

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Sağlık Hizmetiyle İlişkili Enfeksiyon Etkeni *Enterobacterales* Suşlarında Karbapenemaz Direnç Genlerinin Araştırılması

Hadiye DEMİRBAKAN, İpek KOÇER

SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.

ÖZET

Çalışmamızda, hastanemizde otomatize sistem ile meropeneme dirençli veya doza bağlı duyarlı saptanan *Enterobacterales* suşlarında fenotipik ve genotipik yöntemlerle karbapenemazların varlığının araştırılması amaçlandı. Karbapenemazlar, karbapenemler dahil olmak üzere çoğu β -laktamı hidrolize ederler. Bu enzimleri üreten suşların saptanmasında birçok fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Genotipik yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyonu zaman alıcı ve pahalı olmasına rağmen altın standart yöntemdir. Gram negatif bakterilerde artan direnç nedeniyle karbapenem direnç genlerinin profilinin belirlenmesi antibiyotik kullanım politikalarının belirlenmesinde yol gösterici olması açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda, Aralık 2019- Aralık 2020 tarihleri arasında bir yıllık süreçte otomatize sistem ile meropeneme dirençli veya doza bağlı duyarlı saptanan 79 *Enterobacterales* izolatı BD Phoenix CPO Detect paneli, karbapenem inaktivasyon yöntemi ve konvansiyonel PCR yöntemleri ile incelendi. Konvansiyonel PCR ile 42 izolat *blaOXA-48* geni; 16 izolat *blaNDM* geni ve 7 izolat ise *blaOXA-48* ile beraber *blaNDM* gen bölgesi pozitif olarak saptandı. İzolatların hiçbirinde *blaIMP*, *blaVIM* ve *blaKPC* genlerinde pozitiflik bulunmadı. PCR ile pozitif saptanan toplam 65 izolatın iki tanesi BD Phoenix CPO detect paneli ile negatif saptandı. mCIM testi ile ise 64 tanesi pozitif, yalnızca bir tanesi belirsiz olarak bulundu. Çalışmamız laboratuvarımıza gönderilmiş ardışık örneklerden üretilmiş karbapenem dirençli izolatlar ile planlanan ilk çalışma olduğu için verilerimiz hastanemiz ve bölgemiz açısından epidemiyolojik olarak önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonlar. *Enterobacterales*. Karbapenemaz. *blaOXA-48*. *blaNDM*.

Investigation of Carbapenemase Resistance Genes in Healthcare-Associated Infectious *Enterobacterales* Strains

ABSTRACT

In our study, it was aimed to investigate the presence of carbapenemases by phenotypic and genotypic methods in *Enterobacterales* strains that were found to be resistant to meropenem or susceptible to dose-related in our hospital. Carbapenemases hydrolyze most β -lactams, including carbapenems. Many phenotypic and genotypic methods are used to determine the strains producing these enzymes. PCR, which is one of the genotypic methods, is the gold standard method, although it is time consuming and expensive. Due to the increasing resistance in Gram-negative bacteria, the determination of the profile of carbapenem resistance genes is important in terms of being a guide in determining antibiotic use policies. In our study, 79 *Enterobacterales* isolates, which were determined to be resistant to meropenem or susceptible to dose-related, by the automated system between December 2019 and December 2020, were examined by the BD Phoenix CPO detection panel, mCIM and conventional PCR methods. Forty-two isolates of *blaOXA-48* genes by conventional PCR; 16 isolates of *blaNDM* gene and 7 isolates of *blaOXA-48* and *blaNDM* gene region were positive. *blaIMP*, *blaVIM* and *blaKPC* genes were not positive in any of the isolates. Of the 65 isolates that were positive by PCR, two were found to be negative by the BD Phoenix CPO detection panel. With the mCIM test, 64 of them were positive and only one was indeterminate. Since our study is the first planned study with carbapenem resistant isolates produced from consecutive samples sent to our laboratory, our data are epidemiologically important for our hospital and region.

