

Çeşitli Klinik Örneklerden Elde Edilen *Klebsiella pneumoniae*'de Karbapenemaz Üretimi ve Tiplendirilmesinde Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerin Değerlendirilmesi

Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods in Carbapenemase Production and Typing in *Klebsiella pneumoniae* Obtained from Various Clinical Samples

Şura BAŞDAĞ¹, Mehmet Mücahit GÜNCÜ¹, M. Burak AKSU²

¹ Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji ABD., İstanbul, Türkiye

² Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD., İstanbul, Türkiye

Sorumlu Yazar: Şura BAŞDAĞ

E-mail: surabasdag25@gmail.com

Gönderme Tarihi: 28. 03. 2024

Kabul Tarihi: 18. 04. 2024

Öz

Amaç: Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae kaynaklı enfeksiyonlar tüm dünyada halk sağlığını tehdit eden güncel sağlık sorunlarından. Tedavisinde dakikaların bile önemli olduğu bu bakterilerde karbapenemaz tespiti için çeşitli hızlı tanı testleri kullanılmaktadır. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yöntemi; yaklaşık bir saatte, *in vitro* ortamda bakterideki karbapenemazın karbapenemi hidroliz etmesiyle ortam pH'ını düşürerek fenol kırmızısının renginin değişmesi prensibiyle çalışır. Çalışmamızda karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığı, bu yöntemle tespit edilerek yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına 2018-2023 yılları arasında gönderilmiş çeşitli klinik örneklerden elde edilen rutin laboratuvar testleriyle tanımlanıp antimikrobiyal duyarlılıkları belirlenmiş karbapenem dirençli 100, karbapenem duyarlı 25 *K. pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların tümünde enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli yöntem ile karbapenemaz varlığı araştırılmıştır. Yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü, bu tanıda altın standart olan PZR ile karbapenemaz genlerinin (*oxa-48*, *ndm*, *kpc*, *imp* ve *vim*) tespitiyle belirlenmiştir.

Bulgular: PZR ile karbapenem dirençli izolatların 97'sinde (*oxa-48* n=58, *ndm* n=16, *oxa-48+ndm* n=15 ve *kpc* n=8) karbapenemaz geni tespit edilmiştir. Bu izolatların 94'ü enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli yöntem ile karbapenemaz pozitif saptanmıştır. Karbapenem duyarlı izolatların tümü hızlı tanı yöntemiyle karbapenemaz negatif saptanmıştır. Hızlı tanı yönteminin; duyarlılığı %96,9, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri ise %90,3 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Karbapenemaz üretiminin hızlı tespiti için kullanılan testlerde maliyet, zaman ve uzman personel gereksinimi gibi birtakım sorunlar bulunmaktadır. Çalışmamızda test ettiğimiz yöntem uygun maliyetli, kolay uygulanabilir ve ortalama 1 saatte karbapenemaz varlığını yüksek duyarlılık ve özgüllükte tespit etmektedir. Kısa sürede doğru ve güvenilir sonuç veren bu yöntemin rutin laboratuvarlarda kullanımı değerlendirilmelidir.

Anahtar kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, karbapenem direnci, karbapenemaz, hızlı tanı testi

ABSTRACT

Objective: Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae are among the current health problems that threaten public health all over the world. Various rapid diagnostic tests are used to detect carbapenemase in these bacteria, for which even minutes are important in their treatment. Reaction-based colorimetric rapid diagnostic method based on enzyme-substrate interaction works on the principle of changing the color of phenol red by lowering the pH of the environment when the carbapenemase in the bacteria hydrolyzes the carbapenem. In our study, we aimed to detect the presence of carbapenemase in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates with this method and to investigate the sensitivity and specificity of the method.

Methods: Our study included 100 carbapenem-resistant and 25 carbapenem-sensitive *K. pneumoniae* isolates, whose antimicrobial susceptibility was determined by routine laboratory tests obtained from various clinical samples sent microbiology laboratory between 2018 and 2023. The presence of carbapenemase was investigated in all isolates with a reaction-based method based on enzyme-substrate interaction. The sensitivity and specificity of the method were determined by the detection of carbapenemase genes (*oxa-48*, *ndm*, *kpc*, *imp* and *vim*) by PCR that used as the gold standard for this diagnosis.

Results: Carbapenemase gene was detected in 97 of the carbapenem-resistant isolates (*oxa-48*, n=58; *ndm*, n=16; *oxa-48+ndm*, n=15 and *kpc*, n=8) by PCR. Ninety-four of these isolates were detected as carbapenemase positive by the reaction-based method based on enzyme-substrate interaction. All carbapenem-susceptible isolates were detected as carbapenemase negative by rapid diagnostic method. For rapid diagnostic method; its sensitivity was calculated as 96.9%, specificity as 100%, positive predictive value as 100%, and negative predictive value as 90.3%.

