

Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* İzolatlarında BD Phoenix CPO Yöntemi İle Karbapenemaz Üretiminin Tespiti

Determination of Carbapenemase Production by BD Phoenix CPO Method in Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates

Berrin Gergin Özkan¹, Nezahat Akpolat², Nida Özcan², Özge Alkan Bilik³

¹ Dicle Üniversitesi Tıp fakültesi, Nefroloji AD, Diyarbakır, Türkiye

² Dicle Üniversitesi Tıp Fak.T.Mikrobiyoloji AD, Diyarbakır, Türkiye

³ Selahaddin Eyyubi Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

Yazışma Adresi / Correspondence:

Nezahat Akpolat

Dicle Üniversitesi Tıp Fak.T.Mikrobiyoloji AD, Diyarbakır, Türkiye

T: +90 506 273 96 84 E-mail : nakpolat@dicle.edu.tr, nakpolat21@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.12.2021 Kabul Tarihi / Accepte: 06.06.2022

Orcid :

Berrin Gergin Özkan <https://orcid.org/0000-0001-5893-586X>

Nezahat Akpolat <https://orcid.org/0000-0002-8653-6046>

Nida Özcan <https://orcid.org/0000-0001-6898-7516>

Özge Alkan Bilik <https://orcid.org/0000-0002-7376-8032>

(Sakarya Tıp Dergisi / Sakarya Med J 2022, 12(2):273-282) DOI: 10.31832/smj.1039323

Öz

Amaç	Karbapenemaz üreten organizmalar, içerdikleri karbapenemaz enzimleri ile antibiyotiklerin birçoğuna bazen tamamına dirençli Gram negatif bakterilerdir. Karbapenemazların hızlı ve doğru saptanması dirençli hastane enfeksiyonlarının erken tespiti ve yayılımının önlenmesi için gereklidir. Çalışmada moleküler yöntemle karbapenemaz gen tayini yapılmış <i>Escherichia coli</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> izolatları BD Phoenix CPO Detect (Becton Dickinson, ABD) kiti ile çalışılarak testin karbapenemaz varlığını ve sınıflarını doğru saptayabilme durumu değerlendirilerek testin karbapenemazları saptamada duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi amaçlanmıştır.
Yöntem ve Gereçler	Metodolojik araştırma olarak tasarlanan çalışmaya, Dicle Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı bakteriyojoloji birimine Ocak 2020 – Aralık 2020 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> suşları dahil edilmiştir. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> izolatları matriks aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi [matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrophotometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Almanya) ile tanımlanmış, Xpert CARBA-R PCR referans yöntemi ile de izolatlarda KPC, NDM, VIM, OXA-48 ve IMP-1 varlığı araştırılmıştır. BD Phoenix CPO Detect (Becton Dickinson, ABD) kiti ile karbapenemaz durumu araştırılmış referans yöntemle karşılaştırılmıştır.
Bulgular	Moleküler test ile izolatların 64'ünün Oxa-48, 6'sının NDM, 2'sinin NDM+Oxa-48 içerdiği tespit edilen 72 izolat ile karbapenemazlardan KPC, NDM, VIM, OXA-48 ve IMP-1'i içermeyen 16 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. BD Phoenix CPO Detect testinin PCR ile uyumu Oxa-48 geni bulunan izolatlar için %95,3, NDM geni bulunanlar için %100 olarak bulunmuştur. Testin negatif prediktif değeri tüm izolatlarda %88,8, <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında %83,3, <i>E. coli</i> izolatlarında %100 olarak saptanmıştır.
Sonuç	<i>Enterobacterales</i> , <i>Paeruginosa</i> , <i>A.baumannii</i> karbapenemaz enzimlerini saptayabilen BD Phoenix CPO Detect testinin rutin tanı laboratuvarlarında kullanılması dirençli bakterilerin erken tanı ve doğru tedavisine katkı sağlayacaktır.
Anahtar Kelimeler	Karbapenemler; Duyarlılık testi; Direnç; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Escherichia coli</i>

