

Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Rektal Sürüntü Örneklerinden Saptanmasında BD MAX™ CRE Yönteminin Etkinliği§

Ayşe Nur SARI*,**, Sema ALP ÇAVUŞ***, Zeynep GÜLAY*

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

**Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

***Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Amaç: BD MAX™ CRE Assay, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinde KPC, OXA-48 ve NDM direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan, DNA eldesi gibi basamakları otomatize olan, bir gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (PZT) kitidir. Bir seferde 24 örneğin çalışılabildiği bu sistemde, örneklerin yaklaşık 20-30 dakika süren ön işlemlenmesinden sonra, 2.5-3 saate sonuç alınabilmektedir. Bu çalışmada, BD Max™ CRE Assay yöntem etkinliğinin Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarımızda kullanılan yöntem ile karşılaştırarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde riskli ünitelerde yatan hastalardan alınan rektal sürüntü örneklerinde, BD Max™ CRE Assay ve Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarı'mızda kullanılan kültür ve "in-house" polimeraz zincir tepkimesi (PZT) yöntemi ile karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (KÜE) taranmıştır. Her iki yöntem için de 46 hasta örneği çalışmaya dâhil edilmiş olup, karbapenemaz genleri bilinen iki örnek de pozitif kontrol olarak eklenmiştir.

Bulgular: *Enterobacteriaceae* üyelerinde herhangi bir karbapenemaz geninin pozitifliği esas alınarak değerlendirme yapıldığında, her iki yöntemle de 26 örnekte *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenemaz geni saptanmamıştır. On beş örnekte ise saptanan enzimler arasında fark olmakla birlikte, her 2 yöntemle de en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Kalan 5 örneğin 3'ünde kültür ve PZT yöntemi ile 2'sinde ise BD MAX™ CRE ile karbapenemaz geni saptanmıştır. BD MAX™ CRE için duyarlılık %88, özgülük %90, negatif prediktif değer %93 ve pozitif prediktif değer %83 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: BD MAX™ CRE sistemi etkinliğinin belirlenmesinde daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim olmakla birlikte, çalışma bulgularımız, yöntemin karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin hızla saptanmasını ve taşıyıcıların belirlenmesini sağlamak amacıyla kullanılmaya uygun olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Hızlı tarama testleri, Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*, NDM/OXA-48/KPC

ABSTRACT

Efficiency of BD MAX™ CRE Method on Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* spp. from Rectal Swab Samples

Objective: BD MAX™ CRE is a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay kit which determines KPC, OXA-48 and NDM genes where all steps like DNA extraction are automatized. Twenty-four samples can be loaded to the system in one run and results can be obtained in 2.5-3 hours. In this study, our aim was to investigate efficiency of BD MAX™ CRE assay's by comparing the system with in-house method used in our molecular epidemiology laboratory.

Material and Method: Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) were screened in rectal swab samples of patients hospitalized in units with increased risk for nosocomial infection. Both BD MAX™ CRE assay and culture followed by an "in-house" PCR method already in use in our molecular epidemiology laboratory, were performed. Forty-six rectal swab samples were included in the study and also two samples with predetermined carbapenemase gene types were included as positive controls in each run.

Results: When evaluation based on any carbapenemase gene positivity in *Enterobacteriaceae* members was performed, no carbapenemase genes were detected in twenty-six samples by both methods. In although different enzyme types were identified in fifteen samples, at least one carbapenemase gene was found by two methods. In three samples, carbapenemase genes were detected only by the "in house" method following the bacterial culture and for the remaining two only by BD MAX™ CRE assay. Sensitivity, specificity, positive, and negative predictive values for BD MAX™ CRE assay were 88, 90, 83, and 93%, respectively.

Conclusion: Although further studies are needed to determine the efficiency of BD MAX™ CRE system. Our results indicate that BD MAX™ CRE Assay is suitable for use in that it enables rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* strains, and carriers.

Keywords: Rapid screening tests, Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, NDM/OXA-48/KPC

Alındığı tarih: 01.08.2016

Kabul tarihi: 29.09.2016

Yazışma adresi: Zeynep Gülay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balçova / İzmir

e-posta: zeynepgulay62@gmail.com

§ Çalışma, XII. Antimikrobik Kemotarepi Günleri (01-03 Nisan 2016, Askeri Müze, Harbiye, İstanbul) simpoziumunda sunulmuştur.