Conclusion: There are problems in the tests used for the rapid detection of carbapenemase production, such as cost, time and the need for expertised personnel. The method tested in our study is cost-effective, easily applicable, and detects the presence of carbapenemase with high sensitivity and specificity in approximately 1 hour. The routine utilization of this method which provides accurate and reliable results in a short time period should be evaluated in clinical laboratories.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenem resistance, carbapenemase, rapid diagnostic test, enhancing awareness of a healthy lifestyle.

Keywords: Anxiety, COVID-19, Mental health, Healthy lifestyle, Stress.

1. GİRİŞ

Dünya'da ve ülkemizde en önemli halk sağlığı sorunlarından biri antibiyotiklere dirençli bakterilerin yol açtığı enfeksiyon hastalıklarıdır. Antibiyotiklere dirençli patojenler, tedaviyi zorlaştırarak morbidite ve mortalitede artışa yol açmaktadır. Gram negatif bakterilerden Enterobacteriaceae ailesine üye *Klebsiella pneumoniae*, hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan patojenlerdendir. *K. pneumoniae*, başta beta-laktam antibiyotikler olmak üzere florokinolonlar ve aminoglikozitler gibi birçok antibiyotik grubuna karşı direnç göstermektedir (Ferreira ve ark., 2019).

Üçüncü kuşak sefalosporinler dahil çoğu antibiyotiğe dirençli *K. pneumoniae* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kurtarıcı antibiyotik olarak kullanılan karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi oranlarda saptanmaya başlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 yılı Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetimi Raporu'nda (CAESAR) Türkiye'de invaziv örneklerden elde edilen *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenem direncinin %39-51 arasında değiştiği bildirilmiştir (WHO, 2020).

Gram negatif bakterilerde karbapenemlere direnç, başta antibiyotiğin yıkımına yol açan karbapenemaz enzimlerinin üretimi olmak üzere, porin kaybına bağlı azalmış membran geçirgenliği veya efluks pompası yoluyla antibiyotiğin dışı atımı gibi mekanizmalara bağlı gerçekleşmektedir (Stuart ve ark., 2010). *K. pneumoniae* karbapenem direncini genellikle çeşitli karbapenemazlar (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemase (KPC), New Delhi metallo- β -laktamase (NDM), Imipenem-resistant *Pseudomonas* (IMP), Verona integron-encoded metallo- β – laktamase (VIM), Oxacillinase-48 (OXA-48) vb.) üreterek sağlamaktadır. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (CDC) yayınladığı raporda karbapenemaz üreten

Enterobacteriaceae üyeleri, "Acil Tehdit Oluşturan Bakteriler" listesinde yer almaktadır (CDC, 2019). Dolayısıyla bu bakteride karbapenemaz üretiminin tespiti gerekli olup bu amaçla kullanılacak yöntemin seçimi, hızlı ve doğru sonuçlar elde edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu amaca yönelik olarak karbapenemaz üretimini tespit etmek için çeşitli hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Kullanılacak yöntemin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması, yöntem tercihinde dikkat edilen öncelikli faktörlerdir. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yöntemi; in vitro ortamda bakterideki karbapenemazın imipenemi hidroliz etmesiyle ortam pH'sını düşürerek fenol kırmızısının renginin değişmesi prensibiyle çalışmaktadır. Bu bağlamda; karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* kaynaklı enfeksiyonların sıklıkla karşılaşıldığı ülkemizde, bahsi geçen hızlı tanı yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi yaygın kullanıma girebilmesi açısından önemlidir.

Çalışmamızın amacı çeşitli klinik örneklerden elde edilen *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığını enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yöntemi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile karşılaştırmalı şekilde tespit ederek yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünü değerlendirmektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM**2.1. Bakteri izolatlarının belirlenmesi ve canlandırılması**

Çalışmaya, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2018-2023 yıllarında gönderilmiş çeşitli klinik örneklerden elde edilen, rutin laboratuvarında tür düzeyinde tanımlaması (MALDI-TOF MS, BioMerieux, Fransa) yapılmış ve antimikrobiyal duyarlılık

