



Karbapenemlere Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Metallo-Beta-Laktamaz Enzimlerinin Fenotipik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Investigation of Metallo-Beta-Lactamases in Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains by Phenotypic and Genotypic Methods

M. Duygu AKSOY¹([iD](#)), H. Murat TUĞRUL²([iD](#))

¹ Yozgat Halk Sağlığı Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Bölümü, Yozgat, Türkiye

² Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Emekli Öğretim Görevlisi), Edirne, Türkiye

* Bu çalışma 8. Balkan Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü sunum olarak sunulmuştur (4 Ekim 2013, Veliko Tarnovo, Bulgaristan).

Makale atfı: Aksoy MD, Tuğrul HM. Karbapenemlere dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde metallo-beta-laktamaz enzimlerinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. FLORA 2020;25(3):301-7.

ÖZ

Giriş: Karbapenemlere dirençli *Pseudomonas aeruginosa* kökenleri, hastane infeksiyonlarına ve tedavide ciddi sorunlara neden olmaktadır. *P. aeruginosa* kökenlerinde karbapenem grubu antibiyotiklere dirençte rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimlerinin bulunmasıdır. Şimdiye kadar çok sayıda MBL enzimi tanımlanmıştır. MBL genleri kromozom ya da plazmid üzerinde bulunur ve farklı bakteri kökenleri arasında kolayca yayılabilmektedir. Bu enzimler çinko bağımlıdır ve aktiviteleri etilendiaminotetraasetik asit (EDTA) ile inhibe olmaktadır. Bu yüzden MBL tanımlama testlerinde EDTA'nın inhibisyon özelliğinden yararlanılmaktadır. Bu çalışmada *P. aeruginosa* kökenlerinde MBL varlığının araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metod: Karbapenem grubu antibiyotiklerden herhangi birine orta duyarlı/dirençli olduğu kabul edilen 35 adet *P. aeruginosa* kökeninde MBL varlığı, fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırıldı. Çift disk sinerji testi (ÇDST), 0.1 M ve 0.5 M EDTA kullanılarak yapılan kombine disk difüzyon testleri (KDDT), MBL E-test ve modifiye Hodge testi (MHT) olmak üzere dört farklı fenotipik test kullanıldı. Genotipik olarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM} genleri ve PZR ile *bla*_{NDM} geni araştırıldı. Standart köken olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853, pozitif kontrol olarak VIM-1, VIM-2, IMP-13, SPM-1, NDM-1 tipi MBL üreten *P. aeruginosa* kökenleri kullanıldı.

Bulgular: *P. aeruginosa* kökenlerinde, MBL E-test ile %54.2, 0.5 M ve 0.1 M EDTA ile yapılan KDDT ile sırasıyla %94.2 ve %37.1, ÇDST ile %42.8 oranlarında MBL pozitifliği saptandı. Modifiye Hodge testi ve genotipik yöntem ile MBL direnci saptanmadı.

Sonuç: Fenotipik test sonuçlarının doğru değerlendirilmesi için direnç genlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması da gerekmektedir. *Pseudomonas* türlerinde karbapenem direncinden sorumlu olan en yaygın MBL'lere rastlanmadı. Karbapenem direncinden farklı mekanizmaların sorumlu olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*; Metallo-beta-laktamaz; Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu

Geliş Tarihi/Received: 22/05/2019- Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 18/11/2019

©Telif Hakkı 2020 Flora. Makale metnine www.floradergisi.org web adresinden ulaşılabilir.

Çevrimiçi Yayın Tarihi: 15.10.2020

ABSTRACT

Investigation of Metallo-Beta-Lactamases in Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains by Phenotypic and Genotypic MethodsM. Duygu AKSOY¹, H. Murat TUĞRUL²¹ Department of Microbiology, Yozgat Public Health Laboratory, Yozgat, Turkey² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Trakya University (Retired Lecturer), Edirne, Turkey

Introduction: Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains cause serious problems in treatment. A large number of identified metallo-beta-lactamase (MBL) enzymes produced by *P. aeruginosa* are one of the most important mechanisms in resistance to carbapenems. MBL genes are located on the chromosome or plasmid, and they can easily spread between different bacterial strains. The activities of these enzymes are zinc-dependent, and they are inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Therefore, this advantage is used in MBL identification tests. In this study, it was aimed to determine MBL among *P. aeruginosa* strains.

