



## BLAOXA-48 POZİTİF K. PNEUMONİAE İZOLATLARINDA FENOTİPİK KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN MODİFİYE HODGE VE KARBAPENEMAZ İNAKTİVASYON TESTLERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Evaluation of Phenotypic Carbapenemase Production in blaOXA-48 positive K. pneumoniae Isolates  
by Modified Hodge and Carbapenemase Inactivation Tests

Reyhan YİŞ , E. Deniz BAYRAM , Özlem Yüksel ERGİN 

SBÜ İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir, TÜRKİYE.

### Öz

**Amaç:** Son yıllarda özellikle uzun süre hastanede yatan, immun supresif, invaziv araç ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan hastalarda kolonizasyon oranları gittikçe artmakta olan K.pneumoniae, dirençli enfeksiyonlara yol açmaktadır. Çalışmamızda laboratuvarımıza gönderilmiş olan klinik örneklerden izole ettiğimiz çoklu dirençli K. pneumoniae izolatlarında karbapenem direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle saptanması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Temmuz 2014'te çeşitli servislerden laboratuvarımıza gelen örneklerden izole edilen, 51 K. pneumoniae değerlendirilmiştir. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri otomatize sistem (BD Phoenix System, ABD) ile çalışılmıştır. Karbapenem direnci gradient test stripleri (BioMerieux, Fransa ve Liofilchem, İtalya) ile doğrulanmıştır. Karbapenemaz direnç genlerinin saptanması 'in-house' polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm izolatlara fenotipik testlerden Modifiye Hodge testi (MHT) ve Karbapenemaz İnaktivasyon Testi (CIM Testi) uygulanmıştır. MHT ve CIM testi uyumsuz sonuç veren izolat için her iki test tüm karbapenemler ile tekrar çalışılmıştır.

**Bulgular:** İmipenem (IPM), meropenem (MEM) ve ertapenem (ETP) direnç oranları sırasıyla %78,43, %60,78 ve %96,08 olarak belirlenmiştir. MHT ile 51 adet izolattan 42 'sinde, CIM testi ile 43 adet izolatta pozitiflik saptanmıştır. PZT sonuçlarına göre izolatların 42'sinde blaOXA-48 geni bulunduğu belirlenmiş olup, diğer karbapenemaz genleri saptanmamıştır. blaOXA-48 geni ve diğer karbapenemaz genleri negatif olarak saptanan dokuz izolatin tamamında MHT, sekiz izolatta ise CIM Testi ile negatiflik saptanmıştır.

**Sonuç:** MHT ve CIM, karbapenemaz varlığının saptanmasında basit ve hızlı uygulanabilecek yöntemlerdir. CIM, değerlendirilmesi daha kolay, bir tarama testi olarak faydalı olabilecek bir yöntem olsa da, yalancı negatif ve pozitif sonuçlar açısından dikkatli olmayı gerektirmektedir. Testin diğer karbapenem disklerinin kullanımı yoluyla modifiye edilmesinin yalancı negatiflikleri azaltabileceğini düşünüyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** OXA-48, Karbapenem direnci, Modifiye Hodge Testi, Karbapenem İnaktivasyon Testi, PZR.

### Abstract

**Aim:** In recent years, increasing colonization rates of K. pneumoniae in patients with immunosuppression, long hospital stay, invasive devices and treated with broad spectrum antibiotics lead to resistant infections. In this investigate, we aimed to investigate carbapenem resistance in multiresistant K. pneumoniae isolates derived from clinical specimens by phenotypic and genotypic methods.

**Materials and Methods:** In July 2014, 51 K. pneumoniae isolates which were derived from clinical specimens were evaluated. Identification and antibiotic susceptibility tests of isolates were studied with automatized system. Verification of carbapenem resistance were studied with gradient strip tests. Identification of carbapenemase resistant genes were studied with "in house" PCR. Phenotypic tests including Modified Hodge test (MHT) and Carbapenemase Inactivation Method (CIM) were applied to all isolates. We re-studied all carbapenems for the isolates with incompatible results.

**Results:** Resistance rates of all isolates to imipenem, meropenem and ertapenem were 78.43%, 60.78% and 96.08%, respectively. 42 of 51 isolates were positive with MHT and 43 of 51 isolates were positive with CIM. blaOXA-48 gene was identified in 42 isolates with PCR. nine isolates which were negative for blaOXA-48 and other carbapenemases gene were negative with MHT and eight isolates which were negative for blaOXA-48 gene were negative with CIM.

**Conclusion:** MHT and CIM are fast and easy methods for the identification of carbapenemase presence. CIM is an easy screening test, but one should be cautious for false negative and positive results. We suggest that modification of the test with carbapenem discs should decrease false negative results.