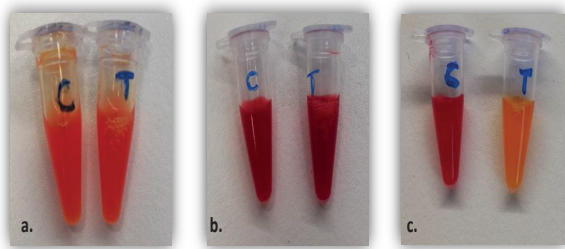
testleriyle (disk difüzyon ve/veya VITEK 2 otomatize sistem) karbapenemlere duyarlılıkları belirlenmiş 125 adet *K. pneumoniae* izolatu dahil edilmiştir. İzolatlardaki karbapenemaz enziminin klonal kökenli olmaması ve farklı türdeki enzimlerin test edilebilmesi amacıyla; yakın tarihlerde aynı servisten alınmış olmaması ve aynı hastadan alınan örnekler olmaması gibi kriterlere dikkat edilerek seçilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirilmiştir (Versiyon 13.1, Haziran 2023).

Skim milk besiyeri (gliserollü) içerisinde – 80°C'lik derin dondurucuda saklanan izolatlar MacConkey agar besiyerine (Biomeriux, Fransa) ekilmiş ve 37°C'de 18-24 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. Üreyen mikroorganizmaların tür tanımlaması MALDI-TOF MS (BioMerieux, Fransa) ile doğrulandıktan sonra enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yönteminde kullanılmak üzere Mueller Hinton agar besiyerine pasajlanmıştır.

2.2. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yöntemi ile karbapenemaz varlığının belirlenmesi

Test edilecek izolatta hücre içinde bulunan karbapenemazın serbest kalması ve testte çalışır hale gelebilmesi için bakteri, lizis amacıyla 1:10 oranında Tris HCl (20 mmol/L) içeren ortamda 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Test aşamasında test edilecek her bir bakteri izolatu için 2 tüp hazırlanmıştır. Kontrol tüpünde pH 7,8'e ayarlanmış 100µL fenol kırmızısı + ZnSO₄ solüsyonu (10mM) bulunmaktadır. Test tüpünde ise 100µL fenol kırmızısı + ZnSO₄ + 6 mg/mL imipenem-silastatin solüsyonu bulunmaktadır. Kontrol ve test tüplerinin hazırlanmasından sonra her iki tüpe de 30 µL lizis edilmiş bakteri süspansiyonundan eklenmiştir. Ardından tüpler 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda tüplerdeki renk değişimi incelenmiştir.

Her çalışmada kontrol amacıyla karbapenemaz geni taşıdığı bilinen bir pozitif kontrol suşu ve negatif kontrol amacıyla karbapenem duyarlı *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu test edilmiştir. Ayrıca test sonuçlarının geçerli kabul edilebilmesi için kontrol tüpünde renk değişikliği meydana gelmemelidir. Kontrol tüpü kırmızı renkte olup, test tüpü sarı veya turuncuya dönmüş izolatlar karbapenemaz pozitif şeklinde yorumlanmıştır. (Resim 1)

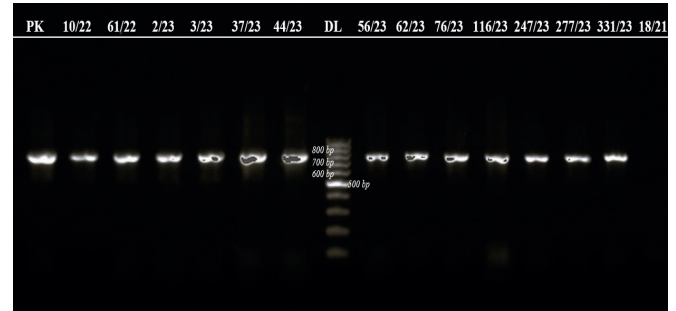


Resim 1. Test sonuçlarının yorumlanması (a. Kontrol tüpündeki renk değişikliği sebebiyle geçersiz test sonucu, b. Karbapenemaz negatif test sonucu, c. Karbapenemaz pozitif test sonucu) C: Kontrol tüpü, T: Test tüpü

2.3. Karbapenemaz direnç genlerinin belirlenmesi

izolatlarda PZR amacıyla kullanılacak genomik DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Steril ependorf tüpünde 100µL distile su ile beş öze dolusu (10µL'lik öze) koloni karıştırılmıştır. Ardından tüp, 1 dk boyunca vortekslenmiştir. Homojenizasyonu sağlanan bu süspansiyon 95°C'de 10 dk boyunca ısı bloğunda bekletilmiştir. Süspansiyon 15000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. DNA bulunan süpernatant kısmı alınarak steril başka bir ependorf tüpe aktarılmıştır.