Keywords: Healthcare-associated infectious. *Enterobacterales*. Carbapenemase. *blaOXA-48*. *blaNDM*.

Geliş Tarihi: 13.Eylül.2022

Kabul Tarihi: 10.Ekim.2022

Hadiye DEMİRBAKAN
Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Gaziantep
Tel.: 0505 450 94 72
E-posta: hadiye.demirbakan@sanko.edu.tr

Yazarların ORCID Bilgileri:

Hadiye DEMİRBAKAN: 0000-0003-4180-8201
İpek KOÇER: 0000-0002-0631-6415

Çoklu ilaca dirençli Gram negatif çomaklar, sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonların yarısından fazlasından ve dolayısıyla hastanede yatış süresinin uzamasından, ölüm oranlarında artıştan sorumludurlar¹.

Karbapenemler, dirençli mikroorganizmalara bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla tercih edilen, birçok aerob ve anaerob bakteriye karşı etkin tedavi seçenekleridir. Dirençli bakterilerle meydana gelen enfeksiyonlarda artış, dolayısıyla tedavide

karbapenemlerin yaygın olarak kullanılması, bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimine neden olmuştur. Porin kaybı nedeniyle azalmış zar geçirgenliği, antibiyotik atılımını sağlayan efflux pompaları ve sıklıkla da karbapenemaz üretimi, karbapenemlere karşı direnç gelişimine neden olan mekanizmalardır^{2,3}. Ayrıca karbapenemaz üretiminden sorumlu genler, plazmidler gibi hareketli DNA parçaları üzerinde aktarıldığından, diğer direnç mekanizmalarına göre bakteriler arasında daha hızlı ve kolay yayılırlar⁴.

Sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonlarda çoğunlukla A, B ve D sınıfı karbapenemaz üreten suşlar etkendirler^{5,6}. Karbapenemazlardan *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) karbapenemazı (KPC) ve Guiana extended spectrum (GES) enzimi A sınıfı; IMP, VIM, GIM, SPM, SIM ve NDM-1 (New Delhi metallo-beta-laktamaz-1) enzimleri B sınıfı iken; OXA-48 ise D sınıfı plazmidler aracılığıyla aktarılabilen enzimlerden bazılarıdır. Bu enzimler içerisinde ilk olarak 2001 yılında ülkemizde tanımlanan ve plazmid ile aktarılan sınıf D karbapenemazlar en yaygın bulunanlardır^{5,7,8}.

Karbapenemazların belirlenmesinde, avantaj ve dezavantajları bulunaç birçok fenotipik, genotipik yöntem kullanılmaktadır. Farklı direnç mekanizmalarının eşlik etmesi, fenotipik yöntemlerle karbapenemaz üretiminin saptanmasını zorlaştırmaktadır. Bazı fenotipik testlerde, bakteri karbapenemaz ürettiği halde, karbapenemlere karşı doza bağlı duyarlılık ve hatta duyarlılık saptanmaktadır. Bu durum rutin laboratuvarlarda karbapenemaz üreten suşların doğru tespitini zorlaştırmaktadır. Günümüzde altın standart olan genotipik yöntemlerden daha hızlı, daha kolay uygulanabilen ve ucuz yeni yöntemlere olan ihtiyaç yadsınamaz.

Çalışmamızda, hastanemizde Aralık 2019-Aralık 2020 tarihleri arasında otomatize sistem ile meropeneme dirençli veya doza bağlı duyarlı saptanan *Enterobacterales* suşlarında fenotipik ve genotipik yöntemlerle karbapenemazların varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Sanko Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 09.01.2020 tarih ve 2020/01 karar no ile izin alınmıştır. Çalışma TF.AP.2020/02 no ile Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.