**Keywords:** OXA-48, Carbapenem Resistance, Modified Hodge Test, Carbapenem Inactivation Method, PCR.

### Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Reyhan YİŞ  
Adres: SBÜ İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. İzmir/TÜRKİYE  
E-posta: reyhanys@yahoo.com

### Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 07.08.2019  
Date Accepted / Kabul Tarihi: 10.01.2019

## GİRİŐ

Son yıllarda özellikle hastanede yatan hastalarda kolonizasyon oranları gittikçe artan *K.pneumoniae*, sağlıklı bireylerde solunum yolları ve gaitada flora elemanı olarak bulunmaktadır. Sıklıkla üriner sistem, solunum yolları ve cerrahi alanda fırsatçı patojen olarak hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilmekte ve uzun süre hastanede yatan, immün supresyonu olan, invaziv araç ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan hastalarda dirençli suşların etken olduğu enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. 1980'li yılların başlarında geniş spektrumlu sefalosporin grubu antibiyotiklerin kullanıma girmesinden kısa süre sonra Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üreten *K.pneumoniae* ciddi bir sorun olarak ortaya çıkmaya başlamıştır <sup>1,2</sup>. GSBL üreten *K.pneumoniae*'ya bağlı enfeksiyonlarda karbapenemler genellikle ilk seçenek ajanlar olup meropenem (MEM) ve imipenem'in (IMP) yoğun olarak kullanılması direncin ortaya çıkışını hızlandırmıştır <sup>3,4</sup>.

Karbapenem direnci ile ilişkili en sık görülen mekanizma, karbapenemaz olarak da bilinen enzimlerdir. Bu enzimler ayrıca bilinen tüm  $\beta$ -laktamları inaktive eder. Ambler sınıflamasına göre *Enterobacterales*'te karbapenemleri hidroliz eden beta-laktamazlar A, B ve D olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılırlar. En sık görülen sınıf B metallo beta-laktamazlar (MBL) olup, daha az sıklıkta sınıf A'daki KPC ailesi enzimler görülmekte olup, plazmid ile veya kromozomal yayılım gösterirler. Oksasilinaz (OXA) tipi beta-laktamazlar ise Sınıf D karbapenemazlardır <sup>5</sup>. Sınıf D içerisinde yer alan OXA-48 özellikle ülkemizde *K.pneumoniae* izolatları arasında oldukça yaygın saptanan saptanan enzim tipidir <sup>4,6</sup>.

Karbapenemaz enzimi bulunduran *Enterobacterales* tipi bakterilerle gelişen

enfeksiyonlarda mortalite oldukça yüksek seyretmekte, mobil genetik elemanlar yoluyla hastadan hastaya yayılım, sorunun boyutunu daha da arttırmaktadır. Bu nedenle, bu enzimleri üreten bakterilerin erken saptanması, karbapenemaz üreten bakterilerin yayılmasının önlenmesine yarar sağlayacaktır. Hastanemizde laboratuvarımıza gönderilmiş olan klinik örneklerden ardışık olarak izole ettiğimiz çoklu dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenem direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle saptanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**İzolatlar:** Çalışmada Temmuz 2014'te çeşitli servislerden laboratuvarımıza gelen örneklerden izole edilen, en az bir karbapenem dirençli olarak bulunmuş, 51 adet *K. pneumoniae* değerlendirilmiştir. Farklı hastalardan izole edilmiş ve laboratuvarımızda ardışık olarak saptanmış olan izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir.

***K. pneumoniae* izolatlarının identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri:** Örneklerin %5 Koyun Kanlı (Salubris, Türkiye) ve "eosin methylene blue" (EMB) (Salubris, Türkiye) agar ekimleri yapılarak 18-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması klasik yöntemlere ek olarak BD Phoenix ID/ AST (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) otomatize sistemi ile antibiyotik duyarlılık testleri de aynı sistem ile çalışılmış ve "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre değerlendirilmiştir <sup>7</sup>.

**Disk difüzyon çalışması:** İzolatların karbapenem duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonun steril eküvyon

ile Mueller-Hinton agar (MHA) (Salubris, Türkiye) plaklarına ekimi yapılmış, Ertapenem (ETP) (10 mg), IMP (10 mg) ve MEM (10 mg) diskleri yerleştirilmiştir. 24 saat 35°C'de inkübe edilen MHA besiyerinde karbapenem disklerinden inhibisyon zon çapları  $\leq 22$  mm olarak ölçülenler test edilen izolatlar için karbapenem dirençli olarak değerlendirilmiştir <sup>7</sup>.

**Gradyent test alışması:** Disk difüzyon yöntemiyle karbapeneme dirençli olarak saptanan suşlarda karbapenem direncinin doğrulaması CLSI önerileri doğrultusunda gradient test stripleri (ETP, MEM Etest®, BioMerieux, Fransa) [IMP MIC Test Strip (MTS-Liofilchem®)] kullanılarak yapılmıştır <sup>7</sup>.