PZR ile karbapenemaz direnç genlerinin (oxa-48, ndm, kpc, imp ve vim) belirlenmesi işlemleri tablo 1'de verilen primerler ve reaksiyon koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR işlemi sonrası oluşan ürünler, %1 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jele yükleme sonrası elektroforez ile saptanmıştır. Bu amaçla örnekler 25 dakika boyunca 80 V altında yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrası elde edilen bantlar UV görüntüleyicide incelenmiştir. Gözlenen bant profilleri DNA ladder ve pozitif kontrol ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. (Tablo 1) (Resim 2)



Resim 2. blaOXA-48 pozitif izolatların ve karbapenem duyarlı izolatın jel görüntüsü [blaOXA-48 pozitif örnekler: KLB 10/22, 61/22, 2/23, 3/23, 37/23, 44/23, 56/23, 62/23, 76/23, 116/23, 247/23, 277/23, 331/23, karbapenem duyarlı örnek: KLB18/21; PK: blaOXA-48 pozitif kontrol suşu, DL: 100-1000 bp DNA Ladder (GeneMark, ABD)]

Tablo 1. Araştırılan karbapenemaz genlerine ait primer dizileri ve döngü koşulları

Primer	Dizi	Boyut (bp)	Amplifikasyon Koşulları
OXA-48 R	5' TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG 3'	743	94°C 5dk, 35 döngü, (94°C 60sn,56°C 45sn,72°C 60sn), 72°C 7 dk
OXA-48 F	5' GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC 3'		
NDM R	5' GGG CAG TCG CTT CCA ACG GT 3'	475	95°C 5dk, 30 döngü, (95°C 30sn,60°C 40sn,72°C 50sn), 72°C 6 dk
NDM F	5' GTA GTG CTC AGT GTC GGC AT 3'		
İMP R	5' GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC 3'	587	95°C 5dk, 35 döngü, (95°C 45sn,60°C 45sn,72°C 60sn), 72°C 8 dk
İMP F	5' GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC 3'		
VIM R	5' GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC 3'	389	95°C 5dk, 35 döngü, (95°C 45sn,60°C 45sn,72°C 60sn), 72°C 8 dk
VIM F	5'AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG 3'		
KPC R	5' TCT GGA CCG CTG GGA GCT GG 3'	399	95°C 2dk, 35 döngü, (94°C 2sn,62°C 10sn,72°C 15sn)
KPC F	5' TGC CCG TTG ACG CCC AAT CC 3'		

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, NDM: *New Delhi metallo-β-lactamase*, IMP: *Imipenem-resistant Pseudomonas*, VIM: *Verona integron-encoded metallo-β-laktamase*, OXA-48: *Oxacillinase-48*

Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı testi ile karbapenemaz negatif sonuç veren 3 izolatta PZR çalışması ile blaOXA-48 geni varlığı tespit edilmiştir. Bu izolatlar için öncelikle test aynı koşullarda tekrar edilmiştir. Ancak sonuçlar değişmemiştir. Daha sonra bu izolatlar için iki farklı yaklaşımla, antibiyotik miktarı 8 mg/mL'ye çıkarılarak ve bakteri yoğunluğu 2 katına çıkarılarak test yinelenmiştir. Sonuçlarda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak dikkat çekici olarak, bakteri yoğunluğu arttırıldığında pozitif kontrol olarak kullanılan OXA-48 enzimine sahip izolata çok daha hızlı (normalde 30-60 dk; bu şartlarda 2-3 dk) renk değişimi gösterdiği gözlenmiştir.

2.4. Verilerin istatistiksel analizi

Verilerin istatistiksel analizi SPSS sürüm 26.0 (IBM, Armonik, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değeri (PPV) ve negatif prediktif değeri (NPV) altın standart olarak kullanılan PZR testi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. İki yöntem arasındaki niteliksel uyum, Phi Cramer's korelasyonu kullanılarak belirlenmiştir.

3. BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden elde edilmiş, rutin antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre karbapenemlerden en az birine dirençli olduğu saptanan 100 adet ve karbapenemlere duyarlı olduğu saptanan 25 adet *K. pneumoniae* izolatu çalışmamıza dahil edilmiştir.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarının (n:100) elde edildikleri kliniklere göre dağılımı incelendiğinde, yoğun bakım ünitelerinden (n:52), dahiliye servislerinden (n:7) ve değişen oranlarda farklı bölümlerden (n:41) izole edildikleri belirlenmiştir. İzolatların elde edildiği örneklerin dağılımı incelendiğinde ise, sırasıyla; derin trekeal aspirat (n:33), idrar (n:24), kan (n:16), balgam (n:5), yara (n:5) ve diğer örnekler (n:17) olarak dizildikleri belirlenmiştir.