Çalışma Grubu

Aralık 2019-Aralık 2020 tarihleri arasında Sanko Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastaların çeşitli klinik örneklerinden mikrobiyoloji kültür laboratuvarına gönderilen ve otomatize sistem ile meropeneme dirençli veya doza bağlı duyarlı olarak

saptanan toplam 79 *Enterobacterales* izolatu çalışmaya alındı. Bunlardan 25'i *Escherichia coli* (*E. coli*), 54'ü *K. pneumoniae* idi. Her hastadan bir tane olacak şekilde, ilk izole edilen meropenem dirençli/doza bağlı duyarlı suş fenotipik ve genotipik yöntemlerle incelendi.

Laboratuvar Çalışmaları

Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Rutin bakteri kültürü için uygun transport koşullarında laboratuvara gönderilen örnekler, %5 Koyun Kanlı agar (RTA, Türkiye), MacConkey agar (RTA, Türkiye), Çikolata agar (RTA, Türkiye) ve Sabouraud Dekstroz Agar (RTA, Türkiye) besiyerlerine ekilerek uygun ortam ısısında inkübe edilir. Etken olduğu düşünülen bakteriler, konvansiyonel yöntemler ve otomatize bakteri tanımlama-antibiyoqram sistemi (Phoenix M50, BD, ABD) kullanılarak tanımlama ve antibiyoqramları yapılır. Phoenix M50 cihazı, mikrodilüsyon temelli olup, elde edilen okumalar cihaz tarafından EUCAST 2019 kriterlerine göre standart dozda duyarlı (S), doza bağlı duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak sonuçlandırılır⁹. Epidemiyolojik olarak önemli olduğu düşünülen mikroorganizmalar antibiyoqram sonuçlarına göre, 150 ml/L saf gliserol ve 850 ml/L nutrient broth içeren boncuklu tüp (GBL, Türkiye) kullanılarak, daha sonra genotipik ve fenotipik yöntemlerle incelenmek üzere -80°C'de saklanır.

BD Phoenix CPO Detect Paneli

Daha önceden -80°C'de saklanan izolatlar canlandırma amacıyla %5 koyun kanlı agara pasajlandı. CPO saptama paneli NMIC-505 kitinde (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA) her izolat için ID Broth Tube (Cat No 246001) kullanılarak, 0.5-0.6 McFarland bakteri süspansiyonu hazırlanır. ID kısım için, AST Broth tüpüne (Cat No 246003, 8 ml) 1 damla AST indikatörü damlatılır ve hazırlanan ID Broth tüpünden 25 µL eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Karışımın 3.5 ml'si pipet ile atılarak, kalanı ID kısma eklendi. AST kısım için, AST Broth tüpüne (Cat No 246003, 8 ml) 1 damla AST indikatörü ve hazırlanan ID Broth tüpünden 25 µL eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Karışımın tamamı AST kısmına döküldükten sonra BD Phoenix otomatize sistem cihazına yerleştirildi. CPO test sonucu, phoenix sistemi sonuçları "karbapenemaz üreticisi", "A sınıfı karbapenemaz üreticisi", "B sınıfı karbapenemaz üreticisi" veya "D sınıfı karbapenemaz üreticisi" olarak okuduğunda, mikroorganizmanın "karbapenemaz üretimi pozitif" şeklinde yorumlandı. CPO sınıflandırması açısından "karbapenemaz üreticisi" "sınıflandırılmamış" olarak kabul edildi.

Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM)

mCIM metodu CLSI tarafından önerilen fenotipik bir testtir¹⁰. Bir karbapenemin, bakteri süspansiyonu ile

Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması

inkübasyonu sonucunda enzim aracılığıyla parçalandığını göstermek bu yöntemin çalışma prensibidir.