Abstract

Introduction	Carbapenemase-producing organisms are Gram-negative bacteria that are resistant to most, sometimes all, antibiotics with their carbapenemase enzymes. Rapid and accurate detection of carbapenemases is essential for the early detection and prevention of resistant nosocomial infections.
Materials and Methods	Isolated from various clinical samples sent to the bacteriology unit of Dicle University Hospital Central Laboratory between January 2020 and December 2020. <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i> isolates were identified by matrix assisted laser desorption-time of flight mass spectrophotometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Germany). The presence of KPC, NDM, VIM, OXA-48 and IMP-1 in the isolates was also investigated with the Xpert CARBA-R PCR reference method. Carbapenemase enzyme groups were investigated in isolates with the BD Phoenix CPO Detect (Becton Dickinson, USA) kit.
Results	The study included 72 isolates, 64 containing Oxa-48, 6 NDM, 2 NDM+Oxa-48 and 16 isolates without carbapenemase. The compatibility of the BD Phoenix CPO Detect test with PCR was 95.3% for Oxa-48 carrying isolates and 100% for those with the NDM gene. The negative predictive value of the test was 88.8% in all isolates, 83.3% in <i>K. pneumoniae</i> isolates, and 100.0% in <i>E. coli</i> isolates.
Conclusion	The usage of the BD Phoenix CPO Detect test, which can detect carbapenemase enzymes, in routine diagnostic laboratories will contribute to the early diagnosis and correct treatment of resistant bacteria.
Keywords	Carbapenems; Resistance; Sensitivity Test ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Escherichia coli</i>

GİRİŞ

Karbapenemaz üreten organizmalar (KÜO), bakteriden bakteriye geçiş gösterebilen karbapenemaz enzimlerini içeren, antibiyotiklerin birçoğuna, bazen tamamına dirençli Gram negatif bakterilerdir.¹ İlk karbapenemaz üreten bakteri 1991'de Japonya'dan bildirilen *Paeruginosa* izolatıdır. Onu takiben Enterobacterales üyelerinde de karbapenemaz üretimi ve panrezistan izolatlar bildirilmiştir.^{1,2} Kırk yıla yakın zaman dilimi içerisinde KÜO yayılımı ciddi anlamda artmış, yüksek mortaliteli global bir pandemiye dönüşmüştür.³⁻⁵

Karbapenemaz üreten bakterilerin tedavisinde kombinasyon tedavisinin mortaliteyi ve direnç gelişimini önlediği bildirilmiştir.⁴ Yüksek mortaliteli enfeksiyonlara neden olan KÜO'nun etkin tedavisi ve diğer hastalara yayılımının önlenmesi için erken dönemde saptanması önemlidir. Karbapenemaz üreten mikroorganizmaların saptanması için kullanılan bazı testler zaman alıcı ve uğraştırıcıdır. Bakterilerin kültürde üremesi ve dirençli saptanmasının ardından uygulanır.⁶ Karbapenemazların moleküler yöntemlerle saptanması için geliştirilen ticari kitlerin ise maliyetleri yüksektir ayrıca her zaman fenotipe yansımaktadır. Karbapenemazların hızlı ve doğru saptanması dirençli hastane enfeksiyonlarının erken tespiti ve yayılımının önlenmesi için elzemdir. Bunun yanı sıra karbapenemaz direnç mekanizmasının tespiti epidemiyolojik anlamda önem taşır. Göçler, sadece insanların değil, dirençli bakterilerin de bir bölgeden veya ülkeden diğerine transferine yol açar. Karbapenemaz türlerinin tayini bu global pandemilerin kontrolünde kolaylık sağlayacaktır.⁷

Karbapenemaz tayinini antibiyotik duyarlık testi (ADT) ile eş zamanlı gerçekleştiren BD Phoenix CPO Detect testi son yıllarda kullanıma giren otomatize testlerden biridir. Kültürde üreme sonrası 24 saat içinde antibiyotik duyarlılığına ek olarak karbapenemaz genlerini de ön görmesi direnç genlerinin diğer hastalara yayılımının önlenmesi açısından zaman kazandırıcıdır.^{8,9} Bu çalışma ile moleküler yöntemlerle karbapenemaz gen tayini yapılmış izolatların

BD Phoenix CPO Detect kiti ile çalışılarak karbapenemaz genlerini doğru saptayabilme durumu değerlendirilmiştir. Çalışmamız, dirençli bakteriyel etkenlerin erken tanısı ve erken izolasyon önlemleri açısından ilgili testlerin rutin tanı laboratuvarlarında kullanımının maliyet-etkinliğinin ölçülmesinde yol gösterici olacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Metodolojik araştırma olan çalışmamıza, Dicle Üniversitesi Hastanesi klinik ve polikliniklerinden Merkez Laboratuvarı bakteriyoloji birimine Ocak 2020–Aralık 2020 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve moleküler yöntemlerle karbapenemaz genleri (KPC, NDM, VIM, OXA-48 ve IMP-1) içerdiği tespit edilen toplam 72 *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatı ile karbapenemaz genleri içermeyen 16 *K.pneumoniae* ve *E. coli* izolatı dahil edilmiştir.