GİRİŞ

Karbapenemler, çoklu ilaç dirençli bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde sık kullanılan, etkin tedavi seçenekleridir. Ancak, son yıllarda karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (KÜE) üyeleri, başta *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* olmak üzere, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yayılmakta ve tehlike oluşturmaktadır.

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenem direnci birçok mekanizmaya bağlı olabilir. Bu mekanizmalar arasında porin kaybına bağlı dış membran geçirgenliğindeki değişimler ya da efluks sistemleri ile birlikte yüksek oranda AmpC enzimlerinin üretimi sayılabilir. Fakat tüm Gram negatif bakterilerde karbapenem direncinin en önemli nedeni karbapenemaz enzimlerinin üretimidir⁽¹⁾. KÜE üyelerinde tanımlanan temel karbapenemazlar Ambler Sınıf A, Sınıf B ve Sınıf D içerisinde yer almaktadır. Sınıf A aktif bölgesi serin beta-laktamazlardan, Sınıf B metallo beta-laktamazlardan ve Sınıf D oksasilinazlardan oluşmaktadır⁽²⁾. Sınıf A'ya ait olan KPC enzimi günümüzde Amerika Birleşik Devletleri, İsrail, Güney Amerika ve Avrupa ile Asya'nın bazı ülkelerinde endemiktir. Dünyanın diğer bölgelerinde Sınıf B içerisinde yer alan NDM ya da ilk kez ülkemizde bulunup, endemik hâle gelen sınıf D OXA-48-benzeri karbapenemazlar baskın olarak bulunmaktadır^(3,4). Ülkemizde 2014 yılına ait 155 izolat ile yapılan çok merkezli çalışmada, karbapenemaz varlığı şüpheli *E. coli* izolatlarının %90.5'inde ve *K. pneumoniae* izolatlarının %92.5'inde genotipik olarak en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Saptanan enzim tipleri bulunma oranı en yüksekten en düşüğe OXA-48, NDM, VIM ve IMP olup, KPC enzimi bulunmamıştır⁽⁵⁾. Bu çalışma dışında, KPC enziminin seyrek olmakla birlikte, ülkemizden raporlandığı bilinmektedir^(6,7).

KÜE yayılımının kontrol önlemleri arasında ilk sırada, bu mikroorganizmalar ile enfekte olan ve/veya gastrointestinal kolonizasyonu bulunup yayılımda rezervuar rolü oynayan hastaların saptanması gelmektedir. Kolonize hastaların sağlık kuruluşlarına girmesi ile KÜE izolatlarının kurum içi ve kurumlar arasında yayılımı hızla gerçekleşebilmektedir⁽⁸⁾. *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenemazların belirlenmesi, karbapenemlere duyarlı olmayan izolatların saptanması ve bunu takiben duyarlı olmayan izolatlarda karbapenemaz varlığının doğrulanması şeklinde genel olarak iki basamaklı bir süreci içerir. Doğrulama süreci için geliştirilmiş birçok fenotipik ve genotipik yöntem olup, hepsinin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemlerin seçiminde duyarlılık ve özgüllüklerinin yanı sıra yöntemin uygulanacağı sağlık kuruluşunun bölgesel direnç profilinin bilinerek seçim yapılması da önemlidir. Ayrıca karbapenemlere duyarlı olmayan izolatların taranmasında OXA-48-benzeri enzim üreten izolatların genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere ve bazı karbapenemlere duyarlı olabilmesi de bu bakterilerin tespitini zorlaştırmaktadır. Kültür temelli taramayı takiben KÜE varlığı antimikrobiyal duyarlılık testleri, hidroliz testleri ve/veya polimeraz zincir tepkimesi (PZT) gibi moleküler testler ile doğrulanma süreci yaklaşık olarak 72 saat alan, emek yoğun bir süreçtir. KÜE varlığının saptanması, surveians ve epidemiyolojik çalışmalar için de önem taşımakla beraber, bu izolatların hızla belirlenmesi özellikle bakteri popülasyonuna ilk kez giren bir enzimin anlaşılmasında, kritik hastalarda direnç profilinin belirlenip klinisyene hızlı bildiriminde, salgın durumları için enfeksiyon kontrol önlemlerinin en kısa sürede alınmasında da önemlidir. Ayrıca kolonize hastaların hızlı tespiti enfeksiyon kontrol önlemlerinin bir an önce uygulanması ve yayılımının önüne geçilmesi açısından büyük önem teşkil etmektedir⁽⁹⁾. Ülkemiz için özellikle, hastaneye başvuran göçmenlerin de taşıyıcılık açısından taramaları önerilmektedir.

