

Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Saptanmasında Karbapenemaz İnaktivasyon Testinin Kullanımı

Tayfun DEMİRAY*, Özlem AYDEMİR*, Ümit KILIÇ**, Kerem YILMAZ**, Mehmet KÖROĞLU**, Mustafa ALTINDIŞ**

*Sakarya Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya

**Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Sakarya

ÖZ

Amaç: Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en güncel sağlık sorunlarından. Karbapenem dirençli *Klebsiella türlerinin* neden olduğu salgınlar ve sporadik olgular ülkemizde giderek artan sıklıkta rapor edilmeğe başlanmıştır. Bu çalışmada, moleküler metot ile karbapenemaz ürettiği doğrulanmış *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz inaktivasyon testinin tanısıl değerinin modifiye Hodge testi ile kıyaslanması ve rutin laboratuvar pratiğinde kullanımının irdelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hastanemizde 2014-2015 yılları arasında klinik örneklerden ve tarama numunelerinden izolenen toplam 125 *Klebsiella pneumoniae* izolatları çalışma kapsamında değerlendirildi. Modifiye Hodge testi ve karbapenemaz inaktivasyon testinin değerlendirilmesi için karbapenemaz üreten karbapenem dirençli 60 izolat ve karbapenem duyarlı 60 izolat kullanıldı. Moleküler değerlendirme Gene-Xpert® sistemine ait Carba R kitleri (Cepheid, ABD) ile *bla_{IMP-1}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-48}* ve *bla_{VIM}* gen bölgeleri araştırılarak yapıldı.

Bulgular: Moleküler yöntem ile karbapenemaz kodlayan gen varlığı saptanan 60 *Klebsiella* izolatında modifiye Hodge testi ile 54 adet izolat pozitif sonuç saptanırken, karbapenemaz inaktivasyon testinde 52 adet izolat pozitiflik saptandı.

Sonuç: Moleküler yöntem altın standart olarak değerlendirildiğinde; modifiye Hodge testinin ve karbapenemaz inaktivasyon testlerinin duyarlılıkları sırasıyla 0.85 ve 0.80, özgüllükleri ise 0.95 ve 0.93 olarak hesaplanmıştır. Enzim inhibityonuna bağlı fenotipik testler düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmaları nedeniyle rutin uygulamalarda tercih edilebilmektedirler. Ancak bu testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin değişken olduğu unutulmamalıdır.

Anahtar kelimeler: Karbapenemaz inaktivasyon testi, karbapenemazlar, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Use of Carbapenemase Inactivation Test in the Detection of Carbapenemase Production Among The Isolates of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*

Objective: The infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates are among the most actual health problems in our country as well as all over the world. Epidemics and sporadic cases caused by carbapenem-resistant *Klebsiella* species have begun to be reported increasingly from our country. In this study, we aimed to compare the diagnostic value of carbapenemase inactivation test with the modified Hodge test in carbapenemase producing *K. pneumoniae* isolates verified by molecular method and to evaluate the use of this test in routine laboratory practice.

Material and Methods: A total of 125 isolates of *Klebsiella pneumoniae* harvested from clinical, and screening specimens between 2014 and 2015 were evaluated. Carbapenemase-producing 60, and carbapenem sensitive 60 isolates were used for the evaluation of the modified Hodge test and carbapenemase inactivation test. Molecular evaluation was performed by investigating the *bla_{IMP-1}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-48}* and *bla_{VIM}* gene regions with Carba R kits (Cepheid, USA) of the Gene-Xpert® system.

Results: The modified Hodge test detected 54 out of 60 *Klebsiella* isolates, which were found to have carbapenemase encoding gene by molecular method; whereas carbapenemase inactivation test detected 52 out of 60 isolates.

Conclusion: When molecular method is regarded as gold standard, sensitivities of modified Hodge test and carbapenemase inactivation test were 0.85 and 0.80; specificities were calculated as 0.95 and 0.93, respectively. Phenotypic tests depending on enzyme inhibition can be preferred in routine practice since they have low cost and are easy-to-apply. However, it should not be forgotten that the sensitivity and specificity of these tests are variable.