Materials and Methods: MBL existence was investigated in 35 *P. aeruginosa* strains accepted to be mildly susceptible/resistant to any of the carbapenem group of antibiotics through phenotypic and genotypic methods. Phenotypic tests were performed as double disk synergy test (DDST), combined disk diffusion tests (CDDT) by using 0.1 M and 0.5 M EDTA, MBL E-test, and modified Hodge test (MHT). *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM} genes and *bla*_{NDM} gene were investigated by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and PCR, respectively. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 standard bacteria were used in tests. VIM-1, VIM-2, IMP-13, SPM-1, NDM-1 type MBL-producing *P. aeruginosa* strains were used as positive controls.

Results: Among the carbapenems resistant *P. aeruginosa* isolates, positivity of MBL was found as 54.2% by MBL E-test, 42.8% by DDST, 94.2% and 37.1% by CDDT method using 0.5 M and 0.1 M EDTA, respectively. Modified Hodge test and genotypic method did not detect MBL.

Conclusion: In order to correctly evaluate the results of the phenotypic method, the investigation of resistance genes by molecular methods is also required. The most common metallo-beta-lactamase enzymes responsible for resistance to carbapenem in *Pseudomonas* were not observed. It was thought that different mechanisms might be responsible for the identified carbapenem resistance.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*; Metallo-beta-lactamase; Multiplex polymerase chain reaction

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa nonfermentatif, çevresel izolattan (toprak ve su) insan patojenine geçiş yapabilen, *Pseudomonadaceae* familyasından gram-negatif bir bakteridir. Hastane ortamında pek çok yerde, cihazlarda, hatta dezenfektan solüsyonlarında bile canlılığını sürdürmektedir. Özellikle bağışık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır^[1].

Son yıllarda, *P. aeruginosa* kökenlerinde gelişen çoklu antibiyotik direnci dünya genelinde önemli bir sorun haline gelmiştir. Başta sefalosporinler olmak üzere pek çok antibiyotiğe direnci nedeniyle karbapenemler tedavide yaygın olarak kullanılmakta ve buna bağlı olarak son yıllarda karbapenemlere dirençli kökenler hızla artmaktadır. *P. aeruginosa* ve diğer gram-negatif bakterilerin karbapenemlere direnci geliştirmesinde en önemli mekanizmalardan biri karbapenemazların üretimi-

dir. Aktif bölgelerinde metal iyonları taşıyan karbapenemaz enzimleri metallo-beta-laktamaz (MBL) olarak adlandırılır. Bu enzimler monobaktamlar hariç, karbapenemleri de kapsayan beta-laktam antibiyotiklere direnci gelişiminden sorumludur. Direnci genleri plazmid ve transpozonlarla taşındığı için diğer bakterilere aktarılabilmektedir^[2].

P. aeruginosa'da tespit edilen MBL'ler İmipenemaz (IMP), Verona İmipenemaz (VIM), Sao Paulo İmipenemaz (SPM), Seul İmipenemaz (SIM), German İmipenemaz (GIM), New Delhi Metallo-beta-laktamaz (NDM), Australian İmipenemaz (AIM), Floransa İmipenemaz (FIM-1), Hamburg Metallo-beta-laktamaz (HMB-1), Central Alberta Metallo-beta-laktamaz (CAM-1) türleridir^[3-6]. Dutch İmipenemaz (DIM-1), Kyorin Üniversitesi Hastanesi İmipenemaz (KHM-1), Tripoli Metallo-beta-laktamaz (TMB-1), Linz Metallo-Beta-Laktamaz (LMB-1) farklı bakterilerde de tanımlanmıştır^[4,7].