Test edilen *K. pneumoniae* suşlarının enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yöntemi ve PZR karşılaştırmalı sonuçları tablo 2'de gösterilmiştir. Altın standart yöntemle karşılaştırma sonucu elde ettiğimiz bulgulara göre enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yönteminin; duyarlılığı %96,9, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri ise %90,3 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca kullandığımız yöntem ile PZR testi arasında uyumluluk açısından çok güçlü anlamlı bir ilişki saptanmıştır (Phi Cramer's $p = 0.936$, $p < 0.001$). (Tablo 2)

Tablo 2. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik hızlı tanı yöntemi ve PZR testi karşılaştırmalı sonuçları

Karbapenem Duyarlılık Durumu	PZR Sonucu	Enzim-Substrat Etkileşimine Dayalı Reaksiyon Temelli Kolormatik Hızlı Tanı Yöntemi	
		Karbapenemaz Pozitif	Karbapenemaz Negatif
Dirençli (n=100)	OXA-48 (n=58)	55	3
	OXA-48+NDM (n=15)	15	0
	NDM (n=16)	16	0
	KPC (n=8)	8	0
	Gen Saptanmadı (n=3)	0	3
Duyarlı (n=25)	Gen Saptanmadı (n=25)	0	25

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, NDM: New Delhi metallo- β -lactamase, IMP: Imipenem-resistant *Pseudomonas*, VIM: Verona integron-encoded metallo- β -laktamase, OXA-48: Oxacillinase-48

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

"Karbapenem dirençli enfeksiyonlar" tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli sağlık sorunları arasındadır. Bu enfeksiyonlar, mortalite ve morbidite oranlarında artış, hastanede kalış süresinin uzaması, hasta başı maliyetin artması ve iş gücü kaybı gibi sosyo-ekonomik açıdan birçok soruna yol açmaktadır. Ayrıca antibiyotik direnci sebebiyle de böyle enfeksiyonlarda tedavi zorlaşmaktadır. Antibiyotik dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda hastalara en kısa zamanda, etkili antibiyotik tedavisinin verilmesi hayat kurtarıcıdır. Kritik hastalarda uygun antibiyotik tedavisinin verilmesindeki 1 saatlik gecikmenin hastanın ölüm riskini %20 oranında artırdığı gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2006).

K. pneumoniae'de karbapenem direnci esas olarak antibiyotigi parçalayarak etkisiz kılan karbapenemaz enzimlerinin üretiminden kaynaklanmaktadır. Bu durum aynı zamanda hastada mortalite ve morbiditede artışa yol açmaktadır. Dolayısıyla enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığını koruma açısından *K. pneumoniae*'de karbapenemaz varlığının hızlı tespiti gereklidir ve yaşamsal öneme sahiptir.

Karbapenemaz tespiti için geliştirilmiş birçok fenotipik (Modifiye Hodge testi (MHT), Karbapenem İnaktivasyon metodu (CIM) vb.) ve genotipik yöntem bulunmaktadır (Osei Sekyere ve ark., 2015). Bu yöntemler genel olarak değerlendirildiğinde, testlerin sonuçlanmasının uzun sürmesi, bazı direnç enzimlerini saptamada duyarlılığın ve özgüllüğün düşük olması gibi birtakım sorunlar göze çarpmaktadır. Örneğin; MHT, çoğu karbapenemaz için, özellikle KPC enzimleri için kabul edilebilir duyarlılık (>%90) gösterirken, NDM ve IMP gibi karbapenemazları saptamada düşük duyarlılığa sahiptir (Girlich ve ark., 2012). Ayrıca test maliyetinin düşük ve uygulanabilirliği kolay olmasına rağmen testin sonuçlanması için 24 saate ihtiyaç duyulmaktadır. Karbapenem inaktivasyon metodu da (CIM), MHT yöntemine benzer şekilde, sonuçlanması için bir gecelik inkübasyona ihtiyaç duymaktadır. Bunlara ek olarak, yapılan çalışmalarda bu yöntemin OXA-48 ve NDM üreten izolatları saptamada yetersiz olduğu gösterilmiştir (Tekintaş ve ark., 2017; Gelmez ve ark., 2021). Çalışmamızda kullandığımız

