

Klebsiella pneumoniae İzolatlarının Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Profilinin Genotipik ve Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

Investigation of Extended Spectrum Beta-Lactamase Profiles of Klebsiella pneumoniae Isolates by Using Genotypic and Phenotypic Methods

Şükrü ŞEN^{1*}, Ufuk HASDEMİR^{2,3}

¹ Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

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

³ T.C. Sağlık Bakanlığı Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

Sorumlu Yazar: Şükrü ŞEN

E-mail: sukruusen96@gmail.com

Gönderme Tarihi: 07.05.2024

Kabul Tarihi: 20.05.2024

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, hastanemizde izole edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üretimini fenotipik ve genotipik yöntemlerle tespit etmek ve bölümümüzde yeni geliştirilen kolorimetrik-GSBL testinin performansını değerlendirmektir.

Yöntem: 2018-2023 yılları arasında hastanemizde rutin otomatize duyarlılık testinde seftazidim ve seftriakson MİK'leri GSBL tarama sınırının (>1mg/L) üstünde olan 100; altında (≤1mg/L) olan 20 *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlarda GSBL pozitifliği ve negatifliği, EUCAST önerilerine göre kombinasyon disk testi ile konfirme edilmiştir. En sıklıkla rastlanan üç GSBL geni, bla_{TEM} , bla_{SHV} ve bla_{CTX-M} yönünden spesifik primerlerle PZR'a alınmıştır. PZR testinde GSBL genlerinden en az biri saptanan izolatlarda kolorimetrik-GSBL testinin, GSBL saptamadaki performansı değerlendirilmiştir. Kolorimetrik-GSBL testi, belirli konsantrasyonlarda sefotaksim/seftriakson ve pH indikatörü olarak fenol-kırmızısı içeren bir tüpte gerçekleştirilmiştir (araştırmacıyla görüşme sonucu).

Bulgular: Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) tarafından tarama testinde MİK'leri >1 mg/L olan 100 izolatın tamamı kombinasyon disk testi ile GSBL pozitif olarak doğrulanmıştır. İzolatların %97'sinde PZR ile araştırılan GSBL genlerinden en az biri saptanmıştır. En sıklıkla rastlanan GSBL geni, tek başına veya diğer bir GSBL geni ile birlikte bla_{CTX-M} (%95,9) oldu. Üç geni bir arada taşıyan izolatların oranı %28,9'dur. PZR test sonuçlarını göre, PZR pozitif 97 izolatın 94'ü kolorimetrik-GSBL testi ile pozitif sonuç vermiştir. PZR negatif 20 izolatın ise kolorimetrik-GSBL testi ile hepsi GSBL negatif bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda, *K. pneumoniae* izolatlarımızda en yaygın GSBL geninin bla_{CTX-M} olduğu ve izolatların yarısından çoğunda ikili veya üçlü GSBL gen kombinasyonlarının varlığı belirlenmiştir. Kolorimetrik-GSBL testinin, bla_{CTX-M} , bla_{SHV} ve bla_{TEM} genlerini saptamadaki duyarlılığının (%96,9) ve özgüllüğünün (%100), geniş kapsamlı çalışmalarda da değerlendirilmek koşuluyla, yüksek olduğunu kaydedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, *Klebsiella pneumoniae*, kolorimetrik test, polimeraz zincir reaksiyonu

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study is to detect the production of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolates isolated in our hospital using phenotypic and genotypic methods and to evaluate the performance of the newly developed colorimetric-ESBL test in our department.

Materials and Methods: Between 2018 and 2023, routine automated susceptibility testing in our hospital detected MICs of ceftazidime and ceftriaxone that were 100 above the ESBL screening limit (>1mg/L); 20 *K. pneumoniae* isolates that were below (\leq 1mg/L) were included in the study. The ESBL positivity and negativity of the isolates was confirmed by a combination disk test according to the EUCAST recommendations. The three most common ESBL genes, bla_{TEM} , bla_{SHV} and bla_{CTX-M} were PCR-treated with specific primers. The performance of the colorimetric-ESBL test in detecting ESBL in isolates in which at least one of the ESBL genes was detected in the PCR test was evaluated. The performance of the colorimetric-ESBL test in detecting ESBL in isolates in which at least one of the ESBL genes was detected in the PCR test was evaluated. The colorimetric-ESBL test was performed in a tube containing specific concentrations of cefotaxime/ceftriaxone and phenol red as a pH indicator (*unpublished data).

