



## Evaluation of Metallo Beta Lactamase E test Results from Different Brands of Mueller Hinton Agar Plates

### MBL E Test Araştırmasında 5 Farklı Marka Müller-Hinton Agar Besiyerlerinden Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Selma Ay<sup>1</sup>, Ahmet Mansur<sup>2</sup>, Barış Otlu<sup>1</sup>, Ayfer Serindağ<sup>1</sup>, Mehmet Sait Tekerekoğlu<sup>1</sup>, Fikret Karademir<sup>3</sup>

<sup>1</sup>İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye  
<sup>2</sup>Yeşilyurt Hasan Çalık Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Malatya, Türkiye  
<sup>3</sup>Muşla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Marmaris, Türkiye

#### Abstract

**Aim:** MBL E test for MBL screening in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates is recommended as a fast and reliable phenotypic screening test. However, as it has been put forward by some researchers, because of variations in antibiotic susceptibility tests or MBL E test with different brands of Müller- Hinton Agar (MHA) media, the possibility that carbapenem MIC values and MBL E test results can, therefore, be influenced by these media. To this end, we aim to determine the most suitable MHA media to be used in search for MBL E test in routine microbiology laboratories by employing five different brands of MHA media.

**Materials and Methods:** 29 carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalised patients have been used in this study. *P. aeruginosa* isolates were identified by conventional methods. Imipenem and meropenem E test were used for verification of carbapenem resistance. MBL E test was used for detecting MBL production by five different brands of Mueller Hinton agar plates and the results of these tests were compared with polymerase chain reaction (PCR) results.

**Results:** IMP, VIM, GIM, SIM and SPM type genes were found to be negative with polymerase chain reaction for 29 isolates that were resistant to carbapenem. One isolate with BBL brand MHA, two isolates with Oxoid brand MHA, 19 isolates with Himedia brand MHA, 21 isolates with Merck brand MHA, and 27 isolates with Plasmatec brand MHA gave positive results.

**Conclusion:** The present results indicate that use of BBL or Oxoid brand MHA media, especially in laboratories without any facilities for molecular diagnosis, can be more reliable compared to other brands.

**Keywords:** MBL E Test; *Pseudomonas Aeruginosa*; Metallo Beta-Lactamase.

#### Öz

**Amaç:** Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında MBL taraması için MBL E test; hızlı ve güvenilir fenotipik test olarak önerilmektedir. Ancak antibiyotik duyarlılık testlerinde MBL E testinde kullanılan farklı marka Müller- Hinton Agar (MHA) besiyerlerinde karbapenem MİK değerleri ve MBL E test sonuçlarının etkilenebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle çalışmamızda 5 farklı marka MHA besiyeri kullanarak, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL E test araştırılmasında kullanılacak en uygun marka MHA besiyerini belirlemeyi amaçladık.

**Gereçler ve Yöntemler:** Çalışmada yatan hastalardan izole edilen, karbapenemlere dirençli 29 *Pseudomonas aeruginosa* izolatları konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmıştır. Karbapenem direncini doğrulamak için imipenem ve meropenem E test (AB BIODISK, Solna, İsveç) kullanılmıştır. MBL üretimini belirlemek için MBL E test (AB BIODISK, Solna, İsveç) beş farklı marka (Oxoid, BBL, Merck, Himedia, Plasmatec) Müller Hinton agar (MHA) besiyerinde test edilmiş ve elde edilen 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 geni saptanmamıştır. MBL E test ile BBL marka MHA besiyerinde bir izolat (1/29), Oxoid marka MHA besiyerinde iki izolat (2/29), Himedia marka MHA besiyerinde 19 izolat (19/29) Merck marka MHA besiyerinde 21 izolat (21/29), Plasmatec marka MHA besiyerinde 27 izolat (27/29) pozitif sonuç vermiştir.

**Sonuç:** Moleküler tanı yapma olanağı olmayan laboratuvarlarda MBL E test araştırmalarında BBL ve Oxoid marka besiyerlerinin, diğer besiyerlerine oranla daha güvenilir bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** MBL E Test; *Pseudomonas Aeruginosa*; Metallo Beta-Laktamaz.

