

Karbapeneme Dirençli *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* İzolatlarında Genişlemiş Spektrumlu β -laktamaz, Karbapenemaz ve AmpC β -laktamaz Varlığının Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

Investigation of Extended Spectrum β -lactamase, Carbapenemase and AmpC β -lactamase by Phenotypic Methods in Carbapenem-resistant *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* Isolates

Filiz Orak*, Esra Kaya*, Murat Aral*, Adem Doğaner**

* Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

** Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

Atf/Cite as: Orak F, Kaya E, Aral M, Doğaner A. Karbapeneme dirençli *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatlarında genişlemiş spektrumlu β -laktamaz, karbapenemaz ve AmpC β -laktamaz varlığının fenotipik yöntemlerle araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(2):75-83.

Öz

Amaç: Karbapenem direnci, yüksek mortalitesi ve sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu nedenle karbapenem direnç mekanizmasını kısa sürede saptayan güvenilir ve basit testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı, karbapenem dirençli *Klebsiella* spp. ve *E. coli* izolatlarında karbapenemaz, GSBL ve AmpC varlığını aynı plak üzerinde disk difüzyon, kombine disk ve disk antagonizma test yöntemleri ile belirlemektir.

Yöntem: Çalışmaya Aralık 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında bir üniversite hastanesinde rutin hasta kültür örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatları dahil edildi. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing önerileri doğrultusunda GSBL, KPC-tip ve metallo-beta-laktamaz için doğrulama testi olarak kombine disk yöntemi ve OXA-48 tipi karbapenemaz için temosilin disk difüzyon testi uygulandı. Plazmit aracı AmpC beta-laktamaz tanımlaması için disk difüzyon testi ve indüklenebilir (kromozomal) AmpC beta-laktamaz için disk antagonizma testi kullanıldı. Kontrol suşu olarak KPC-2 tipi karbapenemaz üreten BAA-1705 *K. pneumoniae* kullanıldı.

Bulgular: Karbapenem direnci 56'sı (%74,6) *Klebsiella pneumoniae*, 17'si (%22,6) *E.coli*, biri (%1,3) *Klebsiella ozaenae* ve biri (%1,3) *Klebsiella aerogenes* olmak üzere toplam 75 izolatta tespit edildi. Metallo-beta-laktamaz tipi karbapenemaz ile ilişkili direnç 24 (%31,5) izolatta, GSBL 17 (%22,3) izolatta, AmpC 4 (%5,2) izolatta ve OXA-48 ile ilişkili direnç 31 (%40,7) izolatta belirlendi.

Sonuç: Direnç mekanizmalarının hızlı tespiti uygun antimikrobiyal tedavi ve enfeksiyon kontrol önlemleri açısından önemlidir. Çalışmada uyguladığımız yöntem, kolay ve uygulanabilir bir algoritma oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., beta-laktamaz

ABSTRACT

Objective: Carbapenem resistance has become an important public health problem due to its high mortality and limited treatment options. Therefore, there is a need for reliable and simple tests that detect the carbapenem resistance mechanism in a short time. The aim of this study was to determine the presence of carbapenemase, ESBL, and AmpC in carbapenem-resistant *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* isolates using disc diffusion, combined disc and disc antagonism test methods on the same plate.

Methods: Carbapenem-resistant *Klebsiella* spp. and *E.coli* isolates routinely isolated from patient culture samples in a university hospital between December 2017 and December 2018, were included in the study. Combined disk method was used as confirmatory test for ESBL, KPC type and metallo-beta-lactamase, and temocillin disk diffusion test was used for OXA-48 type carbapenemase in line with the recommendations of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. The disc diffusion test was used for plasmid-mediated AmpC beta-lactamase identification and the disc antagonism test for inducible (chromosomal) AmpC beta-lactamase. BAA-1705 *K. pneumoniae* producing KPC-2 type carbapenemase was used as the control strain.

Results: Carbapenem resistance was detected in a total of 75 isolates, of which 74.6% (n=56) were *Klebsiella pneumoniae*, 22.6% (n=17) *Escherichia coli*, 1.3% (n=1) *Klebsiella ozaenae* and 1.3% (n=1) were *Klebsiella aerogenes*. Metallo-beta-lactamase type carbapenemase-associated resistance was determined in 24(31,5%) isolates, ESBL in 17(22,3%), AmpC in 4 (5,2%) isolates, and OXA-48-related resistance in 31(40,7%) isolates.

Conclusion: Rapid detection of resistance mechanisms is important for appropriate antimicrobial therapy and infection control measures. The method we used in the study creates an easy and applicable algorithm.

