

Klinik örneklerden izole edilen karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında metallo-beta-laktamaz enzimi varlığının iki farklı fenotipik yöntemle araştırılması

Investigation of the presence of metallo-beta-lactamase enzyme in two different phenotypic methods in carbapenem resistant Acinetobacter baumannii strains isolated from clinical specimens

Sami Kınıklı¹, Kader Doğan¹, Salih Cesur¹, Ayşe Büyükdemirci¹, Serap Yağcı², Çiğdem Ataman Hatipoğlu¹, Esra Kaya Kılıç¹, Bedia Dinç²

¹Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

²Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) suşları pek çok antibiyotik grubuna karşı direnç geliştirebilen nozokomiyal enfeksiyon etkenleridir. *A. baumannii* suşlarında karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç mekanizmalarından birisi de metallo-beta-laktamaz enzimi üretimidir. Metallo-beta-laktamaz enzimleri (VIM, IMP vb.) aztreonam dışındaki tüm beta-laktamazları inhibe eden, çinko iyonuna gereksinim duyan enzimlerdir. Bu çalışmanın amacı, karbapeneme dirençli *A. baumannii* suşlarında metallo-beta-laktamaz varlığının iki farklı fenotipik yöntemle araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapeneme dirençli 82 *A. baumannii* suşu dahil edildi. Bakteri identifikasyonu konvansiyonel yöntemler ve BD Phoenix (Becton Dickinson, USA) otomatize sistemi ile gerçekleştirildi. Antibiyotik duyarlılık testleri EUCAST önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. MBL varlığı kombine disk yöntemi ve modifiye Hodge testi ile araştırıldı.

Bulgular: Karbapeneme dirençli 82 *A. baumannii* suşunun 3'ünde (% 3,7), kombine disk yöntemiyle MBL enzimi saptanırken, Modifiye Hodge testi çalışılan 70 *A. baumannii* suşunun 27 (%39)'sinde MBL üretimi saptandı.

Sonuç: Hastanemizde karbapeneme dirençli *A. baumannii* suşlarında kombine disk yöntemiyle MBL enzimi pozitifliği düşük oranda saptanırken, modifiye Hodge testi ile yüksek oranda saptanmıştır. İki yöntem arasında korelasyon saptanmamıştır. Sonuç olarak, MBL enzim varlığının referans yöntem olan moleküler yöntemlerle belirlenerek iki fenotipik yöntemden hangisinin daha uygun olduğunun belirlenmesi uygun bir yaklaşım olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, metallo-beta-laktamaz, kombine disk yöntemi, modifiye Hodge yöntemi

ABSTRACT

Aim: *Acinetobacter baumannii* strains are nosocomial infections that can develop resistance to many antibiotic strains. One of the mechanisms of resistance of the carbapenem group to antibiotics in *A. baumannii* strains is the production of metallo-beta-lactamase enzyme. Metallo-beta-lactamase enzymes (VIM, IMP, etc.) are enzymes that inhibit all beta-lactamases outside of aztreonam and require zinc ions. The aim of this study is to investigate the presence of metallo-beta-lactamase in carbapenem resistant *A. baumannii* strains by two different phenotypic methods.

Material and Method: The study included 82 *A. baumannii* strains isolated in various clinical specimens resistant to carbapenem. Bacteria identification was performed using conventional manners and an automated system from BD Phoenix (Becton Dickinson, USA). Antibiotic susceptibility tests were determined by disc diffusion method in accordance with the EUCAST recommendation. MBL presence was investigated by the combined disc method and the modified Hodge test.

Results: MBL enzyme was detected by combined disc method in 3 of carbapenem resistant 82 *A. baumannii* strains (3.7%), whereas MBL production was detected in 27 of 70 *A. baumannii* strains tested (Modified Hodge test)

Conclusion: In our hospital, MBL enzyme positivity was detected at low rate by combination disc method in carbapenem resistant *A. baumannii* strains, but it was detected high with the modified Hodge test. No correlation was found between the two methods. In conclusion, it would be appropriate to identify the presence of MBL enzyme by molecular methods which are the reference methods and to determine which of the two phenotypic methods is more appropriate.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, metallo-beta-lactamase, combined disc method, modified Hodge method

Sorumlu Yazar: Salih Cesur, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ulucanlar Cd, Altındağ, Ankara, Türkiye

E-posta: scesur89@yahoo.com

Tel: +90 312 595 30 00

Geliş Tarihi: 29.03.2018 **Kabul Tarihi:** 05.04.2018

Corresponding Author: Salih Cesur, Ankara Training and Research Hospital, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Ulucanlar Street, Ankara, Turkey

E-mail: scesur89@yahoo.com

Phone: +90 312 595 30 00

Received: 2018.03.29 **Accepted:** 2018.04.05

Cite this article as: Kınıklı S, Doğan K, Cesur S, Büyükdemirci A, Yağcı S, Ataman Hatipoğlu Ç, Kaya Kılıç E, Dinç B. Klinik örneklerden izole edilen karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında metallo-beta-laktamaz enzimi varlığının iki farklı fenotipik yöntemle araştırılması. *J Health Sci Med* 2018; 1(1): 9-12

GİRİŞ

A. baumannii doğada ve hastane ortamında yaygın olarak bulunabilen, farklı mekanizmalarla çoğul antibiyotik direnci gösterebilen nozokomiyal patojenlerdir (1).