**Antibiyotik duyarlılıkları:** Karbapeneme dirençli suşların antimikrobiyallere duyarlılıkları BD Phoenix ID/ AST otomatize sistemi ile belirlenmiştir. Çalışmada izolatların amikasin (AK), gentamisin (GN), amoksisilin klavulonik asit (AMC), sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ), siprofloksasin (CIP), sefepim (FEP), sefoksitin (FOX), levofloksasin (LEV), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT), piperasilin-tazobaktam (TZP), imipenem (IMP), meropenem (MEM), ertapenem (ETP) duyarlılıkları test edilmiştir.

#### Fenotipik Testler:

**Modifiye Hodge testi (MHT):** MHT için Standart suş olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922, 0,5 McFarland bulanıklığında süspense edilerek MHA besiyerine sürülmüştür. Plağın merkezine karbapenem (MEM) diski konularak izolatlar disklerin sağ ve solundan periferde doğru ekuyyonla çizgi şeklinde ekim yapılmıştır. *E. coli* ATCC 25922 kalite kontrol suşu aynı zamanda negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Diskin etrafındaki inhibisyon zonu 24 saatlik inkübasyon sonunda yonca görünümü oluşturmuş ise test

edilen izolat karbapenemaz üretimi pozitif olarak değerlendirilmiştir. <sup>7</sup>.

**Karbapenemaz İnaktivasyon Testi (CIM Testi):** CIM testi için karbapenemaz üretimini araştırdığımız izolatın bsiyerinde üretilmiş olan kolonilerinden bir dolu öze alınarak steril distile su içinde süspense edilmiştir. Süspansiyona 10 µl karbapenem (MEM) diski atılmıştır. Disk İki saat inkübe edildikten sonra, yüzeyine *E. coli* ATCC 29522 inoküle edilmiş olan MHA besiyerine yerleştirilmiş ve altı saat 35°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karbapenem diskinin etrafında inhibisyon zonunun oluşmaması durumunda, test pozitif kabul edilmiştir <sup>8, 9</sup>. CIM testi uygulaması ve sonuçların değerlendirilmesi ise Van Der Zwaluw ve arkadaşlarının önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir <sup>10</sup>.

Çalışmamızda her iki testte de karbapenem diski olarak MEM kullanılmıştır. MHT ve CIM testi uyumsuzluğunda testler modifiye edilerek ETP ve IMP diskleri ile tekrar edilmiştir.

#### Genotipik Testler:

##### Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması

**DNA eldesi:** Steril distile su içerisinde homojenize edilen koloniler, ben maride 100 °C'de 10 dk bırakılmış, 10000 rpm'de santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

**PZR:** Tablo 1'de yer alan primerler ile 'in-house' PZR gerçekleştirilmiştir. *blaIMP-1*, *blaKPC*, *blaNDM-1*, *blaOXA-48* ve *blaVIM* gen bölgeleri araştırılmıştır. PZR çalışmasında negatif kontrol ve *blaIMP-1*, *blaKPC*, *blaNDM-1*, *blaOXA-48* ve *blaVIM* gen bölgelerini taşıdığı doğrulanmış olan pozitif kontrol izolatları kullanılmıştır. PZR koşulları 94°C'de 5 dakika; 30 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika, 53°C'de 1 dakika,

72°C'de 1,5 dakika ve sonrasında 72°C'de 10 dakika olarak uygulandı. PZR ürünleri %2 agaroz jel içinde 100 V'da bir saat yürütüldü<sup>11-14</sup>. Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri Tablo 1'de yer almaktadır.

**Tablo 1.** Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri ve saptanan genler

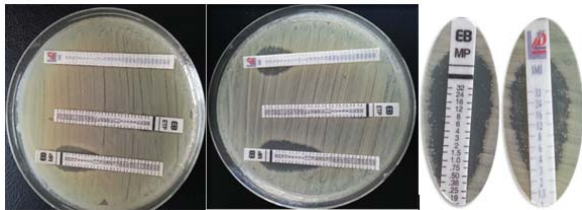
Primer	Gen
OXA-48A:5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG- OXA-48B:5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-	<i>bla</i> OXA-48
VIM-A:5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC- VIM-B:5'- TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-	<i>bla</i> VIM
IMP-A: 5'- GAAGGYGTTTATGTTTCATAC-(Y:C/T) IMP-B: 5'- GTAMGTTTCAAGAGTGATGC-(M:A/C)	<i>bla</i> IMP-1
Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri ve saptanan genler (11-14).	
IMP-A: 5'- GAAGGYGTTTATGTTTCATAC-(Y:C/T) IMP-B: 5'- GTAMGTTTCAAGAGTGATGC-(M:A/C)	
KPC-F: 5'-TGTCACGTGATCGCCGTC- KPC-R: 5'-TATTTTCCGAGATGGGTGAC-	<i>bla</i> KPC
NDM-1-F:5'- CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG- NDM-1-R:5'- ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-	<i>bla</i> NDM-1

