

Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın Karbapenemaz Üretimi ve Tiplendirilmesinde Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerin Değerlendirilmesi

Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods for Carbapenemase Production and Typing in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Various Clinical Samples

Hatice KARALI¹, Mehmet Mücahit GÜNCÜ¹, M. Burak AKSU²

¹ Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Sorumlu Yazar: Hatice KARALI

E-mail: haticekarali.23@hotmail.com

Gönderme Tarihi: 02.05.2024

Kabul Tarihi: 19.05.2024

ÖZ

Amaç: Son on yılda karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının artışı enfeksiyon tedavisinde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Rutin laboratuvarında karbapenem direncinin saptanması için gereken süre yaklaşık 48 saattir. Bu durum, özellikle kritik hastalarda etkili tedavinin başlatılmasında gecikmeye neden olur. Bu nedenle çalışmalar antimikrobiyal direncin daha erken tespit edilmesi için yeni yöntemlere odaklanmaktadır. Bu çalışmada, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenemaz üretimine bağlı direncin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2018 ile Şubat 2023 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 120 *P. aeruginosa* izolatı rutin antibiyogram sonuçlarına bakılarak çalışmamıza dahil edilmiştir. Karbapenemaz üretimi fenotipik test olarak enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik yöntem ve genotipik test olarak polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada karbapenem dirençli 100 izolatın 46'sında (%46) genotipik yöntemle karbapenemaz kodlayan genler tespit edilmiştir. Fenotipik test ile karbapenemaz enzimi taşıyan 46 izolatın 31'inde (%67) 1 saat içinde pozitif sonuçlar kaydedilmiştir. Geriye kalan 13 izolat yanlış negatif olarak; moleküler yöntem ile direnç genlerini taşımadığı belirlenen 2 izolat ise yanlış pozitif olarak değerlendirilmiştir. Fenotipik testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; %67.4 ve %97.3 ($p < 0.0001$) olarak bulunmuştur.

Sonuç: Sonuç olarak, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının hızlı ve doğru tanımlanması, zamanında uygun tedavinin verilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin başarılı bir şekilde uygulanması açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin performansının değerlendirilebilmesi için daha fazla örnek içeren *in vitro* çalışmalarla ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiyotik direnci, karbapenem, karbapenemaz, fenotipik test

ABSTRACT

Objective: The increase in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates has become an important health problem in infection treatment in the last decade. The time required to detect carbapenem resistance in the routine laboratory setting is about 48 hours. So, it causes a delay in the initiation of effective treatment, especially in critically ill patients. For this reason, studies focus on new methods to detect antimicrobial resistance earlier. It aimed to investigate carbapenemase-dependent resistance by phenotypic and genotypic methods in carbapenem-resistant clinical *P. aeruginosa* isolates in this study.

Methods: A hundred twenty *P. aeruginosa* isolates obtained from clinical samples between January 2018 to February 2023 in the Microbiology Laboratory of Marmara University Pendik Training and Research Hospital, were included in our study based on routine antibiogram results. Carbapenemase production was detected by enzyme-substrate reaction-based colorimetric method as a phenotypic test and polymerase chain reaction as a genotypic test.

Results: In this study, carbapenemase-coding genes were detected in 46 (46%) of 100 carbapenem-resistant isolates by genotypic method. With the phenotypic test, positive results were recorded within 1 hour in 31 of 46 isolates (67%) carrying the carbapenemase enzyme. The remaining 13 isolates were false negatives; 2 isolates determined not to carry the resistance genes by molecular method were evaluated as false positives. The sensitivity and specificity of the phenotypic test were 67.4% and 97.3%, respectively ($p < 0.0001$).

Conclusion: In conclusion, rapid and accurate identification of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates is very important for the timely administration of appropriate treatment and successful implementation of infection control measures. In vitro studies with a larger number of samples are needed to evaluate the performance of the enzyme-substrate reaction-based colorimetric test that we used in our study.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, carbapenem, carbapenemase, phenotypic test

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, karbapenem grubu da dahil birçok sınıfta yer alan antibiyotiklere karşı hızla geliştirdiği direnç nedeni ile tedavide önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Zhang et al., 2016). Antibiyotik direnci, ulusal ve uluslararası kuruluşların raporlarına göre, enfeksiyon hastalıklarının tedavi etkinliğini büyük ölçüde sınırlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2017 yılında yayınlanan raporuna göre, karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direnç sonuçlarının 20 bakteri türü arasında ikinci sırada yer aldığı ve kritik öncelikli bir bakteri olduğu bildirilmiştir (Tacconelli et al., 2018). Ek olarak, *P. aeruginosa* Amerikan Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin 'İnsan Sağlığı için Ciddi Tehdit Oluşturan Bakteriler' listesinde yer almaktadır (CDC, 2019).