Dünyada en yaygın MBL ailesi IMP'dir ve ilk olarak 1988 yılında Japonya'da *P. aeruginosa* suşunda bildirilmiştir^[8]. Ülkemizde ilk kez *P. aeruginosa* kökeninde 2004 yılında Ankara'dan VIM-5 tipi MBL bildirilmiştir^[9]. Günümüze kadar *P. aeruginosa* kökeninde karbapenemaz enzimlerinin çeşitleri ve sayıları hızlı bir artış göstermiştir. Esenkaya ve arkadaşlarının Kasım 2011 – Ekim 2013 tarihlerini kapsayan Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'nde yapmış oldukları çalışma ile *Pseudomonas* spp. kökenlerinde OXA-23, OXA-40 ve OXA-58 tipi karbapenemazların varlığı Türkiye'den ilk kez rapor edilmiştir^[10]. İraz ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yayımlanan çalışmada Guiana extended-spektrum beta-laktamaz (GES-5) ve VIM-38 tipi MBL tespit edilmiştir^[11]. Beriş ve arkadaşları 2015 yılında Rize Devlet Hastanesinde bir kan örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* kökeninde VIM-38 tipi MBL enzimini raporlamışlardır^[12]. Malkoçoğlu ve arkadaşlarının 2017 yılında yayımlanan çalışmasında, İstanbul'da üçüncü basamak bir hastanede karbapenem dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde VIM-1, VIM-2 ve GES-5 tipi karbapenemazların varlığı gösterilmiştir^[13].

Çalışmamızda karbapenem orta duyarlı/dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinde fenotipik ve genotipik yöntemlerle MBL varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışmada, Trakya Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (Hastanesi) Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü'ne Haziran 2011-Haziran 2012 tarihleri arasında gönderilen materyallerden izole edilen ve karbapenem grubu antibiyotiklerden herhangi birine orta duyarlı/dirençli olduğu kabul edilen 35 adet *P. aeruginosa* kökeni incelendi.

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 2011/08.09 sayılı onayı alınarak ve Helsinki Deklarasyonu'na uygun olarak yapıldı.

Pseudomonas aeruginosa Kökenlerinin Tanımlanması

Hastanemizin çeşitli kliniklerinden gönderilen materyallerden izole edilen *P. aeruginosa* kökenlerinin tanımlanmasında, VITEK 2 (Biomerieux, France) tam otomatize sistem ve konvansiyonel identifikasyon yöntemlerini kapsayan Gram boyama,

oksidaz testi, fermentasyon testleri yapıldı. *Escherichia coli* ATCC 25922 ve MBL negatif *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşları kullanıldı. Pozitif kontrol olarak VIM-1, VIM-2, IMP-13, SPM-1, NDM-1 tipi MBL üreten *P. aeruginosa* suşları kullanıldı.

Metallo-Beta-Laktamazın Fenotipik Olarak Tanımlanması

Kökenlere, modifiye Hodge test (MHT), kombine disk difüzyon testi (KDDT), çift disk sinerji testi (ÇDST) ve MBL E-test olmak üzere dört fenotipik test uygulandı^[14].

1. Modifiye Hodge testi: İmipenem duyarlı *E. coli* ATCC 25922 kökeninin, MBL üreten bir bakteri ile birlikte bulunduğu imipenem (IPM) varlığında üreyebilme esasına dayanmaktadır^[14]. İmipeneme duyarlı *E. coli* ATCC 25922 standart susundan elde edilen 0.5 Mc Farland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonların 1:10 sulandırımı yapılarak, steril eküvyon yardımıyla Müller Hinton agar (MHA) üzerine homojen inokülasyonu sağlandı. Besiyeri yüzeyinin kurummasını takiben besiyerinin merkezine IPM diski (10 µg) yerleştirildi. *E. coli* kökenine bağlı oluşan inhibisyon zonunun *P. aeruginosa* üremesinin bulunduğu bölgede azalması ve bu bölgede *E. coli* üremesinin görülmesi pozitif test sonucu olarak kabul edildi.

2. Kombine disk difüzyon testi: IPM inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişlemesi esasına dayanır. Plak içine 2 adet IPM diski yerleştirildi. Bir tanesine EDTA (10 µL) eklendikten sonra inhibisyon zon çapı farkına göre değerlendirme yapıldı. 0.1 M EDTA solüsyonunun eklendiği IPM/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına IPM diski zon çapından ≥ 4 mm, 0.5 M EDTA solüsyonunun eklendiği IPM/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına IPM diski zon çapından ≥ 7 mm büyük ise MBL pozitif bakteri izolatu kabul edildi^[14].