yönteme benzer bir metodoloji kullanan CARBA NP testi diğer fenotipik yöntemlere kıyasla ortalama 2 saat gibi kısa sürede sonuçlanması sebebiyle daha avantajlı görülmesine karşın yapılan çalışmalarda testin duyarlılığı %73 ile %100 arasında rapor edilmiştir (Vasoo ve ark., 2014; Yusuf ve ark., 2014). Bununla birlikte hem ülkemizde endemik olan OXA-48 benzeri karbapenemazlara karşı duyarlılığı önemli ölçüde düşüktür hem de maliyeti oldukça yüksektir (Poirel ve ark., 2012; Gelmez ve ark., 2020). Karbapenemaz genlerini saptamaya yönelik kullanılan genotipik yöntemler ise altın standart olmasına rağmen maliyet yüksekliği, deneyimli personel ve donanımlı laboratuvar altyapısı gereksinimi gibi nedenler dolayısıyla tercih edilmemektedir. Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli hızlı kolormatik yöntem düşük maliyetli, kolay uygulanabilir, 1-2 saat gibi çok kısa sürede sonuç verebilen bir test olmasının yanı sıra ülkemiz açısından önem taşıyan OXA-48 tipi karbapenemazları yüksek duyarlılıkla (%95,9; 55/58) saptamaktadır.

Kullandığımız enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli hızlı kolormatik yöntem, bu alanda yaygın kullanımda olan ticari CARBA NP testinden bazı basamaklarda avantaj sağlayan farklılıklar içermektedir. Bunlar bakteri lizis aşamasında santrifüj işlemine gereksinim duyulmaması, testin direkt inokülasyon ile gerçekleştirilmesi, saf imipenem yerine ticari olarak kolaylıkla temin edilebilen imipenem-silastatin antibiyotiklerini içermesi, reaksiyonun 37°C'lik etüv içerisinde değil 25°C'lik oda sıcaklığında gerçekleşmesi, 2 saat yerine 1 saatlik inkübasyon ile testin sonuçlanması ve ülkemizde endemik olan OXA-48 enzimini saptamada yüksek duyarlılığa (%95,9) sahip olması şeklinde sıralanabilir. Ayrıca kullandığımız yöntemin test başı maliyeti 5 TL iken ticari CARBA NP testinin test başı maliyeti 4 dolar olarak hesaplanmıştır (120 TL, Şubat 2024).

Test ettiğimiz yönteme benzer olarak literatürde in-house CARBA NP testi olarak geçen bazı biyokimyasal testler mevcuttur. 2016 yılında Österblad ve ark. tarafından yapılan, karbapenemaz pozitif 57 – karbapenemaz negatif 37 gram negatif basilin değerlendirildiği çalışmada karbapenemaz pozitif izolatların 41'i in-house CARBA NP testi ile karbapenemaz pozitif bulunmuştur (Österblad ve ark., 2016). Karbapenemaz negatif suşların tamamı aynı test ile negatif bulunmuştur. Yazarlar, çalışmalarındaki yanlış negatif sonuç veren izolatların çoğunluğunun karbapenemleri zayıf hidrolize ettiği bilinen OXA-48 veya OXA-181 üreticisi olduğunu saptamış ve yanlış negatif sonuçların bundan kaynaklı olabileceğini belirtmiştir. Aynı tarihli Pires ve ark. tarafından yapılan karbapenemaz pozitif 30 – karbapenemaz negatif 33 Enterobacteriaceae izolatının değerlendirildiği başka bir çalışmada ise in-house CARBA NP testinin %100 duyarlılık ve %98,9 özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir (Pires ve ark., 2016). Çalışmada OXA-48 enzimi bulunan izolatlarda zayıf karbapenem hidrolizi sebebiyle renk değişiminin daha zayıf olduğunu ancak bu durumu da pozitif olarak kabul ettikleri ifade edilmiştir. Ayrıca yanlış pozitif sonuç veren izolatlarda AmpC enzimi varlığını gerekçe göstermiş ve bu enzimin düşük düzeyde de olsa imipenem hidrolizine yol açmasını söz