Results: All 100 isolates with MICs >1 mg/L in the screening test with Vitek 2 (bioMérieux, France) were confirmed as ESBL-positive by the combination disk test. At least one of the ESBL genes tested by PCR was detected in 97 % of the isolates. The most frequently occurring ESBL gene was bla_{CTX-M} (95.9 %), alone or in combination with another ESBL gene. The proportion of isolates carrying all three genes together was 28.9 %. According to the PCR test results, 94 of 97 PCR-positive isolates showed positive results in the colorimetric-ESBL test. Of the 20 PCR-negative isolates, all were found to be ESBL-negative in the colorimetric-ESBL test.

Conclusion: Our study showed that the most common ESBL gene in our *K. pneumoniae* isolates was bla_{CTX-M} and more than half of the isolates had a double or triple ESBL gene combination. The evaluation of extensive studies showed that the sensitivity (96.9 %) and specificity (100 %) of the colorimetric-ESBL test in detecting the bla_{CTX-M} , bla_{SHV} and bla_{TEM} genes were high.

Keywords: antibiotic resistance, colorimetric test, extended spectrum beta-lactamase, *Klebsiella pneumoniae*, polymerase chain reaction

1. GİRİŞ

Dünya genelinde halk sağlığı problemlerinin önemli bölümü enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanmaktadır. Özellikle bakteriler, enfeksiyon hastalıklarının büyük bir bölümünden sorumlu olmaktadır. Bakterilerin sebep olduğu enfeksiyon tedavisi antibiyotiklerle sağlanmaktadır. Son yıllarda enfeksiyon etkeni bakteriler arasında antibiyotiklere karşı direnç hızla artmaktadır (WHO, 2020).

Beta laktam grubu dünya çapında reçete edilen antibiyotiklerin başında gelmektedir. Günümüzde bu grup antibiyotiğe karşı direnç gelişmiştir. Özellikle, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), *Enterobacteriaceae*'de bulunan en yaygın antibiyotik direnci türlerinden biri olduğu bilinmektedir. Yaklaşık olarak 400 farklı GSBL türü tanımlanmıştır (Latifpour ve ark., 2016). Tanımlanan bu direnç profilleri tüm dünyada ve ülkemizde hızlıca yayılmaktadır (Paterson ve ark., 2005, Stürenburg ve ark., 2003). GSBL'ler, plazmidler aracılığıyla aktararak üçüncü kuşak sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize etmektedir (Akova, 2004). GSBL'ler, plazmitler tarafından kodlanan ana enzim ailelerini ve varyantlarını içermektedir. Bu kodlanan ana enzim aileleri: TEM, SHV, CTX-M ve OXA tipi enzimlerdir (Paterson ve ark., 2005). CTX-M tipi beta-laktamazlar, sefotaksimleri en iyi hidrolize eden enzimler olup beş farklı alt gruptan (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25) oluşmaktadır (Harada ve ark., 2008). Bu grupların içinde en sık gözlenen enzimler ise CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-3 ve CTX-M-2'dir (Harada ve ark., 2008, Carattoli, 2009). Ana enzimleri kodlayan genlerde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda yeni varyant enzimler çıkmıştır. Ayrıca farklı bölgelerde nadir olarak TEM ve SHV dışı GSBL'ler, GES, VEB, PER, IBC, BES, TLA ve SFO, görülmektedir (Moland ve ark., 2008).

GSBL genlerini içeren plazmitler ayrıca aminoglikozitler, kloramfenikol, sülfonamidler, trimetoprim ve tetrasiklin gibi diğer antibiyotik sınıflarına ait genleri de içermektedir (Rozwandwicz ve ark., 2018). Dolayısıyla bu plazmidleri içeren Gram-negatif basiller çoğunlukla çoklu antibiyotik direnci gösteren bakterileridir (Rozwandwicz ve ark., 2018).

GSBL üreten *Enterobacteriaceae* ile enfekte olma riski en yüksek grubun yoğun bakım ünitelerinde uzun süre yatmakta olan hastalar olduğu bilinmektedir (Navon-Venzea ve ark., 2017). GSBL üreten izolatların hızlı teşhis edilememesi, bu izolatlarla gelişen enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmakta ve morbitide ve/veya mortalite oranlarında ciddi artışlara neden olmaktadır (Navon-Venzea ve ark., 2017).

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) türlerinin, hastane kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık %10'una neden olduğu ileri sürülmektedir; gram-negatif bakteriyel sepsisin ise en yaygın ikinci nedeni olarak gösterilmekte ve idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %6 ile %17'sini oluşturmaktadır. Bu durum *K. pneumoniae* türlerini hastane içinde en sık gözlenen sekiz patojen arasına sokmaktadır (Jean ve ark., 2011, Tsai ve ark., 2010). *K. pneumoniae*'de gerçekleşen antimikrobiyal direnç kendi kendine konjuge olan plazmitlerin kazanımına bağlanmaktadır (Lee ve ark., 2016). Bundan dolayı, aynı suşta birden fazla β -laktamaz geninin taşınması, *K. pneumoniae*'nin spesifik özelliği olup patojenin seçici başarısına katkı sağlayabilmektedir (Lee ve ark., 2016).