P. aeruginosa'da karbapenemlere direnç gelişiminde OprD porin proteini kaybı, dışı atım pompalarının aşırı ekspresyonu ve karbapenemaz üretimi gibi farklı direnç mekanizmaları rol oynar (Jean et al., 2022). Son yıllarda *P. aeruginosa*'da karbapenemlere karşı gelişen direnç oranının hızla arttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, karbapenemaz üretimine bağlı direnç gelişimi de sık sık rapor edilmektedir (Çopur ve ark. 2021).

Karbapenem direnci daha yüksek morbidite ve mortalite oranları, maliyetin artması ve hastanede yatış süresinin uzaması ile sonuçlanmaktadır (Shaaban et al., 2017). Dolayısıyla karbapenemaz enzimlerinin varlığının hızlı tespit edilmesi antimikrobiyal yönetimin ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin erken aşamada etkili olabilmesi için önemlidir (Osei et al., 2015). Genotipik testler, direnç genlerinin tespit edilmesinde altın standarttır. Genotipik yöntemler deneyimli personel gerektirmesi ve pahalı olması gibi dezavantajlara sahiptir (Malkoçoğlu ve ark., 2017). Bu nedenle rutin laboratuvarında uygulanabilmesi için karbapenemaz üretimini hızlı tespit eden, basit, güvenilir ve uygun maliyetli testlere ihtiyaç vardır (Aktaş ve ark., 2017 ve Osei et al., 2015). Son yıllarda, karbapenemazların fenotipik olarak saptanması amacıyla birçok farklı yöntem (Modifiye

Hodge testi, Karbapenem İnaktivasyon Metodu, Carba NP test vb.) geliştirilmiştir. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik test, karbapenemaz aktivitesinin saptanması için geliştirilen fenotipik yöntemlerden biridir. Bu yöntem karbapenemlerin beta-laktam halkasının enzimatik hidrolizi sonucu oluşan pH değişikliğine bağlı olarak pH indikatöründe renk değişimi ile karbapenemaz üretiminin tespitini sağlar (Nordmann et al., 2012).

Çalışmamızda klinik *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinde öne çıkan mekanizma olan karbapenemaz varlığının enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik yöntem ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (03.02.2023 tarih ve 265 kayıt numarası) onaylanmıştır.

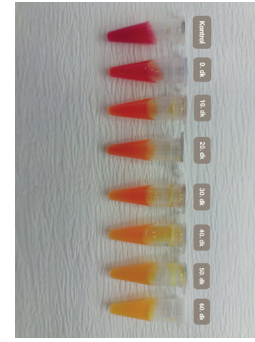
2.1. Bakterilerin Seçimi

Çalışmamızda, son 5 yıla ait (2018 Ocak-2023 Şubat) Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden etken olarak izole edilen ve rutin antibiyogram sonuçlarına bakılarak imipenem, meropenem veya doripenemden en az birine dirençli olduğu saptanan 100 *P. aeruginosa* izolatu kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak karbapenem duyarlı olduğu saptanan 20 *P. aeruginosa* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Bakteriler – 80°C derin dondurucudan çıkartılarak, pasajlanmış ve Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) standartlarına göre disk difüzyon yöntemi ile doripenem (10 µg), imipenem (10 µg) veya meropenem (10 µg) diskleri kullanılarak test edilmiştir. İnhibisyon zon çapları ölçümünde doripenem için <22 mm, imipenem için <22 mm ve meropenem için <14 mm dirençli kabul edilmiştir.

2.2. Karbapenemaz Üretiminin Fenotipik Tespiti

Karbapenemaz üretiminin saptanmasında laboratuvarında hazırlanan enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli fenotipik yöntem kullanılmıştır. Test edilecek her izolat için bir kontrol tüpü (sadece pH indikatörü içeren) ve bir test tüpü (antibiyotik ve pH indikatörü içeren) hazırlanmıştır. Kontrol tüpü 100 µL fenol kırmızısı (Sigma, ABD) solüsyonu (%0.5, pH 7.8) ve 10 mmol/L ZnSO₄ (Merck, Almanya) çözeltilisi içermektedir. Test tüpünde, kontrol tüpü içeriğine ek olarak 6 mg/mL imipenem/silastatin (Tüm Ekip ilaç, Türkiye) içermektedir.