Son yıllarda karbapeneme dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* ineksiyonları ülkemizde ve dünyada önemli bir sorundur. Her iki bakteride de antibiyotik direnci beta-laktamaz enzimleri, dış membran proteinleri ve penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklikler, eflüks pompa sistemi ve porin kaybı vb. mekanizmalarla gelişebilir (2).

Metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimleri Ambler sınıflamasında B sınıfında yer alan, plazmid aracılıklı enzimler olup, başlıca MBL enzimleri IMP ve VIM'dir. Bu enzimler aztreonam dışındaki tüm beta-laktamazları hidrolize eden ve çinko iyonuna gereksinim duyan bir beta-laktamaz enzimidir. MBL enzimleri, aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunan enzimlerdir ve klasik beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken, etilen diammin tetra asetik asit (EDTA) veya merkaptobileşikler gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar (3,4). Bu özelliğinden faydalanılarak, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri için fenotipik doğrulama yöntemi olarak ertapenem veya meropenem diskinin kullanıldığı modifiye Hodge yöntemi önerilmektedir, ancak; bu yöntemin nonfermentatif Gram negatif basillerdeki karbapene-

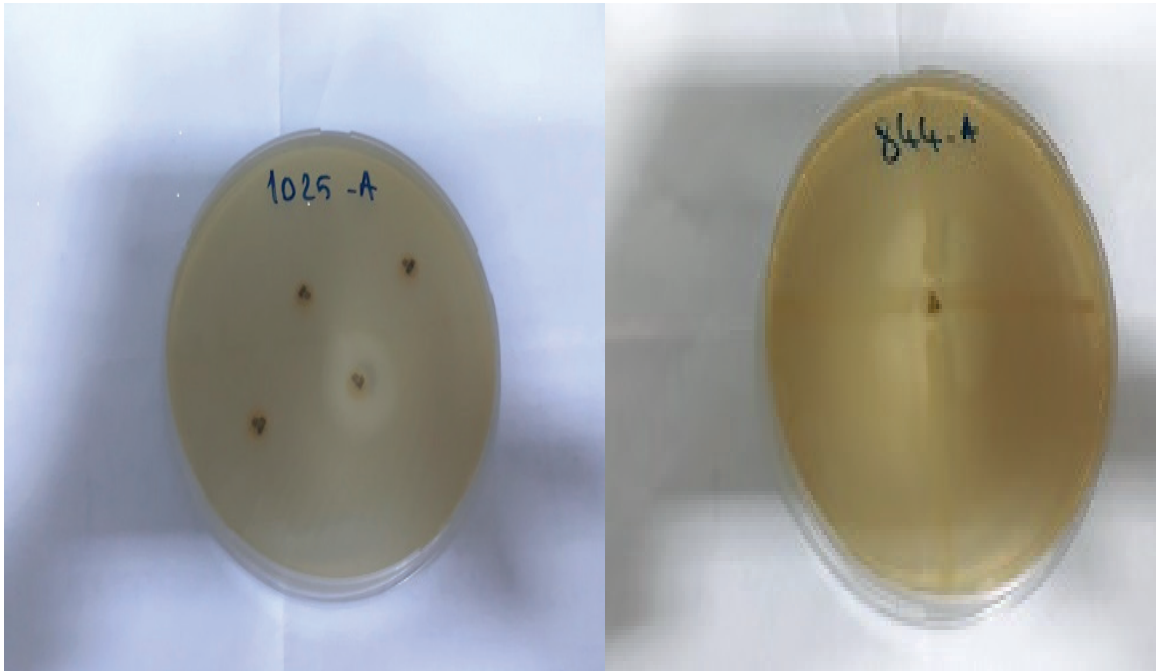
nemaz üretiminin saptanmasında kullanılabilirliğine ilişkin yeterli veri bulunmamaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında çift disk sinerji testi, IPM-EDTA kombine disk testi, MBL E-test ve modifiye Hodge testi gibi fenotipik testler, nonfermentatif Gram negatif basillerde MBL saptanmasında kullanılan başlıca fenotipik yöntemlerdir (1,5-7).

