

## Karbapenem Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Metallo Beta Laktamaz Üretiminin Araştırılması\*

Ahmet Mansur<sup>1</sup>, Selma Ay<sup>2</sup>, Barış Otlu<sup>2</sup>, Nilay Güçlüer<sup>2</sup>, Yasemin Ersoy<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Yeşilyurt Hasan Çalık Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Malatya

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

<sup>3</sup>İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

### Özet

**Amaç:** Bu çalışmada nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilen, karbapenemlere dirençli 29 *Pseudomonas aeruginosa* izolatında metallo beta-laktamaz üretiminin belirlenmesi ve üç farklı fenotipik yöntemin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** *Pseudomonas aeruginosa* izolatları konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış, antibiyotik duyarlılık testleri Clinical and Laboratory Standards Institute standartlarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Karbapenem direncini doğrulamak için imipenem E test ve meropenem E test (AB BIODISK, Solna, İsveç) kullanılmıştır. Metallo beta-laktamaz üretimini belirlemek için metallo beta-laktamaz E test (AB BIODISK, Solna, İsveç), modifiye Hodge testi ve imipenem-EDTA kombine disk testi kullanılarak sonuçlar polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Karbapenemlere dirençli 29 izolatta polimeraz zincir reaksiyonu ile IMP, VIM, GIM, SIM ve SPM tipi metallo beta-laktamaz enzim geni bulunamamıştır. Fenotipik testlerden kombine disk testi ile altı izolat, E test ile iki izolat pozitif sonuç vermiştir. Modifiye Hodge testi ile 10 izolat pozitif sonuç vermiş, iki izolatta ise sonuç belirlenememiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile metallo beta-laktamaz E test sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ). Polimeraz zincir reaksiyonu ile kombine disk testi sonuçları arasındaki farkın anlamlı olduğu ( $p:0,023$ ) ve yine polimeraz zincir reaksiyonu ile modifiye Hodge testi sonuçları arasında farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p < 0,001$ ).

**Sonuç:** Bulgularımıza göre; karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatları için metallo beta-laktamaz tarama testi olarak metallo beta-laktamaz E testin kullanılması uygundur, ancak pozitif sonuçların moleküler yöntemler ile doğrulanması gereklidir.

**Anahtar Kelimeler:** *Pseudomonas Aeruginosa*; Metallo Beta-Laktamaz; Metallo Beta-Laktamaz E Test; Kombine Disk Testi; Polimeraz Zincir Reaksiyonu

### Investigation of Metallo Beta-lactamase Production in Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

### Abstract

**Objective:** In this study; we aimed to determine metallo beta-lactamase production in 29 *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to carbapenems that isolated as a cause of nosocomial infection and to compare the three different phenotypic methods for screening of metallo beta-lactamase production.

**Material and Methods:** *P.aeruginosa* isolates were identified by conventional methods. Antibiotic susceptibility tests were performed by Kirby-Bauer disk diffusion method according to the standards of Clinical and Laboratory Standards Institute. Imipenem and meropenem E tests (AB Biodisk, Sweden) were used for verification of carbapenem resistance. Metallo beta-lactamase E test (AB Biodisk, Sweden), modified Hodge test and imipenem-EDTA combined disk test were used for detection of metallo beta-lactamase production and the results of these tests were compared with polymerase chain reaction results.

**Results:** IMP, VIM, GIM, SIM and SPM type genes were negative for all isolates with polymerase chain reaction. As a screening test for metallo beta-lactamase enzymes, combined disk test and E test detected positivity for six and two isolates, respectively. Modified Hodge test yielded 10 positive and two undetermined results within 29 isolates.

There were no statistical difference between metallo beta-lactamase E test results and polymerase chain reaction results ( $p > 0,05$ ). But, there were significantly statistical difference between polymerase chain reaction results and combined disk test ( $p:0,023$ ) and modified Hodge test ( $p < 0,001$ ) results.

**Conclusion:** According to our results; metallo beta-lactamase E test is suitable method for screening metallo beta-lactamase enzymes in carbapenem resistant *P.aeruginosa* isolates, however; positive results of this test should be confirmed with molecular methods.