Kanlı agarda 18-24 saat inkübe edilmiş kolonilerden bir öze dolusu alınır, 2 ml Triptik Soy Broth (TSB) olan tüpe konulur. On saniye vortekslenildikten sonra tüpün içine 10µg'lık meropenem diski eklenir. Üç saat ±15 dakika, 35 °C etüvde inkübe edilir. Bu süre sonunda etüvden çıkarılan tüpteki meropenem diski, 0.5 McFarland bulanıklığında *E. coli* ATCC 25922 yayılmış Mueller Hinton Agar (MHA)'a yerleştirilir. MHA, 18-24 saat, 35°C etüvde inkübe edilir. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları karbapenemaz varlığı açısından değerlendirilir. CLSI önerilerine uygun olarak, meropenem inhibisyon zonu 6-15 mm saptandığında veya 16-18 mm inhibisyon zonu içerisinde noktasal koloniler tespit edildiğinde, "mCIM pozitif", test edilen suş "karbapenemaz üretiyor"; inhibisyon zonu ≥ 19 mm ölçüldüğünde ise "mCIM negatif", test edilen suş "karbapenemaz üretmiyor" olarak kabul edilir. İnhibisyon zonu ≥ 19 mm olup zon içerisinde noktalar koloniler varsa veya inhibisyon zonu 16-18 mm olarak tespit edildiğinde "mCIM indeterminate (belirsiz)", test edilen suşun karbapenemaz sonucu belirsiz olarak kabul edilerek ek yöntemlere başvurulması önerilmektedir¹⁰.

Moleküler Yöntemler

Tüm izolatlar, yaygın karbapenemaz kodlayan *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA48*, *blaVIM*, *blaIMP* karbapenemaz genlerinin varlığı açısından konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle değerlendirildi. Karbapenemaz genlerinin belirlenmesi amacıyla aşağıdaki öncüller kullanıldı:

<i>blaNDM</i> (826 bp)	NDM-1 F (5'- CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-)
	NDM-1 R (5'- ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-)
<i>blaOXA</i> (743 bp)	OXA-48A (5'- TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG)
	OXA-48B (5'- GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC)
<i>blaIMP</i> (586 bp)	IMP-A (5'- GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC- (Y:C/T)
	IMP-B (5'- GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC- (M:A/C)
<i>blaVIM</i> (388 bp)	VIM-A (5'- GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-)
	VIM-B (5'- TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-)
<i>blaKPC</i> (331 bp)	KPC-F (5'- TGT CAC TGT ATC GCC GTC-)
	KPC-R (5'- TAT TTT TCC GAG ATG GGT GAC-)

Bakteri süspansiyonu için, 1/10 oranında distile su ile sulandırılmış 10X Taq buffer (Thermoscientific) kullanıldı. Her bir suş için, 1.5 ml'lik ependorfların

içine, 250 µl dilüe buffer ve bir steril öze dolusu bakteri kolonisi alınarak, 0.5 McFarland'lık bakteri süspansiyonu hazırlandı. Suş başına düşen reaksiyon karışımı, 10 µl 2X PCR master miks (Thermoscientific), 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer, 1 µl bakteri süspansiyonu ve 7 µl PCR grade su içerecek şekilde 20 µl olarak hazırlandı. PCR reaksiyonu thermal cycler (Prime, UK)'da 5 döngü, 95°C'de 3 dakika, 95°C'de 15 saniye, 52°C'de 30 saniye ve 72°C'de bir dakika ve 20 döngü, 95°C'de 15 saniye, 50°C'de bir dakika ve 72°C'de bir dakika olacak şekilde toplamda 25 döngü olarak gerçekleştirildi. Negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 izolatı kullanıldı.

Bulgular

Çalışmaya alınan bakterilerin 55'ini (%69,6) *K. pneumoniae*, 24'ünü (%30,4) *E. coli* oluşturmaktaydı. Bakteriler, idrar [n=30 (%38)], kan [n=24 (%30.4)], trakeal aspirat [n=18 (%22.8)], yara [n=5 (%6.3)] ve katater [n=2 (%2.5)] örneklerinden izole edilmişti.

mCIM testi ile toplamda 64 (%81) izolat meropenem inhibisyon zonuna göre, "mCIM pozitif, karbapenemaz üretiyor" olarak, bir (%1.3) izolatta "belirsiz (indeterminate)" olarak bulundu. Bunlardan altı izolatta meropenem zon çapı içerisinde noktasal üreme tespit edildi. Bu altı izolat CLSI önerisine göre yeniden değerlendirildiğinde, beşi "mCIM testi pozitif, karbapenemaz üretiyor" olarak; biri ise "belirsiz" olarak kabul edildi.