Çalışmaya dahil edilen *P. aeruginosa* izolatları – 80°C derin dondurucudan alınmış ve MacConkey agara (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa) ekilerek canlandırılmıştır. Ardından bakteriler Mueller Hinton agarda (Oxoid/İngiltere) 37°C'de 18-24 saat inkübasyon ile üretilmiştir. Test edilen izolatın 4 öze dolusu alınarak 400 µL Tris-HCl (HiMedia, Hindistan) lizis tamponunda (20 mmol/L) süspansiyon edilmiştir. Karışım homojen hale gelene kadar vortekslenmiş, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Süspansiyondan 30 µL kontrol ve test tüplerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Tüpler 15,30,45 ve 60. dakikalarda renk değişimi için değerlendirilmiştir. İnkübasyon süresi 2 saate uzatılmış sonuçlarda değişiklik olup olmayacağı değerlendirilmiştir. Kırmızıdan sarıya renk değişimi olan tüpler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Resim 1). Çalışmamızda pozitif kontrol kökenleri olarak; *Klebsiella pneumoniae* CCUG 56233 (KPC pozitif köken), *Escherichia coli* NCTC 13476 (İMP pozitif köken), *K. pneumoniae* NCTC 13440 (VİM pozitif köken), *K. pneumoniae* NCTC 13443 (NDM-1 pozitif köken), *K. pneumoniae* NCTC 13442 (OXA-48 pozitif köken), negatif kontrol kökenleri olarak da *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır (EUCAST, 2017).



Resim 1. Enzim-substrat ilişkisine dayalı reaksiyon temelli fenotipik yöntemde pozitif izolat içeren solüsyonun zamana bağlı değişen görüntüsü

2.3. Karbapenemaz Üretiminin Genotipik Tespiti

Bakteri DNA izolasyonu için, Mueller-Hinton agarda 18-24 saat inkübasyon sonunda üreyen bakterilerden birkaç koloni alınmış ve 250 µl steril distile su ile homojenize edilmiştir. Karışım kuru blok ısıtıcıda 95°C'de 15 dk tutulmuş ve 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı alınarak polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kalıp DNA olarak kullanılmıştır (Doyle et al., 2012). PZR amplifikasyonları, 12.5 µL 2x PZR Master Miksi (Thermo Scientific, ABD), 1 µL her bir primer, 2 µL hedef DNA ve steril su eklenerek toplam 25 µL hacimde PZR karışımı içinde gerçekleştirilmiştir. Ambler sınıflandırmasına göre en sık gözlemlenen karbapenemazlar olan sınıf A (KPC, GES), sınıf B (NDM, İMP, VİM) ve sınıf D (OXA-48) beta-laktamazları kodlayan genler spesifik primerler ve amplifikasyon koşulları kullanılarak PZR ile tespit edilmiştir (Tablo 1). Tüm PZR ürünleri, boyut belirteci olarak 1 kbp DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) ile 1x TBE tamponu ve etidyum bromür içeren %1.5'lük agaroz jelde yürütülmüş, ultraviyole ışığı altında görüntülenmiştir.

Tablo 1. PZR'de kullanılan primerler ve amplifikasyon koşulları

Primer	Dizi	Boyut(bp)	Amplifikasyon Koşulları	Referans
İMP-R	5'-GAAGGCGTTTATGTTTCATAC-3'	587	95°C 5 dk 35 siklus (95 °C 45 sn, 60 °C 45 sn, 72 °C 1 dk), 72 °C 8 dk	Pitout et al., 2005
İMP-F	5'-GTACGTTTCAAGAGTGATGC-3'			
KPC-R	5'-TCTGGACCGCTGGGAGCTGG-3'	399	95°C 2 dk 35 siklus (94 °C 2 sn, 62 °C 10 sn, 72 °C 15 sn)	Poirel et al., 2011
KPC-F	5'-TGCCCGTTGACGCCAATCC-3'			
NDM-R	5'-GGGCAGTCGCTTCCAACGGT-3'	475	95°C 5 dk 30 siklus (95 °C 30 sn, 60 °C 40 sn, 72 °C 50 sn), 72 °C 6 dk	Perry et al., 2011
NDM-F	5'-GTAGTGCTCAGTGTGGCAT-3'			
OXA-48-R	5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3'	743	94°C 5 dk 35 siklus (95 °C 1 dk, 56 °C 45 sn, 72 °C 1 dk), 72 °C 7 dk	Aktaş ve ark., 2008
OXA-48-F	5'-GAGCACTTCTTTGTGATGGC-3'			
VİM-R	5'-GTTTGGTCGCATATCGAAC-3'	389	95°C 5 dk 35 siklus (95 °C 45 sn, 60 °C 45 sn, 72 °C 1 dk), 72 °C 8 dk	Pitout et al., 2005
VİM-F	5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'			
GES-CASA	5'-ACAAAGATTCCATCTCAAGGGAT-3'	860	94°C 5 dk 35 siklus (95 °C 45 sn, 56 °C 45 sn, 72 °C 1 dk), 72 °C 7 dk	Çelik, 2007
GES-CASB	5'-GTTTTAGACGGCGCTCAACT-3'			