Hastanemizde GSBL üretimi gösteren *K. pneumoniae* izolatlarının ciddi oranlarda izole edilmesi nedeniyle bu izolatlardaki antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi son derece önem arz etmektedir. Çünkü *K. pneumoniae*'da GSBL üretiminin erken tanısı, tedavinin doğru yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle araştırmamızda, hastanemizde enfeksiyon etkeni

olarak izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında antibiyotik direncinden sorumlu tutulan TEM, SHV ve CTX-M tipi GSBL enzimlerinin yaygınlığının araştırılması ve bununla birlikte, GSBL üreten izolatların fenotipik olarak hızlı tanımlanması için bölümümüzde geliştirilen kolorimetrik-GSBL saptama testinin *K. pneumoniae* izolatları üzerindeki performansının değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2018-2023 yılları arasında Sağlık Bakanlığı Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında farklı servis (hematoloji, onkoloji, plastik cerrahi, üroloji) ve yoğun bakım ünitelerinden (anesteziyoloji ve reanimasyon, covid, dahiliye, pediatri, erişkin, organ nakli) alınmış invaziv (kan, bos) örnekleri etken olarak izole edilen ve ardından stoklanan, otomatize sistem (VITEK 2 Compact, BioMérieux, Fransa) ile duyarlılık testinde seftazidim (CAZ) ve seftriakson (CRO) antibiyotiklerinin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri GSBL tarama sınırının ($>1\text{mg/L}$) üstünde olan 100 adet *K. pneumoniae* izolatı; kontrol grubu olarak ise GSBL tarama sınırının ($\leq 1\text{mg/L}$) altında olan 20 adet *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir (Hope ve ark., 2013). Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu tarafından (19.09.2012 tarih ve 94 kayıt numarası) onaylanmıştır.

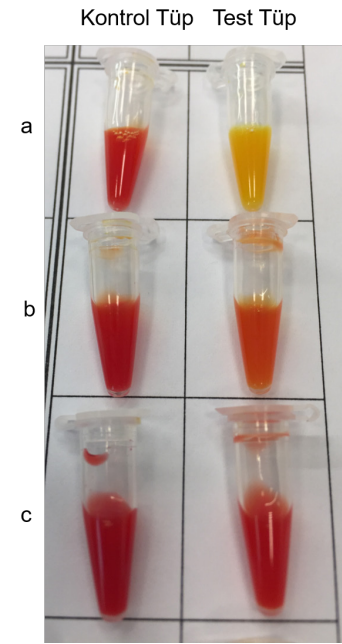
2.1 Fenotipik Yöntemler

2.1.1. GSBL Fenotipik Doğrulama

a. Kombinasyon Disk Testi (KDT): Seçilen izolatların GSBL üretiminin fenotipik olarak doğrulanmasında EUCAST önerilerine göre seftazidim (CAZ), seftoksim (CTX), seftazidim-klavulanik asit (CAZ/CLA) ve seftoksim-klavulanik asit (CTX/CLA) kullanılarak KDT yöntemi kullanılmıştır. – 80°C'deki derin dondurucudan çıkartılan stoklar kanlı agara (BioMérieux, Fransa) ekilmiş ve 35°-37°C'lik etüvde 18-24 saatlik inkübasyona kaldırılmıştır. Kültürlenmiş izolatlar, 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/mL) bulanıklığında bakteri süspansiyonu Mueller Hinton Agar'ın (MHA) üzerine steril eküvyon aracılığıyla yayılmıştır. CAZ/CLA ve CTX/CLA MHA besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. 35°C'de 16-18 saat inkübasyondan sonra sefalosporinlerin tek başlarına oluşturdukları zon çapı ile klavulanik asitli bileşikler arasında ≥ 5 mm fark olması GSBL üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Towne ve ark., 2010).