konusu uyumsuz sonuçlarla ilişkilendirmişlerdir. 2019 yılında Bir ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, karbapenemaz pozitif 32 – karbapenemaz negatif 5 ve karbapenemlere artan dozda duyarlı 3 Enterobacteriaceae izolatı ile elde edilen veriler ışığında, in-house CARBA NP testinin duyarlılığı %93,9 ve özgüllüğü %71,4 olarak hesaplanmıştır (Bir ve ark., 2019). Çalışmada OXA-48 enzimi taşıyan bir izolatta alınan yanlış negatif sonucun enzime bağlı zayıf karbapenemi hidrolizinden kaynaklı olabileceği belirtilmiştir. Ancak yanlış pozitif bulunan izolatlarla ilgili bir yorum yapılmamıştır. Akyar ve ark. tarafından karbapenemaz pozitif 153 – karbapenemaz negatif 16 Klebsiella spp. ve E. coli izolatının değerlendirildiği çalışmada, in-house CARBA NP testinin %96,7 duyarlılık ve %100 özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir (Akyar ve ark., 2019). Çalışmalarında yanlış negatif sonuç veren izolatlarda inkübasyon süresi arttırıldığında (4 saat), duyarlılığın %100'e yükseldiğini belirtilmiştir. Bu izolatlardaki sonucu, düşük karbapenemaz aktivitesine sahip enzimlerle, özellikle de OXA grubu enzim üreticileriyle ilişkilendirmişlerdir. Çalışmamızda da kullandığımız yöntemle yanlış negatif olarak saptanan 3 izolatta PZR ile OXA-48 enzimi varlığı saptanmıştır. Bu izolatlar için test aynı koşullarda inkübasyon süresi 2 saate uzatılarak tekrar edilmesine rağmen sonuç değişmemiştir.

Yukarıda paylaştığımız literatürdeki in-house CARBA NP testlerinin çoğunun özgüllüğü yüksektir ancak özgüllüğün düşük olarak saptandığı çalışmalarda suşlardaki AmpC enziminin yanlış pozitifliğe neden olabileceği yorumu yapılmıştır (Pires ve ark., 2016; Österblad ve ark., 2016). Ayrıca in-house CARBA NP testlerinin duyarlılık oranları da çoğu çalışmada yüksek bulunmuş ve oranı düşüren neden var ise zayıf karbapenem hidrolizi dolayısıyla OXA tipi karbapenemazlar ile ilişkilendirmişlerdir (Österblad ve ark., 2016; Akyar ve ark., 2019). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli hızlı kolormatik yöntem ile duyarlılık %96,9, özgüllük ise %100 bulunmuştur.

Çalışmamızda hem PZR (taranan *bla*OXA-48, *bla*NDM, *bla*KPC, *bla*VIM ve *bla*IMP için) hem de enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli hızlı kolormatik yöntem ile karbapenemaz negatif sonuç veren 3 izolat bulunmaktadır. Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da kullandığımız yöntemin duyarlılık oranını düşüren temel faktör, OXA-48 enzimi taşıyan bu 3 izolatın yanlış negatif olarak saptanmasıdır. OXA-48 benzeri enzimlerin karbapenemler üzerinde zayıf hidrolitik etki sergilediği dikkate alındığında, bu 3 izolatta elde ettiğimiz yanlış negatif sonuçların *bla*OXA-48 alt tipleri ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

K. pneumoniae'de karbapenem direncine neden olan en temel mekanizma karbapenemaz üretimi olmasına rağmen başka mekanizmaların da dirençte rol oynadığı bilinmektedir (Alizadeh ve ark., 2020; Ranjbar ve ark., 2019). Ülkemizde diğer tip karbapenemazların görülme sıklığı ve fenotipik test ile de karbapenemaz negatif bulunmaları gibi nedenler düşünüldüğünde, bu izolatlardaki karbapenem direncinin karbapenemaz üretimi yoluyla değil, porin kaybına bağlı (OmpK35 ve OmpK36) membran geçirgenliğinin azalması

veya efluks pompaları ile ilacın hücre dışına atılımının sağlanması yoluyla olabileceği öngörülmektedir.

Sonuç olarak, karbapenem direnci ülkemizde ve dünyada halk sağlığını tehdit eden ciddi bir sağlık sorunudur. EUCAST'a göre; karbapenem direnci tespit edilen izolatlarda, enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı açısından karbapenemaz tespitinin hızlı yapılması gerekli ve önemlidir. Yaygın kullanılan fenotipik karbapenemaz doğrulama testlerinde (CIM, MHT vb.) sonuçlanma sürelerinin 48 saatten uzun sürmesi, enzim tipine göre duyarlılık ve özgüllük oranlarının düşük olması gibi birtakım sorunlar bulunmaktadır. Genotipik testler altın standart olmasına rağmen maliyetinin yüksek olması, deneyimli personel ihtiyacı ve donanımlı laboratuvar altyapısı gereksinimi gibi sebepler dolayısıyla rutin laboratuvar süreçlerinde yer alamamaktadır. Bu sorunlardan yola çıkarak çalışmamızda maliyeti uygun, kısa sürede sonuçlanan ve laboratuvarla kolay uygulanabilecek enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli hızlı kolormatik "in-house" yöntemi değerlendirdik. Ülkemiz açısından ele alındığında, karbapenemaz tespitinde kullanılan hızlı tanı testi seçiminde temel faktör, kullanılacak testin ülkemizde yaygın görülen karbapenemazları saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğüdür. Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli hızlı kolormatik test, %96,9 duyarlılık ve %100 özgüllüğe sahip olmasının yanı sıra, benzerlerinden farklı olarak, ülkemiz açısından büyük önem taşıyan OXA-48 tipi karbapenemazları yüksek duyarlılık (%95,9) ile kısa sürede, doğru ve güvenilir şekilde saptayabilmektedir. Bu yöntemin klinik laboratuvarlarda rutin kullanımı değerlendirilmelidir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu tarafından 19.09.2022-90 onay tarihi ve numarasıyla etik onay almıştır.