Hızlı saptamanın önem kazandığı bu durumlar için ticari gerçek-zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) temelli yöntem kitleri hızlı, duyarlılığı/ özgülüğü yüksek ve iş yükü az olan genotipik yöntemlerdendir. Bu ticari kitlerden bazılarında, DNA izolasyon aşaması da otomatize edilmiştir.

Bu amaçla kullanılacak sistemlerden BD MAX™ CRE Assay, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinde KPC, OXA-48 ve NDM direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan, DNA eldesi gibi basamakları otomatize olan, gerçek-zamanlı bir PZT kitidir. Bir seferde 24 örneğin çalışılabilirdiği bu sistemde, örneklerin yaklaşık 20-30 dakika süren ön işlemlenmesinden sonra, 2.5-3 saatte sonuç alınmaktadır. Eküvyon ile alınan örneklerde veya kültürde üremiş bakteri süspansiyonları ile çalışılabilmesi yanı sıra, kit, PZT işlemi sonunda örneklerin kültür ile işlemlenmesine de olanak sağlamaktadır. Yöntem, şimdilik araştırma amaçlı kullanım için önerilmektedir⁽¹⁰⁾.

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde riskli ünitelerde yatan hastalardan alınan rektal sürüntü örneklerinde, BD MAX™ CRE Assay ve Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarı'mızda kullanılan kültür ve "in-house" PZT yöntemi ile KÜE taranmış, sonuçlar karşılaştırılarak sistemin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar

Çalışmaya, Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi'nden 18, Hematoloji Servisi'nden 12, Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi'nden 11 ve Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi'nden 5 hastaya ait toplam 46 sürüntü örneği dâhil edilmiştir. Tüm örnekler 2016 yılı Şubat ayına aittir. Ayrıca, NDM ve OXA-48 geni taşıdığı bilinen bir izolat da pozitif kontrol

olarak çalışmaya alınmıştır. Her hastadan biri BD Max CRE için, diğeri kültür için olmak üzere eküvyonlu çubuk ile ikişer örnek alınmıştır. Kültür için alınan örnekler direkt olarak seçici besiyerine (besiyerinin içeriği "kültür" kısmında anlatılmıştır), BD Max CRE Assay için alınan örnekler ise steril cam tüplere alınarak kapalı bir şekilde laboratuvara getirilmiş ve aynı gün işlemlenmeye başlanmıştır.

Kültür

Rektal sürüntü örneklerinin taranmasında uygulanan örnek alım ve kültür yöntemi moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarı'mızda geliştirilmiştir. Yöntem çevresel örneklerde KÜE taramak amacıyla da kullanılmaktadır. Bu yöntemde örnekler alınır alınmaz seçici besiyerine (%5 oranında Tween 80, 6 µg/ml derişimde vankomisin ve 2 µg/ml derişimde imipenem içeren beyin kalp infüzyon) aktarılmıştır. Seçici besiyeri içerisinde getirilen örnekler, laboratuvara ulaşır ulaşmaz imipenem (2 µg/ml) içeren "Eosin Methylen Blue Agar" (EMB) besiyerine ekilmiştir ve bu EMB plakları ile birlikte seçici besiyerinde bulunan örnekler de zenginleştirme amacıyla bir gece inkübe edilmiştir. Bir gecelik inkübasyondan sonra plaklar değerlendirmeye alınmıştır. Zenginleştirme örnekleri ise imipenem (2 µg/ml) içeren EMB besiyerlerine ikinci kez ekilerek ve bir gece inkübasyondan sonra üremeler açısından değerlendirilmiştir. Hem doğrudan hem de zenginleştirme sonrası ekim yapılan EMB agar plakları, üreme olmaması halinde 48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra besiyerlerinde üreyen *Enterobacteriaceae* spp. ve diğeri Gram negatif bakterilerden tür tanımı, biyokimyasal yöntemler ve VITEK 2.0 ile yapılmıştır. Ertapenem ve meropenem duyarlılıkları EUCAST önerilerine göre disk difüzyon ile değerlendirilmiştir⁽¹¹⁾.