3. Çift disk sinerji testi: İmipenem diski ve merkezinden 20 mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirildi. Üzerine 10 µL, 0.5 M EDTA eklendikten sonra IPM diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirildi^[14].

4. Metallo-beta-laktamaz E-test: Test stribinin (Biomerieux, Solna, İsveç) bir tarafında IPM (256 µg/mL-4 µg/mL), diğer tarafında ise IPM

ve EDTA (64 µg/mL-1 µg/mL) bulunmaktadır. IPM/IPM-EDTA MİK değerleri oranlandığında 8 ve üzerinde bir değer elde edilmesi MBL üreten bakteri izolatu olarak değerlendirildi^[14].

Metallo-beta-laktamazın Genotipik Olarak Tanımlanması

DNA izolasyonu için *P. aeruginosa* kökenleri bir gece Müller Hinton Agar (MHA)'da 37°C'de inkübe edildi. Ependorf tüplerine 500 µL steril distile su konuldu, içerisine 0.5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu edildi. 95°C'lik ısı bloğunda 10 dakika bekletildi, takiben 13.000 g'de 10 dakika santrifüj sonrasında tüpteki üstte kalan sıvıdan 200 µL yeni bir ependorf tüpüne aktarılarak izolasyon tamamlandı.

Çalışmamızda *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SIM-1} gen bölgelerinin primer dizileri Woodford'un çalışmasından seçilerek multipleks PZR protokolü uygulandı^[15]. *Bla*_{NDM-1} gen bölgesi için Zarfel ve arkadaşlarının çalışması kaynak alınarak ayrıca PZR ile araştırıldı^[16]. (Tablo 1).

BULGULAR

P. aeruginosa kökenleri yoğun bakım ünitesinden (%48.5), cerrahi kliniklerden (%31.5), ve dahili kliniklerden (%20) gönderilen klinik örneklerde saptandı. Klinik örneklerden en sık solunum örneklerinden (%37), daha sonra sırasıyla idrardan (%20) ve yara/dokudan (%20) izole edildi.

P. aeruginosa kökenlerinde, MBL E-test %54.2, 0.5 M EDTA'lı KDDT %94.2, 0.1 M EDTA'lı KDDT %37.1 ve ÇDST %42.8 oranlarında MBL pozitifliği gösterildi. Bir diğer fenotipik test olan MHT ile kökenlerin hiçbirinde MBL pozitifliği saptanmadı. Genotipik yöntemlerle de kökenlerde *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{NDM-1} MBL direnç genlerine rastlanmadı (Şekil 1).

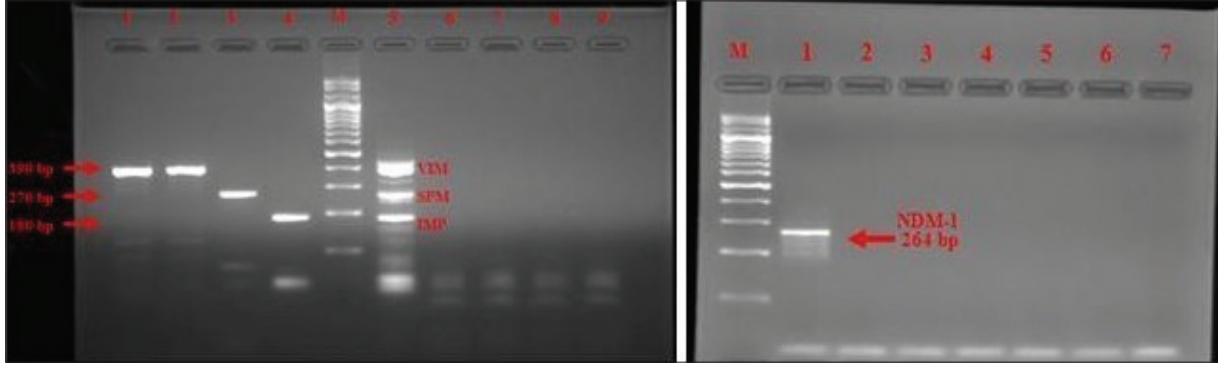
TARTIŞMA

P. aeruginosa kökenleri her ortamda bulunabilirler ve daha da önemlisi hastane ortamında da kolay yaşayabilirler. Özellikle çoğul antibiyotik direnci kazanmaları nedeniyle hastane infeksiyonları arasında önemli bir yere sahiptirler. *P. aeruginosa* immün sistemi baskılanmış olanlarda, genel durumu kötü, bilinci kapalı ve uzun süre entübe olan hastalarda, ağır yanıklı kişilerde, malign veya ciddi metabolik hastalığı bulunanlarda, uygunsuz şekilde uzun süre antibiyotik kullananlarda, uzun süre kemoterapi ve radyoterapi alanlarda, yaşlılarda infeksiyon etkeni olarak önem kazanmaktadır.