Keywords: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., beta-lactamase

Alındığı tarih / Received:

27.05.2022 / 27.May.2022

Kabul tarihi / Accepted:

02.08.2022 / 02.August.2022

Yayın tarihi / Publication date:

01.06.2023 / 01.June.2023

ORCID Kayıtları

F. Orak 0000-0001-5153-7391

E. Kaya 0000-0002-0732-6471

M. Aral 0000-0002-3576-4380

A. Doğaner 0000-0002-0270-9350

✉ drfilizorak@hotmail.com

GİRİŞ

Enterobacterales suşlarında karbapenem direncinin gelişimi çoğunlukla karbapenamaz özelliği olan beta-laktamaz üretimi ile meydana gelir. Karbapenemazlar, karbapenemlerin hidrolizine ve bunun sonucunda karbapenemlerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde yükselmeye neden olan beta-laktamazlardır. Diğer mekanizmalar ise porin üretiminde azalma veya aktif dışarı pompalama (eflüks) görevi gören proteinlerin aşırı üretimi ve buna eşlik eden AmpC veya genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimidir⁽¹⁾. Fonksiyonel ve yapısal olarak çeşitli sınıflandırmaları olan karbapenemazlar, karbapenem direncinin başlıca sorumlusudur. Sıklıkla moleküler Ambler sınıflaması ile sınıflandırılırlar. Ambler sınıflamasında karbapenemazlar geniş bir gruptur ve A, B ve D sınıfı beta-laktamazları içermektedir. A ve D sınıfı beta-laktamazlar aktif bölgesinde serin içerirken, B sınıfı beta-laktamazlar aktif bölgesinde çinko (Zn) içerir ve metallo-beta-laktamaz (MBL) olarak adlandırılırlar^(1,2).

Karbapenemlere karşı azalmış duyarlılık fenotipi gösteren suşların belirlenmesi karbapenemaz üretiminin saptanmasında ilk basamaktır. Bu durum rutin çalışmalar dışında özel laboratuvar disiplini ve prosedürlerini gerektirmektedir. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)⁽³⁾ ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S24)⁽⁴⁾ kılavuzunda da bu izolatlarla ilgili eşik değerlerine ve laboratuvar uygulamalarına yer verilmiştir⁽¹⁾.

Bazı durumlarda mikroorganizma karbapenemaz üretse de düşük karbapenem MİK değeri nedeniyle gözden kaçabilir ve yalancı negatif olarak kabul edilir. Bunun yanında, AmpC aşırı üretimi ve daha az ölçüde, CTX-M tipi GSBL'lerin neden olduğu porin kaybı veya porin mutasyonları nedeniyle yüksek oranda yanlış pozitif sonuç bildirilmiştir. Bu durum karbapenemaz pozitif olarak değerlendirilerek karbapenem tedavisinden gereksiz yere kaçınılmasına da yol açabilmektedir^(5,6).

Karbapenemaz üreten izolatların saptanması; yayılmasının önlenmesi ve tedavinin doğru yönlendirilmesi açısından önemlidir.

Moleküler yöntemler, Gram negatif mikroorganizmalara ait sınırlı sayıda karbapenemaz genini analiz eder ve diğer bazı karbapenemazları kodlayan genler tanınmadığından moleküler yaklaşımlarla gözden kaçabilir. Ayrıca moleküler yöntemler rutin laboratuvar kullanımı için pratik değildir⁽⁷⁾. Bu nedenle genellikle fenotipik testler tercih edilmektedir.

GSBL'yi saptamak için genellikle çift disk sinerji testi (ÇDST) ve kombine disk testi (KDT) gibi fenotipik yöntemler tercih edilmektedir. Yapısal ve indüklenebilir AmpC aktivitesi ise Kirby-Bauer tarafından geliştirilen basit bir disk yöntemi ile saptanabilmektedir. Bu yöntemde bir indükleyici substrat (seftazidim ve imipenem gibi) ve bir ikinci haberci substrat (sefoksitin) varlığında disk zon bölgelerinde düzleşme veya girinti AmpC üretimi olarak değerlendirilir. Plazmid aracılı AmpC tanısında ise disk antagonizma testi (DAT) ve AmpC disk testi uygulaması kolay ve ucuz yöntemlerdir⁽⁸⁾.

Bu çalışmada, karbapenem dirençli *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatlarında aynı plak üzerinde disk difüzyon, kombine disk ve disk antagonizma test yöntemleri birlikte kullanılarak karbapenemaz, GSBL ve AmpC varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurul tarafından (21.03.2018 tarih ve 15/2018-06 karar numarası) onaylanmıştır.