2.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel analizi SPSS sürüm 26.0 (IBM, Armonik, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda kullanılan enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin 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

Çalışmamıza dahil edilen karbapenem dirençli 100 *P. aeruginosa* izolatının genotipik test sonuçlarına göre 46'sının (%46) bir veya daha fazla direnç geni taşıdığı, negatif kontrol grubunun test edilen hiçbir karbapenemaz genini taşımadığı tespit edilmiştir. Fenotipik test ile karbapenemaz enzimi taşıyan 46 izolatın 31'i (%67) pozitif saptanmıştır. Geriye kalan 13 izolat yanlış negatif olarak; moleküler yöntem ile araştırılan direnç genlerini taşımadığı belirlenen 2 izolat ise yanlış pozitif şeklinde değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubunun tümünde fenotipik test negatif sonuçlanmıştır. 46 izolatta genlerin dağılımı, bla_{NDM} (n=36), bla_{GES} (n=2), bla_{VIM} (n=2), bla_{IMP} (n=2), bla_{OXA-48} (n=1), bla_{VIM} ile bla_{NDM} birlikteliği(n=1), bla_{GES} ile bla_{NDM} birlikteliği (n=1) ve bla_{NDM} ile bla_{OXA-48} birlikteliği (n=1) şeklinde saptanmıştır. Hiçbir izolatta bla_{KPC} geni tespit edilmemiştir. Çalışılan *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildikleri klinik örnekler göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildikleri klinik örnekler göre dağılımı (n=120)

Klinik Örnek	YBÜ n(%)	YBÜ Dışı n(%)
Solumun yolu	15(12.5)	25(20.8)
İdrar	6(5)	12(10)
Katater ucu	7(5.8)	6(5)
Sürüntü	6(5)	8(6.7)
Kan	4(3.3)	4(3.3)
Diğer steril örnekler	12(10)	15(12.5)
Toplam	50(42)	70(58)

*YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; %93.9 ve %82.8 olarak hesaplanmıştır. Testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; %67.4 ve %97.3 (p<0.0001) olduğu bulunmuştur. Korelasyon analizi sonucunda fenotipik test ile PZR testi arasında çok güçlü anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Phi Cramer's p=0.704, p<0.001) (Tablo 3).

Tablo 3. Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin PZR sonucu ile karşılaştırılması

		PZR Sonucu				p değeri	
		Negatif	Pozitif	Duyarlılık %	Özgüllük %		PPD %
Enzim-Substrat Etkileşimine Dayalı Reaksiyon Temelli Yöntem	Negatif	72	15				
	Pozitif	2	31	67,4	97,3	93,9	82,8

*PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu, PPD: Pozitif prediktif değer, NPV: Negatif prediktif değer

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

P. aeruginosa sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonları olan hastalarda en sık izole edilen patojenlerden birisidir ve çok sayıda antibiyotige karşı doğal dirençlidir (Halat and Moubareck, 2022). Bununla birlikte pseudomal enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kabul edilen karbapenemler de dahil pek çok antibiyotik grubuna karşı direnç kazanması küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Zhang et al., 2016). Bu durum enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır ve hastaneye yatırılan veya bağışıklık sistemi zayıflamış hastalar arasında morbidite ve mortalite oranlarını arttırmaktadır (Shaaban et al., 2017). DSÖ, *P. aeruginosa*'yu sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonlarda ve salgınlarda öncelikli tehdit oluşturan altı mikroorganizmadan biri olarak göstermektedir (Tacconelli et al., 2018).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin 2022 surveyans verilerine göre dünya genelinde *P. aeruginosa*'da karbapenem direnç oranının %18.1, Türkiye'de ise %39 olduğu bildirilmiştir (ECDC, 2022).

P. aeruginosa'da karbapenem direncinin gelişmesinde OprD porin kaybı, dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu ve karbapenemaz üretimi gibi çok sayıda mekanizma rol oynar (Jean et al., 2022). Karbapenemazlar, plazmid ve transpozon gibi mobil genetik elemanlar aracılığıyla çeşitli bakteri klonları arasında hızla aktarılıp yayılabildiğinden bu mekanizmalar içinde kritik önem taşımaktadır (Henry et al., 2011). *P. aeruginosa*'da Ambler sınıf A (KPC ve GES tipi beta-laktamazları), sınıf B (İMP, VİM ve NDM gibi farklı metalo-β-laktamazlar) ve sınıf D (OXA-48) gibi çok sayıda karbapenemaz tanımlanmıştır. Karbapenemazların dağılımı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. VİM, İMP ve NDM metalo-beta-laktamazlar en yaygın olanlardır (Walsh et al., 2005). Bunun yanı sıra dünya genelinde; KPC, GES ve OXA gibi beta-laktamaz türlerinin varlığının giderek arttığı rapor edilmiştir (Potron et al., 2015).