Son yıllarda dikkat çekici nokta *P. aeruginosa* kökenlerinde hızla artan karbapenem direncidir. Karbapenem direncine birden fazla mekanizma neden olabilmektedir. Kromozomal kaynaklı OprD değişikliği ve aktif eflüks mekanizmalarının yanı sıra aktarılabilen, plazmid kaynaklı MBL üretimine bağlı direnç en yaygın görülenleridir^[17].

Tablo 1. Metallo-beta-laktamaz üretiminden sorumlu *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{NDM-1} gen bölgelerine spesifik primer dizileri

Gen Bölgesi	Primer Adı	Nükleotid Dizisi (5'-3')	Kaynak	
<i>bla</i> _{IMP} (188bp)	F1	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	Woodford 2010	
	R1	CCAAACCACTACGTTATCT		
<i>bla</i> _{SPM-1} (271bp)	F4	AAAATCTGGGTACGCAAACG		
	R4	ACATTATCCGCTGGAACAGG		
<i>bla</i> _{VIM} (390bp)	F2	GATGGTGTGGTTCGCATA		
	R2	CGAATGCCGACACCAG		
<i>bla</i> _{GIM-1} (477bp)	F3	TCGACACACCTTGGTCTGAA		
	R3	AACTCCAACCTTGGCCATGC		
<i>bla</i> _{SIM-1} (570bp)	F5	TACAAGGGATTCCGGCATCG		
	R5	TAATGGCCTGTTCCCATGTG		
<i>bla</i> _{NDM-1} (264bp)	F	ACCGCTGGACCGATGACCA		Zarfel ve arkadaşları 2011
	R	GCCAAAGTTGGGCGCGGTTG		



Şekil 1. bla_{VIM-1} , bla_{VIM-2} , bla_{SPM-1} , bla_{IMP-13} genlerinin Multipleks PZR ve bla_{NDM-1} geninin PZR ile %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi.

MBL üreten etkenlerin yayılımının takip ve kontrolü toplum sağlığı açısından önemlidir. Bu yüzden tanımlamada fenotipik testler ilk değerlendirme için yararlı olabilir. Ancak genotipik yöntemler ile sonuçların doğrulanması gerekmektedir. Çalışmamızda kökenlere, MHT, KDDT, ÇDST, MBL E-test olmak üzere dört fenotipik test uygulandı.

Fenotipik testlerden, MBL E-test %54.2, 0.5 M EDTA'lı KDDT %94.2, 0.1 M EDTA'lı KDDT %37.1 ve ÇDST %42.8 oranlarında MBL pozitifliği gösterirken, Modifiye Hodge testi ile kökenlerin hiçbirinde MBL pozitifliği saptanmadı. Kökenlerde PCR yöntemiyle araştırılan bla_{VIM} , bla_{IMP} , bla_{SPM-1} , bla_{GIM-1} , bla_{SIM-1} , bla_{NDM-1} genlerinin hiçbirini saptanamadı. Ülkemizde *P. aeruginosa* kökenlerinde fenotipik olarak MBL üretimi değişik oranlarda bulunmasına rağmen, MBL direnç genlerinin negatif saptandığı çalışmalar mevcuttur. Aktas ve arkadaşları KDDT, ÇDST, MBL E-test ile MBL pozitif bulunan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* kökenlerinde bla_{VIM} , bla_{IMP} genleri açısından pozitiflik tespit etmemiştir^[14]. Küçükbaşmacı ve arkadaşları multipleks PZR yöntemi ile IPM'ye dirençli veya orta dirençli 51 adet *P. aeruginosa* kökeninde bla_{VIM} , bla_{IMP} genini saptamamışlardır^[18]. Ankara'da 79 *Acinetobacter* kökeni üzerinde yapılan başka bir çalışmada IPM direnci E-test ile %51.9'unun, kombine disk sinerji testi ile %58.2'sinin, çift disk sinerji testi ile %55.7'sinin, MHT ile %69.6'sinin MBL ürettiği saptanmış, PZR yöntemiyle bla_{IMP-1} geni araştırılmış, ancak pozitiflik bulunamamıştır^[19]. Benzer şekilde *Acinetobacter* kökenlerinde yapılan bir diğer çalışmada KDDT ile %51.6'sında MBL pozitif saptanmış, ancak kökenlerde bla_{IMP-1} ve bla_{VIM-2} genleri ne-