**Key Words:** *Pseudomonas Aeruginosa*; Metallo Beta-Lactamase; Metallo Beta-Lactamase E Test; Combined Disk Test; Polymerase Chain Reaction

## GİRİŞ

*Pseudomonas aeruginosa* birçok antimikrobiyal ilaca doğal olarak dirençlidir ve günümüzde kullanılan antimikrobiyallere direnci hastanelere göre değişebilmektedir. Enfeksiyonların tedavisi sırasında

antibiyotiklere direnç geliştirebilmesi tedavi güçlüğüne neden olmakta ve direnç profilinin sürekli izlenmesini gerekli kılmaktadır (1). *P.aeruginosa*'da; kromozomal ve plazmid kaynaklı beta-laktamazların üretimi, hedef ve porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, efluks pompa sistemi ile antimikrobiyal ilacın dışarı atılması başlıca direnç

mekanizmalarıdır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ve AmpC tipi beta-laktamazların yanı sıra imipenem (IMP) ve/veya meropenemi hidrolize edebilen karbapenemaz enzimlerine sahiptirler. Karbapenemaz enzimleri içerisinde klinik yönden en önemlileri metallo-beta-laktamaz(MBL) enzimleridir. Aztreonam hariç tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilen MBL enzimlerini kodlayan genler plazmid ve integronlarda lokalize olabilmekte, bu durum direncin diğer bakterilere aktarılmasını mümkün kılmaktadır. *P. aeruginosa*'da IMP, VIM, SPM, GIM ve SIM tipi MBL'lar tanımlanmış olup, VIM-2 şu an dünyada en yaygın olan MBL enzimidir (2,3). Türkiye'de yapılmış çalışmalarda da *blaVIM-2*, *blaVIM-5* ve *blaIMP-1* tipi MBL genleri taşıyan *P. aeruginosa* izolatları bildirilmiştir (4-6). Karbapenemlerin tedavide yoğun olarak kullanılmasına paralel olarak son yıllarda OXA tipi karbapenemaz enzimi bildirimleri de artmaktadır (2,7-9).

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezinde nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında MBL üretiminin üç farklı fenotipik yöntemle araştırılması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Turgut Özal Tıp Merkezinde, Ocak-Aralık 2009 tarihleri arasında yatarak tedavi gören hastaların Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'ne gönderilen klinik örneklerinden izole edilen, Amerika'daki Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) kriterlerine göre hastanemiz Enfeksiyon Kontrol Komitesince hastane enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanan, karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatu çalışma kapsamına alınmıştır (10). Her hastaya ait tek bir örnek çalışılmıştır. Gram negatif, aerob, nonfermentatif, hareketli, oksidaz pozitif, karakteristik trimetilamin kokusuna sahip, beyin-kalp infüzyon buyuonunda 37°C ve 42°C'de üreyen, Mueller-Hinton agar (OXOID, Hampshire, İngiltere) besiyerinde maviyemiş pigment yapan suşlar *P.aeruginosa* olarak değerlendirilmiştir (11-13).

Antibiyotik duyarlılık testleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine göre ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır (14). Karbapenem direncini doğrulamak için imipenem ve meropenem E test (AB BIODISK, Solna, İsveç) üretici firmanın önerilerine göre çalışılarak sonuçları değerlendirilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu(PZR) yönteminde kontrol suşları olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *blaVIM* pozitif *P. aeruginosa* (Dr. Zeynep Gülay'dan sağlanmıştır) kullanılmıştır.

MBL üretiminde fenotipik tarama testleri olarak modifiye Hodge testi, IMP-EDTA kombine disk testi ve IMP/IMP+EDTA E test (IP/IPI E test: MBL E test) kullanılmıştır. Modifiye Hodge Testi için *E. coli* ATCC 25922 suşu kanlı agar plağına ekim yapılarak bir gece

etüvde 35°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kolonilerinden 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak, Mueller-Hinton agar (MHA) plağının tüm yüzeyini kaplayacak şekilde ekimi yapılmıştır. Plak 15 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra merkeze IMP diski yerleştirilmiştir. İmipenem ve/veya meropeneme dirençli olan *P.aeruginosa* suşlarının ekimi karşılıklı olacak şekilde, merkezden perifer doğru çizgi şeklinde yapılmıştır. 35°C'de 20 saatlik inkübasyondan sonra IMP diskinin oluşturduğu inhibisyon zonu çapında görülen yonca yaprağı şeklinde en küçük bir bozulma MBL pozitifliği olarak değerlendirilmiştir (15,16).