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Karbapenem dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında NDM, OXA-48, KPC, IMP ve VIM genleri “in-house” PZT yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca ek olarak karbapenem dirençli nonfermentatif bakteriler içinde (*Pseudomonas aeruginosa* için VIM, IMP, NDM ve *Acinetobacter* spp. için OXA-benzeri) karbapenemaz genleri de PZT ile belirlenmiştir. Kullanılan primerler, beklenen bant büyüklükleri ve reaksiyon koşulları Tablo 1’de gösterilmiştir.

BD MAX™ CRE Assay

Diğer grup sürüntü örnekleri BD Max CRE kiti uygulama prosedüründe belirtildiği şekilde, ön işleme alınmıştır. Bu amaçla eküvyonlar kit içerisinde bulunan örnek hazırlama tüplerine yerleştirilerek tüp steril bir şekilde kapatılmıştır ve her tüp bir dakika süre ile vortekslenmiştir. Örnek etiketleri BD MAX™ sistemine tanıtılarak tüpler ile DNA izolasyonu kiti ve gerçek

zamanlı PZT kiti üretici önerileri doğrultusunda cihaza yerleştirilmiş ve cihaz uygun programda çalıştırılmıştır⁽¹⁰⁾.

BULGULAR

Kültür

Kültür sonuçlarına göre tüm örnekler değerlendirildiğinde tanımlanan Gram negatif izolatlar ve sayıları şöyledir; *K. pneumoniae* (n=20), *E. coli* (n=8), *Acinetobacter* spp. (n=6), *P. aeruginosa* (n=5), *Enterobacter* spp. (n=2), *Proteus mirabilis* (n=1) ve *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1). Örneklerden izole edilen bakteri türleri ve antibiyotik duyarlılıkları Tablo 2’de gösterilmiştir. Tüm izolatların %60.5’inin (n=26) karbapenemlere duyarlı olmadığı görülmüştür. Bunların %69.2’si *K. pneumoniae* (n=18), %19.3’ü *Acinetobacter* spp. (n=5) ve %11.5’i *P. aeruginosa* (n=3) izolatıdır. *Enterobacteriaceae* spp. üyeleri değerlendirildiğinde ise karbapeneme duyarlı olmayan tüm izolatların *K. pneumoniae* izolatı olduğu görülmüştür.

Tablo 1. “In-house” PZT için kullanılan primer dizileri, büyüklükleri ve reaksiyon koşulları.

| Primer Dizisi | Ürün Büyüklüğü | Reaksiyon Şartları |
|--|----------------|---|
| NDM-1-F:5'-CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3' NDM-1-R:5'-ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3' | 826 bp(12) | 94°C→5 dakika, ön denatürasyon 94°C→1 dakika, denatürasyon 54°C→1 dakika, birleşme 72°C→1.5 dakika, uzama 72°C→10 dakika, son uzama |
| OXA-48A:5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG-3' OXA-48B:5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3' | 438 bp(13) | |
| IMP-A: 5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3' IMP-B:5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3' | 586 bp(14) | 94°C→5 dakika, ön denatürasyon 94°C→1 dakika, denatürasyon 53°C→1 dakika, birleşme 72°C→1.5 dakika, uzama 72°C→10 dakika, son uzama |
| VIM-A:5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' VIM-B:5'-TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3' | 388 bp(14) | |
| KPC-F: 5'-TGTCACGTATCGCCGTC-3' KPC-R: 5'-TATTTTCCGAGATGGGTGAC-3' | 331 bp(15) | |
| OXA-51-F: 5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3' OXA-51-R: 5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3' | 353 bp(16) | 94°C→5 dakika, ön denatürasyon 94°C→25 dakika, denatürasyon |
| OXA-23-F: GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA OXA-23-R: ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT | 501 bp(16) | 53°C→40 dakika, birleşme 72°C→50 dakika, uzama 72°C→6 dakika, son uzama |
| OXA-24-F: GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA OXA-24-R: AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT | 246 bp(16) | |

Tablo 2. Örneklerle göre bakteriyotipleri, antibiyotik duyarlılıkları ve enzim tipleri.