Son yıllarda, Modifiye Hodge testinin MBL enzimlerinin saptanmasında yalancı pozitif sonuç verdiği bildirilmektedir (8).

Bu çalışmada, hastanemizde yatan hastaların çeşitli kültür örneklerinden izole edilen *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında MBL varlığının kombine disk yöntemi ve Modifiye Hodge testi olmak üzere iki farklı yöntemle saptanması idi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yatan hastaların çeşili klinik örneklerinden izole edilen karbapeneme dirençli *A. baumannii* suşu dahil edildi. Suşların klinik örneklerle dağılımları Tablo 1'de gösterildi. Bakteri tanımlanması konvansiyonel yöntemler ve BD Phoenix (Becton Dickinson, USA) kullanılarak yapıldı. Bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile EUCAST önerileri doğrultusunda belirlendi. Karbapeneme dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında MBL enzimi varlığı kombine disk yöntemi ve modifiye Hodge testi ile belirlendi (9).



Resim 1. Kombine disk yöntemiyle (sol taraf) ve modifiye Hodge testiyle (sağ taraf) MBL pozitif olarak saptanan *A. baumannii* suşları

Kombine disk yöntemi: Bu amaçla imipenem diski (Bioanalyse, Türkiye) ve imipenem+EDTA diski (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı. Mc Farland 0,5 olarak ayarlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar besiyerine ekildi. Etüvde 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Besiyerine imipenem ve imipenem+EDTA diskleri arasındaki mesafe 25 mm olacak şekilde diskler yerleştirildi. İmipenem+EDTA da zon çapının imipeneme göre 5 mm ve üzerinde olması MBL enzimi pozitifliği olarak değerlendirildi.

Modifiye Hodge testi: Mac Farland 0,5 bulanıklığında ayarlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar besiyerine yayıldı. Besiyerinin tam ortasına eritapemenem diski yerleştirildi. Diskin olduğu yerden artı işaretli şekilde besiyeri çizildi. Etüvde 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Besiyerinde yonca görüntüsü oluşması Modifiye Hodge testi pozitifliği olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen karbapeneme dirençli 82 *A. baumannii* suşunun 3'ünde (% 3,7), kombine disk yöntemiyle MBL enzimi saptanırken, Modifiye Hodge testi çalışılan 70 *A. baumannii* suşunun 27'sinde (%39)'unda MBL üretimi saptanmıştır.

Kombine disk yöntemi ve modifiye Hodge testiyle MBL pozitif olarak saptanan *A. baumannii* suşları **Resim 1**'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

A. baumannii suşları özellikle yoğun bakım ünitelerinde başta karbapenemler olmak üzere çoklu ilaç direnci gösteren, salgınlara neden olabilen önemli bir nozokomiyal infeksiyon etkenidir (1,4).

A. baumannii türlerinde karbapenem direncinin en sık görülen mekanizması kromozom veya plazmid kaynaklı beta-laktamaz enzimlerinin üretimidir. *A. baumannii* suşlarında OXA tipi karbapenemazlar daha sık görülmeyle birlikte MBL enzimleri de bildirilmektedir. MBL enzimlerinin karbapenemaz aktivitesi yüksektir. MBL enzimleri Ambler sınıf B ve Bush grup 3'te yer alır. Metallo-beta-laktamazlar, genel olarak *P.aeruginosa* suşlarında saptanmakla birlikte, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides fragilis*, *Serratia* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* gibi Gram negatif bakterilerden de izole edilmektedir. MBL enzimleri, karbapenemleri hidrolizleyen IMP ve VIM serisinden enzimler ile SPM, GIM ve SIM enzimlerini içermekte olup aztreonam dışındaki tüm beta-laktam antibiyotikleri

hidrolize etmeleri bu suşların tespit edilmesinin önemini artırmaktadır (1,10).

Son yıllarda MBL enzimlerinin neden olduğu karbapenem direnci tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir sorundur (1,4,5,9,11).

Türkiye'de ve ark. (11) karbapeneme dirençli 202 *A. baumannii* suşunun 139'unda (%69) kombine disk yöntemiyle metallo-beta-laktamaz enzimi üretimi saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile 139 suşun hiçbirinde bla IMP ve bla VIM genleri tespit edilmemiştir.