Keywords: Carbapenemase inactivation test, carbapenemases, *Klebsiella pneumoniae*

Alındığı tarih: 22.12.2016

Kabul tarihi: 07.02.2017

Yazışma adresi: Tayfun Demiray, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Adnan Menderes Cad., Sağlık Sok. 54100 Sakarya

e-posta: tayfurdemiray@gmail.com

GİRİŞ

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en güncel sağlık sorunlarından (1-3). Karbapenem dirençli mikroorganizmalar ile gelişen enfeksiyonlarda, mortalite ve morbidite arttığı, hastanede yatış süresinin uzadığı ve tedavi maliyetlerinde artış olduğu görülmektedir. Bu enfeksiyonlar tedavide kullanılacak etkin antibiyotiklerin seçeneklerinin tükenmesi ve direncin hızlı yayılması nedeniyle de önemlidir (4-6). Özellikle karbapenem dirençli *Klebsiella* türlerinin neden olduğu salgınlar ve sporadik olgular ülkemizde giderek artan sıklıkta rapor edilmeye başlanmıştır (3,7,8). Genellikle karbapenemlere direnç karbapenemaz enziminin salınımı ile karbapenem moleküllerinin hidrolizi ile ortaya çıksa da porin kaybı ya da artmış eflüks pompa fonksiyonu gibi mekanizmalar da karbapenem direncine yol açabilmektedir (9). Daha sık görülmesinin yanında, karbapenemaz enzimleri ile ortaya çıkan dirençte asıl önemli konu bu enzimleri kodlayan genlerin transfer edilebilen plazmidler üzerinde yer alması ve direncin bu plazmidler yardımı ile hızla aynı ve farklı türler arasında yayılabilesidir (10). Bu nedenle karbapenemaz üreten izolatların saptanması hem tedavinin doğru yönlendirilebilmesi hem de yayılımın önüne geçilebilmesi önem göstermektedir. Avrupa ülkelerinde 2014 ve 2015 yıllarını kapsayan ve ülkelerin karbapenemaz tiplerine göre epidemiyolojik durumunun gösterildiği bir raporda ülkemiz, özellikle OXA-48 tip karbapenemazlar açısından endemik, NDM-1 tip karbapenemazlar açısından bölgesel yayılımın gösterildiği, VIM açısından da hastanelerden salgınların bildirildiği bir ülke olarak tanımlanmıştır (3,11). Bu durum ülkemiz gibi karbapenem direnci yönünden yüksek epidemiyolojik ülkelere direncin saptanmasının önemini daha da artırmaktadır.

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izo-

latlarının saptanmasında fenotipik testlerden ve moleküler metotlardan sıklıkla yararlanılmaktadır. Moleküler testler hızlı ve güvenilir olmakla birlikte, yüksek maliyetli olmaları ve uygun teknik altyapı gerektirdiğinden, fenotipik testlerin rutin uygulamalarda kullanılması önerilmektedir (12). Amerika merkezli Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) klavuzlarında antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında, karbapenem minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinde 2 µg/mL ve üzerindeki değerlerde modifiye *Hodge* testinin, Carba NP testinin ve/veya moleküler bir yöntem ile karbapenemaz üretiminin doğrulanmasını önermektedir (12). Son dönemde hızlı sonuç veren, rutin laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilen, ticari kitlere göre maliyeti çok düşük olan karbapenemaz inaktivasyon testi adında fenotipik bir metot da kullanıma girmiştir (13).