b. Kolorimetrik Test: PZR testinde GSBL genlerinden en az biri saptanan izolatlarda kolorimetrik-GSBL testinin, GSBL saptamadaki performansı değerlendirilmiştir. Kolorimetrik-GSBL testinin çalışma prensibi: – 80°C'deki derin donduncuda stoklanmış *K. pneumoniae* izolatları kanlı agara (BioMérieux, Fransa) pasajlanmış ve 35°-37°C'lik etüvde bir gece inkübasyona kaldırılmıştır. Ardından taze kültürde üreyen *K. pneumoniae* kolonileri deney için hazırlanmıştır. Buna göre, bir tüpün içinde 400 µL TrisHCl (20 mmol/L) solüsyonu

eklenmiş ve ardından 4 öze dolusu bakteri kolonisi solüsyonun içine eklenmiştir. Daha sonra süspansiyon vortekslenmiş ve bakterinin parçalanması için oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona kaldırılmıştır. Ardından deneyin gerçekleşeceği tüpler hazırlanmıştır. Tüpler de 12 mg/L konsantrasyonlarda seftoksim/seftriakson antibiyotiği, pH indikatörü fenol-kırmızısı ve bakteri süspansiyonu içeren test tüpü ile sadece pH indikatörü olarak fenol-kırmızısı ve bakteri süspansiyonu içeren kontrol tüpü kullanılmıştır. Test tüpleri ile kontrol tüpleri oda sıcaklığında 2 saat boyunca takip edilmiştir. GSBL üreten tüpler de pH değişimi sonucu renk değişimi (kırmızı/sarı/turuncu) görülmüştür (Resim 1) (araştırmacıyla görüşme sonucu).



Resim 1. Kolorimetrik-GSBL saptama testi. a. Kontrol tüpünde renk değişiminin olmaması testin doğru çalıştığını göstermektedir. Test tüpündeki renk değişimi (kırmızı/sarı) GSBL pozitifliğini göstermektedir. b. Kontrol tüpünde renk değişiminin olmaması testin doğru çalıştığını göstermektedir. Test tüpündeki renk değişimi (kırmızı/turuncu) GSBL pozitifliğini göstermektedir. c. Kontrol tüpünde renk değişiminin olmaması testin doğru çalıştığını göstermektedir. Test tüpünde renk değişimi (kırmızı/kırmızı) olmaması GSBL negatifliğini göstermiştir.

2.2 Genotipik Yöntemler

izolatlarda bla_{TEM} , bla_{SHV} ve bla_{CTX-M} genlerinin varlığı uygun primerler kullanılarak PZR ile araştırılmıştır. İzolatlar, MHA'da (BioMérieux, Fransa) 37°C'de 18-24 saat inkübasyon ile üretilmiştir. DNA ekstraksiyonu için, bakteriler kanlı (BioMérieux, Fransa) agara ekilmiş ve 18-24 saatlik inkübasyona kaldırılmıştır. Kültürden elde edilen saf koloniler eppendorf tüpünde 100 µL steril distile su içinde 5 saf koloni ile homojenize edilmiştir. Karışım kuru blok ısıtıcıda 95°C'de 10 dk inkübasyona tutulmuştur. Tüp 1500 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş ve sonrasında DNA içeren süpernatant kısmı alınmış ve üzere – 20°C'de saklanmıştır (Doyle ve ark.,

2012). PZR için kullanılan primerler ve reaksiyon şartları belirtilmiştir (Tablo 1). Elde edilen PZR ürünleri, etidyum bromür varlığında %1'lik agaroz jelde yürütülüp ultraviyole ışık altında değerlendirilmiştir (Roschanski ve ark., 2014).

Tablo 1. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz genlerine özgü primer ve reaksiyon koşulları

Gen	Primer Dizisi (5'-3')	bp	Reaksiyon Koşulları
TEM-F TEM-R	5'-GAAGACGAAAGGGCCTCGTG-3' 5'-GGTCTGACAGTTACCAATGC-3'	1024	(94°C 30sn, 52°C 1dk, 72°C 1.5dk) 30 siklus, 72°C 10dk
SHV-F SHV-R	5'-CGCCGGGTTATTCTTATTGTCGC-3' 5'-TCTTCCGATGCCGCCAGTCA-3'	1016	(94°C 45sn, 52°C 1dk, 72°C 1.5dk) 30 siklus, 72°C 10dk
CTX-M-F CTX-M-R	5'-CGCTTGGCGATGGCAG-3' 5'-ACCGGATATCGTTGGT-3'	544	(94°C 1dk, 54°C 1dk, 72°C 2dk) 30 siklus, 72°C 10dk

Çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesinde dört gözlü tablo ile duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