Örnekler rutin kültür yöntemleri ile %5 Koyun Kanlı Agar (KKA) ve Eozin Methylen Blue (EMB) Agar besiyerlerine ekilmiş, aerob ortamda 16-24 saat süreyle 35±2°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların tür tayini matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi [matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrophotometry (MALDI-TOF MS)] (Bruker Daltonics, Almanya) yöntemi ile yapılmıştır. Xpert CARBA-R PCR referans yöntemi ile de izolatlarda KPC, NDM, VIM, OXA-48 ve IMP-1 varlığı araştırılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testi (ADT) ile karbapenemaz dirençli olduğu ve moleküler yöntemle karbapenemaz direnç genleri saptanan ve saptanmayan izolatlar %16'lık gliserollü Triptik Soy Broth içeren 2 ml'lik vidalı kapaklı steril saklama tüplerine alınarak çalışma zamanına kadar -20°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Örneklerin BD Phoenix CPO Detect Kiti ile Çalışılması

Dondurulmuş izolatlar çalışma gününden önce canlandırma amaçlı iki kez pasajlanmıştır. İlkinde KKA besiyerine, ardından EMB besiyerine subkültürleri yapılarak 37°C'de

16-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası saf üreyen bakteri izolatlarından 4-5 koloni eküvyon çubuğuyla alınarak ID Broth Tube (Cat No 246001) içerisine bırakılmıştır. Tüp içerisindeki bakteri süspansiyonu 10-20 saniye süreyle vortexlenerek homojen hale getirilmiş ve dansimetrik ölçümle 0,5-0,6 McFarland bulanıklığı sağlanmıştır. Bakteri süspansiyonu, kit üretici tavsiyesi ve antibiyotik duyarlılık test protokolleri uyarıları doğrultusunda çalışılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar (AST Broth Tube ; Cat No 246003, 8 ml) CPO Detect panelinin AST kısmına döküldükten sonra panelin kapakları kapatılıp laboratuvarında mevcut BD Phoenix otomatize sistem cihazına yerleştirilmiştir. Paneller BD Phoenix cihazında inkübasyona bırakıldıktan bir gün sonra antibiyogram ve yanı sıra karbapenemaz varlığıyla ilgili yorumlar cihaz tarafından otomatik olarak rapor halinde sunulmuştur.

İzolatların elde edildiği hasta bilgileri (yaş, cins, materyal, klinik) geriye dönük hasta dosyalarından elde edilmiştir. Üniversitemiz girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulundan 15.03.2019 tarih ve 108 protokol numaralı kararı ile izin alınmıştır. Moleküler test referans yöntem kabul edilerek CPO testinin karbapenemazları saptamada duyarlılık ve özgüllükleri saptanmıştır.

Kullanılan İstatistiksel Testler

Verilerin analizi SPSS 26 programı ile yapılmış ve %95 güven düzeyi ile çalışılmıştır. Kategorik (nitel) değişkenler için frekans ve yüzde (n(%)) istatistikleri verilmiştir.

BULGULAR

Bakterilerin izole edildiği hastaların 48 (%54,5)'i erkek, 40 (%45,5)'i kadındır. İzolatların 69 (%78,4)' u yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yatan hasta materyallerine aittir. Hastaların %33,0'ü 50-69 (ortalama yaş 52) yaş aralığındadır. İzolatların %78,4'ü yoğun bakımda bulunan hasta materyallerinden olup, %43,2'si kandan izole edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların %86,4'ü *K. pneumoniae* 'dır. Hastalara ait demografik ve mikrobiyolojik veriler Tablo 1'de verilmiştir.

Değişkenler		n (%)
Yaş	20 altı	15 (17)
	20-49	17 (19,3)
	50-69	29 (33)
	69 üstü	27 (30,7)
Cinsiyet	Erkek	48 (54,5)
	Kadın	40 (45,5)
Bölüm	KL	13 (14,8)
	YB	69 (78,4)
	POL	6 (6,8)
Materyal	Dren	1 (1,1)
	Eklem Sıvısı	1 (1,1)
	ETA	15 (17)
	İdrar	24 (27,3)
	Kan	38 (43,2)
	Katater	1 (1,1)
	Plevra	1 (1,1)
	Yara sürüntüsü	7 (8)
Bakteri	<i>E. coli</i>	12 (13,6)
	<i>K. pneumoniae</i>	76 (86,4)

İzolatların %81,8'inin PCR karbapenemaz sonucu pozitif olup %72,7'si Oxa-48, %6,8'i NDM ve %2,3 ND-M+OXA-48' dir. İzolatların %71,6'sı BD CPO test sonucu Class D olup toplam CPO test pozitifliği %79,5' tir Toplam izolatlarda PCR karbapenemaz - CPO test uyum oranı %97,7 olup sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

		Sınıf/ Genotip	n (%)
PCR Karbapenemaz		Negatif	16 (18,2)
		NDM	6 (6,8)
		Oxa-48	64 (72,7)
		NDM+Oxa-48	2 (2,3)
Toplam PCR		Negatif	16 (18,2)
		Pozitif	72 (81,8)
BD CPO Sınıf		Negatif	18 (20,5)
		Class B	6 (6,8)
		Class D	63 (71,6)
		Sınıf yok	1 (1,1)
Toplam BD CPO Test		Negatif	18 (20,5)
		Pozitif	70 (79,5)
PCR-BD CPO Test Uyumu		Yok	2 (2,3)
		Var	86 (97,7)

Tablo 3'te *E. coli* ve *K. Pneumoniae* suşları karbapenemaz genotipleri (PCR) ile BD phonex CPO test karşılaştırılması verilmiştir.