Bu çalışmada, moleküler metot ile karbapenemaz ürettiği doğrulanmış *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz inaktivasyon testinin tanısal değerinin modifiye *Hodge* testi ile kıyaslanması ve rutin laboratuvar pratiğinde kullanımının irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2014-2016 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden ve ertapenemli besiyeri kullanılarak tarama örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatları çalışma kapsamında değerlendirildi. Bu izolatların tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri VITEK® 2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile gerçekleştirildi. Karbapenem direncinden şüphelenilmesi durumunda gradient test stripleri (E-test, BioMérieux, Fransa) ile doğrulama yapıldı. Yorumlamalar CLSI 2015 klavuzuna göre yapıldı. İmipenem, meropenem ya da ertapenem minimal inhibitör konsantrasyonunun 2 µg/mL ve üzerinde saptanması duru-

munda karbapenem direnci varlığı kabul edildi. Bu çalışma kapsamında, 64 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatu irdelendi. *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu negatif kontrol, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 suşu ise pozitif kontrol olarak çalışmada kullanıldı.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarından karbapenemaz enzimi kodlayan gen varlığı moleküler yöntem ile gösterilen 59 adedi ve bir adet pozitif kontrol suşu, toplamda karbapenem dirençli 60 izolat ile karbapenem duyarlı, genişlemiş spektrum beta laktamaz negatif 59 adet *K. pneumoniae* izolatu ve bir adet negatif kontrol standart suşu, toplamda 60 karbapenem duyarlı *K. pneumoniae* izolatu genel toplam 120 olacak şekilde çalışmada kullanıldı. Karbapenem dirençli olup, karbapenemaz enzimi kodlayan gen varlığı gösterilemeyen beş adet *K. pneumoniae* değerlendirme dışı bırakıldı.

Modifiye Hodge Testi (MHT)

Mueller Hinton Agar (Merck, ABD) besiyerine *E. coli* ATCC 25922 standart suşu yayıldıktan sonra, meropenem 10 µg (BioMérieux, Fransa) diski plağın ortasına yerleştirildi. *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu negatif kontrol, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 suşu ise pozitif kontrol olarak çalışmada kullanıldı. Karbapenemaz üretiminden şüphelenilen izolatlar ile birlikte kontrol izolatları meropenem diskinden periferde doğru dik şekilde plağa ekildi. Diskin etrafındaki üreme saptanmayan zonda deformasyon saptanması durumunda test pozitif kabul edildi.

Karbapenemaz İnaktivasyon Testi (KİT)

Karbapenemaz inaktivasyon testi için çalışmaya karbapenemaz enzimi üretimi araştırılan izolatdan bir öze dolusu alınarak steril distile su içinde süspansiyon hâline getirildi ve içine 10 µl meropenem diski (BioMérieux, Fransa) atıldı. İki saat inkübasyondan sonra *E. coli* ATCC 29522 ino-

küle edilmiş Mueller-Hinton (Merck, ABD) agar besiyerine süspansiyondan alınan meropenem diski yerleştirildi ve altı saat 35°C'de inkübe edildi. Altı saatlik sürenin sonunda Meropenem diskinin etrafında üreme olması (inhibisyon zonu oluşmaması) durumunda, testin sonucu pozitif kabul edildi⁽¹³⁾.

Moleküler Değerlendirme

Çalışmaya dâhil edilen tüm *Klebsiella* izolatlarında Gene-Xpert® sistemine ait Carba R kitleri (Cepheid, ABD) ile *bla*_{IMP-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM} gen bölgeleri araştırıldı. Karbapenem dirençli izolatların kanlı besiyerinde 35-37°C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında, bu izolatlara ait taze kolonilerden steril eküvyon yardımı ile alınan koloniler Xpert örnek tampionuna aktarıldı. Bu süspansiyondan iki ml, DNA ekstraksiyonunun, amplifikasyonunun ve saptama reaksiyonlarının gerçekleştirileceği kullanıma hazır ticari kartuşa aktarıldı. Kartuş daha sonra Gene-Xpert® cihazına yüklenerek, üreticinin talimatlarına uygun şekilde sonuçlar bir saatlik sürede değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen 125 izolatin tümünde modifiye Hodge testi ve karbapenemaz inaktivasyon testi ile karbapenemaz varlığı araştırıldı. Çalışmada, bir adet standart suş haricinde toplam 64 adet karbapenem dirençli izolat moleküler yöntem ile de karbapenemaz kodlayan beş gen bölgesi araştırıldı. Bu incelemenin sonucunda, bu izolatlardan 27'sinde NDM-1, 20'sinde NDM-1/OXA-48, 11'inde OXA-48 ve birinde KPC gen bölgeleri saptandı. VIM ve IMP-1 gen bölgeleri hiçbir izolatta saptanmadı. Ayrıca beş izolatta, karbapenemaz araştırılan bu beş gen bölgesinden herhangi biri saptanmadı.