**Tablo 2.** İzolatların örnek tiplerine ve izole edildikleri servislere göre dağılımı

Servis	TrakealAspirat	İdrar	Kateter	Kan	Yara	Toplam Sayı
Beyin Cerrahi Servis	-	2	-	-	-	2
Beyin Cerrahi YB	-	3	-	-	-	3
Dahiliye plk	-	1	-	-	-	1
Dahiliye YB	-	2	1	3	-	6
Enfeksiyon Hastalıkları plk	-	1	-	-	-	1
Genel Cerrahi Servis	-	3	1	-	3	7
Genel YB	5	3	1	2	4	15
Lokal Üroloji plk	-	1	-	-	-	1
Nöroloji Servisi	-	3	-	-	-	3
Nöroloji YB	-	4	-	-	-	4
Organ Nakli plk	-	1	-	-	-	1
Reanimasyon	3	2	-	1	-	6
Üroloji Böbrek taşı hastalıkları plk	-	1	-	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>51</b>

YB: Yoğun Bakım, plk: Poliklinik

**Gradyent test çalışması (Şekil 1):** İzolatlarda otomatize sistemin saptamış olduğu karbapenem duyarlılık sonuçları gradyent test ile tam uyumlu bulunmuştur.



**Şekil 1.** Her üç karbapeneme de dirençli olan iki izolat/ zon içi üremeler

**İstatistiksel analiz:** Moleküler yöntem altın standart olarak alınarak, fenotipik test sonuçlarının duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve test geçerlilik oranları hesaplanmıştır.

## BULGULAR

**İzolatlar:** Örnek tiplerine ve izole edildikleri servislere göre izolatların dağılımı Tablo 2'de yer almaktadır.

**K. pneumoniae izolatlarının identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri:** Çalışmaya alınan 51 *K.pneumoniae* izolatının IMP, MEM, ETP direnç oranları sırasıyla %78,43, %60,78 ve %96,08 olarak belirlenmiştir.

**Karbapenem dışındaki diğer antibiyotiklere duyarlılıkları:** İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 3'te yer almaktadır. En yüksek direnç oranı ETP ve AMC' de (%96,08), en düşük direnç oranı aminoglikozid grubu antibiyotiklerde ( AK: %43,13 ve GN: %51) saptanmıştır.

## Fenotipik Testler: (Şekil 2, Şekil 3)

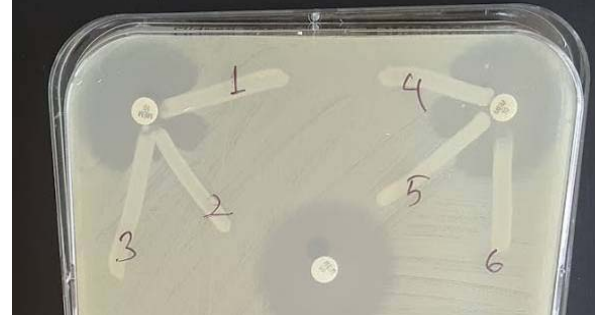
**Modifiye Hodge testi (MHT):** MHT ile 51 adet izolattan 42 'sinde pozitif sonuç alınmıştır.

**Karbapenemaz İnaktivasyon Testi (CIM Testi):**

CIM testinde 43 adet izolatta pozitiflik saptanmıştır. Bir izolatta karbapenemaz üretimi MHT ile negatif saptanmış iken, CIM testi ile pozitiflik görülmüştür.

**Genotipik Testler:** PZR sonuçlarına göre izolatların 42 tanesinde *blaOXA-48* geni bulunduğu belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde *blaNDM*, *blaIMP*, *blaVIM* ve *blaKPC* genine rastlanmamıştır.

*blaOXA-48* geni negatif olarak saptanan dokuz izolatta MHT ile de negatiflik saptanırken, CIM testi ile sekiz izolatta karbapenemaz negatifliği gözlenmiştir. MHT ve CIM testi ile uyumsuz sonuç veren bu izolat tüm karbapenemler ile tekrar çalışılmıştır. MHT'de her üç karbapenem ile sonuç değişmez iken, CIM testi ile ise IMP ve MEM ile pozitiflik devam etmiş, ETP ile negatiflik ortaya çıkmıştır.