Tüm gruplarda PCR sonucu negatif olanların tamamının CPO test sonucu da negatiftir. NDM geni tespit edilen toplam 6 *K. pneumoniae*'nin tamamında CPO test sonucu (ClassB) da pozitifdir.

Oxa-48 karbapenemaz pozitif toplam izolatların CPO test (ClassD) pozitiflik uyumu %95,3'tür.

K. pneumoniae Oxa-48 karbapenemaz pozitif izolatların CPO test ile pozitiflik uyumu %94,8'dir.

Tablo 4'te CPO testinin bakteri türlerine göre prediktif değerleri verilmiştir. Negatif prediktif değeri toplamda %88,9 (10/12), *E. coli* suşlarında %100, *K. pneumoniae* suşlarında %83,3'tür. Pozitif prediktif değeri tüm gruplarda %100'dür.

CPO testinin karbapenemaz sınıflarına göre prediktif de-

	Sınıf	PCR sonuç			
		Negatif	NDM	Oxa-48	Oxa-48+NDM
Toplam					
CPO test sonuç	Negatif	16 (100)	0 (0)	2 (3,1)	0 (0)
	Class B	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
	Class D	0 (0)	0 (0)	61 (95,3)	2 (100)
	Sınıf yok	0 (0)	0 (0)	1 (1,6)	0 (0)
<i>E. coli</i>					
CPO test sonuç	Negatif	6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Class B	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Class D	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)
	Sınıf yok	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>K. pneumoniae</i>					
CPO test sonuç	Negatif	10 (100)	0 (0)	2 (3,4)	0 (0)
	Class B	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
	Class D	0 (0)	0 (0)	55 (94,8)	2 (100)
	Sınıf yok	0 (0)	0 (0)	1 (1,7)	0 (0)

ğerleri Tablo 5'te verilmiştir. Negatif prediktif değeri B sınıfı için de %91,7'dir. Pozitif prediktif değeri B ve D sınıfı karbapenemazlar için %100, D sınıfı karbapenemazlar için %100'dür.

Tablo 4. CPO Testinin Bakteri Türlerine Göre Prediktif Verileri

Bakteri	Toplam	CPO (+)	CPO (-)	PCR (-)	PCR (+)	Duyarlılık	Özgüllük	PPD*	NPD*
E. coli	12 (13,6)	6 (50,0)	6 (50,0)	6 (50,0)	6 (50,0)	%100	%100	%100	%100
K. pneumoniae	76 (86,4)	64 (84,2)	12 (15,8)	66 (86,8)	10 (13,2)	%97,0	%100	%100	%83,3
Toplam	88 (100,0)	70 (79,5)	18 (20,5)	72 (81,8)	16 (18,21)	%97,2	%100	%100	%88,9

* PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer

Tablo 5. Tablo V. CPO Testinin Karbapenemaz Sınıflarına Göre Prediktif değerleri.

Sınıf	Pozitif n %	Negatif n %	Pozitif	Negatif	Duyarlılık	Özgüllük	PPD*	NPD*
B	6 (6,8)	82 (93,2)	6 (6,8)	82(93,2)	%100,0	%100,0	%100,0	%100
D	64 (72,7)	24 (27,3)	66(75,0)	22(25,0)	%97,0	%100,0	%100,0	%100

* PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

Tablo 6. Çalışmamız ile Thomson ve arkadaşlarının⁹ çalışma verilerinin karşılaştırılması

Değerlendirme Kriteri	Karbapenemaz sınıfı/durumu	CPO Detect ile saptanan örnek sayısı n (%)	
		Thomson ve ark(9)	Mevcut çalışma
Duyarlılık (Sensitivity)	Class A	110 (97.3)	- -
	Class B	91 (95.6)	6 (100)
	Class D	35 (100)	64 (97.0)
	Çift Karbapenemaz	7 - tüm pozitiflerde	2- tüm pozitiflerde
	Total Karbapenemaz	243 (97.1)	72 (97.2)
Özgüllük (Specificity)	Total Karbapenemaz olmayanlar	51(68.6)*	16 (100) *