Received/Başvuru: 10.07.2015  
Accepted/Kabul: 28.08.2015

#### Correspondence/İletişim

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

#### For citing/Atf için

Ay S, Mansur A, Otlu B, Serindağ A, Tekerekoğlu MS, Karademir F. Evaluation of metallo beta lactamase e test results from different brands of mueller hinton agar plates. J Turgut Ozal Med Cent 2016;23(1):21-5

DOI: 10.5455/jtomc.2015.3217

## GİRİŞ

*P.aeruginosa* birçok antimikrobiyal ilaca doğal olarak dirençli bir mikroorganizmadır. 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), AmpC tipi beta-laktamazlar, 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 (1-3). Türkiye'de yapılmış çalışmalarda *bla*VIM-2, *bla*VIM-5 ve *bla*IMP-1,OXA-48 tipi MBL genleri taşıyan *P. aeruginosa* izolatları bildirilmiştir. Ülkemiz için bunlar arasında en önemlisi ve yaygını OXA-48 olmakla birlikte, son yıllarda artan oranlarda NDM-1 ve KPC-2 enzimleri de bildirilmiştir. Karbapenemazların hızla yayılması tedavi ve enfeksiyon kontrolü açısından ciddi sorun oluşturmaktadır (4-6). Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında MBL taraması için MBL E test; hızlı ve güvenilir bir fenotipik tarama testi olarak önerilmektedir (7,8). Ancak yaptığımız literatür taramasında gerek antibiyotik duyarlılık testlerinde, gerekse MBL E testinde farklı marka Müeller- Hinton Agar (MHA) besiyerlerinin test sonucunu etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (8-10). Bu nedenle çalışmamızda 5 farklı MHA besiyeri kullanarak, MBL E test araştırılmasında kullanılabilcek en uygun besiyerini belirlemeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada yatarak tedavi gören hastaların laboratuvarımıza gönderilen klinik örneklerinden izole edilen, karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatı çalışma kapsamına alınmıştır. Her hastadan tek bir örnek çalışılmıştır. Gram negatif, aerop, nonfermentatif, hareketli, oksidaz pozitif, karakteristik trimetilamin kokusuna sahip, Mueller-Hinton agar (OXOID, Hampshire, İngiltere) besiyerinde mavi-yeşil pigment yapan suşlar *P.aeruginosa* olarak değerlendirilmiştir (1,3).

Antibiyotik duyarlılık testleri Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI) önerilerine göre ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır (11). Karbapenem direnci, imipenem ve meropenem E test (AB BIODISK, Solna, İsveç) ile doğrulanmıştır. MBL üretiminde fenotipik tarama testi olarak MBL E test (IP/IPI E test: AB BIODISK, Solna, İsveç) kullanılmıştır. Her bir izolat için, beş farklı marka MHA besiyeri kullanılmış ve MBL E testleri eş zamanlı olarak çalışılmıştır. Bu amaçla Oxoid(OXOID LTD.Basingstroke,hampshire,England; Lot no :654362), BBL(Becton Dickinson and Company,France; Lot no:7015175), Merck(Darmstadt, Germany; Lot no :VL219337 046), Himedia(Himedia

Laboratory Put.LTD.,Mumbai, India; Lot no:0000079622 ) ve Plasmatec(Plasmatec Laboratory Product LTD, UK; Lot no: 106100/308) marka MHA besiyerleri kullanılmıştır.

MBL-E test için, bir gecelik inkübasyon sonunda 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  $\geq 3$  dilüsyonluk ( $\geq 8$  kat) fark saptanan izolatlar MBL pozitif olarak değerlendirilmiştir (7,8).

Metallo beta-laktamaz üretimine neden olan IMP, VIM, GIM, SIM ve SPM genleri daha önce tanımlandığı şekilde, multipleks PZR yöntemiyle araştırılmıştır (13). Bu amaçla; 18-24 saatlik kültürden elde edilen örneklerden DNA izolasyonu, QIAmp DNA mini kit(QIAGEN, Hilden, German) kullanılarak yapılmıştır. Amplifikasyon için mastermik(QIAGEN, Hilden, German)kiti kullanılmıştır. 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 jelde elektroforeze tabi tutularak UV transilluminator altında görüntülenmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 17.0(SPSS Incorporated, Chicago) programında Ki-kare testi( $p < 0.05$ : anlamlı) kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri, MBL E test ve multipleks PZR yönteminde kontrol suşları olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853, *bla*VIM pozitif *P. aeruginosa*, OXA-48 *Klebsiella pneumoniae* ve NDM-1 *Klebsiella pneumoniae* kullanılmıştır.