**Şekil 2.** MHT sonuçları

1,2,3 numaralı izolatlar: Karbapenemaz pozitif, 4,5 numaralı izolatlar: Karbapenemaz pozitif, 6 numaralı izolat: Karbapenemaz negatif

**Şekil 3.** CIM testi sonuçları

a. 1,2,3 numaralı izolatlar: Karbapenemaz pozitif, (+): *E. coli* ATCC 29522 kalite kontrol suşu  
b. 4,5,7 numaralı izolatlar: Karbapenemaz pozitif, 6 numaralı izolat: Karbapenemaz negatif

**Tablo 3.** İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları.

	AK	GN	AMC	CTX	CAZ	CIP	FEP	FOX	LEV	SXT	TZP	IMP	MEM	ERT
<b>Toplam R (%)</b>	43,13	51	96,08	94,11	90,2	76,47	58,82	62,75	72,55	76,47	88,24	78,43	60,78	96,08

Amikasin (AK), gentamisin (GN), amoksisilin klavulonik asit (AMC), sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ), siprofloksasin (CIP), sefepim (FEP), sefoksitin (FOX), levofloksasin (LEV), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT), piperasilin-tazobaktam (TZP), imipenem (IMP), meropenem (MEM), ertapenem (ETP).

**İstatistiksel analiz:** Moleküler yöntem altın değerlendirilmesi Tablo 4'te, fenotipik testlerin standart olarak alındığında, fenotipik test tanısal performans değerleri Tablo 5'te yer sonuçlarının moleküler yöntemle göre almaktadır.

**Tablo 4.** Karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarının belirlenmesinde fenotipik testler ve moleküler yöntemin kıyaslanması

PZR	Modifiye Hodge Testi (MHT)			Karbapenemaz İnaktivasyon Testi (CIM)		
	Pozitif	Negatif	Toplam	Pozitif	Negatif	Toplam
<b>Pozitif</b>	42	-	42	42	-	42
<b>Negatif</b>	-	9	9	1	8	9
<b>Toplam</b>	42	9	51	43	8	51

**Tablo 5.** Modifiye Hodge ve karbapenemaz inaktivasyon testlerinin tanısal performans değerleri.

	Modifiye Hodge Testi (MHT)	Karbapenemaz İnaktivasyon Testi (CIM)
<b>Duyarlılık (%)</b>	100	100
<b>Özgüllük (%)</b>	100	88,9
<b>PPD (%)</b>	100	97,7
<b>NPD (%)</b>	100	100
<b>Test Geçerliliği</b>	1,00	0,98

PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer



## TARTIşMA

Karbapenem direnci esas olarak Enterobacterales türleri arasında, küresel boyutlarda devam eden bir halk sağlığı sorunudur. Bu tip bir antimikrobiyal direnç, özellikle aktarılabılır karbapenemaz kodlayan genler aracılı olduğunda, hızla yayılarak ciddi salgınlara neden olmakta ve tedavi seçeneklerini önemli ölçüde sınırlamaktadır. Yayılımın önlenmesinin, uygun tedavinin stratejilerinin belirlenmesinin, enfeksiyon kontrol planlamalarının yapılabilmesi adına, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında karbapenemaz üreten izolatların doğru tanımlanması gerekmektedir.

Enterobacterales'deki karbapenem direnci;  $\beta$ -laktamazlar tarafından enzimatik inaktivasyon, dış zar proteinlerinin (porinler) ve penisilin bağlayan proteinlerin modifikasyonu ve dışa atım pompaları yoluyla ortaya çıkmaktadır. Enterobacterales türleri arasında karbapenem hidrolizi yapan enzimler, en sık Ambler sınıf A (KPC tipi), sınıf B (VIM, NDM ve IMP tipi) ve sınıf D (OXA-48 benzeri) enzimlerdir. Bunun yanında plazmid kaynaklı Ambler sınıf C'de yer alan AmpC enzimleri de karbapenem direncine yol açmaktadır<sup>15,16</sup>. Ülkemizde en sık olarak OXA-48 benzeri enzimleri taşıyan izolatlar saptanmakta olup, ek mekanizmalarla ortaya çıkan karbapenem direnci de görülmektedir. Dünyada hızla artış göstermekte olan karbapenemaz üreten enterik bakterilerin karbapenem direnç mekanizmasının belirlenmesi, karbapenemaz genlerinin saptanması için moleküler yöntemler altın standart yöntemlerdir. Günümüzde, birçok klinik laboratuvar, fenotipik yöntemlerin problemleriyle başa çıkabilmek ve saptama süresini kısaltmak için rutin olarak "in-house" PZR tabanlı yöntemleri kullanmaktadır. Doğrudan koloniden çalışılan bir PZR tekniği, mükemmel