*: Karbapenemaz geni bulunmayan izolatlarda karbapenemaz saptama sayısı ve oranı

TARTIŞMA

Karbapenem dirençli, Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlarda sınırlı tedavi seçenekleri, yüksek morbidite/mortalite oranlarına katkıda bulunur. Hastanelerde, karbapenemaz üreten organizmaların hızlı ve doğru tanımlanması tedavi ve enfeksiyon kontrol önlemleri açısından önemlidir. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), Avrupa Anitmikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST) karbapenemaz testinin, enfeksiyon kontrol önlemleri, korunma stratejileri ve epidemiyoloji açısından önemli olduğunu belirterek önermektedir.^{10,11}

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2017 yılında karbapenemaz üreten Enterobacterales üyelerini küresel bir tehdit olarak kabul etmiştir. Bu etkenlere karşı yeni ve etkili ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi için desteklenecek öncelikli patojenler olarak listelemiştir.¹² *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* ve *Enterobacter spp.* Enterobacterales ailesinin en yaygın Karbapenem dirençli Enterobacterales (KDE)'e bağlı ciddi enfeksiyonlarla ilişkilendirilen önde gelen üyeleridir.¹³

Enterobacterales türleri arasında karbapenem direncine en sık KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48 benzeri ve AmpC enzimleri neden olmaktadır. Ülkemizde 2001 yılında *K.pneumoniae*' da ilk defa OXA-48 geni tespit edilmiş bundan yaklaşık beş yıl sonra hastane salgınları görülmüştür.^{9,14-15} Bu süreç içinde salgınlarda NDM-1 genine sahip suşlar ve yine pozitif OXA-48 ve NDM-1 birlikteliği olan izolatlar da tanımlanmıştır.^{16,17} Ülkemizde, ayrıca 2018 yılı izolatlarında KPC gen pozitifliği sporadik olarak bildirilmiştir.¹⁸ Çalışmamızda %86,4 oranı ile en yaygın karbapenemaz aktivitesi olan *K.pneumoniae* ve %13,6 *E.coli* izolatları çalışılmıştır. Dünyada karbapenem dirençli Enterobacterales türleri yaygın olup karbapenemaz genotipleri bölgeden bölgeye değişebilmektedir. Yıldız ve arkadaşları Türkiye'nin 26 il, 28 hastanesinden gönderilen 127 *E.coli* (%25,7) ve 366 *K.pneumoniae* (%74,3) suşunun karbapenemaz gen tiplerini araştırmıştır.¹⁹ Çalıştıkları izolatları %31 toplum kökenli, %69 yatan hasta enfeksiyon etkeni

olarak bildirilmektedir. Çalışma sonuçları Enterobacterales yaygın tür, materyal, klinik özellik ve karbapenemaz türü açısından ülkemizi yansıtmaktadır. Çalışmamız da bu çalışma ve diğer bölgelerde yapılan çalışma sonuçları ile benzerdir.²⁰⁻²²

Karbapenemaz üreten ve üretmeyen Enterobacterales bakteriyemisi olan hastalarda yapılan gözlemsel bir çalışmada, karbapenemaz üreten etkenle enfekte hastaların diğer gruba göre 14 gün içinde ölme olasılığının 4 kat arttığı bulunmuştur. Çalışma, direnç mekanizmasının belirlenmesinin hasta yönetiminde ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır.²³ Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2014 yılı raporunda üye ülkelerin tümünde, son yıllarda özellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae* gibi bakterilerde direnç sorununun ciddi boyutlara ulaştığını bildirmektedir. Bu direncin artmasında en önemli neden beta-laktamaz üreten Enterobacterales izolatlarına karşı yoğun olarak genişlemiş spektrumlu karbapenemlerin kullanılmasıdır.^{24,25} Dolayısıyla ile KDE'nin tedavi ve enfeksiyon kontrolü etkileri göz önüne alındığında, bunların doğru ve zamanında tespiti, hasta yönetimi ve kontrol önlemlerinin uygulanması için hayati önem taşımaktadır. Dirençle birlikte direnç genlerinin epidemiyolojisinin bilinmesi ve takibi, antibiyotik direnç yönetimi için de elzem olmuştur. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında karbapenemaz üreten izolatların doğru ve hızlı tanımlanması önemlidir. Karbapenemaz saptanmasında çeşitli fenotipik, biyokimyasal ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. İnhibitörlerle meropenem arasındaki sinerjinin gösterilmesi, kombinasyon disk testi, meropenem hidrolizinin kanıtlanması, MALDI-TOF MS, Carba-NP, CIM testi gibi fenotipik-biyokimyasal testler ve PCR, dizi analizi, microarray genotipik testler başlıca testlerdir. Karbapenemaz genlerinin saptanmasında moleküler temelli testler altın standart olarak kabul edilmektedir. Moleküler testlerden en çok kullanılan yöntem PCR yöntemidir. PCR tabanlı yöntemler simpleks, multipleks PCR analizleri olabildiği gibi, saptama süresini 2-4 saate kadar indirebilen real-time PCR da kullanılabilir.^{19,26} Ancak moleküler tabanlı teknolojiler hala yüksek mali-