EUCAST önerilerine göre tarama testinde CAZ ve CRO MİK değerleri >1 mg/L olan 100 izolatin hepsi KDT ile GSBL pozitif olarak doğrulanmıştır. Fenotipik olarak KDT'de GSBL pozitif bulunan 100 izolatin 97'sinde PZR ile araştırılan *bla*_{CTX-M} (%95,9), *bla*_{TEM} (%55,7), *bla*_{SHV} (%50,5) genlerinden en az biri saptanmıştır. Bu izolatlardan 22'si tek başına *bla*_{CTX-M} 4'ü tek başına *bla*_{SHV}, 26'sı *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M}, 17'si *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M} ikili gen ve 28'i *bla*_{SHV} + *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} üçlü gen kombinasyonlarını taşımaktadır (Tablo 2). KDT ile GSBL pozitif olduğu halde üç izolatta araştırılan GSBL genlerinin hiçbiri saptanmamıştır. Tarama sınır değerleri MİK ≤ 1mg/L olan 20 *K. pneumoniae* izolatinin kontrol amacıyla yapılan PZR testlerinde ise araştırılan GSBL genlerinden (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV}) hiçbiri saptanmamıştır.

Tablo 2. Kombinasyon disk testi ile GSBL pozitif bulunan 100 *K. pneumoniae* izolatinde GSBL-PZR sonuçları

Gen	GSBL-PZR pozitif izolat sayısı (%)
<i>bla</i> _{CTX-M}	22 (22,7)
<i>bla</i> _{SHV}	4 (4,1)
<i>bla</i> _{TEM}	0
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{SHV}	17 (17,5)
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{TEM}	26 (26,8)
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{TEM}	28 (28,9)
Toplam	97 (100)

Kolorimetrik-GSBL saptama testinin performansını değerlendirmek için altın standart olarak GSBL üreten izolatların PZR sonuçları esas alınmıştır. Buna göre, fenotipik olarak GSBL pozitif yüz *K. pneumoniae* izolatinin 97'si (%97) araştırılan GSBL genlerinin en az birine taşımaktadır. Doksan yedi adet PZR pozitif izolatın 94'ü (94/97) kolorimetrik-GSBL testinde renk değişimine uğramış ve GSBL üretimi açısından pozitif bulunmuştur. Buna göre kolorimetrik-GSBL testinin

duyarlılığı %96,9 bulunmuştur. Kontrol grubu olarak ise GSBL-PZR negatif sonuç veren yirmi *K. pneumoniae* izolatı kullanılmış ve yirmi izolatin tamamı kolorimetrik-GSBL testinde renk değişimi gerçekleşmemiştir. Bunun sonucunda kolorimetrik-GSBL testimizin özgüllük oranı %100 olarak kaydedilmiştir. Ayrıca çalışmamızın pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri %87 hesaplanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. GSBL-PZR sonuçları baz alındığında GSBL-Kolorimetrik testin duyarlılık ve özgüllüğü

	GSBL-PZR pozitif izolat sayısı (%)	GSBL-PZR negatif izolat sayısı (%)	Toplam
Kolorimetrik-GSBL pozitif izolat sayısı (%)	94 (96,9)	0	94
Kolorimetrik-GSBL negatif izolat sayısı (%)	3 (3,1)	20 (100)	23
Toplam	97	20	117

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotik direnci, insan sağlığını tehdit eden en temel sorunlardan biridir. Beta laktam grubu antibiyotikler, en çok tercih edilen antimikrobiyallerin başında gelmektedir. Bununla birlikte bu grup antibiyotiklere karşı antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2023 yılında yayımlanan Avrupa'da antimikrobiyal direnç sürveyansı raporuna göre Türkiye'de 3. kuşak sefalosporine direnç oranı *K. pneumoniae*'da %75,4'tür (WHO ve ECDC, 2023).

Gram negatif bakterilerde, beta laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen en önemli direnç mekanizması beta-laktamaz enzimleridir (Pfeifer, 2010). Bu enzimleri kodlayan genler, bakteriler arasında horizontal olarak aktarılmakta ve bu durum direncin hızla yayılmasına neden olmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesi içinde bulunan *K. pneumoniae* izolatlarında ise GSBL enzimleri en yüksek oranda görülmektedir (Drieux ve ark., 2008). GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatlarının, tedavi seçeneklerini kısıtlama, hastanede yatış süresini uzatma, hasta maliyetini arttırma, mortalite ve morbiditeye neden olmalarından dolayı erken tespiti önemlidir.