Modifiye Hodge testi ile 54 adet izolatta pozitif sonuç saptanırken, karbapenemaz inaktivasyon

Tablo 1. Karbapenemaz üreten *Klebsiella* izolatlarının belirlenmesinde fenotipik testler ve moleküler metodun kıyaslanması, (n=120).

Moleküler Yöntem	Modifiye Hodge Testi			Karbapenemaz İnaktivasyon Testi		
	Pozitif	Negatif	Toplam	Pozitif	Negatif	Toplam
Gene-Xpert®						
Pozitif	51	9	60	48	12	60
Negatif	3	57	60	4	56	60
Toplam	54	66	120	52	68	120

Tablo 2. Modifiye Hodge ve karbapenemaz inaktivasyon testlerinin tanısal performans değerleri.

	Modifiye Hodge Testi	Karbapenemaz İnaktivasyon Testi
Duyarlılık (%)	85	80
Özgüllük (%)	95	93
PPD (%)	94	92
NPD (%)	86	82
Test geçerliliği (%)	90	87

PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer

testinde 52 adet izolatta pozitiflik saptandı. Fenotipik test sonuçlarının moleküler yönetime göre değerlendirilmesi Tablo 1’de yer almaktadır.

Moleküler yöntem altın standart olarak değerlendirildiğinde, modifiye Hodge testinin ve karbapenemaz inaktivasyon testlerinin duyarlılıkları sırasıyla 0.85 ve 0.80, özgüllükleri ise 0.95 ve 0.93 olarak hesaplanmıştır. Bu testlere ait test performans değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

TARTIŞMA

Çoklu dirençli Gram negatif bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılan karbapenemlere gelişen direnç tüm dünyada kaygı ile izlenmektedir⁽¹⁴⁾. Bu direncin doğru saptanması hem tedavinin uygun şekillendirilmesi hem de epidemiyolojik olarak enfeksiyon kontrol çalışmalarına veri sağlaması açısından önemlidir. Karbapenemazların doğru tespitinde öncelikle azalmış karbapenem duyarlılığı ve sonrasında fenotipik olarak enzim hidrolizine bağlı testlerin ya da biyokimyasal testlerin yapılması

önerilmektedir⁽¹⁵⁾. Bu amaçla modifiye Hodge testi rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan bir testtir. Son dönemde van der Zwaluw ve ark.⁽¹³⁾ tarafından fenotipik bir test olarak geliştirilen ve sekiz saatlik süre sonunda sonuç verebilen bir test olan karbapenemaz inaktivasyon testi kullanıma girmiştir.