| Örnek | Servis | Bakteri | AMP | AMC | CTX | CAZ | ETP | IPM | MEM | GN | NN | AK | CIP | SXT | SCF | FOS** | Enzim Tipi | |
|-------|--------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|-----|-----|-----|-------|------------|------------|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | Kültür+PZT | BD MAX |
| 1 | DYB | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | NDM | NDM |
| | | <i>P. mirabilis</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | |
| 2 | DYB | <i>Acinetobacter</i> spp.* | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-23*** | OXA-48+NDM |
| | | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-48+NDM | |
| 3 | DYB | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 4 | DYB | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | NDM | NDM |
| 5 | DYB | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | I | I | S | R | S | R | S | S | S | S | S | OXA-48 | OXA-48 |
| 6 | DYB | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-48+NDM | OXA-48+NDM |
| 7 | DYB | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-48+NDM | OXA-48+NDM |
| 8 | DYB | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-48+NDM | OXA-48+NDM |
| | | <i>E. coli</i> | S | S | I | S | S | S | S | I | S | S | S | | | | | |
| 9 | DYB | <i>Acinetobacter</i> spp.* | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | | OXA-23*** | (-) |
| | | <i>P. aeruginosa</i> * | S | S | R | R | R | S | S | S | S | S | S | | | | VIM*** | |
| | | <i>E. coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | I | S | R | | | | | | |
| 10 | DYB | <i>P. aeruginosa</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | | OXA-48 |
| | | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | I | I | I | S | R | S | S | S | S | S | S | OXA-48 | |
| 11 | DYB | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | ÇYB | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 13 | ÇYB | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 14 | ÇYB | <i>Enterobacter</i> spp. | R | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | | | (-) |
| 15 | ÇYB | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 16 | HEM | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 17 | HEM | <i>E. coli</i> | S | S | S | S | S | S | R | R | R | I | S | S | S | S | | (-) |
| | | <i>K. pneumoniae</i> | S | S | S | S | S | S | I | I | I | I | S | S | S | S | | (-) |
| 18 | HEM | <i>E. coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S | | (-) |
| 19 | HEM | <i>E. coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S | | (-) |
| 20 | HEM | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 21 | HEM | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 22 | HEM | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 23 | HEM | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 24 | HEM | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 25 | HEM | Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |

Tablo 2. Örneklerle göre bakteri tipleri, antibiyotik duyarlılıkları ve enzim tipleri.

| Örnek Servis | Bakteri | AMP | AMC | CTX | CAZ | ETP | IPM | MEM | GN | NN | AK | CIP | SXT | SCF | FOS** | Enzim Tipi | |
|--------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|-----|-----|-----|-------|------------|------------|
| | | | | | | | | | | | | | | | | Kültür+PZT | BD MAX |
| 26 | AYB <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | NDM | NDM |
| | <i>E. coli</i> | R | S | S | S | S | S | S | I | R | I | R | S | S | S | | |
| 27 | AYB Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 28 | AYB <i>E. coli</i> | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | R | R | R | S | | (-) |
| 29 | AYB Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 30 | AYB <i>P. aeruginosa</i> * | | | | S | | R | R | R | R | S | S | | | | VIM*** | (-) |
| 31 | AYB Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 32 | AYB Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 33 | AYB <i>K. pneumoniae</i> | R | R | I | S | S | S | R | R | R | S | R | R | R | S | | (-) |
| 34 | AYB <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | NDM | NDM |
| 35 | AYB Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 36 | DYB <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | NDM | OXA-48+NDM |
| | <i>S. maltophilia</i> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 37 | DYB <i>P. aeruginosa</i> * | | | | R | R | R | R | S | S | S | S | | | | VIM*** | OXA-48+NDM |
| | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | | NDM |
| 38 | DYB <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-48+NDM | (-) |
| 39 | DYB <i>Acinetobacter</i> spp.* | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-23*** | OXA-48 |
| 40 | DYB <i>E. coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | I | R | I | R | S | S | | | OXA-48 |
| | <i>Acinetobacter</i> spp. | R | | | | | | | | | | | | | | | |
| 41 | DYB Üreme saptanmadı | | | | | | | | | | | | | | | | (-) |
| 42 | DYB <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-48+NDM | OXA-48 |
| | <i>Acinetobacter</i> spp.* | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | | OXA-23*** | |
| 43 | ÇYB <i>Enterobacter</i> spp. | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | OXA-48+NDM |
| | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | S | R | R | S | OXA-48 | |
| 44 | HEM <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | OXA-48 | (-) |
| 45 | HEM <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-48 | (-) |
| | <i>K. pneumoniae</i> * | R | R | R | R | R | R | S | I | S | R | R | R | R | S | OXA-48 | OXA-48+NDM |
| 46 | AYB <i>Acinetobacter</i> spp.* | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | OXA-23*** | |
| | <i>P. aeruginosa</i> | | | | S | | S | S | S | S | S | S | | | | | |