PCR ile izolatların hiçbirinde *blaIMP*, *blaVIM* ve *blaKPC* genlerinde pozitiflik bulunmadı. Toplam 79 suşun 65 (%82.3)'ünde PCR ile karbapenemaz gen pozitifliği belirlenirken, beşi *K. pneumoniae*, dokuzu *E. coli* olmak üzere toplam 14 (%17.7) suşta karbapenemaz geni saptanmadı. Kırkiki suş (%64.6) *blaOXA-48* pozitif olarak belirlendi (Resim 2). Bunlardan biri mCIM testi ile "belirsiz" olarak saptanan *K. pneumoniae* suşu idi. Toplamda 16 (%24.6) suş *blaNDM*, yedi (%10.8) suş ise *blaOXA48* ve *blaNDM* birlikte pozitif saptandı. Karbapenemazların saptanmasında kullanılan PCR ve mCIM testlerinin sonuçları Tablo I'de verildi.

Karbapenemaz gen bölgesinin saptanmasında altın standart olan PCR ile 65 pozitif suştan ikisi (%3.1) BD Phoenix CPO saptama kiti ile "karbapenemaz üretmiyor", 63 (%96.9)'ü "karbapenemaz üretiyor" olarak saptandı. CPO saptama kiti ile pozitif bulunanların 47 (%59.5)'si D sınıfı karbapenemaz üreticisi olarak tespit edildi. On iki (%15.2) suş B sınıfı, 4 (%5) suş ise sınıflandırılmadı, ancak karbapenemaz üreticisi olarak belirlendi. On altı (%20.3) suşta *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA48*, *blaVIM*, *blaIMP* karbapenemaz genleri negatif olarak saptandı. PCR sonuçları ile CPO test sonuçları Tablo II'de verildi.

Tablo I. Konvansiyonel PCR ve mCIM test sonuç verileri

		Konvansiyonel PCR				TOPLAM (n:79)
		K. pneumoniae (n:54)		E. coli (n:25)		
		Karbapenemaz geni saptanan n:49 (%62)	Karbapenemaz geni saptanmayan n:5 (%6.3)	Karbapenemaz geni saptanan n:16 (%20.3)	Karbapenemaz geni saptanmayan n:9 (%11.4)	
mCIM Testi	Pozitif	48 (%75)	0 (%0)	16 (%20.3)	0 (%0)	64 (%81)
	Negatif	0 (%0)	5 (%35.7)	0 (%0)	9 (%64.3)	14 (%17.7)
	Belirsiz	1 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.3)

Tablo II. Konvansiyonel PCR ile BD Phoenix CPO Saptama paneli test sonuç verileri

		Konvansiyonel PCR							
		K. pneumoniae (n:54)				E. coli (n:25)			
		<i>bla</i> NDM n:11 (%20.4)	<i>bla</i> OXA-48 n:32 (%59.2)	<i>bla</i> OXA48+ <i>bla</i> aNDM n:6 (%11.1)	Gen bölgesi saptanmadı n:5 (%9.3)	<i>bla</i> NDM n:5 (%20)	<i>bla</i> OXA-48 n:10 (%40)	<i>bla</i> OXA48+ <i>bla</i> aNDM n:1 (%4)	Gen bölgesi saptanmadı n:9 (%36)
CPO Saptama Paneli	Sınıf B	6 (%54.5)	0 (%0)	1 (%16.7)	0 (%0)	4 (%16)	0 (%0)	1 (%100)	0 (%0)
	Sınıf D	1 (%9.1)	32 (%100)	3 (%50)	0 (%0)	1 (%4)	10 (%40)	0 (%0)	0 (%0)
	Karbapenemaz üreticisi	3 (%27.3)	0 (%0)	1 (%16.7)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	Karbapenemaz üreticisi değil	1 (%9.1)	0 (%0)	1 (%16.7)	5 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	9 (%100)