## BULGULAR

İzolatların %72'si yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilmiştir. İzolatların elde edildikleri örnekler göre dağılımı sıklık sırasına göre; trakeal aspirat (10/29), idrar(6/29), yara (4/29), kan (3/29), dren (3/29), balgam (2/29) ve katater (1/29) şeklindeydi. 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 yöntemi ile karbapenem direnci belirlendi ve bu direnç imipenem ve meropenem E test ile doğrulandı. İmipenem E test ile izolatların 15'i dirençli (MİK  $\geq 16$   $\mu$ g/ml), 13'ü orta derecede duyarlı (MİK: 8-12  $\mu$ g/ml) olarak bulundu. İmipeneme duyarlı (MİK: 4  $\mu$ g/ml) olan bir izolatın meropeneme dirençli (MİK: 16  $\mu$ g/ml) olduğu belirlendi (Tablo 1). Karbapenemlere dirençli 29 izolatla multipleks PZR ile IMP, VIM, GIM, SIM ve SPM tipi MBL geni saptanamadı. Bu izolatlara beş farklı marka MHA besiyerlerinde MBL-E testi yapıldı. MBL E test ile BBL marka MHA besiyerinde bir izolat (1/29), Oxoid marka MHA besiyerinde iki izolat (2/29), Merck marka MHA besiyerinde 21 izolat (21/29), Plasmatec marka MHA besiyerinde 27 izolat (27/29), Himedia marka MHA besiyerinde 19 izolat (19/29) 'ın MBL pozitif olduğu belirlendi.

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

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

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

**Tablo 2.** PZR ile MBL negatif 29 *P. aeruginosa* izolatında, standart suş ve MBL pozitif suşlarda 5 farklı marka besiyerinde elde edilen MBL E test sonuçları

İzolat No	Oxoid	BBL	Merck	Plasmatec	Himedia
1	negatif	negatif	negatif	pozitif	pozitif
2	negatif	negatif	negatif	pozitif	pozitif
3	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
4	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
5	negatif	negatif	pozitif	pozitif	negatif
6	negatif	negatif	negatif	pozitif	pozitif
7	negatif	negatif	negatif	pozitif	negatif
8	negatif	negatif	pozitif	pozitif	negatif
9	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
10	pozitif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
11	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
12	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
13	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
14	pozitif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
15	negatif	negatif	pozitif	pozitif	negatif
16	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
17	negatif	negatif	negatif	pozitif	pozitif
18	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
19	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
20	negatif	negatif	negatif	pozitif	pozitif
21	negatif	negatif	pozitif	pozitif	negatif
22	negatif	negatif	pozitif	pozitif	negatif
23	negatif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
24	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
25	negatif	negatif	negatif	pozitif	negatif
26	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
27	negatif	negatif	pozitif	pozitif	negatif
28	negatif	negatif	pozitif	negatif	negatif
29	negatif	negatif	pozitif	pozitif	pozitif
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
blaVIM pozitif <i>P. aeruginosa</i>	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
OXA 48 <i>K.pneumoniae</i>	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
NDM-1 <i>K.pneumoniae</i>	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif

## TARTIŞMA

*P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde yoğun olarak kullanılması nedeniyle son yıllarda karbapenemlere karşı direnç artmaktadır. *P.aeruginosa*'da düşük düzey karbapenem direnci OprD porin proteini kaybı, aktif efluks pompa sistemleri ve IBL 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 MBL'ların üretimi genellikle karbapenemlerin yanı sıra diğer beta-laktam antibiyotiklere de direnç gelişimine neden olmaktadır (1,2,13).

BBL marka ve Oxoid marka MHA besiyerlerinde elde edilen MBL E test sonuçları ile PZR sonuçları arasındaki istatistiksel farkın anlamlı olmadığı ( $p > 0,05$ ; Fisher'in *Ki-kare testi*), ancak Merck, Plasmatec ve Himedia marka MHA besiyerlerinden elde edilen MBL E test sonuçları arasında istatistiksel olarak farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p < 0,001$ ; *continuity correction*), (Tablo 2)

Özellikle epidemiyolojik çalışmalar açısından önemli olan MBL pozitif suşların saptanması için rutin laboratuvarlarda kullanılacak hızlı, güvenilir ve maliyet etkin fenotipik tarama testlerine ihtiyaç vardır. 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. Gerek çalışma kolaylığı, gerek sayısal sonuç vermeleri ve yorumlama kolaylığı nedeniyle MBL E testin 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 bildirilmiştir (7,12-17).

Çalışmamızda imipenem ve/veya meropenem dirençli 29 izolatın hiçbirinde PZR ile MBL geni saptanamamıştır. MBL E test ile pozitif saptadığımız örneklerde MBL

geninin negatif olması, muhtemelen OprD porin protein kaybı sonucu karbapenem direncinin ortaya çıkmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Meropenem ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin farklı kanallardan dış membranı geçebilmesi de azalmış duyarlılığı açıklar niteliktedir. Yine karbapenemler dahil çoklu ilaç direncine sahip izolatlarda OprD porin protein kaybıyla birlikte efluks pompa sistemlerinin ve OXA tipi karbapenemaz enzimlerinin dirençten sorumlu olabileceği söylenebilir (18-20).