HE DYB: Dahiliye Yoğun Bakım, ÇYB: Çocuk Yoğun Bakım, HEM: Hematoloji, AYB: Anestezi Yoğun Bakım

*Karbapenemlere duyarlı olmayan izolatlar

**CLSI kriterlerine göre uygulanmıştır (17).

***Kiti tarafından saptanmayan titre/enzim

“in house” PZT ve BD MAX™ CRE

Enterobacteriaceae üyelerinde herhangi bir karbapenemaz geninin pozitifliği esas alınarak, değerlendirme yapıldığında, her iki yöntemle de 26 örnekte *Enterobacteriaceae* üyelerinde herhangi bir karbapenemaz geni saptanmamıştır. On beş örnekte ise saptanan enzimler arasında fark olmakla birlikte, her iki yöntemle de en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. On beş örneğin onunda kültürü takiben yapılan PZT uygulaması ve BD MAX CRE sonuçları tamamen uyumluluk göstermektedir (yalnızca NDM belirlenen dört örnek, OXA-48 ve NDM birlikte belirlenen dört örnek ve yalnızca OXA-48 belirlenen iki örnek olmak üzere). Saptanan enzimler arasında farklılığın olduğu beş örnek için ise bulgular şöyledir: BD MAX CRE sistemi dört örnekte hem OXA-48 hem NDM saptarken laboratuvarımızdaki yöntem sonucunda bu örneklerin ikisinde yalnızca NDM, ikisinde ise yalnızca OXA-48 saptanmıştır. Bir örnekte ise laboratuvarımızda uygulanan yöntem hem OXA-48 hem NDM saptarken BD MAX sistemi yalnızca OXA-48 bulmuştur. Yöntemlerden yalnızca biri ile enzim saptanan beş örneğin üçünde kültür ve PZT yöntemi ile (iki örnekte OXA-48 ve bir örnekte OXA-48+NDM) ikisinde ise BD MAX™ CRE ile (OXA-48) karbapenemaz geni saptanmıştır. Her iki yöntemle de örneklerin hiçbirinde KPC enzimi saptanmamıştır. Örneklerle göre tanımlanan bakteri tipleri, antibiyotik duyarlılıkları ve her iki yöntemle belirlenen enzim tipleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Rektal sürüntü örneklerinin her iki yöntemle karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* açısından değerlendirilmesi.

| Kültür + PZT | BD MAX CRE | | Toplam |
|--------------|------------|---------|--------|
| | Pozitif | Negatif | |
| Pozitif | 15 | 3 | 18 |
| Negatif | 2 | 26 | 28 |
| Toplam | 17 | 29 | 46 |

Çalışma bulgularına göre BD MAX™ CRE Assay için duyarlılık %88, özgüllük %90, negatif prediktif değer %93 ve pozitif prediktif değer %83 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3).

Ayrıca kültür ve PZT yönteminde örneklerden izole edilen karbapenem dirençli beş *Acinetobacter* spp. ve üç *P. aeruginosa* izolatında sırası ile OXA-23 ve VIM genleri bulunmuştur.

TARTIŞMA

Günümüzde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanması genellikle kültürde üretilen izolatların duyarlılık testlerini takiben yapılan doğrulama testleri (fenotipik ya da genotipik testler) ile sağlanmaktadır. Bu süreç 2-5 gün arasında sonuç veren bir süreçtir. Karbapenemaz üreten veya karbapenem dirençli izolatların tanımlanması ile etkin antimikrobiyal tedavinin zamanında başlanması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınarak salgınların önüne geçilmesi arasındaki kritik ilişki nedeniyle bu izolatların hızla belirlenmesi gerekmektedir⁽¹⁰⁾. Ayrıca KÜE ile kolonize hastaların hasta popülasyonuna bir kez girmesi ile sağlık kuruluşunda ve kuruluşlar arasında hızla yayılması da enfeksiyon kontrolü açısından hızlı testlerin kolonize hasta tespitinde kullanılmasının önemini göstermektedir⁽⁸⁾.