IMP-EDTA kombine disk testi için 0,5M EDTA solüsyonu hazırlanmıştır. 18.61 g disodium EDTA.H<sub>2</sub>O (MERCK, Darmstadt, Almanya) 100 ml'lik steril distile suda çözülerek, pH 8.0'e ayarlanmış ve +4°C'de saklanmış, MBL enzim inhibitörü olarak IMP-EDTA kombine disk testinde kullanılmıştır. MHA plağı üzerine imipenem ve/veya meropeneme dirençli olan *P.aeruginosa* suşlarının ekimi yapılmıştır. Plağın bir yarısına 25 mm aralıkla iki adet IMP diski yerleştirilmiş, bir tanesinin üzerine 0,5 M EDTA solüsyonundan 10 µl pipetle damlatılarak diskin solüsyonu absorbe etmesi sağlanmıştır. 35°C'deki etüvde 18 saatlik inkübasyon sonrasında IMP-EDTA diski etrafındaki inhibisyon zonu çapının, IMP diski etrafındaki inhibisyon zonu çapından (≥7 mm) daha büyük olması MBL pozitifliği olarak değerlendirilmiştir (17).

MBL E test (AB BIODISK, Solna, İsveç) üretici firmanın önerilerine göre çalışılmıştır. Bir gecelik inkübasyon sonrasında imipenem ve/veya meropeneme dirençli veya orta derecede duyarlı olan *P.aeruginosa* izolatlarından 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanarak, MHA plaklarına ekilmiştir. MBL E test şeritleri plaklara yerleştirilmiş, 35°C'deki etüvde 18 saatlik inkübasyon sonrasında IMP için bulunan MİK değeri, IMP+EDTA için bulunan MİK değerine oranlanmıştır. Üretici firmanın önerilerine göre ≥3 dilüsyonluk (≥8 kat) fark saptanan izolatlar MBL pozitif olarak değerlendirilmiştir (18-20).

Metallo beta-laktamaz üretimine neden olan IMP, VIM, GIM, SIM ve SPM genleri Ellington ve ark.'nın tanımladığı şekilde multipleks PZR yöntemiyle araştırılmıştır (21). Yöntem kısaca şu şekilde uygulanmıştır. 18-24 saatlik kültürden elde edilen bakteri suşlarından DNA izolasyonu QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Multipleks PZR için ticari olarak hazır mastermiks(QIAGEN, Hilden, Almanya) kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon koşulları; 95°C'de 15 dk denatürasyonu takiben 40 siklus 94°C'de 30 sn, 55°C'de 90 sn, 72°C'de 90 sn olarak uygulanmıştır. Son uzama için 72°C'de 10 dk bekletilmiş, amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel de elektroforeze tabi tutularak UV transilluminator altında görüntülenmiştir.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 17.0 (SPSS Incorporated, Chicago) programında; Fisher'in Ki-kare testi (p<0.05: anlamlı) kullanılarak yapılmıştır.

## BULGULAR

İzolatların %72'si yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edildi. İzolatların elde edildikleri örneklere dağılımı trakeal aspirat (10/29), idrar (6/29), yara (4/29), kan (3/29), dren (3/29), balgam (2/29) ve katater (1/29) şeklindedir. En sık neden oldukları enfeksiyonlar sırası ile; pnömoni (% 41), cerrahi alan enfeksiyonu (% 24), idrar yolu enfeksiyonu (% 21) ve sepsis (% 10) olarak saptandı. İzole edilen 29 *P. aeruginosa* örneğinde disk difüzyon metodu ile karbapenem direnci belirlendi ve bu direnç imipenem ve meropenem E test ile doğrulandı. İmipenem E test ile izolatların 15'i dirençli (MIK  $\geq$  16  $\mu\text{g/ml}$ ), 13'ü orta derecede duyarlı (MIK: 8-12  $\mu\text{g/ml}$ ) olarak bulundu. İmipeneme duyarlı (MIK: 4  $\mu\text{g/ml}$ ) olan bir izolatın meropeneme dirençli (MIK: 16  $\mu\text{g/ml}$ ) olduğu belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. 29 *P. aeruginosa* izolatının imipenem ve meropenem duyarlılığı.