yetlidir. Ayrıca karbapenemaz genotip sayısı artmakta, devamlı yeni karbapenemaz türleri bildirilmekte ve bazen de genotipler fenotipe yansımamaktadır. Özellikle PCR gibi nükleik asit testlerinin sadece hedef genleri tespit edebilmesi, tanımlanmamış yeni genleri tespit edememesi dezavantajdır.²⁷ Fenotipik testler örneğin kombinasyon disk yöntemi, ulaşılabilir, maliyeti düşük %95'lere varan duyarlılık bildirimlerine karşılık en az 18 saat kadar inkübasyon gerektirmesi rutin laboratuvarlar için süre açısından dezavantajdır. Modifiye Hodge testi zaman alıcı ve sonuçlarının yorumlanması açısından zordur. MALDI-TOF MS ile karbapenem hidrolizinin duyarlılık ve özgüllüğünün saptanması ümit vaat etse de, en yaygın olan OXA-48 üreten izolatlarda problem olabilmektedir. Diğer mevcut testlerin de yorumlama, süre, duyarlılık, özgüllük, tüm karbapenemazları saptayamama, mukoid koloni, zahmet gibi sorunları vardır.^{19,28,29} Dolayısıyla karbapenemaz tespitinde çok sayıda fenotipik, biyokimyasal ve genotipik yöntemler bulunmakla beraber devamlı en doğru, en hızlı, en ekonomik, en kolay çalışılabilir yöntem arayışı devam etmektedir. Dünyada artan antibiyotik direnci ve özellikle karbapenemaz direncinin mortalite / morbidite üzerine etkisi bu arayışları haklı kılmaktadır. Özellikle son 10 yılda, karbapenem dirençli bakteriler arasında karbapenemaz üretenleri tespit edebilmek için geliştirilen fenotipik yöntemlerin sayısı artmıştır. Becton-Dickinson (BD), 2017 yılında BD Phoenix CPO™ (karbapenemaz üreten organizma) Detect panellerini geliştirip piyasaya sürmüştür. Panelleri, karbapenemazların saptanması ve sınıflandırılması için gerekli meropenem, doripenem, temocillin ve cloxacillin içeren dokuz kuyucuğu tek başına veya çeşitli şelatörler ve β-laktamaz inhibitörleri ile kombinasyon halindedir.⁹ Testin performansını ilk araştıranlardan olan Thomson ve arkadaşları toplam 294; *Enterobacterales spp.* (n=241), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* izolatını otomatize BD Phoenix CPO Detect ve manuel bioMérieux Rapidec Carba NP metodları ile çalışmışlardır.⁹ Çalışmada her iki testin karbapenemaz saptama duyarlılığını yüksek (>%97) olarak bildirmektedir.⁹ Çalışmamız ve Thomson ve arkadaşlarının çalışma verileri Tablo 6'da karşılaştırılmıştır.

Tabloda görüldüğü gibi verilerimiz Thomson ve arkadaşlarının sonuçlarına yakın bulunmakla beraber özgüllük oranımız daha yüksektir. Karbapenemaz negatif izolat sayımız (n=16) az olmakla birlikte Saad Albichr ve arkadaşlarının 103 karbapenemaz negatif Enterobacterales izolatı için bildirdikleri özgüllük oranına (%91,9) yakındır.³⁰ Thomson ve arkadaşları özgüllük oranlarını diğer yapılan çalışmalardan daha düşük buldukları yorumunu yapmışlardır.⁹ Çalışmalarında seçtikleri 51 karbapenemaz negatif izolatın; GSBL üretenler, AmpC'ler, K1, geniş spektrumlu β-laktamazlar ve porin mutantları olan koleksiyona dahil zorlu izolatlar olduğunu ve bunun testin özgüllüğünde etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Toplam 190 Enterobacterales (160'ı karbapenemaz pozitif, 30'u negatif) izolatının dahil edildiği bir çalışmada CPO Detect testinin duyarlılığı %89,4 özgüllüğü ise %66,7 olarak bildirilmiştir.³¹ CPO testinin çalışmada özellikle 23 IMI-1 tipi izolatın ancak 7'sini A sınıfı karbapenemaz olarak doğru tanımladığı, kalan 16 izolatın karbapenemazını saptamada başarısız olduğu bildirilmiştir.³ Yine aynı çalışmada CPO testi 26 OXA-48 suşundan 24 suşu D sınıfı karbapenemaz olarak doğru tanımlarken, 2 *E. coli* OXA-48 izolatını sınıflandıramamıştır.³¹ OXA-48 ve NDM için duyarlılık %100 ve KPC'lerin 6/7'sinin tespiti açısından hassas olsa da IMI-1 karbapenemazların tespitinde başarısız bulunmuştur.³¹ Çalışmamızın sınırlılıklarından biri de A sınıfı karbapenemaz üreten izolatımızın olmamasıdır. Bu tür izolatların imipenem ile sorgulandıklarında IMI karbapenemaz enzim üretiminin indüklenileceği bildirilmektedir. Özellikle IMI ve diğer A sınıfı karbapenemazların yaygın olduğu laboratuvarlarda CPO testi kullanımında dikkatli olunması gerektiği bildirilmektedir.³¹ Çalışmamızda diğer çalışmalarla benzer olarak OXA-48 ve NDM duyarlılığı sırasıyla %97 ve %100 bulunmuştur.