Çalışmamızda etkinliği araştırılan BD MAX™ CRE yöntemi, BD MAX™ sistemi ile kullanılabilen bir gerçek-zamanlı PZT kitidir. KÜE tespitinde moleküler temelli testlerin fenotipik testlere göre önemli avantajları bulunmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri oldukça yüksektir ve BD MAX™ CRE sisteminde olduğu gibi bazıları direkt klinik örnekten karbapenemaz genlerini tespit edebilmektedir⁽⁹⁾. BD MAX™ CRE sistemi sürüntü örnekleri ve bakteri süspansiyonları ile çalışabilmektedir. Günümüzde kan kültürü sistemlerinden ya da

solunum örneklerinden doğrudan karbapenemaz genlerini belirleyen moleküler temelli sistemler de bulunmaktadır^(18,19). Rektal sürüntü örneklerinden direkt olarak karbapenemaz genlerini tanımlayan sistemlerden, GeneXpert Carba-R (Cepheid) sistemi Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımı FDA onayı almış bir sistem olup, bunun dışında Check-Direkt CPE, RenDx Carbaplex assay ve Amplidiag CarbaR+VRE gibi sistemler de bulunmaktadır. Bu sistemlerin en önemli kısıtlamasının bazı karbapenemaz genleri için düşük pozitif prediktif değer olduğu bilinmektedir⁽¹⁰⁾. Çalışmamızda, BD MAX™ CRE için pozitif prediktif değeri %83 olarak bulunmuştur. Yakın bir tarihte GeneXpert Carba-R (Cepheid) ile yapılan çok merkezli çalışmada, bu değer %95 olarak bildirilmiştir. Bu sistemde, BD MAX™ CRE' den farklı olarak IMP ve VIM genleri de saptanabilmektedir⁽²⁰⁾. Ancak, örnekte bir *Enterobacteriaceae* üyesi ile birlikte bu metallo beta-laktamazları üreten bir non-fermentatif bulunması hâlinde GeneXpert Carba-R sistemi KÜE bulgusu vermektedir (yayımlanmamış bulgu).

Çalışmamız kültür bulgularına göre örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem dirençli izolatların hepsi *K. pneumoniae* izolatıdır. Bu izolatlara "in-house" olarak NDM, OXA-48, KPC, IMP ve VIM PZT uygulanmış ve %52.6'sında (n=10) OXA-48+NDM, %26.3'ünde (n=5) yalnızca OXA-48 ve %21.1'inde (n=4) yalnızca NDM geni belirlenmiştir. Bu sonuçlar hastanemiz ve ülkemizde yaygın enzim tipinin OXA-48 ve NDM olmasıyla uyumludur. Hızlı testlerin seçiminde yerel epidemiyolojik bilgi ve yaygın karbapenemaz tipleri önemli bir kriterdir⁽¹⁰⁾. BD MAX CRE sistemi de üç gen bölgesini (NDM, OXA-48 ve KPC) belirlemesi yönünden ülkemizde KÜE tespiti için uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızın bir diğer bulgusu örneklerde karbapenem dirençli beş *Acinetobacter* spp. ve iki

P. aeruginosa izolatının tanımlanmış olmasıdır. "in house" PZT ile *Acinetobacter* spp. izolatlarında OXA-23 ve *P. aeruginosa* izolatlarında VIM genleri bulunmuştur. BD MAX™ CRE sistemi bu karbapenemaz genlerini belirleyememektedir. VIM genini KPC, OXA-48 ve NDM ile birlikte belirleyen ve yine gerçek zamanlı PZT temelli bir sistem olan Check-direct CPE de duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir sistem olup, etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, pozitif prediktif değeri düşük bulunmuştur⁽²¹⁾. Lee ve ark.'nın⁽²²⁾ geliştirdiği ve BD MAX™ CRE sisteminde olduğu gibi gerçek zamanlı PZT temelli olan sistem de aynı KPC, NDM ve OXA-48 genlerini etkin bir şekilde belirleyebilmektedir. Fakat bu sistemde bakteri lizati hazırlama aşaması iş yükü ve süreyi uzatmaktadır.

Kültür+ PZT yönteminde, sıvı besiyerinde zenginleştirme işlemi saptanma oranlarını arttırmaktadır. Ancak bu yöntemle sonuçların çıkması en az dört gün sürmektedir. Ev yapımı yöntemin avantajları, maliyetinin düşük olması, karbapenemlere dirençli tüm Gram negatif bakterilerin saptanabilmesi ve sonraki çalışmalar için saklanabilmesidir. Fakat emek yoğun olduğu için ancak salgın sırasında veya riskli ünitelerde aylık taramalarda kullanılabilir.