Günümüzde Carba-NP®, Blue Carba®, kombine disklerle dayalı metodlar, gradient test stripleri gibi birçok ticari ürün karbapenemazların tesbitinde kullanılmaktadır^(3,16). Rutin laboratuvarlarda ticari ürünlerin kullanımı maliyet nedeniyle çok da yaygın değildir. Karbapenemaz inaktivasyon testinin en dikkat çekici özelliği mikrobiyoloji laboratuvarlarında modifiye Hodge testi gibi kolaylıkla yapılabilmesi ve modifiye Hodge testinden daha kısa sürede (sekiz saat) sonuçların elde edilebilmesidir. Yaptığımız bu çalışmada karbapenemaz inaktivasyon testinin performans değerleri modifiye Hodge testinin performans değerlerine yakın bulundu. Ancak değerlerine yakın bulundu. Ancak *Klebsiella* izolatları ile yaptığımız bu çalışmada, karbapenemaz inaktivasyon testinin pozitif prediktif değeri 0.92 bulunurken, bu testin kullanımı ile ilgili ilk verileri sunan van der Zwaluw ve ark.⁽¹³⁾ bu testin moleküler metodla uyumunun *Enterobacteriaceae* izolatlarında %100, non-fermentatif bakterilerde ise %98.8 olduğunu belirtmektedir. Ayrıca aynı çalışmada, *Enterobacteriaceae* izolatlarında pozitif ve negatif prediktif değeri %100 olarak verilmektedir⁽¹³⁾. Yalnızca *Klebsiella* izolatları ile yaptığımız bu çalışmada ise, pozitif prediktif değer %92 ve negatif prediktif değeri %82 ola-

rak referans çalışmadan daha farklı sonuçlar elde ettik. Bu durum yeni kullanıma giren testler ile ilgili olabildiğince çok sayıda izolat kullanılarak yapılacak bilimsel çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

Karbapenemaz inaktivasyon testi enzim inaktivasyonuna dayalı bir test olarak rutin laboratuvarlarda kolaylıkla yapılabilmesi, modifiye Hodge testine göre daha kısa sürede sonuç vermesi testin avantajları olarak öne çıkmaktadır. Ancak, karbapenemaz inaktivasyon testini karbapenemaz üretiminin tespiti amacıyla kullanmayı planlayan laboratuvarların, testin farklı tanılabilir test performans değerleri olduğunu göz önünde bulundurmaları gerekmektedir. Moleküler yöntemler ile karbapenemaz genlerinin varlığını gösterebilecek altyapısı ve olanağı olmayan mikrobiyoloji laboratuvarlarında iki farklı fenotipik yöntemin kullanılması düşünülebilir.

Sonuç olarak, artan miktarda ve çeşitlilikte ortaya çıkan karbapenemazlara bağlı karbapenem direnci ile gelişen enfeksiyonların saptanmasında ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin geliştirilmesinde mikrobiyoloji laboratuvarlarının yaşamsal önemi vardır⁽¹⁶⁾. Kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli enzim inhibisyonuna bağlı fenotipik testler rutin uygulamalarda sıklıkla kullanılsa da bu testlerin duyarlılıkları ve özgüllüklerindeki değişkenliklerin olduğu unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:432-38.
https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x
2. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:228-36.
https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4
3. Kılıç Ü, Demiray T, Altındiş M. Karbapenemaz üreten enterobacteriaceae izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metodlar. *ANKEM Derg* 2016; 30:62-75.
4. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; 27:128-42.
https://doi.org/10.3904/kjim.2012.27.2.128
5. Canton R, Akova M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:413-31.
https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x
6. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Update* 2012; 15:237-47.
https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.06.001
7. Kılıc A, Baysallar M. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med* 2015; 35:382-83.
https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.3.382
8. Karabay O, Altındiş M, Koroglu M, Karatuna O, Aydemir ÖA, Erdem A. The carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* threat is growing: NDM-1 epidemic at a training hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016; 15:6.
https://doi.org/10.1186/s12941-016-0118-4
9. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:821-30.
https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719
10. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:1503-7.
https://doi.org/10.3201/eid1809.120355
11. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries. *Euro Surveill* 2015; 20.
12. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, Clinical Laboratory Standards Institute, 2015.
13. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One* 2015; 10:e0123690.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690
14. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1791-8.
https://doi.org/10.3201/eid1710.110655
15. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall, Dutch MA. Working Party on the detection of highly resistant microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrobial Agents* 2010; 36:205-10.
https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.05.014
16. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods* 2014; 107:106-18.
https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.09.009