Anwar ve ark. (12) Pakistan'da yaptıkları çalışmada 112 *A. baumannii* suşunun 66'sında (%59) disk difüzyon yöntemiyle hem imipenem hem de meropenem direnç saptanmıştır. Bu suşların 55 (%83)'ünün modifiye Hodge testiyle karbapenemaz ürettiği, kombine disk ve çift disk sinerji yöntemleriyle ise 66 izolatın 49'unun (%74) metallo-beta-laktamaz ürettiği saptanmıştır. Çalışmada testlerin birbirine uyumlu olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak; sunduğumuz çalışmada kombine disk yöntemiyle modifiye Hodge yöntemi arasında uyum olmadığı saptanmıştır. Benzer şekilde her iki yöntem arasında uyumsuzluk olduğunu, kombine disk yönteminin daha duyarlı bir yöntem olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur.

Acinetobacter türlerinde fenotipik olarak MBL tespiti için imipenem ve imipenem+EDTA kombine disk difüzyon yöntemi duyarlı ve pratik bir yöntemdir (9). Bazı çalışmalarda MBL saptanmasında fenotipik yöntemler ile moleküler yöntemler arasında uyumsuzluk da bildirilmiştir. Eser ve ark. (13) yaptıkları bir çalışmada imipenem-EDTA kombine disk difüzyon yöntemi ile *Acinetobacter* izolatlarının % 51,6'sında MBL fenotipi saptanmışlar, ancak izolatlarda *blaIMP-1* ve *blaVIM-2* genleri negatif bildirmişlerdir.

Aksoy ve ark. (14) 52 imipenem dirençli *A. baumannii* suşunda MBL varlığını kombine disk, çift disk sinerji, MBL E-test yöntemi, modifiye Hodge testi ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışmada modifiye Hodge testiyle 50 suşta (%96) MBL pozitifliği, EDTA'lı kombine disk yöntemiyle ve çift disk sinerji yöntemleriyle %21 oranında pozitiflik saptanırken, genotipik yöntemle multipleks PZR ile suşların hiçbirinde MBL geni saptanmamıştır. Çalışmada fenotipik olarak saptanan MBL pozitifliğinin moleküler yöntemlerle doğrulanması gerektiği, bu amaçla multipleks PZR yönteminin uygun bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Sunduğumuz çalışmada karbapeneme dirençli 82 *A. baumannii* suşunun 3'ünde (%3,7), kombine disk yöntemiyle MBL enzimi saptanırken, modifi-

ye Hodge testi çalışılan 70 *A. baumannii* suşunun 27 (%39)'sinde MBL üretimi saptanmıştır. Modifiye Hodge yöntemiyle daha fazla oranda (yaklaşık 10 kat) MBL pozitifliği saptanmıştır.

Çalışmamızın sınırlandırıcı yönü suşlarda moleküler testlerle MBL enzimleri (VIM, IMP, SPM vb.) genlerinin araştırılmaması idi.

Hastanemizde karbapeneme dirençli *A. baumannii* suşlarında kombine disk yöntemiyle MBL enzimi pozitifliği düşük oranda saptanırken, modifiye Hodge testi ile yüksek oranda saptanmıştır. İki yöntem arasında korelasyon saptanmadı.

Sonuç olarak; MBL enzim varlığının referans yöntem olan moleküler yöntemlerle belirlenerek iki fenotipik yöntemden hangisinin daha uygun olduğunun belirlenmesi uygun bir yaklaşım olacaktır.

MADDİ DESTEK VE ÇIKAR İLİŞKİSİ

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların çıkara dayalı bir ilişkisi yoktur.

KAYNAKLAR

- Huang H, Chen B, Liu G, et al. A multi-center study on the risk factors of infection caused by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. BMC Infect Dis 2018; 18: 11.
- Lee CR, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
- Öztürk CE, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. ANKEM Derg 2011; 25: 42-7.
- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes, Clin Microbiol Infect 2002; 8: 321-31.
- Aktaş AE, Yiğit N, Kayserili F, Ayyıldız A. *Pseudomonas* ve *acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması, İnfeksiyon Derg 2009; 23: 57-62.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Çeviri editörü D Gür). Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları, Ondokuzuncu Bilgi Eki, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2009.
- Fidan I, Gürelik FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. ANKEM Derg 2005; 19: 68-70.
- Pragasam AK, Sahni RD, Anandan S, et al. Study on carbapenemase detection: do we see the same level of agreement as with the CLSI observations. J Clin Diagn Res 2016; 10: DC09-13.
- 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-β-lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41: 4623-9.
- Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for

- detecting metallo-β-lactamases in Gram negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 49: 5-11.
- Türkdağı 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 doi:10.5222/ankem.2012.187.
- Anwar M, Ejaz H, Zafar A, Hamid H. Phenotypic detection of metallo-beta-lactamases in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from pediatric patients in Pakistan. J Pathog 2016; 2016: 8603964.
- 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.
- Aksoy MD, Çavuşlu Ş, Tuğrul HM. Investigation of metallo beta lactamases and oxacilinas in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from inpatients. Balkan Med J 2015; 32: 79-83.