BD MAX™ CRE sisteminin en önemli avantajı hızlı sonuç alınması ve iş yükünün az oluşudur. Bu çalışmada, denenmemesine karşın, sistem ayrıca kültür yapılmasına da izin vermektedir. Böylelikle taramada pozitif çıkan örneklerden kültür işlemleri de yapılarak izolatlar elde edilebilir. BD MAX™ CRE'nin en önemli dezavantajı maliyetidir. Bu dezavantaj çoğu moleküler temelli hızlı testlerde bulunmaktadır. Yine diğer PZT temelli testlerde olduğu gibi yalnızca sistemde hedeflenen karbapenemaz genlerinin belirleniyor olması, yeni karbapenemaz genlerinin gözden kaçırılmaması için dikkatli olmayı gerektirmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız bulgularına göre BD MAX™ CRE, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin hızlı saptanmasını ve taşıyıcıların belirlenmesini sağlamak amacıyla kullanılmaya uygundur. Sistem kullanılırken PZT temelli testlerin hepsinde bulunan yeni karbapenemaz genlerinin gözden kaçırılması noktasına dikkat edilmelidir. Henüz araştırma amaçlı önerilen sistem ile yapılacak çalışmalar, sistem etkinliğini daha da iyi ortaya koymaya yardımcı olacaktır.

Teşekkür

Yardımlarından dolayı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Feriha Çilli'ye, BD (Becton, Dickinson and Company) Türkiye'ye ve Sayın Deniz Ertekin Kandemir'e (Nukleus, İzmir), Sayın Meral Biçmen'e ve Dokuz Eylül Üniversitesi Enfeksiyon Kontrol Ekibi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Matsumura Y, Pitout JD.** Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Expert Rev Mol Diagn* 2016; 16:783-94. <https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1172964>
2. **Nordmann P, Naas T, Poirel L.** Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1791-8. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
3. **Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group.** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill* 2015; 20.
4. **Temkin E, Adler A, Lerner A, Carmeli Y.** Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: biology, epidemiology, and management. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1323:22-42. <https://doi.org/10.1111/nyas.12537>
5. **Çakar A, Akyön Y, Gür D ve ark.** Türkiye'de 2014 yılı içinde izole edilen karbapenem dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:21-33. <https://doi.org/10.5578/mb.10695>
6. **Labarca J, Poirel L, Ozdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P.** KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes New Infect* 2014; 2:50-1. <https://doi.org/10.1002/nmi2.42>
7. **Zahedi Bialvaei A, Samadi Kafil H, Ebrahimzadeh Leylabadlo H, Asgharzadeh M, Aghazadeh M.** Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. *Iran J Microbiol* 2015; 7:226-46.
8. **Lin MY, Lyles-Banks RD, Lolans K, et al; Centers for Disease Control and Prevention Epicenters Program.** The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* 2013; 57:1246-52. <https://doi.org/10.1093/cid/cit500>
9. **Banerjee R, Humphries R.** Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence* 2016; 11:1-13. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1185577>
10. Instructions for BD MAX™ CRE Assay, Ref. 443379, 2013.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 3.1, valid from 2013-02-11. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf (Erişim tarihi: Eylül 2016).
12. **Samuelsen Ø, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümmel A, Sundsfjord A.** Identification of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Norway. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:670-2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq483>
13. **Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P.** Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:15-22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>
14. **Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL.** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3129-35. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005>
15. **Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, et al.** Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2680-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.00158-08>
16. **Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al.** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:351-3. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>
17. **CLSI.** Clinical and Laboratory Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-First Informational Supplement. Document M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
18. **Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, et al.** Evaluation of the FilmArray blood culture identification panel: Results of a multicenter controlled trial. *J Clin Microbiol* 2016; 54:687-98. <https://doi.org/10.1128/JCM.01679-15>
19. **Kunze N, Moerer O, Steinmetz N, Schulze MH,**

- Quintel M, Perl T.** Point-of-care multiplex PCR promises short turnaround times for microbial testing in hospital-acquired pneumonia-an observational pilot study in critical ill patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015; 14:33.
<https://doi.org/10.1186/s12941-015-0091-3>
- 20. Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, et al.** Multisite evaluation of Cepheid Xpert-Carba-R Assay for the detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2016; 54:1814-9.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00341-16>
- 21. Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, van Zwet A.** Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77:316-20.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.007>
- 22. Lee TD, Adie K, McNabb A, et al.** Rapid detection of KPC, NDM, and OXA-48-like carbapenemases by Real-Time PCR from rectal swab surveillance samples. *J Clin Microbiol* 2015; 53:2731-3.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01237-15>