İmipenem	Duyarlı Dirençli*	Meropenem		Toplam
		Duyarlı	Dirençli*	
	-	1	1	
	10	18	28	
	<b>Toplam</b>	10	19	29

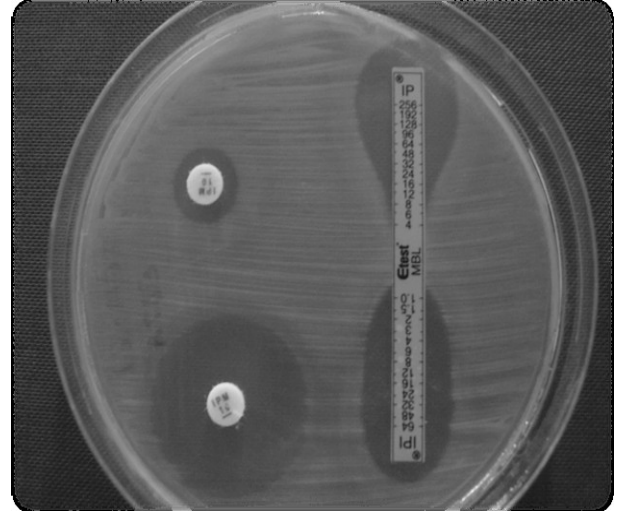
\*İmipenem ve/veya meropeneme orta derecede duyarlı olan izolatlar da tabloda dirençli olarak gösterilmiştir.

MBL üretimini belirlemek için yapılan fenotipik testlerden E test ile iki izolat, kombine disk testi ile altı izolat, modifiye Hodge testi ile 10 izolat pozitif bulunmuştur. E test ile MBL pozitif bulunan iki izolat kombine disk testi ile de pozitif sonuç vermiştir. E test ile negatif sonuç alınan dört izolatta kombine disk testi ile pozitif sonuç alınmıştır. Modifiye Hodge testi diğer iki testle ortak pozitiflik ve negatiflikler vermiş ve iki izolatta sonuç belirlenememiştir. Karbapenemlere dirençli 29 izolatta multipleks PZR ile MBL geni saptanmamıştır (Tablo 2, Resim 1,2,3).

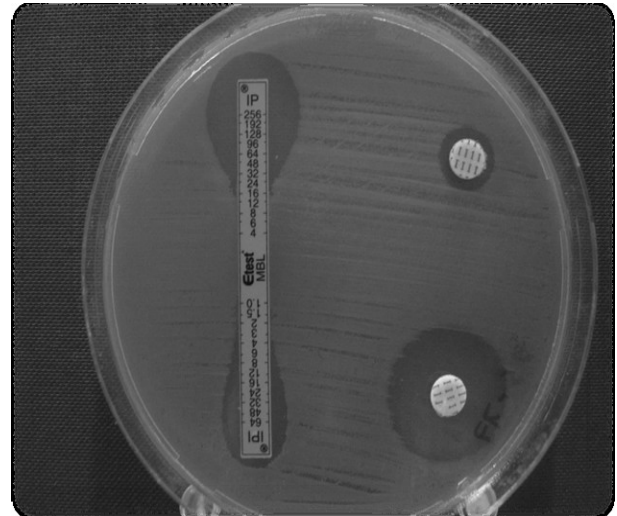
Buna göre PZR sonuçları ile E test sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Ancak PZR sonuçları ile kombine disk testi sonuçları arasındaki fark ( $p:0,023$ ) ve modifiye Hodge testi sonuçları arasındaki fark ( $p < 0,001$ ) anlamlıdır.

Tablo 2. Karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatında, standart suşta ve *blaVIM* pozitif suşta fenotipik testlerle MBL sonuçları