GSBL'yi saptamak için Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines (CLSI) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ın önerdiği yöntemler mevcuttur. GSBL'leri saptama yöntemleri temelde ikiye ayrılmaktadır: tarama ve doğrulama testleri (Giske, 2017). Tarama testleri genel olarak disk difüzyon veya otomatize duyarlılık sistemlerine dayanmaktadır. Tarama yöntemlerinin GSBL üreten organizmaları saptama duyarlılık oranı %100 saptanmıştır (Gherardi ve ark., 2012). Doğrulama testleri, fenotipik ve genotipik yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Fenotipik yöntemler (KDT, çift disk sinerji testi, gradient strip testi, sıvı mikrodilüsyon testi ve biyokimyasal testler), GSBL aktivitesinin klavulanik asit ile inhibisyonu prensibine dayanmaktadır (Towne ve ark., 2010 ve Platteel ve

ark., 2013). Bu testlerin duyarlılık oranları %70-100 arasında değişmektedir (Platteel ve ark., 2013). GSBL genlerinin genotipik olarak tanımlanması, çoğunlukla altın standart olarak da kabul edilen PZR esasına dayanmaktadır (Bradford, 2001). Ayrıca, tüm genom analizi ve DNA mikroarray temelli başka genotipik yöntemlerde kullanılabilir (Ellington ve ark., 2017).

GSBL üretiminden sorumlu genler, dünyada ve ülkemizde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu genlerin tanımlanması ve direnç profillerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Uygun tedavi, morbidite ve mortaliteyi azaltacak etkenler buna bağlıdır.

Bu çalışmamızda, rutin otomatize (VITEK 2 Compact, BioMérieux, Fransa) sistemde CAZ ve CRO MİK'leri için tarama sınırı değerinin (>1 mg/L) üzerinde olan 100 *K. pneumoniae* izolatı, KDT ile konfirme edilmiş ve izolatların hepsi GSBL pozitif olarak doğrulanmıştır. Çalışmamızda, PZR ile 100 *K. pneumoniae* izolatlarının direnç genleri belirlenmiştir. Buna göre, bla_{CTX-M} geni tek başına izolatların 22'sinde; bla_{SHV} ise 4'ünde pozitif olarak bulunmuştur. İzolatlarımızın 17'si bla_{CTX-M} ile bla_{SHV} genlerini, 26'sı bla_{CTX-M} ile bla_{TEM} genlerini ve 28'si adeti araştırılan üç geni de birlikte bulundurmaktadır. Sonuç olarak, 100 *K. pneumoniae* izolatımızın 97'si PZR açısından pozitif saptanmıştır. Üç *K. pneumoniae* izolatının, KDT testi ile fenotipik olarak GSBL pozitif olduğu belirlenmiş olsa da araştırılan GSBL genlerinden hiçbirini taşımadığı görülmüştür. Bu izolatlarda araştırılan üç enzimin haricinde nadir rastlanan VEB, GES, IBC, PER, TLA, BES veya SFO beta-laktamazlarından biri bulunuyor olabilir. Bu beta-laktamazlara yönelik PZR veya tüm genom dizi analizi ile bu nadir beta-laktamazlar araştırılmalıdır.

Çalışmamızda izolatlarımızda en yaygın bulduğumuz GSBL geni bla_{CTX-M} . Bu gen tek başına ve diğer GSBL genleriyle birlikte toplamda izolatların %95,9'unda bulunmuştur. CTX-M tipi beta-laktamazları kodlayan genler, bilindiği üzere plazmidler aracılığı ile horizontal olarak bakteriler arasında çok hızla yayılmaktadır. Halbuki TEM ile SHV tipi enzimlere bağlı direnç, bunları kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmakta ve CTX-M kadar kolay horizontal olarak aktarılmamaktadır. (Livermore ve ark., 2008, Bush ve ark., 2018). Konjugatif plazmidler, CTX-M tipi GSBL'lerin *K. pneumoniae*'de yayılmasında temel faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (D'Andrea ve ark., 2013, Mathers ve ark., 2015). Özellikle CTX-M-1 grubunda yer alan $bla_{CTX-M-15}$ geni uyumsuz F grubu plazmidle taşınmakta olup bu plazmid CTX-M-15 dışında diğer antibiyotik gruplarına direnç genlerini de taşımaktadır (Carattoli, 2009).

GSBL üreten izolatların hızlı, güvenilir ve doğru tanımlanması ile uygun tedavi başarısı, hastanede yatış süresinin uzamaması, enfeksiyon kontrol önlemlerinin doğru uygulanması ve epidemiyolojik çalışmalara katkı sağlaması nedenleriyle oldukça önemlidir. EUCAST ve CLSI gibi GSBL saptama yöntemlerinin en büyük dezavantajı en az 24 saatlik inkübasyona ihtiyaç duymasıdır. Bundan dolayı, özellikle enzim-substrat etkileşiminde pH değişimine bağlı olarak

gelişen kolorimetrik testler olarak adlandırılan biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir (Nordmann ve ark., 2012).