Tartışma ve Sonuç

Ülkemizde ilk defa 2003 yılında *K. pneumoniae*'da OXA-48 saptanmış, ardından imipeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının tanımlandığı bir başka çalışmayla karbapeneme dirençli izolatların yıllar içinde hızla artış göstereceği vurgulanmıştır¹¹. Sonrasında da çeşitli çalışmalarla karbapenem dirençli izolat sayısında zamanla artış olduğu gösterilmiştir¹²⁻¹⁷.

Gram negatif organizmalara bağlı enfeksiyonların tedavisinde en uygun antibiyotığın seçiminde antimikrobiyal duyarlılık test sonucu önemlidir, ancak zaman alıcıdır. Önceden karbapenemaz üretiminin ve karbapenemaz enzim sınıfının belirlenmesi tedaviye yön verebilir¹⁸. Ayrıca, karbapenem dirençli bir organizmada erkenden karbapenemaz varlığının tanımlanması hızla enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve dolayısıyla direnç genlerinin yayılmasının önlenmesine yardımcı olabilir¹⁸.

Çalışmamızda, meropeneme doza bağlı duyarlı veya dirençli olarak saptanan toplam 79 *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatında, yaygın karbapenemaz kodlayan OXA-48, NDM, KPC, IMP ve VIM direnç genleri araştırıldı. Ülkemizde endemik olan OXA-48 karbapenemaz geni, bizim çalışmamızda da en sık saptadığımız karbapenemaz geni oldu^{8,19}.

İlk defa 2008 yılında izole edilen NDM-1 günümüzde dünyanın birçok yerinde varlığını gösterilmiştir²⁰. Ülkemizde de *bla*NDM ilk defa 2011 yılında bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmış olup, yapılan çeşitli çalışmalarla ülkemizde en çok izole edilen ikinci karbapenemaz geni olduğu belirlenmiştir^{12,17}. Çalışmamızda da OXA-48 geninden sonra en çok

tanımlanan karbapenemaz geni NDM'dir. Sıklıkla *K. pneumoniae* izolatlarında saptanmasına rağmen son yıllarda özellikle toplum kökenli *E. coli* izolatlarında da tespit edilmektedir¹⁹. Çalışmamızda 11 *K. pneumoniae* ve beş *E. coli* izolatı NDM pozitif, altı *K. pneumoniae*, bir *E. coli* izolatı hem OXA-48 hem NDM pozitif olarak saptanmıştır. NDM genlerinin en sık izole edildiği enfeksiyonlar idrar yolu enfeksiyonlarıdır². Bizimde çalışmamızda NDM pozitif saptanan suşlar en sık olarak idrar örneklerinden (%54.5) izole edilmiştir.

Günümüzde NDM taşıyan mikroorganizmalar lehine değişen durum göz önüne alındığında; NDM+OXA-48 birlikteliği saptanan suşlar, direnç profilleri dolayısıyla tedavi güçlükleri ve mortalite oranları açısından önemlidirler²¹. Bizim çalışmamızda da altı *K. pneumoniae*, bir *E. coli* izolatı olmak üzere toplamda yedi (%10.8) izolat, hem OXA-48 hem NDM pozitif olarak saptanmıştır.