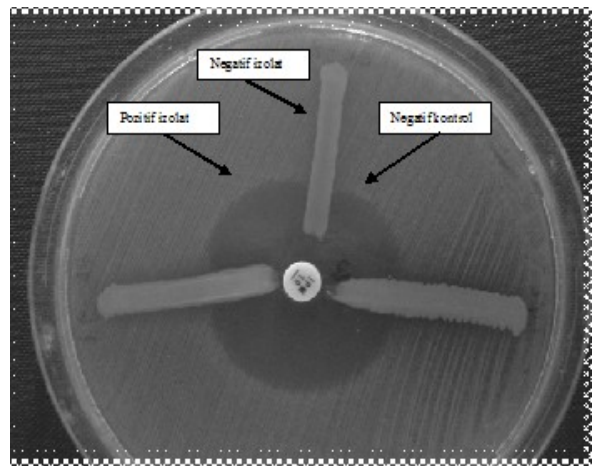
	Modifiye Hodge testi	Kombine disk testi	E test
Pozitif	10 (%34)	6 (%21)	2 (%7)
Negatif	17 (%59)	23 (%79)	27 (%93)
Belirlenemeyen <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853(Negatif kontrol)	2 (%7)	-	-
<i>P. aeruginosa</i> <i>blaVIM</i> pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
	Pozitif	Pozitif	Pozitif



Resim 1. MBL E test ve kombine disk testi pozitif izolat.



Resim 2. MBL E test negatif, kombine disk testi pozitif izolat



Resim 3. Modifiye Hodge testi

## TARTIŞMA

Karbapenemlerin *P.aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde yoğun olarak kullanılması son yıllarda bu antibiyotiklere karşı direncin artmasına yol açmıştır. *P.aeruginosa*'da düşük düzey karbapenem direnci OprD porin proteini kaybı, aktif efluks pompa sistemleri ve İBL salgılayan dereprese mutantların oluşumu, OXA tipi karbapenemaz enzimleri gibi birkaç faktörün bir arada bulunmasıyla mümkündür. Ambler moleküler sınıf B grubu MBL enzimleri ise yüksek düzeyde karbapenem direncinden sorumludur ve klinik yönden en önemli karbapenemazlardır. *P.aeruginosa*'da tanımlanmış olan IMP, VIM, SPM ve GIM tipi MBL'ların üretimi genellikle karbapenemlerin yanı sıra diğer beta-laktam antibiyotiklerde de direnç gelişimine neden olmaktadır. Sadece monobaktamlar MBL'ların hidrolitik özelliklerinden etkilenemeyebilirler (2,8,22).

MBL üreten bakteriler ile oluşan enfeksiyonlarda bu direncin saptanması ve yayılmasının kontrol edilmesi gerekmektedir. Ancak uygulanacak önlemler karbapenemlere dirençli herhangi bir suşla oluşan enfeksiyondakinden farklı değildir. Daha çok epidemiyolojik çalışmalar açısından önemli olan MBL pozitif suşların saptanması için rutin laboratuvarlarda kullanılacak hızlı, güvenilir ve maliyet etkin fenotipik tarama testlerine ihtiyaç vardır. Fakat *P.aeruginosa*'da MBL saptanması için henüz CLSI'nin önerdiği standart bir tarama testi bulunmamaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında modifiye Hodge testi, IMP-EDTA kombine disk testi, IMP-EDTA çift disk sinerji testi ve MBL E test MBL saptanmasında kullanılan basit tarama testleridir. Duyarlılık ve özgüllük oranı en yüksek yöntem olsa da bugün için sayıları artmış olan MBL subtiplerini PZR ile saptamak sık kullanılan bir yöntem değildir (22-28). Modifiye Hodge testini geliştiren Lee ve ark.'nın 2001 yılındaki çalışmasında PZR ile *blaVIM-2* geni pozitif bulunmuş olan 493 *P. aeruginosa* klinik izolatında modifiye Hodge testi'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise % 88 olarak bildirilmiştir (15). Yine aynı araştırmacılar 2003 yılında *blaIMP-1* veya *blaVIM-2* geni pozitif 39 *P. aeruginosa* klinik izolatında modifiye Hodge testinin performansını yeniden değerlendirmişlerdir. Çalışmada 26 pozitif, 10 şüpheli ve 3 negatif sonuç elde etmişler ve testin duyarlılığının düşük olduğunu açıklamışlardır (16). Araştırmacılar 2008 yılında yaptıkları çalışmada ise imipenem dirençli 415 klinik *P. aeruginosa* izolatının 45'inde PZR ile MBL geni saptamışlardır. Ancak çalışmada tarama testi olarak modifiye Hodge testi kullanıldığında 117 izolatta MBL pozitif sonuç alındığını rapor etmişlerdir (23). Modifiye Hodge testi için Lee ve arkadaşlarının yöntemi tekrar modifiye etme çalışmaları devam etmektedir.