Karbapenemaz üretimine bağlı direnç, dünya çapında *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere karşı direnç geliştirdiği belirtilen vakaların %39'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da ise bu oran %30,6'dır (Rizek, C et al., 2014; Castanheira, M et al., 2014). Çalışmamızda karbapenem dirençli 100 izolattan 46'sının (%46) genotipik yöntemle bir veya daha fazla karbapenemaz geni taşıdığı tespit edilmiştir. Karbapenem

dirençli olan fakat direnç geni saptanmayan 54 izolatin ise diğer mekanizmaları kullanarak direnç kazandığı düşünülmektedir.

P. aeruginosa'da karbapenem direnci prevalansı pek çok ülkede %10-50 arasında değişmektedir. Son yıllarda karbapenemlere karşı gelişen direncin tüm dünyada giderek artması nedeniyle bu dirençli mikroorganizmanın direnç mekanizmasının erken saptanmasına yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç doğmuştur (Çopur ve ark., 2021).

Karbapenemaz genlerinin genotipik tekniklerle tespit edilmesi altın standarttır. Fakat bu yöntem yüksek maliyetlidir, uzmanlık ve uygun laboratuvar olanakları gerektirmektedir (Malkoçoğlu ve ark., 2017). Ek olarak bilinmeyen ve yeni direnç genlerinin varlığı tespit edilemeyeceğinden yanlış negatif sonuç riski bulunmaktadır (Aktaş ve ark., 2017). Karbapenemazların saptanması amacıyla çeşitli fenotipik yöntemler (Modifiye Hodge testi, karbapenem inaktivasyon metodu, immünokromatografik testler, Carba NP testi vb.) geliştirilmiştir. Tüm bu fenotipik testlerin hız, maliyet, duyarlılık ve özgüllükleri yönünden sınırlamaları bulunmaktadır. Dolayısıyla rutin laboratuvarında uygulanabilmesi için karbapenemaz üretimini hızlı tespit eden, basit, güvenilir ve uygun maliyetli yeni testlere ihtiyaç vardır (Osei et al., 2015; Aktaş ve ark., 2017). Son yıllarda, Nordmann ve çalışma arkadaşları tarafından karbapenemazların hızlı ve ucuz tespiti için Carba NP (Karbapenemase Nordmann-Poirel) testi geliştirilmiş ve ticari olarak pazara verilmiştir (Nordmann et al. 2012; Dortet et al., 2014). Carba NP, karbapenem grubu ilaçların beta-laktam halkasının enzimatik hidrolizi sonucu pH indikatörünün renk değişikliğine dayanan kolorimetrik bir testtir (Dortet et al., 2014). Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve EUCAST kılavuzlarında yer alan Carba-NP testi, yüksek doğruluk oranlarına sahip olması ve 2 saat gibi kısa süre içinde karbapenemaz aktivitesini saptamasıyla diğer fenotipik yöntemlere göre büyük bir avantaj sağlamıştır (CLSI, 2015; EUCAST, 2017). Carba NP testinin, karbapenemaz üreten *Pseudomonas spp.* için %100 spesifik ve %94.4 duyarlı olduğu bildirilmiştir (Nordmann ve Poirel, 2013). Fakat mukoid izolatlarda ve OXA-48 gibi zayıf karbapenemaz aktivitesi gösteren izolatlarda tespit etmede zorlanması gibi dezavantajları vardır. (Tijet et al., 2013).

Carba NP testinin sınırlamalarının üstesinden gelmek, maliyeti azaltmak ve işlem süresini kısaltmak amacıyla çeşitli modifikasyonları geliştirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik test, CLSI'de açıklanan Carba NP testinin bir modifikasyonudur (CLSI, 2015). Kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli yöntemde Carba NP'den farklı olarak bazı değişiklikler yapılmıştır: Bakteri inokulum miktarı artırılmış ve Tris-HCl lizis tamponunda süspansiyon edilmiştir. Bakteri süspansiyonu santrifüjleme yapılmadan homojen hale gelene kadar vortekslenmiş ve testte bütün bakteri lizati kullanılarak, etüv yerine oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Ek olarak imipenem monohidrat (3 mg/ml) yerine ticari olarak bulunabilen imipenem-silastatin (6 mg/ml) kullanılmıştır (Abdel Ghani et al., 2015). Çalışma