hassasiyet ve özgüllük ile 4-6 saat içinde sonuç verebilmektedir. Kullanılan PZR tabanlı yöntemler simpleks ya da multipleks PZR analizleri olabildiği gibi, saptama süresini daha da kısaltan real-time PZR'da kullanılmaktadır<sup>17-20</sup>. Moleküler tabanlı teknolojiler yüksek maliyet, deneyimli personel gereksinimi ve tanımlanmamış yeni genlerin tespit edilememesi gibi dezavantajlarından ötürü rutin hizmet veren tüm laboratuvarlarda uygulanamamaktadır<sup>21</sup>. Mikrobiyoloji laboratuvarında herhangi bir izolata karşı azalmış karbapenem duyarlılığı saptanması sonrasında enzim hidrolizini esas alan fenotipik testler ve biyokimsal testlerin yapılması önerilmektedir<sup>22</sup>. Bu nedenle rutin bildirim karbapenem direncinin olup, olmadığı üzerinden gitmesi uygun bir yaklaşımdır. Bunun yanında EUCAST karbapenem direnç mekanizmasının bildirilmesini doğru enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı açısından önermektedir<sup>8</sup>. Bu açıdan karbapenem dirençli izolatların tanımlanmasında güvenilir fenotipik testlere olan ihtiyaç gündeme gelmiştir. Fenotipik yöntemler bakteri türüne, enzim tipine, enzimi kodlayan genin ekspresyon düzeyine, ek direnç mekanizmalarının varlığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir<sup>22,23</sup>. Karbapenem dirençli enterik bakterilerle gelişen enfeksiyonların yayılımının önlenmesinde ve tedavi modellerinin geliştirilmesinde duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir yöntem ile çalışmak önem taşımaktadır<sup>12,24,25</sup>.

Enterobacterales'de karbapenemaz üretiminin taranması amacıyla "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından önerilen modifiye Hodge testi (MHT) çalışmanın yapıldığı yıllarda, yıllardır kullanımda olan fenotipik bir test iken son yıllarda kullanıma girmiş fenotipik bir test olarak geliştirilen CIM testinin de, CLSI ve EUCAST tarafından önerilen basit ve hızlı uygulanabilecek, tarama amacıyla kullanımı uygun bir test olduğu belirtilmektedir<sup>7,8,10</sup>. Her iki

test de kültürde üreyen kolonilerden çalışılan, karbapenemaz tipini belirleyemeyeceğimiz tarama testleri olup CIM testi daha kısa sürede sonuç vermektedir. Çalışmamızda CIM testi Zwaluw ve arkadaşlarının geliştirdiği protokol doğrultusunda çalışılmıştır <sup>10</sup>.

Çalışmamızda PZR sonuçlarına göre izolatların 42 tanesinde *blaOXA-48* geni bulunduğu belirlenmiştir. *blaOXA-48* geni negatif olarak saptanan dokuz izolat değerlendirildiğinde; tamamında MHT, sekiz tanesinde CIM Testi ile negatif sonuç alınmış, MHT ve OXA-48 negatif olduğu halde bir izolat CIM testi ile pozitif bulunmuştur. Uyumsuz sonuç veren izolat için testler her üç karbapenem ile tekrar çalışılmıştır. Bu izolat için MHT testi her üç karbapenemle de negatif sonuç vermeye devam etmiş, CIM testi ile ise MEM ve IMP herhangi bir zon açmazken ETP 'in zon açtığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda yer alan izolat sayısı az olsa da her iki testte de MEM diski kullanılmış olduğu için, OXA-48 pozitif izolatlarda MHT %100 oranında karbapenemaz tespiti yapmış olup, CIM testinde bu oran %97,7olarak bulunmuştur. CIM testi pozitif olarak saptanan izolatın ETP ile de test edilmesi karbapenemaz doğru saptama oranını artırmıştır.

Ülkemizde Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında yoğun bir şekilde saptanmaya devam eden *blaOXA48* geni, *blaNDM* geninin aksine karbapenemleri düşük düzeyde hidroliz edebilen bir enzimdir <sup>26</sup>. İzolatlarımızdaki direnç oranları IMP, MEM ve ETP için sırasıyla %78,43, %60,78 ve %96,08 olarak hesaplanmış olup en dirençli karbapenemin ETP olduğu görülmektedir. Karbapenem direncinin saptanmasında EUCAST tarafından önerilen karbapenem, MEM olsa da, ETP haricindeki karbapenemleri düşük hidrolize edebilme yeteneği nedeniyle OXA-48 enziminin saptanmasında ETP'de kullanılabilir <sup>27</sup>.

Bunun yanında karbapenem dirençli izolatların diğer antibiyotiklere duyarlılıkları da farklılık gösterebilmektedir. Örneğin GSBL veya AmpC tipi enzim üretiminin, porin (veya olasılıkla PBP) değişimleri veya kaybı ile birlikte olduğu izolatlarda karbapenem MİK değerleri daha yüksek olarak saptanmaktadır <sup>12,28</sup>. Çalışmamızda izolatların direnç yüzdeleri değerlendirildiğinde en düşük direnç aminoglikozidlerde saptanmıştır (AK'de direnç oranı %43,13 GN'de %51). Bunun yanında en yüksek direnç oranı %98,04 ile AMC ve TZP'de saptanmıştır. GSBL pozitifliği %94,11 oranında gözlenmiş, en duyarlı karbapenem %60,78 direnç oranıyla MEM olarak bulunmuştur.