Bizim çalışmamızda imipenem ve/veya meropenem dirençli 29 izolatta MBL üretimini belirlemek için kullanılan modifiye Hodge testi; IMP-EDTA kombine disk testi ve MBL E testten oldukça farklı sonuçlar vermiştir. Modifiye Hodge testi ile %34 (10/29) oranında pozitiflik saptanmış, 2 izolatta sonuç belirlenememiştir. PZR ile 29 izolatın tamamı MBL negatif olduğundan, iki test

arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Bu nedenle *P. aeruginosa* için MBL taramasında modifiye Hodge testi sonuçlarının güvenilir olmadığı saptanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız diğer fenotipik yöntemler MBL E test ve IMP-EDTA kombine disk yöntemidir. Gerek çalışma kolaylığı, gerek sayısal sonuç vermeleri ve yorumlama kolaylığı nedeniyle MBL E test ve IMP-EDTA kombine disk testinin kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda *P.aeruginosa* izolatları için MBL E test duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla %75-100 ve %86-100 olarak, IMP-EDTA kombine disk testi duyarlılık ve özgüllük oranları ise sırasıyla %86-100 ve %91-100 olarak bildirilmiştir (17-20, 24-28).

Türkiye'de yapılmış çalışmalardan Bahar ve ark. 2003 yılında Ankara'da 53 yaşında bir hastadan izole ettikleri, ancak enfeksiyon etkeni olarak düşünmedikleri bir *P.aeruginosa* izolatında *blaVIM-5* geni saptamışlardır (4). Bu, MBL üreten *P. aeruginosa* izolatı olarak Türkiye'den yapılan ilk bildirimdir. Çalışmada daha önce Türkiye'den bildirilmiş VIM-5 enzimi üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarına dikkat çekilerek, MBL enzimlerinin Gram negatif patojenler arasındaki yayılma potansiyeli vurgulanmıştır.

Özgümüş ve ark. 2007 yılında Rize'de PZR yöntemi ile 10 *P. aeruginosa* izolatının birinde *blaVIM* geni, dokuzunda *blaIMP-1* geni saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada MBL E test IMP-1 geni taşıyan dokuz izolatın sadece dördünde pozitif sonuç vermiştir (5).

Yakupoğulları ve ark. 2006 yılında Elazığ'da iki yaşında kistik fibrozisli bir hastadan izole edilen ve MBL E test ile pozitif sonuç alınan *P.aeruginosa* suşunda *blaVIM-2* geni saptamışlardır (6).

Bayraktar ve ark.'nın çalışmasında yoğun bakım ünitesinden izole edilen 27 *P.aeruginosa* suşundan 17'sinde (%63) E test ile MBL pozitif bulunmuştur ancak sonuçlar genotipik yöntemler ile doğrulanmamıştır (29).

Toraman ve ark.'nın çalışmasında karbapenemlere dirençli 42 *Pseudomonas* suşunda MBL E test uygulanmış ve 10 *P.aeruginosa* (%24) suşunda MBL pozitif bulunmuştur, ancak bu çalışmada da sonuçlar PZR ile doğrulanmamıştır (30).

Sunulan bu çalışmada imipenem ve/veya meropenem dirençli 29 izolatın altısında kombine disk testiyle, ikisinde MBL E test ile pozitiflik saptanmıştır. PZR ile hiçbir izolatta MBL geni saptanamamıştır. MBL taramasında gerek pozitif gerekse negatif sonuç alınan ancak PZR ile MBL geni negatif bulunan 29 *P.aeruginosa* izolatında muhtemelen OprD porin proteini kaybı sonucu karbapenem direnci ortaya çıkmakta, buna bağlı olarak imipenem direnç yanında meropenem azalmış duyarlılık gözlenmektedir. Meropenem ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin farklı kanallardan dış membranı geçebilmesi azalmış duyarlılığı açıklar niteliktedir. Ayrıca OprD porin proteini kaybına bağlı olarak karbapenem direnci gelişimi sadece kromozomal AmpC tipi beta-