için 1,5 ml'lik mikrotüpler kullanılmış ve sonuçlar 2 saat yerine 1 saat sonunda değerlendirilmiştir (Dortet et al., 2014; Nordmann et al., 2012). Bu değişiklikler yapılarak testin yüksek maliyetinin ve testin uygulama süresinin azaltılması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda 36 izolat bla_{NDM} ve 3 izolat çoklu karbapenemaz genleri (bla_{VIM} + bla_{NDM}, bla_{GES} + bla_{NDM} ve bla_{NDM} + bla_{OXA-48}) varlığı moleküler yöntemle tespit edilmiştir. Çoklu karbapenemazların görüldüğü ve aynı protokoller uygulanarak Modifiye Carba NP testinin değerlendirildiği bir çalışmada 25 *P. aeruginosa* izolati çalışılmıştır. Yedi izolatta bla_{NDM} direnç geni ve 6 izolatta çoklu karbapenemaz direnç geni (bla_{NDM} + bla_{OXA 48} benzeri, bla_{NDM} + bla_{VIM}, bla_{NDM} + bla_{IMP}, bla_{VIM} + bla_{OXA 48} benzeri gen) dahil edilerek toplam izolat 16 karbapenemaz pozitif saptanmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde hiçbirinde bla_{KPC} geni saptanmamıştır. Karbapenemaz geni saptanmayan 9 örneğin tamamı fenotipik yöntemlerle dirençli olarak tanımlanmıştır. Modifiye Carba NP testi NDM üreten izolatlardan yalnızca 3'ünde (%43) ve çoklu karbapenemaz üreten izolatlardan 3'ünde (%50) doğru sonuç vermiştir. Çalışmamızda çoklu enzim içeren izolatlardan tamamı (n=3) fenotipik yöntem ile doğru tanımlanmıştır. NDM üreten izolatlardan %75'inde (n=27) fenotipik yöntem ile pozitif sonuç gözlemlenmiş olup bu sonuçlar, çalışmamızda çoklu enzim veya NDM üreten izolatlardan daha iyi tanımlandığını göstermektedir (Rudresh et al., 2017).

Yapılan çalışmalarda, enfeksiyon etkeni olan *P. aeruginosa*'da karbapenem direncinin hızlı tespiti özellikle vurgulanmaktadır (Nordmann et al., 2012; Nordmann 2014). Çalışmamızın önemli sonuçlarından biri; NDM, VIM, IMP, OXA-48 VE GES tipi karbapenemazların fenotipik test kullanılarak 1 saat gibi kısa sürede tespiti sağlanmıştır. İnkübasyon süresi 2 saate kadar uzatılarak sonuçlar tekrar değerlendirilmiş ve tüplerde herhangi bir renk değişimi gözlemlenmemiştir. Kritik hastalarda uygun antibiyotik tedavisinin verilmesindeki 1 saatlik gecikmenin hastanın ölüm riskini %20 artırdığı dikkate alındığında, testin inkübasyon süresinin 2 saatten 1 saate düşmesi hastaya zamanında uygun tedaviyi vermek açısından büyük önem taşımaktadır (Kumar et al., 2006). Buna ek olarak 3 izolatta testin ilk 20 dakika içinde pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. PZR analizlerinde bu izolatlardan bla_{NDM} geni taşıdığı belirlenmiştir. Negatif kontrol grubunda fenotipik testle de negatif saptanmıştır. Buna karşın PZR ile karbapenemaz geni saptanan 13 izolat fenotipik testle yanlış negatif sonuç vermiştir. Benzer bir çalışmada karbapenemaz üreticisi olduğu saptanan fakat fenotipik test ile negatif sonuçlanan izolatlardan, direnç genlerinin ekspresyonunun hiç olmadığı veya düşük seviyede olduğu için fenotipik yöntem ile karbapenemaz varlığı tespit edilemediği bildirilmiştir (Dortet et al., 2014).

Literatürdeki bir çalışmada bakteri ekstraktı miktarının artırılmasıyla duyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla %72,5 ve %69,2'den %80 ve %77,3'e arttığı gösterilmiştir (Tijet et al., 2013). Özellikle OXA-48 ve GES enzimlerinde bakteri inokulum miktarının artışıyla duyarlılığın yükseldiği gösterilmiştir

(Aguirre-Quiñonero, ve Martínez-Martínez, 2017). Çalışmamızda yanlış negatif sonuç veren izolatlardan bakteri inokülüm miktarı ve antibiyotik düzeyi arttırılarak deney tekrar edildiğinde test sonucumuzda herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ayrıca çalışmamızda süspansedilmesi zor olan çok sayıda mukoid izolat ile karşılaşmıştır. Mukoid izolatlar kullanılan yöntemin en önemli dezavantajlarından biridir. Yanlış negatif sonuçlar, OXA-48 alt tipleri gibi düşük hidrolitik karbapenemaz aktivitesine sahip enzimlerin varlığına ya da mukoid yapıdaki izolatlarla ilişkilendirilebilir (Yusuf et al., 2014). Daha önce yapılan çalışmalarda mukoid izolatların yanlış negatif sonuçlara yatkın olduğu belirtilmiştir (Tijet et al., 2013; Tijet et al., 2014).