Genel olarak ülkemizde endemik olan OXA-48 tipi enzimler ve KPC tipi enzimlerin MHT ile daha iyi saptandığı, ancak metallo-beta-laktamazların saptanmasının problemlili olduğu bildirilmektedir <sup>29</sup>. MHT özellikle CTX-M tipi GSBL ve AmpC β laktamazı pozitif izolatlarda yalancı pozitiflikler vermektedir. Enzim tipi göz önüne alındığında uygun bir test olsa da ülkemiz verilerine göre, testin yalancı pozitiflik verebileceği CTX-M tipi GSBL'lerin sıklıkla saptanması testin dezavantajıdır. Bunun yanında özellikle son yıllarda ülkemizde artış gösteren NDM tipi metallo-beta-laktamazlarda testin yalancı negatiflik verebileceği de akılda tutulmalıdır.

Baran ve arkadaşları tarafından yapılan ve OXA-48 pozitif izolatların yoğunlukta olduğu bir çalışmada MHT testi; MEM ile yapıldığında karbapenemazı pozitif izolatların %90,69'sını, ETP ile yapıldığında ise %89,53'ünü yakalamıştır <sup>30</sup>. Çalışmamızda MEM diski ile yapılan MHT'nin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. Yine benzer izolatlarla çalışan Bayramoğlu ve arkadaşları ETP ile çalıştıkları MHT testi ile izolatları %90,8 oranında saptadıklarını belirtmişlerdir <sup>31</sup>. Bu veriler ışığında OXA-48

pozitif *K. pneumoniae* izolatlarının ETP, IMP veya MEM'e karşı duyarlılıkları farklılık gösterebileceği için, karbapenem disklerinin kullanıldığı fenotipik testlerin her üç tip karbapenem ile ayrı ayrı test edilmesi sorunu çözebilir.

CIM testi MHT'ye göre karbapenemaz genlerinin saptanmasında PZR ile daha yüksek bir uyum oranına sahiptir. Bunun yanında bir diğer avantajı van der Zwaluw ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan protokole göre testin sekiz saatte sonuç vermesidir <sup>10</sup>. Ancak, testte IMP diski kullanıldığında, özellikle AmpC β laktamazi pozitif izolatlar için yalancı pozitiflikler gözlenebilmektedir. Yamada ve arkadaşları tarafından ETP diskinin CIM testinde diğer iki diskten daha spesifik sonuçlar verdiği gösterilmiştir <sup>32</sup>. Çalışmamızda MHT ile tüm PZR sonuçları uyumlu çıkmış, PZR ile karbapenemazi negatif saptanmış olan bir izolatta CIM testi ile yalancı pozitiflik gözlenmiştir. Başka bir deyişle her iki test PZR tarafından pozitif saptanan tüm izolatları yakalamış, PZR tarafından karbapenemazları negatif saptanan altı izolattın bir tanesine CIM testi pozitif sonuç vermiştir. Bu durum çalışmamızda testin özgüllük ve pozitif prediktif değerinin MHT'den daha düşük olmasına yol açmıştır. Çalışmamızda IMP ve MEM ile yapılan CIM testi ile yalancı pozitiflik veren izolat ETP ile negatiflik vermiştir. CIM testinin duyarlılığı Süzük ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada %97,59, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur <sup>33</sup>. Ülkemizde Bayraktar ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada MEM diski ile çalışılan CIM testinde duyarlılık % 92,7, özgüllük %100 olarak saptanmıştır <sup>34</sup>. Çalışmamızda ise MEM diski kullanımı ile gerçekleştirilen CIM testinin duyarlılığı % 100, özgüllüğü %88,9 olarak hesaplanmıştır. 2017 yılında yayınlanmış ve 2014-2016 yılına ait izolatların kullanıldığı bir diğer çalışmada CIM ve MHT'nin tanısal

performans değerleri, özellikle MHT' nin lehine olmak üzere birbirine yakın olarak saptanmıştır <sup>35</sup>. Benzer olarak çalışmamızda da tek bir izolatın CIM tarafından yakalanamaması nedeniyle MHT'nin tanısal performans değerleri daha yüksek olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak; son yıllarda karbapenem dirençli Enterobacteriaceae türlerinin tüm dünyada artan oranda saptanıyor olması, tanımlamada hızlı ve güvenilir fenotipik testleri gerekli kılmaktadır. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir yöntemin kullanılması, bu patojenler ile gelişen enfeksiyonların gerek tedavisinde gerekse yayılımının önlenmesinde önemlidir.