laktamaz (İBL) üreten suşlarda görülmekte olup, bu iki direnç mekanizması arasında yakın ilişki vardır (31-33). *P.aeruginosa* izolatlarının çoğu İBL pozitif olduğundan izole karbapenem direnci bu iki mekanizmanın birlikteliğine bağlı olabilir. Yine karbapenemler dahil çoklu ilaç direncine sahip izolatlarda OprD porin proteini kaybıyla birlikte efluks pompa sistemlerinin ve OXA tipi karbapenemaz enzimlerinin dirençten sorumlu olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz PZR sonuçları ile MBL E test sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ). PZR sonuçları ile kombine disk testi ve modifiye Hodge testi sonuçları arasındaki fark anlamlıdır ( $p:0,023$  ve  $p<0,001$ ). Üç farklı fenotipik yöntemin hepsinde hatalı pozitiflikler görülmektedir. Bununla birlikte her ne kadar maliyet etkin olmasa da MBL E test karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında epidemiyolojik amaçlı MBL taraması için rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek hızlı, güvenilir bir fenotipik tarama testi olarak öne çıkmaktadır. Ancak MBL E test ile tarama sonucu pozitif bulunan izolatlarda hatalı pozitifliklerin olabileceği düşünülerek, MBL varlığının moleküler yöntemler ile doğrulanması uygun olacaktır.

*Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından, 2010-144 nolu proje olarak desteklenmiştir*

#### KAYNAKLAR

- Pier GB, Ramphal R: *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p.2587-615.
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance, J Med Microbiol 2009;58:1133-48.
- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002;8:321-31.
- 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.
- Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y: Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2002;40:3798-801.
- Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmström A, Qvarnstrom A 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.
- Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Gales A: Evaluation of a new E test for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol 2002;40:2755-9.
- 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. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;49:5-11.
- Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N: Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2007;59:321-2.
- Özgümüş OB, Caylan R, Tosun I, Sandallı C, Aydın K, Köksal I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a university hospital in Turkey. Microb Drug Resist 2007;13:191-8.
- Yakupogulları Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P: Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey. J Antimicrob Chemother 2008;61:221-2.
- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? Curr Opin Microbiol 2000;3:489-95.
- Poirel L, Nordmann P: Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. Curr Pharm Biotechnol 2002;3:117-27.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.
- Horan TC, Andrus M, Dudeck MA: CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control 2008;36:309-32.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA: Pseudomonads, Acinetobacters, and uncommon Gram-negative bacteria. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, eds. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th edition. New York: TheMcGraw-Hill Co; 2007. p. 263-7.
- Pitt TL, Simpson AJH: *Pseudomonas* and *Bulkholderia* spp. In: Gillespie SH, Hawkey PM, eds. Principles and Practice of Clinical Bacteriology, 2th edition. New York: John Wiley and Sons Ltd; 2006. p.427-35.
- Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P et al: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2006. p.317-23.
- Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th Informational Supplement, M100-S19, CLSI. Pennsylvania: Wayne. 2009.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH: Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001;7:88-91.
- 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.
- Bush K: Metallo-beta-lactamases: a class apart. Clin Infect Dis 1998;27(Suppl 1):48-53.
- Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho JH, Kang JO et al: Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. Yonsei Med J 2009;50:335-9.
- Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Pasteran F, Viale AM, Vila AJ et al: Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo-beta-lactamases in nonfermentative gram-negative bacteria. J Clin Microbiol 2005;43:5648-52.
- 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.
- Samuelsen O, Buaro L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A: Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. J Antimicrob Chemother 2008;61:827-30.
- Qu TT, Zhang JL, Wang J, Tao J, Yu YS, Chen YG et al: Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-

- beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. J Clin Microbiol 2009;47:1136-42.
28. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL: Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol 2005;43:3129-35.
29. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E: Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34:248-52.
30. Toraman AZ, Yakupoğulları Y, Kizirgil A: *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz araştırılması. İnfeksiyon Derg 2005;19:101-5.
31. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE: Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1085-90.
32. Nikaïdo H: Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. Clin Infect Dis 1998;27(Suppl 1):32-41.
33. Lambert PA: Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med 2002;95 (Suppl 41):22-6.

Received/Başvuru: 29.05.2012, Accepted/Kabul: 10.08.2012

#### Correspondence/İletişim

Selma AY  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MALATYA  
E-mail: selma.ay@inonu.edu.tr

#### For citing/Atıf için:

Mansur A, Ay S, Otlu B, Gucluer N, Ersoy Y. Investigation of Metallo Beta-lactamase Production in Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J Turgut Ozal Med Cent 2013; 20(3):237-242 DOI: 10.7247/jtomc.20.3.9