği vurgulanmaktadır. Tigesiklinin in vitro antibiyogram koşullarından etkilendiği ve oksidasyona duyarlı olduğu bildirilmektedir^[31]. Eğer in vitro direnç saptanırsa antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin ve bölgesel farklılıkların incelenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda tüm suşlar FDA'nın *Enterobacteriaceae* için önerdiği sınır değerler referans kabul edildiğinde tigesikline duyarlı saptanmış, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 1 ve 2 µg/mL olarak bulunmuştur. Suşların 40'ında tigesiklin MİK'i ≤ 0.5 µg/mL, 45'inde MİK 1 µg/mL ve 15'inde MİK 2 µg/mL olarak bulunmuştur. Standart tedavi uygulamasında tigesiklin serum düzeyi maksimum 0.63 µg/mL'ye ulaşabilmektedir. Bu nedenle bakteremi etkeni olan suşlarda 0.5 µg/mL'den büyük fakat duyarlılık sınırlarındaki tigesiklin klinik olarak etkin gibi görülmemektedir^[2]. Metan ve arkadaşlarının karbapeneme dirençli *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* kompleks infeksiyonlarında tigesiklin kullanımını inceledikleri çalışmada; cerrahi alan infeksiyonu olan hastalarda tigesiklinin başarılı olduğu rapor edilirken bakteremili hastalarda ise mikrobiyolojik kürün ve klinik başarı oranının düşük olduğu bildirilmiştir^[32]. Dünyada ve ülkemizde az da olsa tigesikline dirençli *A. baumannii* suşu bildirilmektedir. İleride daha yüksek direnç oranlarının gelişmemesi için tigesiklinin uygun endikasyonlarda ve hatta kombinasyon halinde kullanılması yararlı olabilir.

Bugüne kadar dünyanın çeşitli ülkelerinde ve ülkemizde *A. baumannii* izolatlarında MBL enzimini gös-

teren çalışmaların çoğu fenotipik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Yapılan çalışmaların bazılarında, fenotipik testlerin MBL tayinindeki duyarlılık ve özgüllükleri belirlenmiştir. Bu çalışmalarda, çalışılan izolatlarda var olabilecek tüm MBL enzimlerinin saptandığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda ise, çalışılan izolatlarda var olabilecek tüm enzim tipleri saptanamadığı için fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin değerlendirilmesi uygun görülmemiştir. Yapılan çalışmalarda EDTA'ya duyarlı suşların, kombine disk difüzyon testinde EDTA konsantrasyonunun ve disklere eklenen miktarın yanlış pozitifliğe neden olabileceği bildirilmiştir^[12,33]. Çalışmamızda, fenotipik testlerle MBL üretiminin yüksek bulunmasının nedeninin kullanılan EDTA molaritesine ve miktarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Fakat, fenotipik testlerle pozitif bulunan ancak PCR ile *bla*_{IMP} ve *bla*_{VIM} geni saptanamayan izolatlarda MBL geninin olmadığını söylemek doğru değildir. Bu genlerin gösterildiği çalışmalarda PCR için kullanılan primer dizilimleri de çok önemlidir. Aynı ya da farklı primer dizilimi kullanılan çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur^[8-12,18,19].

Sonuç olarak bu çalışmada kan kültüründen izole edilen *A. baumannii* suşlarında *bla*_{IMP-1} ve *bla*_{VIM-1} türü MBL genlerinin varlığı gösterilmiştir. Ülkemizde bu genlere sahip suşların yaygınlığının anlaşılabilmesi için daha geniş kapsamlı ve çok merkezli epidemiyolojik çalışmalara gereksinim mevcuttur.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda kullandığımız *bla*_{VIM-1} geninin belirlenmesi için kullanılan kontrol suş İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından, *bla*_{IMP-1} geninin belirlenmesi için kullanılan kontrol suş Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğinden sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Bassetti M, Ginocchio F, Giacobbe DR, Mikulska M. Development of antibiotics for gram-negatives: where now? *Clin Invest* 2011;1:211-27.
2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538-82.
3. Bush K. Bench-to-bedside review: the role of β-lactamases in antibiotic-resistant gram-negative infections. *Crit Care* 2010;14:224.

4. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306-25.
5. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA synergy tests to screen metallo- β -lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:88-102.
6. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003;41:4623-9.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16 [ISBN 1-56238-588-7]. Clinical and Laboratory Standard Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
8. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, et al. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:282-3.
9. Gacar GG, Midilli K, Kolaylı F, Ergen K, Gundes S, Hosoglu S, et al. Genetic and enzymatic properties of metallo- β -lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4400-3.
10. Yıldırım I, Ceyhan M, Gur D, Mugnaioli C, Rossolini GM. First detection of VIM-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase. *J chemother* 2007;19:467-8.
11. Eser ÖK, Ergin A, Hasçelik G. Erişkin hastalardan izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç ve metallo-beta-laktamaz varlığı. *Mikrobiyol Bul* 2009;43:383-90.
12. Aktaş Z, Bal Kayacan Ç. Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. *Scan J Infect Dis* 2008;40:320-5.
13. Metan G, Sanguzel F, Sumerkan B. Factors influencing survival in patients with multi-drug-resistant *Acinetobacter* bacteremia. *Eur J Intern Med* 2009;20:540-4.
14. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC Disk Diffusion Method for Antimicrobial susceptibility testing version 4. http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/version_4_january_2005_final_NH_april_2.pdf
15. Levin AS. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:144-53.
16. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.
17. Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A. Evaluation of a new E-test for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40:2755-9.
18. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 2000;38:1290-2.
19. Katsuno S, Takashi M, Ohshima S, Ohta M, Kato N, Kurokawa H, et al. Direct screening of the IMP-1 metallo-beta-lactamase gene (*bla*_{IMP}) from urine samples by polymerase chain reaction. *Int J Urol* 2001;8:110-7.
20. Aydın NG, Metan G, Altun B, Zarakolu P. Dissemination of a VIM-positive *Pseudomonas aeruginosa* clone in a university hospital, Ankara, Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:378-9.
21. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, et al. Prevalance 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.
22. Young D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2002;40:3798-801.
23. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and E-test methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diag Microbiol Infect Dis* 2004;49:5-11.
24. Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmström A, Qwärnström A, et al. Evaluation of E-test MBL for detection of *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-2} allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2005;43:942-4.
25. Perçin D, Colakoglu S, Durmaz S, Ekincioglu P. Comparison of eripenem-EMB agar with traditional methods for screening carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from rectal swabs. *Mikrobiyol Bul* 2012;46:546-52.
26. Koomanachai P, Tiengrim S, Kiratisin P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of colistin (colistimethate sodium) for therapy of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. *Int J Infect Dis* 2007;11:402-6.
27. Dizbay M, Altuncekcik A, Sezer BE, Ozdemir K, Arman D. Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:39-32.
28. Ergin A, Hasçelik G, Eser OK. Molecular characterization of oxacillinases and genotyping of invasive *Acinetobacter baumannii* isolates using repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction in Ankara between 2004 and 2010. *Scand J Infect Dis* 2013;45:26-31

29. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, European and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1018-29.
30. Akan ÖA, Uysal S. Çoklu dirençli Acinetobacter baumannii ve karbapenem dirençli Klebsiella pneumoniae izolatlarında tigesiklini in vitro etkinlik durumu. *Mikrobiyol Bul* 2008;42:209-15.
31. Akın FE, Bayram A, Balcı İ. Çoğul dirençli Acinetobacter baumannii izolatlarında kolistin, polimiksin B ve tigesiklin direncinin saptanmasında disk difüzyon, E-test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:203-10.
32. Metan G, Alp E, Yıldız O, Percin D, Aygen B, Sumerkan B. Clinical experience with tigecycline in the treatment of carbapenem-resistant Acinetobacter infections. *J Chemother* 2010;22:110-4.
33. Chu YW, Cheung TK, Ngan JY, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa by E-test and an imipenem-EDTA disk method. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:340-1.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Uzm. Dr. Fatma MUTLU SARIGÜZEL

Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği

Kayseri-Türkiye

E-posta: fmutluguzel@gmail.com