## SONUÇLAR

Çalışmamızda yer alan izolat sayısının az olması, sadece OXA-48 pozitif izolatların yer alması, çalışmamızın sınırlılıkları olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, simüle örneklerle değil, gerçek izolatlar ile ve laboratuvarımıza gönderilmiş ardışık örneklerden üretilmiş karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatları ile çalıştığımız için verilerimiz hastanemiz ve bölgemiz için epidemiyolojik olarak önem taşımaktadır. Günümüzde NDM lehine değişen durumu değerlendireceğimiz yeni çalışmalara ihtiyaç bulursa da MHT ve CIM, karbapenemaz varlığının saptanmasında basit ve hızla uygulanabilecek yöntemlerdir. MHT ile karşılaştırıldığında CIM, değerlendirilmesi daha kolay, bir tarama testi olarak faydalı olabilecek, daha kısa sürede sonuç alınabilecek bir testtir. Ancak her iki test için yalancı negatiflik veya pozitiflikler olabileceği için kullanımları dikkatli olmayı gerektirmektedir. Testlerin diğer karbapenem disklerinin kullanımı yoluyla modifiye edilmesinin yalancı negatiflikleri azaltabileceğini düşünüyoruz. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının taramasında kullanmak



üzere en uygun fenotipik testin seçiminde, iş yükü, bölgesel ve hatta hastane düzeyinde yaygın karbapenemaz enzim tipi, maliyet etkinlik ve testlerin duyarlılık ve özgülüğü gibi çok sayıda faktörün göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

Yardımlarından dolayı, BD (Becton, Dickinson and Company) Türkiye'ye ve Sayın Hüseyin Uyma'ya (Nukleus, İzmir) teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Aktaş Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxa-cillinase, OXA-48, persist in *Klebsiella pneumoniae* in İstanbul, Turkey. *Chemother*. 2008; 54(2):101-6.
- Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(1):29-36.
- Aktaş Z, Satana D, Kayacan Ç, Ozbek B, Gurler N, Somer A et al. Carbapenem resistance in Turkey: repeat report on OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* and first report on IMP-1 beta-lactamase in *Escherichia coli*. *Afr J Microbiol Res*. 2012;6(17):3874-8.
- Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay A, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48 positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in İstanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2950-4.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791-8.
- Maltezou HC. Metallo-beta-lactamases in Gram negative bacteria: introducing the era of panresistance? *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(5):405.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. CLSI Document M100-S21, 2013. CLSI, Wayne, PA.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms, v 1.0. Available at: [http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/)
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 26th Informational Supplement. CLSI M100-S26. CLSI, Wayne, PA
- 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.
- Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):718-21.
- Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to IPM in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22.
- 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(7):3129-35.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1151-61
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
- Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palu G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. *Gut Pathog*. 2014; 6:13.
- Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Cohen Stuart J, Leverstein-van Hall MA. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and OXA beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37: 356-9.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70: 119-25.
- Chen L, Mediavalla JR, Endimiani A, Rosenthal ME, Zhao Y, Bonomo RA et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (blaKPC) variants. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 579-85.
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari A, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 906-9.
- Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(3):487-9.
- Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrobial Agents*. 2010; 36:205-10.
- Voulgari E, Poulou A, Koumaki V, Tsakris A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? *Future Microbiol*. 2013; 8(1): 27-39.
- Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(4): 1295-302.
- Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(9): 839-53.
- Ellis C, Chung C, Tijet N, Patel SN, Desjardins M, Melano RG, et al. OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Ottawa, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(3): 399-400.
- Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*. 2013; 18(31): 20549.
- Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ETP-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:659-67
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol*. 2012; 50(2): 477-9.
- Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016; 15: 20.
- Bayramoğlu G, Uluçam G, Gençoğlu Özgür Ç, Kılıç AO, Aydın F. Comparison of the modified Hodge test and the Carba NP test for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(1):1-10.
- Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Sait R. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae *J Microbiol Methods*. 2016;128:48-51.

33. Yıldız SS, Kaşkatepe B, Avcıküçük H, Öztürk ř. Performance of CarbaNP and CIM tests in OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Acta Microbiol Immunol Hung. 2017;64(1):9-16.
34. Bayraktar B, Barış A, Malkoçoğlu G, Erdemir D, Kına N. Comparison of Carba NP-Direct, Carbapenem Inactivation Method, and  $\beta$ -CARBA Tests for Detection of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae. Microb Drug Resist. 2019;25(1):97-102.
35. Demiray T, Aydemir Ö, Kılıç Ü, Yılmaz K, Köroğlu M, Altındış M. Karbapenem Dirençli Klebsiella pneumoniae İzolatlarında Karbapenemaz Saptanmasında Karbapenemaz İnaktivasyon Testinin Kullanımı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(2):78-82, 2017.