Finansal Destek: Çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından 2023 yılında TYL-2023-10952 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Akyar I, Kaya Ayas M, Karatuna O. Performance evaluation of MALDI-TOF MS MBT STAR-BL versus in-house Carba NP testing for the rapid detection of carbapenemase activity in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Microbial Drug Resistance*. 2019;25(7):985-990.
- [2] Alizadeh N, Ahangarzadeh Rezaee M, Samadi Kafil H, Hasani A, Soroush Barhaghi M H, Milani M, et. al. Evaluation of resistance mechanisms in carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance*. 2020;13:1377-1385.
- [3] Bir R, Mohapatra S, Kumar A, Tyagi S, Sood S, Das B K, Kapil A. Comparative evaluation of in-house Carba NP test with other phenotypic tests for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019;33(1):e22652.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. CDC; 2019.
- [5] D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):3877-80.
- [6] EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 13.1, valid from 2023.
- [7] Ferreira R L, Da Silva B C, Rezende G S, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Campanini E B, Pranchevicius M C D S. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Frontiers in microbiology*. 2019;9:3198.
- [8] Gelmez G A, Can B, Hasdemir U, Soyletir G. Evaluation of two commercial methods for rapid detection of the carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of microbiological methods*. 2020;178:106084.
- [9] Gelmez G A, Can B, Hasdemir U, Soyletir G. Evaluation of phenotypic tests for detection of carbapenemases: New modifications with new interpretation. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2021;27(2):226-231.
- [10] Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50(2): 477-479.
- [11] Kumar A, Roberts D, Wood K E, Light B, Parrillo J E, Sharma S, et. al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*. 2016;34(6):1589-1596.
- [12] Osei Sekyere J, Govinden U, Essack S Y. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2015; 119(5):1219-1233.
- [13] Österblad M, Lindholm L, Jalava J. Evaluation of two commercial carbapenemase gene assays, the Rapidec Carba NP test and the in-house Rapid Carba NP test, on bacterial cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(7):2057-2059.
- [14] Pires J, Tinguely R, Thomas B, Luzzaro, F, Endimiani A. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Microbiological Methods*. 2016;12:33-37.
- [15] Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;67(7):1597-1606.
- [16] Ranjbar R, Fatahian Kelishadroki A, Chehelgerdi M. Molecular characterization, serotypes and phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance of the *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different types of hospital-acquired infections. *Infection and drug resistance*. 2019;12:603-611.
- [17] Stuart J C, Leverstein-Van Hall M A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;36(3): 205-210.
- [18] Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir S Ş. Comparison of phenotypic methods and polymerase chain reaction for the detection of carbapenemase production in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2017;51(3):269-276.
- [19] Vasoo S, Lolans, K, Li, H, Prabaker K, Hayde M K. Comparison of the CHROMagar™ KPC, Remel Spectra™ CRE, and a direct ertapenem disk method for the detection of KPC-producing

- Enterobacteriaceae from perirectal swabs. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2014;78(4): 356-359.
- [20] World Health Organization. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance: Annual Report 2020.
- [21] Yusuf E, Van Der Meeren S, Schallier A, Piérard D. Comparison of the Carba NP test with the Rapid CARB Screen Kit for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. European journal of clinical microbiology & infectious diseases. 2014;33:2237-2240.

How to cite this article: Başdağ Ş, Güncü MM, Aksu MB. Çeşitli klinik örneklerden elde edilen Klebsiella pneumoniae'de karbapenemaz üretimi ve tiplendirilmesinde fenotipik ve genotipik yöntemlerin değerlendirilmesi. Journal of Health Sciences and Management, 2024;2: 29-35. DOI: 10.29228/JOHESAM.33