CPO testinin birden fazla karbapenemaz içeren izolatların sınıfını aynı anda tanımlama özelliği bulunmamaktadır. Birden fazla karbapenemaza sahip izolatları çoğunlukla tanımlayamamakta ya da tek sınıf olarak vermektedir.

Ong'un çalışmasında olduğu gibi çalışmamız da sistem OXA-48+NDM genotipine sahip iki izolatımızın birini D sınıfı, diğerini de tanımlanamayan sınıf olarak vermiştir.¹³

Albichr ve arkadaşları karbapenemaz üreten (n=184) ve üretmeyen (n=103) *Enterobacterales*, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* complex türlerini çalıştıkları CPO test değerlendirmelerinde; testin genel olarak duyarlılığını % 89,7, özgüllüğünü % 83,5 olarak; testin *Enterobacterales* için duyarlılığını %97,5 özgüllüğünü %91,9 olarak tespit etmiştir.³⁰ Albichr çalışmalarında testin genel duyarlılık ve özgüllüğündeki düşük değerlerinin *P.aeruginosa*'dan kaynaklandığını bildirmiştir.³⁰ *P. aeruginosa*'da karbapenem direnci daha çok karbapenemaz dışı mekanizmalar ve daha az VIM-2 üretiminden kaynaklanır. CPO testinin özgüllüğü, testte spesifik olmayan inhibitörlerin kullanılmasından veya şelasyon etkisi ile bakteriyel dış membran geçirgenliğinin tahrip olmasından etkilenmektedir diye ifade edilmektedir.²⁰

Whitley, *Enterobacterales* için CPO testi için PPD ve NPD değerlerini sırasıyla %98,5 ve %97,2 vermiştir. Tüm organizmalar ve tek başına *Enterobacterales* için NPD değerlerinin %98,5 ile %100 arasında değişmekte olduğunu, KÜO saptamasında, test edilen *Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının çoğunu doğru bir şekilde saptayıp sınıflandırdığını bildirmiştir.²⁷ Çalışmamızda negatif prediktif değeri toplamda %88,9 (10/12), *E. coli* suşlarında %100, *K. pneumoniae* suşlarında %83,3' tür. Pozitif prediktif değeri tüm gruplarda %100'dür.

Singapur'da yapılan çalışmada CPO testinin PCR ile uyumu %76 bulunurken, CPO testinin duyarlılığı %93 olarak verilmiştir.⁸ Çalışmamızda iki test arasında uyum %97,2 olarak bulunmuştur. Karbapenemaz OXA-48'e sahip iki *K.pneumoniae* izolatının CPO testi negatif saptamıştır. Karbapenemaz pozitifliği olan suşların negatif saptanması potansiyel olarak tedavi başarısızlığına neden olabildiği

gibi yanlış pozitif karbapenemaz bildirimi, potansiyel olarak ya sınırlı sayıda izolasyon odası üzerinde baskı oluşturan gereksiz hasta izolasyonuna ya da potansiyel olarak hastaları karbapenemaz dirençli hasta grubunda değerlendirip uygunsuz kohortlamaya yol açabileceğinden endişe vericidir.

Sonuç olarak karbapenemazların hızlı ve doğru tespiti hem antimikrobiyal tedavinin optimizasyonu hem de klinik ortamlarda salgınları önlemek için enfeksiyon kontrol önlemlerinin hızlı uygulanması için gereklidir. Karbapenemaz saptama testlerini seçerken, organizma türü, ülkede/bölgede yaygın genotip, çalışılan test sayısı, maliyet ve testin çalışılma süresi göz önünde bulundurulmalıdır. CPO testi, geleneksel inhibitör tabanlı yöntemlere göre, daha kolay bilgisayar destekli algoritma tabanlı saptama avantajı sunmaktadır. Test moleküler yöntemlerden daha ucuz olmanın yanı sıra çalışılma kolaylığı, uygulama süresinin kısa olması ve eş zamanlı antibiyotik duyarlılık test sonucunu da vermesi rutin tanı laboratuvarlarında çalışılması için elverişli olabilir.