MBL E test için çalışma prospektüsünde, testin mutlaka MHA besiyerinde çalışılması önerilmekte ve farklı marka MHA besiyerlerinin çinko oranları farklı olabileceğinden, karbapenem MİK değerlerinin ve MBL E test sonuçlarının markalara göre değişebileceği belirtilmektedir. Tutarlı sonuçlar için tercihen BD marka MHA(Bio Science, USA) besiyeri önerilmektedir (MBL E test package insert, AB BIODISK, Solna, Sweeden). MHA besiyerindeki iyon konsantrasyonlarının antibiyotik duyarlılık testleri ve MBL E test yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyen ve bu amaçla farklı marka besiyerlerinin bir arada kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (8-10). Mazarrasa ve arkadaşları (9) E-test yöntemi ile Tigesiklin MIC değerlerini üç farklı marka Mueller-Hinton Agar besiyerinde incelemişler. Merck marka besiyerinde hem standart suşların hem de klinik örneklerin MIC değerlerini Oxoid ve Difco marka besiyerlerine göre yüksek bulmuşlardır. Merck MHA'ın diğer iki markaya göre daha yüksek manganez içerdiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada Difco ve Merck marka MHA besiyerlerinin çinko içeriği Oxoid marka MHA besiyerine göre 2-2,5 kat yüksek bulunmuştur. Araştırılan diğer iyon konsantrasyonları (Fe, Ca, Mg, Ni, Cd, Pb) üç farklı marka besiyeri için benzer bulunmuştur. Torrico ve ark.(10) enterik bakterilerde tigesiklin duyarlılığını farklı marka MHA besiyerlerinde ve agar dilüsyon, broth mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri ile araştırmışlardır. En yüksek MIC değerini Oxoid marka ile, en düşük inhibisyon zonu değerini Oxoid ve bioMereux besiyerinde saptarken, E-test ile en düşük MIC değerini Difco ve Merck marka besiyerinde saptadıklarını bildirmişlerdir. Walsh ve arkadaşları (8) yaptıkları çalışmada farklı marka MHA(Accumedia, BDMS, Oxoid, Difco ve Remel) plaklarındaki MBL E test sonuçlarını irdelemiş ve Difco hariç diğer marka MHA plaklarındaki sonuçların kabul edilebilir olduğunu belirtmişlerdir.

Sonuç olarak; MBL E test, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında MBL taraması için rutin laboratuvarlarda kullanılacak hızlı, güvenilir fenotipik tarama testi olarak önerilmektedir. Ancak testin yapılacağı besiyerinin seçimi önem arz etmektedir. Çalışmamızda MBL E test için beş farklı marka MHA besiyeri ile elde ettiğimiz sonuçlar testte kullanılan besiyerinin markasına göre farklılık göstermiştir. MBL E test için BBL ve Oxoid marka MHA besiyerleri ile alınan sonuçlar PZR sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Özellikle moleküler tanı yapma olanağı olmayan mikrobiyoloji laboratuvarlarda MBL E test araştırmalarında BBL ve Oxoid marka besiyerlerinin denenen diğer besiyerlerine oranla daha güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

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

## KAYNAKLAR

1. 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. USA: McGraw-Hill Co; 2013. p.245-49.
2. Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009;58:1133-48.
3. Pitt TL, Simpson AJH. Pseudomonas and Burkholderia spp. In: Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2th edition. England: John Wiley and Sons Ltd; 2006. p. 427-35.
4. 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.
5. 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.
6. Gülay Z. Enterobacteriaceae Moleküler Epidemiyolojisi, ANKEM Derg 2014;28:73-6.
7. 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.
8. 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.
9. Mazarrasa CF, Mazarrasa O, Calvo J, Arco A, Martínez LM. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. J Clin Microbiol 2009; 47: 827-9.
10. Torrico M, González N, Giménez MJ, Alou L, Sevillano D, Navarro D, Díaz-Antolín MP, Larrosa N, Aguilar L, Garcia-Escribano N. Influence of media and testing methodology on susceptibility to tigecycline of Enterobacteriaceae with reported high tigecycline MIC. J Clin Microbiol 2010;48:2243-6.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th Informational Supplement, M100-S19, CLSI. Pennsylvania: Wayne 2009.
12. 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.
13. Palzkill T. Metallo-β-lactamase structure and function. Ann N Y Acad Sci 2013;1277:91-104.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. Ochs MM, Mc Cusker 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.
  20. Lister PD, Walter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clin Microbiol Rev 2009;22:582-610.