gatif saptanmıştır^[20]. Türk Dağı ve arkadaşlarının çalışmasında karbapenem dirençli *A. baumannii* kökenlerinin %69'u KDDT ile MBL pozitif saptanmıştır. Ancak PZR ile kökenlerin hiçbirinde bla_{IMP} , bla_{VIM} genleri saptanamamıştır^[21].

MBL'nin EDTA ile inhibisyonu özelliği üzerine tasarlanmış olan MBL E-test, KDDT ve ÇDST gibi fenotipik testler bakterinin hücre zarı geçirgenliğini arttırabilmektedir ve bakterisidal etkili olabilmektedir^[22]. *A. baumannii* kökenlerinde yapılan bir çalışmada ÇDST ile %42.3, MBL E-test ile %79.4 oranında MBL pozitifliği saptanmasına rağmen, kökenlerin hiçbirinde bla_{IMP} , bla_{VIM} ve bla_{SPM} genleri saptanamamıştır. Sonuç olarak yazarlar iki olasılık üzerinde durmuştur. Birincisi EDTA'nın bakterisidal aktivitesine bağlı olarak fenotipik testlerde yanlış MBL pozitifliği olabileceğidir. İkincisi ise incelenmeyen diğer MBL genlerinden (bla_{NDM} gibi) kaynaklı gerçek MBL pozitifliğidir^[23]. Çoğu çalışmada *P. aeruginosa* kökenlerinde MBL enzimleri dışında karbapenem direncine neden olan aktif dışa pompalama sistemleri ve dış membran porin kaybını içeren mekanizmalar gösterilmiştir^[24-26]. Abbas ve arkadaşları 50 adet çoklu antibiyotik direnci gösteren *Pseudomonas* kökenini incelemişlerdir. MBL üretiminin fenotipik tespitinde, 5 imipenem dirençli izolatın sadece 2'sinin (%40) MBL pozitif olduğu saptanmıştır. PCR analizi, tüm suşların MexAB-R, OprD ve AmpC genlerine sahip olduğunu göstermiştir, bölgede yaygın olan bla_{VIM} geni araştırılmış ancak tespit edilememiştir^[27]. Rostami ve arkadaşları 107 adet *Pseudomonas* kökenlerinde yüksek düzey karbapenem direncinde birçok direnç mekanizmasının [bla_{IMP} (%17.9), bla_{VIM} (%1.2) genleri, mexB (%63.2), mexY (%52.6), ampC (%36.8)

aktif dışa pompalama sistemleri ve oprD porin kaybı (%21.1) gibi bir arada rol oynadığını göstermişlerdir^[28]. Mirsalehian ve arkadaşları *Pseudomonas* kökenlerinde yapmış oldukları bir diğer çalışmada bla_{VIM} , bla_{IMP} , bla_{OXA-48} , bla_{KPC} , bla_{GES} , bla_{GIM} , bla_{AIM} , bla_{SPM} , bla_{NDM} ve bla_{SIM} genlerini ve OprD mutasyonunu araştırmışlardır. Sonuç olarak kökenlerinde tümünde OprD mutasyonu, %47.1'inde bla_{VIM} , %3.7'sinde bla_{IMP} genleri saptanmıştır^[29]. Çin'de 28 hastanenin katıldığı karbapenem dirençli 258 *P. aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada da karbapenem direnç mekanizmaları incelenmiş ve dirence neden olan MBL enzimlerine ilave olarak farklı beta-laktamazlar saptamışlar ve çalışmaya alınan bütün *P. aeruginosa* kökenlerinde OXA-50 geni, bir *P. aeruginosa* kökenlerinde GES-5 geni saptanmıştır. Ayrıca dış membran porin defektinin de karbapenem direncinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Kökenlerin %79.8'inde OprD mutasyon varlığını göstermişler. MBL pozitifliği saptadıkları 22 (%8.5) kökende ise bla_{VIM-2} , bla_{IMP-9} , bla_{IMP-1} genleri bulunmuştur^[30]. Bir diğer benzer çalışma da Mac Aogáin ve arkadaşlarının *P. aeruginosa* kökenlerinde direnç mekanizmaları ile ilgili yaptıkları çalışmada IPM dirençli kökenlerin yaklaşık %85'inde oprD porin kaybı gözlemlenmiştir^[31].