Teşekkür

Çalışma; Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.19.024 numaralı proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Maddi desteklerinden dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 15.03.2019 tarihli 108 no'lu kararıyla onay alınmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Yazarlar; Ö.B., A.N., Ö.N. ve B.Ö. çalışma ve makalenin geliştirilmesi, tasarımı, numunelerin test edilmesi ve yorum-

lanması, yazım taslağının hazırlanması ve gözden geçirilmesi aşamalarında rol almışlardır. Çalışmanın doğruluğu ve bütünlüğünden sorumlu olmayı kabul etmişlerdir.

Kaynaklar

1. Thomson KS. The immaculate carbapenemase study. *Journal of Clinical Microbiology* 2017; 55: 1608–11.
2. Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: A report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis* 2009; 49(2): 271–4.
3. Venkatachalam I, Teo J, Balm MND, Fisher DA, Jureen R, Lin RTP. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteria in hospital, Singapore. *Emerging Infectious Diseases*, Centers for Disease Control and Prevention 2012; 18: 1381–3.
4. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012; 13;11(1): 32.
5. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(10):1791–8.
6. Miller S, Humphries RM. Clinical laboratory detection of carbapenem-resistant and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14(8): 705–17.
7. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. *Medecine et Maladies Infectieuses* 2014; 44: 51–6.
8. De PP, Ng E, Pin T, Lin R, Hart T. Evaluation of BD Phoenix™ CPO Detect Assay for Detection of Carbapenemase Producing Organisms in Clinical Samples in Singapore. *Open Forum Infect Dis* 2018; 26;5(suppl_1): 604–5.
9. 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. *J Clin Microbiol* 2017; 55(12): 3437–43.
10. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters- Version 8.0. 2018. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
11. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2018; 8: 296
12. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Kattula D, Burkert F. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
13. Martirosov DM, Lodise TP. Emerging trends in epidemiology and management of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 85(2):266–75.
14. Güllü Z. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları ve Çözüm Önerileri:Beta-Laktamlara ve Karbapenemlere Direnç. *Hastan Enfeksiyonları Derg* 2001; 5: 210–29.
15. Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(1):9–11.
16. Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. The astonishing complexity of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 93–4.
17. Philippon A, Jacquier H, Ruppé E, Labia R. Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. *Current Research in Translational Medicine* 2019; 67: 115–22.
18. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 1050–1.
19. Yiş R, Bayram Ed, Yüksel Ergin Ö. bla OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* İzolatlarında Fenotipik Karbapenemaz Üretimini Modifiye Hodge ve Karbapenemaz İnaktivasyon Testleri ile Değerlendirilmesi. *Namik Kemal Tıp Derg* 2020;8(1): 1–10.
20. Süziük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, Numanoğlu Çevik Y, Hekimoğlu CH, Kılıç S, et al. Türkiye'de 2019 Yılı İçinde İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Epidemiyolojisi. *Mikrobiyol Bul* 2021; 55(1): 1–16.
21. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Öztrak Baysan B. Türkiye'de 2014 yılı içinde izole edilen karbapenem dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(1): 21–33.
22. Tekintaş Y, Çilli F, Erač B, Yaşar M, Aydemir S, Hoşgör Limoncu M. Klinik *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Üretimini Saptanmasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Fenotipik Yöntemlerin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2017; 51(3): 269–76.
23. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, Tekle T, Roberts A, Taiwo A, et al. Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant enterobacteriaceae bacteremia. *Clin Infect Dis* 2017; 64(3): 257–64.
24. Van Duin D, Paterson DL. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders 2016; 30: 377–90.
25. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. WHO. 2016;<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
26. Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(4): 356–9.
27. Petit M, Camélène F, Coite A, Poncin T, Merimèche M, Bonacorsi S, et al. Rapid detection and characterization of carbapenemases in enterobacterales with a new modified carbapenem inactivation method, mCIMplus. *J Clin Microbiol* 2020; 58(11): 1370–20.
28. Papagiannitsis CC, Studentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HCO₃, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 2015; 53(5):1731–5.
29. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; 53: 1996–8.
30. Saad Albichr I, Anantharajah A, Dodémont M, Hallin M, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Evaluation of the automated BD Phoenix CPO Detect test for detection and classification of carbapenemases in Gram negatives. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020; 96(2): 114911
31. Ong CH, Ratnayake L, Ang MLT, Lin RTP, Chan DSG. Diagnostic accuracy of BD phoenix CPO Detect for carbapenemase production in 190 Enterobacteriaceae isolates. *J Clin Microbiol* 2018; 56(12): 01043-18