Bakteriyel izolatlar ve antibiyotik duyarlılık testleri: Çalışmaya, Aralık 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında BD Phoenix 100 (BD, ABD) otomatize bakteri tanımlama ve antibiyotik duyarlılık sistemiyle karbapenemlerden (imipenem, meropenem ve ertapenem) bir ve/veya birden fazlasına direnç tespit edilen 75 izolat (17 *E. coli*, 56 *Klebsiella pneumoniae*,

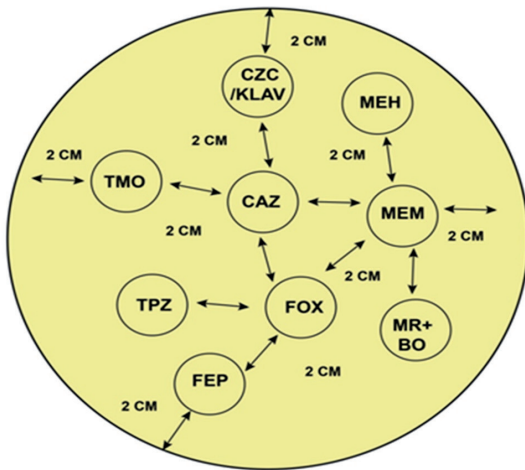
bir *Klebsiella ozaenae* ve bir *Klebsiella aerogenes* dahil edildi.

Antibiyotik disk inhibisyon zon çapı ve MİK sınır değerleri EUCAST standartlarına göre değerlendirildi⁽³⁾. Mueller-Hinton agar (RTA,Türkiye) içeren 120 mm çaplı plak kullanılarak diskler arası ve kenarlardan 20 mm mesafe olacak şekilde yerleştirildi. Kirby Bauer disk difüzyon, kombine disk ve disk antagonizma testleri birlikte uygulandı (Şekil 1). Çalışmada kontrol suş olarak KPC karbapenemaz pozitif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 kullanıldı.

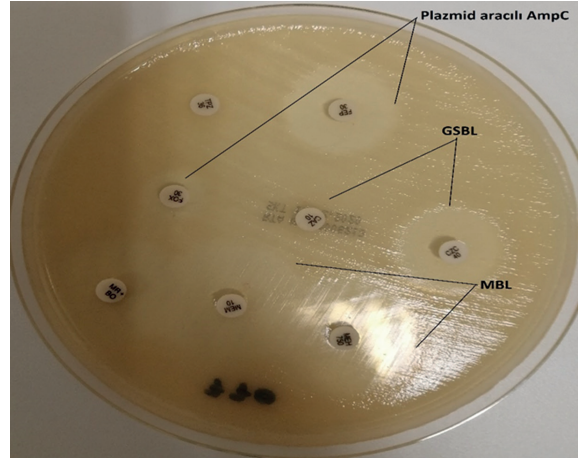
GSBL tanısının doğrulanması: Seftazidim (10 µg, Bioanalyse,Türkiye) inhibisyon zon çapının < 22 mm olması GSBL açısından gösterge kabul edildi.

KDT ile 20 mm aralıklarla yerleştirilen seftazidim (10 µg, Bioanalyse, Türkiye) disk ile seftazidim/klavulanik asit (30/10 µg, Bioanalyse, Türkiye) kombine disk arasında 5 mm veya daha fazla inhibisyon zon farkı GSBL üretimini doğrulamak için kullanıldı⁽³⁾.

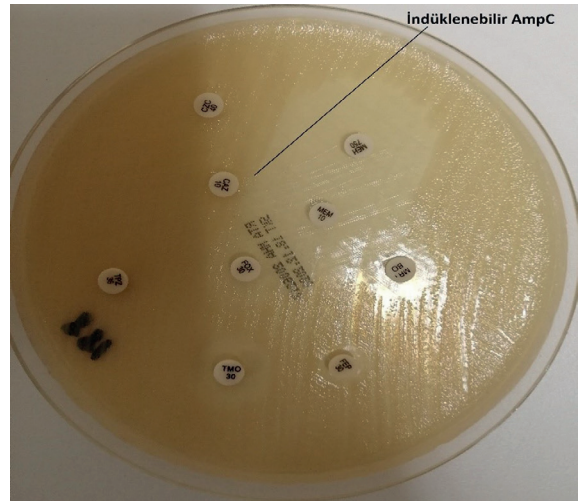
Karbapenemazların saptanması: BD Phoenix 100 otomatik tanımlama sistemine göre karbapenemlere



Şekil 1. Aynı plakta GSBL, karbapenemaz ve AmpC varlığını tanımlamak için kullanılan disklerin şematik resmi. MEM: Meropenem, MEH: Meropenem+EDTA kombine disk, MR+BO: Meropenem+ Boronik asit kombine disk, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim, TPZ: Piperasilin/tazobaktam, CZC/KLAV: Seftazidim/klavulanik asit, TMO: Temosilin.