Karbapenem dirençli kökenlerin hızlı ve doğru tespiti, uygun antibiyotik ve kombinasyonların belirlenebilmesi ile tedavide başarı oranının artırılması açısından oldukça önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığında MBL tespitinde fenotipik testler uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ancak, moleküler yöntemlerle doğrulamadan hiçbir test tek başına kullanılabilecek kadar özgül değildir^[32,33].

Çalışmamızın limitasyonu genotipik yöntemde kullanılan primer ve aranılan genetik bölgelerin sadece bla_{VIM} , bla_{IMP} , bla_{SPM-1} , bla_{GIM-1} , bla_{SIM-1} , bla_{NDM-1} MBL direnç genleri ile sınırlı olması idi. Bundan sonraki hedef diğer karbapenemaz enzimlerinin, dış membran porin defektinin, aktif dışa pompalama sistemlerindeki etkili genlerin ve şimdiye kadar tanımlanmış MBL enzimlerinin mümkün olduğunca çoğuna özgü primer setleri kullanılarak PZR analizinin yapılmasıdır.

TEŞEKKÜR

VIM-1, VIM-2, SPM-1, NDM-1 tipi MBL enzimleri üreten *P. aeruginosa* kökenlerini sağlayan

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ'a katkı ve yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışma için, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı (2011/08.09).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

YAZAR KATKISI

Anafikir/Planlama: MDA, HMT

Analiz/Yorum: MDA, HMT

Veri sağlama: MDA, HMT

Yazım: MDA

Gözden Geçirme ve Düzeltme: HMT

Onaylama: HMT

KAYNAKLAR

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Pseudomonas ve ilişkili Bakteriler* (Çeviri: P. Çıragil) Başustaoğlu AC, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M, Yapar M (Editörler) Tıbbi Mikrobiyoloji.9. baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti; 2010:333-41.
2. Bush K. Past and Present Perspectives on b-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:10.
3. Pfennigwerth N, Lange F, Belmar Campos C, Hentschke M, Gatermann SG, Kaase M. Genetic and biochemical characterization of HMB-1, a novel subclass B1 metallo-b-lactamase found in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1068-73.
4. Cornaglia G, Giamarello H, Rossolini GM. Metallo-b-lactamases: a last frontier for b-lactams? *Lancet Infect Dis* 2011;11:381-93.
5. Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, et al. FIM-1, a new acquired metallo-b-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:410-6.
6. Boyd DA, Lisboa LF, Rennie R, Zhanel GG, Dingle TC, Mulvey MR. Identification of a novel metallo-b-lactamase, CAM-1, in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Canada. 2019;74:1563-7.
7. Lange F, Pfennigwerth N, Hartl R, Kerschner H, Achleitner D, Gatermann SG, et al. LMB-1, a novel family of class B3 MBLs from an isolate of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73:2331-5.
8. Peymani A, Farivar TN, Ghanbarlou MM, Najafipour R. Dissemination of *P. aeruginosa* producing blaIMP-1 and blaVIM-1 in Qazvin and Alborz educational hospital, Iran. *Iran J Microbiol*. 2015;7:302-9.