Genotipik testler farklı genlerin varlığını tespit edebilir. Bununla birlikte, maliyetlidirler ve genellikle en yaygın karbapenemazları kodlayan genleri hedef alırlar. Fenotipik testler ise, daha önce tanımlanmamış karbapenemazları tespit edebilme avantajına sahiptirler, ancak karbapenemaz enzimlerini düşük seviyelerde eksprese eden bazı genleri tespit edemeyebilirler¹⁸. Bir çalışmada BD Phoenix CPO detect paneli ile yanlış pozitiflik oranı %20.51 olarak bulunmuş, çift karbapenemaz üreticisi suşlardan ise hepsinin doğru olarak tanımlandığı, bunlardan yalnız birinin Ambler sınıflamasına göre sınıflandırılmamış olduğu gösterilmiştir²². Bizim çalışmamızda ise BD Phoenix CPO detect paneli ile yanlış pozitif saptanan suş bulunmamakla beraber, bir *bla*NDM geni saptanan

Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması

ve bir tane de eş zamanlı *bla*NDM+ *bla*OXA-48 gen pozitifliği olan *K. pneumoniae* suşları negatif saptanmıştır.

Çalışmamızda, BD Phoenix CPO detect paneli, mCIM testi ve konvansiyonel PCR ile *Enterobacterales* suşlarında karbapenemaz varlığı araştırılmıştır. Konvansiyonel PCR ile pozitif saptanan 65 izolatın iki tanesi BD Phoenix CPO detect paneli ile negatif saptanmış olup, mCIM testi ile 64 tanesi pozitif, yalnızca bir tanesi belirsiz olarak bulunmuştur. Bu da bize CLSI'nın da önerdiği gibi karbapenemazların varlığını araştırmada kullanılan fenotipik bir yöntem olan mCIM testinin rutinde en ucuz, kolay uygulanması ve hızlı sonuç vermesi açısından daha uygun olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmamızın sınırlılığı, meropenem doza bağlı duyarlı veya dirençli olarak saptanan *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında, yaygın direnç genleri ile eş zamanlı olarak sınıf A, B ve D karbapenemazlardan SIM, IMI, GES, OXA-23, OXA-51, OXA-58 gibi diğer bazı nadir karbapenemaz genleri ile sefalosporinaz (AmpC) ve geniş spektrumlu β -laktamaz (ESBL) üretiminden sorumlu genlerin varlığının araştırılmamasıdır.

Karbapenemaz üreten *Enterobacterales* izolatlarının virülanslarının yüksek olduğu ve artan mortalite ile ilişkili oldukları çalışmalarla ortaya konmuştur²⁰. Bu suşlarla kolonize olan hastalarda karbapenem kullanımı, gastrointestinal kanalda karbapenemaz üreten izolatlarda artışa yol açarak, bu bakterilerin etken olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının gelişim riskini artırır⁷. Rutin laboratuvarların hızlı ve doğru karbapenemaz genlerini tespit edebilmesi veya Ambler sınıfını tanımlayabilmesi, hatta eşzamanlı olarak da duyarlılık testi yapabilmesi, hastaların yatışının planlanması ve tedavisinin düzenlenmesi sırasında klinisyenlere bilgi sağlayarak direnç genlerinin yayılmasını azaltmak açısından yararlıdır.

Çalışmamız laboratuvarımıza gönderilmiş ardışık örneklerden üretilmiş karbapenem dirençli izolatlar ile planlanan ilk çalışma olduğu için verilerimiz hastanemiz ve bölgemiz açısından epidemiyolojik olarak önem taşımaktadır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Sanko Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Onay Tarihi: 09.01.2020