Nordmann ve arkadaşları 2012 yılında GSBL-NDP testini geliştirmiştir. Doğrudan hasta örneklerine de uygulanabilen bu testin prensibi karbapenem hidrolizi sonucu pH değişimine bağlı olarak solüsyonun renginin kırmızıdan sarıya dönmesidir (Nordmann ve ark., 2012, Dortet ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar sonucunda testin duyarlılık oranı %73 ile %100 arasında saptanmıştır (Vasoo ve ark., 2013, Tijet ve ark., 2013, Yusuf ve ark., 2014).

Renvoise ve ark. 2013 yılında bir başka GSBL saptama testi olan β -Lacta testi geliştirmişlerdir. Bu test, doğrudan klinik örneklerde ve kolonilerde uygulanabilen kolorimetrik bir yöntemdir (Renvoise ve ark., 2013). Test, Avrupa ülkelerinde prospektif çok merkezli çalışma ile değerlendirilmiştir. Özellikle *K. pneumoniae*'de duyarlılık ve özgüllüğü %100 bulunmuştur (Renvoise ve ark., 2013). Bununla birlikte, testin *K. pneumoniae* için negatif prediktif değerinin yüksek olması, 3. kuşak sefalosporin direncini belirlemede efektif bir yöntem olarak kabul görmesini sağlamıştır (Renvoise ve ark., 2013).

Hastanemizde, 2020 yılı itibarıyla *K. pneumoniae* suşlarında GSBL pozitiflik oranı %53,1 olarak bulunmuştur (Altınkanat Gelmez ve ark., 2021). Bundan dolayı, çalışmamızın diğer bir adımı da PZR ile en az bir GSBL geni saptanan izolatların, bölümümüzde geliştirilmiş olan kolorimetrik-GSBL testi ile birlikte performansını değerlendirmektir. İzole edilen *K. pneumoniae* suşları, içerisinde 12 mg/L konsantrasyonlarda olan sefotaksim/seftriakson antibiyotigi ve pH indikatörü fenol-kırmızısı solüsyonuna inoküle edilmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat boyunca takip edilen tüplerde, GSBL enzimini üreten izolatlar, tüplerde antibiyotikleri parçalayarak pH değişimine neden olmuş ve tüplerdeki renk değişimi kırmızıdan sarıya dönüşmüştür. Kolorimetrik-GSBL saptama testimizi, EUCAST (Giske, 2017) yönergesine göre CAZ-CRO için tarama sınırı MİK değerleri >1 mg/L olan izolatların fenotipik doğrulaması için önerilen KDT ile kıyasladığımızda; kolorimetrik-GSBL testi, taze kültürden üretilmiş bakterilerden 2 saat gibi kısa bir süre de GSBL doğrulaması yapmıştır. Bu süre KDT ile yapılan GSBL doğrulamalarında yaklaşık 2 gün sürmektedir. Kolorimetrik-GSBL testinin avantajı, fenotipik olarak GSBL doğrulamasını KDT yöntemine göre yaklaşık 24 saat daha erken tespit etmesidir. Kolorimetrik-GSBL testinin maliyeti, EUCAST önerilerinde yer alan GSBL NDP testi ve β -Lacta testi gibi onaylanmış iki teste göre, daha düşüktür; test başı maliyeti yaklaşık olarak 5 Türk Lirası'dır. Diğer iki testin yurt dışı kaynaklı olması ve maliyetlerinin yaklaşık 12-60 USD arasında olması kolorimetrik-GSBL testinin diğer iki test ile arasındaki en büyük farkıdır. Ek olarak, testin ucuz ve son derece pratik olması iş akışı yoğun olan laboratuvarlarda rutine entegre olmasını da kolaylaştırmaktadır. Tüm bu veriler ışığında kolorimetrik-GSBL saptama testinin kolay, hızlı ve güvenilir olarak mikrobiyoloji laboratuvarına ivme katacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada en sık rastlanan üç enzim (bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , bla_{SHV}) açısından bu testin performansı belirlenmiştir. Bu yüzden PZR'yi altın standart olarak 97 PZR pozitif izolatla

kolorimetrik-GSBL testi değerlendirilmiştir. Doksan yedi adet PZR pozitif olan izolattan 94'ünde renk değişimi gözlenmiştir. Daha önceden tarama sınırı değerini geçemeyen ve hiçbir GSBL geni taşımadığı bilen 20 *K. pneumoniae* izolatu da kontrol grubu olarak test edilmiş ve herhangi bir renk değişimi görülmemiştir. Bununla birlikte, kolorimetrik-GSBL testinin duyarlılık oranı %96,9 ve özgüllük oranı %100 olarak oldukça yüksek bulunmuştur.