9. Bahar G, Mazzariol R, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rosolini 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.
10. Esenkaya Taşbent F, Özdemir M. The presence of OXA type carbapenemases in *Pseudomonas* strains: first report from Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49:26-34.
11. Iraz M, Duzgun AO, Cicek AC, Bonnin RA, Ceylan A, Saral A, et al. Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing b-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78:292-4.
12. Beriş FŞ, Akyıldız E, Özad Düzgün A, Say Coşkun US, Sandalli C, Çopur Çiçek A. A Novel Integron Gene Cassette Harboring VIM-38 Metallo-b-lactamase in a Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolate. *Ann Lab Med.* 2016;36:611-3.
13. Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B, Otlı B, Bulut ME. VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. *Microb Drug Resist.* 2017;23:328-34.
14. Aktaş Z, Kayacan CB. Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. *Scand J Infect Dis* 2008;40:320-5.
15. Woodford N. Rapid Characterization of b lactamases by Multiplex PCR. In: Gillespie SH. and McHugh TD (Eds.). *Antibiotic Resistance Protocols.* 2th ed. London: Humana Press; 2010. p.181-92.
16. Zarfel G, Hoenigl M, Leitner E, Salzer HJ, Feierl G, Masoud L et al. Emergence of New Delhi metallo-b-lactamase, Australia. *Emerg Infect Dis* 2011;17:129-30.
17. Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics.* 2019;8:37.
18. Küçükbasmacı Ö, Midilli K, Issa G, Güven Ö, Gönüllü N. VIM ve IMP Tipi Metallo Beta Laktamaz Genlerinin Hızlı Saptanması İçin Yeni Bir Multipleks PZR Metodu. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30:1312-6.
19. Ulusoy Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N, Dolapçı İ, Karahan ZC, Baran I ve ark. İmipenem dirençli *Acinetobacter* İzolatlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2011;41:29-36.
20. Eser ÖK, Ergin A, Haşçelik G. Erişkin hastalardan izole edilen *Acinetobacter* türlerinde antimikrobiyal direnç ve metallo-beta-laktamaz varlığı. *Mikrobiyol Bul* 2009;43:383-90.
21. 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;26:187-92.
22. Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, Monteiro N, Nagy E, Peixe L. Controlling for false positives: interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:657-8.
23. Shoja S, Moosavian M, Rostami S, Abbasi F, Tabatabaiefar MA, Peymani A. Characterization of Oxacillinase and Metallo-b-Lactamase Genes and Molecular Typing of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Ahvaz, South-West of Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2016;13:9.
24. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldı O, Aydoğan S, et al. Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Infect Dev Ctries.* 2018;12:1-8.
25. Horna G, Lopez M, Guerra H, Saenz Y, Ruiz J. Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2018;8:16463.
26. Kim CH, Kang HY, Kim BR, Jeon H, Lee YC, Lee SH, et al. Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals. *J Microbiol.* 2016;54:44-9.
27. Abbas HA, El-Ganiny AM, Kamel HA. Phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Afr Health Sci.* 2018;18:11-21.
28. Rostami S, Farajzadeh Sheikh A, Shoja S, Farahani A, Tabatabaiefar MA, Jolodar A et al. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J Chin Med Assoc.* 2018;81:127-32.
29. Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Taherikalani M, Jabalameli F, Emaneini M. Determination of carbapenem resistance mechanism in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients, in Tehran, Iran. *J Epidemiol Glob Health.* 2017;7:155-9.
30. Wang J, Zhou JY, Qu TT, Shen P, Wei ZQ, Yu YS, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:486-91.
31. Mac Aogain M, Kulah C, Rijnsburger M, Celebi G, Savelkoul PH, O'Gara F, et al. Characterization of imipenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:262-5.
32. Bedenic B, Ladavac R, Vranic LM, Barsic N, Karcic N, Sreter KB, et al. False positive phenotypic detection of Metallo-Beta-Lactamases In *Acinetobacter baumannii* *Acta Clin Croat.* 2019;58:113-8.
33. Azimi L, Talebi M, Owlia P, Pourshafie MR, Najafi M, Lari ER, et al. Tracing of false negative results in phenotypic methods for identification of carbapenemase by Real-time PCR. *Gene.* 2016 15;576:166-70.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Uzm. Dr. M. Duygu AKSOY

Yozgat Halk Sağlığı Laboratuvarı,
Mikrobiyoloji, Yozgat-Türkiye

E-posta: dr_m.duygu@hotmail.com