Karar No: 2020/01-02

Araştırmacı Katkı Beyanı

Fikir ve tasarımı: H.D., Veri toplama ve işleme: H.D., İ.K.; Analiz ve verilerin yorumlanması: H.D., İ.K.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: H.D, İ.K.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Çalışma TF.AP.2020/02 no ile Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, Medeiros EA, Todi ST, Gomez DY, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003- 2008, issued June 2009. Am J Infect Control 2010; 38: 95-104. doi: 10.1016/j.ajic.2009.12.004.
2. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends Mol Med. 2012 May;18(5):263-72. doi: 10.1016/j.molmed.2012.03.003.
3. Paterson DL, Doi Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. Clin Infect Dis. 2007 Nov 1;45(9):1179-81. doi: 10.1086/522287.
4. Balkan II, Aygün G, Aydın S, Mutçalı SI, Kara Z, Kuşkuç M, et al. Blood stream infections due to OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: treatment and survival. Int J Infect Dis 2014;26:51-6. doi: 10.1016/j.ijid.2014.05.012
5. Karaaslan A, Soysal A. Karbapenemazlar. Pediatr Inf 2017; 11: 23-28. DOI: 10.5578/ced.58665.
6. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2006 Mar;57(3):373-83. doi: 10.1093/jac/dki482.
7. Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. Curr Opin Infect Dis. 2019 Dec;32(6):609-616. doi: 10.1097/QCO.0000000000000608.
8. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jan;48(1):15-22. doi: 10.1128/AAC.48.1.15-22.2004.
9. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf. Erişim zamanı: 20.08.2022
10. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI document M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020. <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf> Erişim zamanı: 20.08.2022
11. Gur D, Hascelik G, Aydın N, Telli M, Gültekin M, Ögünç D, et al. Antimicrobial resistance in Gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. J Chemother. 2009;21(4):383-9. <https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.4.383>.
12. Sahin K, Tekin A, Ozdas S, Akin D, Yapıslar H, Dilek AR, Sonmez E. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in Enterobacteriaceae isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015 Oct 6;14:44. doi: 10.1186/s12941-015-0105-1.
13. Çiftçi İH, Karakeçe E, Aşık G, Demiray T, Er H. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında OXA-48 ve KPC varlığının araştırılması. ANKEM Derg. 2013;27(2):49-54. <https://doi.org/10.5222/ankem.2013.049>.
14. Davarci I, Senbayrak S, Aksaray S, Kocoglu ME, Kuskucu MA, Samasti M. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. Anadolu Klin. 2019;24(1):1-7. <https://doi.org/10.21673/anadoluklin.423081>.
15. Kuskucu MA, Karakullukcu A, Ailiken M, Otlu B, Mete B, Aygun G. Investigation of carbapenem resistance and the first identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme among *Escherichia coli* isolates in Turkey: A prospective study. Travel Med Infect Dis. 2016;14(6):572-6. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.11.006>.
16. Poirel L, Yılmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S, et al. Spread of NDM-1 producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. Antimicrob

- Agents Chemother. 2014;58(5):2929-33. <https://doi.org/10.1128/AAC.02047-13>.
17. Alp E, Perçin D, Colakoğlu S, Durmaz S, Kürkcü CA, Ekincioğlu P, Güneş T. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect*. 2013 Jun;84(2):178-80. doi: 10.1016/j.jhin.2013.03.002.
 18. Whitley V, Kircher S, Gill T, Hindler JA, O'Rourke S, Cooper C, Tulpule A, Denys GA. Multicenter Evaluation of the BD Phoenix CPO Detect Test for Detection and Classification of Carbapenemase-Producing Organisms in Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2020 Apr 23;58(5):e01752-19. doi: 10.1128/JCM.01752-19.
 19. Yiş R, Gürbüz ED, Sarı AN, Gülay Z. Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Hastanemizde Yayılımı: Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişkinin Araştırılması. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2021;51(1):33-41. doi:10.5222/TMCD.2021.09226.
 20. Khan AU, Nordmann P. Spread of carbapenemase NDM-1 producers: The situation in India and what may be proposed. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2012; 44: 531–535. DOI: 10.3109/00365548.2012.669046.
 21. Özkan BG, Akpolat N, Özcan N, Bilik ÖA. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* İzolatlarında BD Phoenix CPO Yöntemi İle Karbapenemaz Üretimini Tespiti. *Sakarya Med J* 2022, 12(2):273-282 DOI: 10.31832/smj.1039323.
 22. Zhang A, Wang X, Liang X, Zhou C, Wang Q, Zhang J, Wang H. Performance Evaluation of Diagnostic Assays for Detection and Classification of Carbapenemase-Producing Organisms. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Nov 26;10(12):1457. doi: 10.3390/antibiotics10121457.