Kolorimetrik-GSBL testimizin sınırlamalarından biri doğrudan klinik örneklerden GSBL üretimini saptamamaktadır. GSBL üretimini test edebilmek için gelen klinik örnekler kültürleme işleminden sonra koloniler üzerinden yapılmaktadır. İkinci sınırlaması ise pH değişimine bağlı gerçekleşen renk değişiminin herhangi bir spektrofotometre cihazı ile değil tamamen subjektif olarak yorumlanmasıdır. Son olarak testimizin *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} gibi GSBL genlerinin alt gruplarını ayırt edememesi çalışmamızın sınırlamalarını oluşturmaktadır.

Çalışmamızda, *K. pneumoniae* izolatlarında GSBL üretiminde en yaygın CTX-M grubu enzimlerin olduğu tespit edilmiştir. İzolatların yarısından fazlasında antibiyotik direncini oluşturan genlerin ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde buldukları gözlemlenmiştir. Kolorimetrik-GSBL saptama testinin duyarlılık ve özgüllük oranının oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak bu testin, daha geniş kapsamlı bir çalışma ile birlikte performansını değerlendirmek gerekmektedir. Sonuç olarak, hastanemizde, bölgemizde, ülkemizde veya dünyamızda *K. pneumoniae* başta olmak üzere GSBL üretimi artmaya devam etmektedir. Bu nedenle akılcı tedaviyi sağlamak, yanlış antibiyotik kullanımını azaltmak için GSBL üreten izolatların rutinde taranması sağlanmalı ve direnç profilleri çıkartılmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Akova M. Dikkat Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Var! ANKEM Dergisi 2004; 18(2): 98-103.
- [2] Altınkanat Gelmez G, Hasdemir U, Söyletir G. Enterobacterales Üyelerinde Nadir Bir Plazmid Aracılı A Sınıfı Beta Laktamaz Olan IBC-1'in Araştırılması. *Experimed*. 2021;11(2):81-7.
- [3] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):933-951.
- [4] Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(10):e01076-18.
- [5] Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(6):2227-2238.
- [6] Giske CG, Martinez LM, Cantón R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, Nordmann P, Wootton M, Miriagou V, Simonsen GS, Zemlickova H, Cohen-Stuart J, Gniadkowski M. Detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST guidelines, version 2.01. 2017.
- [7] D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013;303(6-7):305-317.
- [8] Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae in blood cultures. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(3):504-507.
- [9] Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(12):3877-3880.
- [10] Drioux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide [published correction appears in *Clinical Microbiology and Infection*. 2008 May;14 Suppl 5:21-4]. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:90-103.
- [11] Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(1):2-22.
- [12] Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, et al. Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012 Jan;72(1):20-31.
- [13] Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*. 2008;28(6):401-412.
- [14] Hope R, Potz NA, Warner M, Fagan EJ, Arnold E, Livermore DM. Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(1):110-113.
- [15] Jean SS, Hsueh PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011;37(4):291-295.
- [16] Latifpour M, Gholipour A, Damavandi MS. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Nosocomial and Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2016;9(3):e31179. Published 2016 Mar 12.
- [17] Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:895. Published 2016 Jun 13.
- [18] Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase [published correction appears in *Clin Microbiol Infect*. 2008 May;14 Suppl 5:21-4]. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14 Suppl 1:3-10.
- [19] Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(3):565-591.
- [20] Moland ES, Kim SY, Hong SG, & Thomson KS. Newer β -Lactamases: clinical and laboratory implications, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2008; 30: 71-77.
- [21] Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Reviews*. 2017;41(3):252-275.

- [22] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(9):3016-3022.
- [23] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(4):657-686.
- [24] Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010;300(6):371-379.
- [25] Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, et al. Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(1):70-76.
- [26] Renvoisé A, Decré D, Amarsy-Guerle R, et al. Evaluation of the β Lacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(12):4012-4017.
- [27] Roschanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U. Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PLoS One*. 2014;9(7):e100956.
- [28] Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(5):1121-1137.
- [29] 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.
- [30] Towne TG, Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Jorgensen JH. Detection of SHV-type extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacter* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(1):298-299.
- [31] Tsai SS, Huang JC, Chen ST, et al. Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in community-acquired and nosocomial infections in diabetic patients. *Chang Gung Medical Journal*. 2010;33(5):532-539.
- [32] Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(9):3097-3101.
- [33] World Health Organization. Annual Report 2020, Access To Medicines And Health Products Programme. 2021.
- [34] World Health Organization and European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 – 2021 data. 2023, Stockholm.
- [35] 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(12):2237-2240.

How to cite this article: Şen Ş, Hasdemir U. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz profilinin genotipik ve fenotipik yöntemlerle araştırılması. *Journal of Health Sciences and Management*, 2024; 4(3):76-82. DOI: 10.29228/JOHESAM.40