Karbapenemaz aktivitesinin enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik test ile tespiti için standart bir protokol bulunmasa da benzer prosedürlerin uygulandığı birçok çalışma yapılmıştır. Farklı çalışmalarda testlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri %94-100 ve %98-100 aralığında bulunmuştur (Mangayarkarasi et al., 2018; Yusuf et al., 2014; Tamma et al., 2017; Bayramoğlu ve ark., 2016). Çalışmamızda karbapenemaz üretimi için fenotipik testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %67,4 ve %97.3 olarak bulunmuştur. Duyarlılık oranımız hem ülkemizdeki diğer çalışmalarda hem de dünya literatüründe verilen oranlardan düşüktür (Thomson et al., 2017; Aguirre-Quiñonero, ve Martínez-Martínez, 2017; Bayramoğlu ve ark., 2016). Öte yandan suşlardaki karbapenemaz enzimlerinin dağılımı ve mukoid izolatlar çalışmaları arasındaki farklılıkları açıklayabilir. Çalışmamızda kullanılan izolatların çoğunluğu NDM taşıyıcısıdır.

Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin en önemli avantajlarından biri uygulanmasının kolay olması ve uzmanlık gerektirmemesidir. Rutin laboratuvarında bulunan ekipmanlarla üreme gözlemlenen klinik örneklerden kısa sürede karbapenemaz aktivitesi hakkında bilgi sahibi olunabilir.

DSÖ, karbapenemaz aktivitesini saptamada uygun maliyetli testlerin geliştirilmesini önermektedir. Çalışmamızda test başına maliyet yaklaşık 5 TL (0.14 Euro, 26.01.2024) olarak hesaplanmıştır. Benzer bir çalışmada bir izolat için test maliyeti yaklaşık 0.31 euro, farklı bir çalışmada ise test başına maliyet <0.2 dolar olarak belirtilmiştir (Yusuf et al., 2014; Rudresh et al., 2017).

Enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin bir diğer avantajı moleküler yöntemlerle tespit edilemeyenler de dahil olmak üzere tüm karbapenemaz türlerini tespit edebilmesidir (Akhi et al., 2017; Nordmann, 2017). Buna karşın test çıplak gözle subjektif olarak yorumlandığı için küçük renk değişiklikleri yanlış veya belirsiz sonuçlara yol açabilmektedir (Simner et al., 2018).

Sonuç olarak, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının hızlı ve doğru tanımlanması, zamanında uygun tedavinin verilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerini başarılı bir şekilde uygulanması açısından çok önemlidir. Diğer fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında, enzim-substrat etkileşimine

dayalı reaksiyon temelli kolormatik test, sonucun hızlı elde edilmesi, kolaylıkla uygulanabilmesi ve kısıtlı bütçeye sahip laboratuvarlarda kullanılabilmesi gibi avantajları nedeniyle öne çıkmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız enzim-substrat etkileşimine dayalı reaksiyon temelli kolormatik testin performansının değerlendirilmesine yönelik daha fazla sayıda örnek içeren *in vitro* çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Finansman: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPKO) tarafından TYL-2023-11039 nolu proje ile desteklenmiştir.

*Çalışmamız 28-30 Eylül 2023'te İstanbul'da düzenlenen Bio Türkiye-Uluslararası Biyoteknoloji Kongresi'nde sunulmuştur.

5. KAYNAKLAR

- [1] AbdelGhani S, Thomson GK, Snyder JW, Thomson KS. Comparison of the Carba NP, modified Carba NP, and updated Rosco Neo-Rapid Carb kit tests for carbapenemase detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015; 53 (11):3539-3542.
- [2] Aguirre-Quiñonero A & Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2017; 23(1):1-11.
- [3] Akhi MT, Khalili Y, Ghotaslou R, Kafil HS, Yousefi S, Nagili B & Goli HR. Carbapenem inactivation: a very affordable and highly specific method for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared with other methods. *Journal of Chemotherapy*. 2017; 29(3):144-149.
- [4] Aktaş E, Malkoçoğlu G, Otlu B, Çopur ÇA, Külah C, Cömert F, & Bulut ME. Evaluation of the carbapenem inactivation method for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in comparison with the rapidec carba np. *Microbial Drug Resistance*. 2017;23 (4): 457-461.
- [5] Aktaş Z, Kayacan ÇB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*. 2008; 54(2): 101-106.
- [6] Bayramoğlu G, Ulucam G, Gençoğlu ÖÇ, Kılıç A, Aydın F. Comparison of the modified hodge test and the carba NP test for detection of carbapenemases in enterobacteriaceae isolates enterobacteriaceae izolatlarında karbapenemazların saptanmasında modifiye hodge testi ve carba NP testlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 2016;50(1):1-10.
- [7] Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014; 69(7):1804-1814.
- [8] CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth informational supplement M100-S25. CLSI, Wayne, PA. 2015.

- [10] Çelik N. Çoğul dirençli nozokomiyal pseudomonas aeruginosa suşlarında beta laktamazların fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi.2007.
- [11] Çopur ÇA, Ertürk A, Ejder N, Rakici E, Kostakoğlu U, Esen Yİ, Sönmez E. Screening of antimicrobial resistance genes and epidemiological features in hospital and community-associated carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa infections. *Infection and Drug Resistance*. 2021; 14: 1517-1526.
- [12] Dortet L, Brécharde L, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Strategy for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2014; 58(4): 2441-2445.
- [13] Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbaAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing acinetobacter spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014; 52(7): 2359-2364.
- [14] ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control, Surveillance Report Antimicrobial Resistance In The Eu/Eea (Ears-Net) ,2022.
- [15] Halat DH, Moubareck CA. The intriguing carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: current status, genetic profile, and global epidemiology. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2022; 95(4): 507.
- [16] Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. in: Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2011;Vol.1. (10th ed) Washington DC, s: 677-691.
- [17] Jean, SS, Harnod D, Hsueh PR. Global threat of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022; 12: 823684.
- [18] Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE., Sharma S,& Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*. 2006; 34(6): 1589-1596.
- [19] Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B, Otlu B, Bulut ME. VIM-1, VIM-2, and GES-5 carbapenemases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates at a tertiary hospital in Istanbul, Turkey. *Microbial Drug Resistance*. 2017; 23(3): 328-334.
- [20] Mangayarkarasi V, Moses SP, Swarna SR, Kalaiselvi K, Fathima SS. In-house standardization of Carba NP test for carbapenemase detection in gram negative bacteria. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 2018; 7(01): 2876-2881.
- [21] Nordmann, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Medecine et Maladies Infectieuses*. 2014; 44(2): 51-56.
- [22] Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68(3): 487-489.
- [23] Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*. 2012; 18(9): 1503.
- [24] Osei SJ, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2015;119 (5): 1219-1233.
- [25] Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA., Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S & Raza MW. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan and evaluation of two chromogenic media. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(10): 2288-2294.
- [26] Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2005; 43(7): 3129-3135.
- [27] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011; 70(1): 119–123.
- [28] Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International Journal Of Antimicrobial Agents*. 2015; 45(6): 568-585.
- [29] Rizek C, Fu L, Dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, & Costa SF. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2014; 13: 1-5.
- [30] Rudresh SM, Ravi GS, Sunitha L, Hajira SN, Kalaiarasan E, Harish BN. Simple, rapid, and cost-effective modified Carba NP test for carbapenemase detection among Gram-negative bacteria. *Journal of Laboratory Physicians*. 2017; 9(04): 303-307.
- [31] Shaaban M, Al-Qahtani A, Al-Ahdal M, Barwa R. Molecular characterization of resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to carbapenems. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2017; 11(12): 935-943.
- [32] Simner PJ, Johnson JK, Brasso WB, Anderson K, Lonsway DR, Pierce VM & Roe-Carpenter DE. Multicenter evaluation of the modified carbapenem inactivation method and the Carba NP for detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;56(1): 10-1128.
- [33] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL& Zorzet A. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18(3): 318-327.
- [34] Tamma PD, Opene BN, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, & Simner PJ. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55(4): 1046-1055.
- [35] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017
- [36] Thomson G, Turner D, Brasso W, Kircher S, Guillet T, Thomson K. High-stringency evaluation of the automated BD Phoenix CPO detect and Rapidec Carba NP tests for detection and classification of carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;55(12): 3437-3443.
- [37] Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Reply to "further proofs of concept for the Carba NP test." *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58:1270.
- [38] Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(9): 4578-4580.
- [39] Walsh, TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*, 2005;18(2): 306-325.

- [40] 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.
- [41] Zhang Y, Chen XL, Huang AW, Liu SL, Liu WJ, Zhang N, Lu XZ. Mortality attributable to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. *Emerging Microbes & Infections*, 2016;5(1): 1-6.

How to cite this article: Karali H, Güncü MM, Aksu MB. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *pseudomonas aeruginosa*'nın karbapenemaz üretimi ve tiplendirilmesinde fenotipik ve genotipik yöntemlerin değerlendirilmesi. *Journal of Health Sciences and Management*, 2024; 4 (2): 42-49. DOI: 10.29228/JOHESAM.35