Şekil 2. GSBL, AmpC (plazmid aracılı) ve metallo-beta laktamazın aynı plak üzerinde gösterilmesi. Seftazidim (CAZ) ile seftazidim/klavulanik asit (CZC) arasındaki sinerjiye göre GSBL üretimi, seoksitin (FOX) direnci ve sefepim (FEP) duyarlılığına göre AmpC tanısı ve meropenem (MEM) ile meropenem+EDTA (MEH) arasındaki sinerjiye göre metallo-beta-laktamaz tanımlanmıştır.



Şekil 3. İndüklenebilir (kromozomal) AmpC tipi beta laktamazın disk antagonizma testine göre tanısı. Şekilde sefoksitin (FOX) ve seftazidim (CAZ) zonları arasında düzleşme görülmektedir.

dirençli izolatlar için fenotipik doğrulama testleri uygulandı. Meropenem (10 µg, Bioanalyse, Türkiye) zone çapının <28 mm olması durumunda; meropenem (10 µg) ve meropenem+boronik asit (10/600 µg, Bioanalyse, Türkiye) (kombine disk zon çapı) arasında 5 mm veya daha fazla inhibisyon farkı KPC tipi karbapenemaz (Ambler sınıf A) olarak, meropenem (10 µg) ve meropenem+EDTA (10/750 µg Bioanalyse, Türkiye) kombine disk zon çapı arasında 5 mm veya daha fazla inhibisyon farkı metallo-beta-laktamaz (Ambler sınıf B) olarak tanımlandı⁽⁹⁾.

Temosilin duyarlılığına göre (30 µg, Bioanalyse, Türkiye) inhibisyon zon çapının 11mm'nin altında olması durumunda OXA-48 olarak değerlendirildi⁽³⁾.

Meropenem için direnç sınır değerlerinin dışında kalan zon çaplarında (25-27 mm= I/S) piperasilin/tazobaktam (30/6 µg, Bioanalyse, Türkiye) diski kullanılarak, duyarlı bulunması durumunda karbapenem direnci dışlandı⁽³⁾.

Plazmid aracılı (dereprese) ve indüklenebilir (kromozomal) Ampc beta-laktamaz ve /porin kaybı tanısı: Plazmid aracılı (dereprese) AmpC β – laktamazların tespitinde Kirby Bauer disk difüzyon testi (DDT), yapısal (indüklenebilir) AmpC β-laktamaz tespitinde disk antagonizma testi (DAT) kullanıldı^(3,10).

DDT ile; inhibisyon zon çaplarının; sefoksitin için (30 µg Bioanalyse, Türkiye) < 19 mm ve/ veya seftazidim için < 22 mm olması durumunda sefepim (30 µg Bioanalyse, Türkiye) duyarlılığı dikkate alındı. Sefepim zon çapının ≥ 27 mm (duyarlı) olması ve izolatin seftazidim/klavulanik asit ile inhibe olmaması durumu plazmid kaynaklı (dereprese) AmpC ve/veya porin kaybı olarak değerlendirildi⁽³⁾.

Sefoksitin duyarlılığında azalma AmpC ve/veya dış membran porinlerinin kaybı durumlarında görülebilmektedir⁽³⁾.

Daha önce Sanders ve ark.⁽⁹⁾ tarafından DAT yönteminde belirtildiği gibi; seftazidim ve meropenem (20 mm aralıklı) gibi indükleyici bir antibiyotiğin

yakınında sefoksitin inhibisyon bölgesinin düzleşmesi veya girintili olması indüklenebilir (kromozomal) AmpC; her iki diskin zon bölgelerinde bozulmama durumunda direnç geni negatif olarak değerlendirildi.

AmpC üreten suşlar klavulanik asit ile indüklenebildiğinden, bu beta-laktamaz inhibitörü varlığında duyarlılıkta azalma gözlenmesi ve GSBL varlığının baskılanması nedeniyle GSBL tespiti için piperasilin/tazobaktam duyarlılığı da değerlendirildi⁽¹¹⁾.

BULGULAR

BD Phoenix 100 otomatik tanımlama ve antibiyotik duyarlılık sistemine göre karbapenem direnci saptanan 75 izolatin 56'sı (%74.6) *K. pneumoniae*, 17'si (%22.6) *E. coli*, biri (%1.3) *K. ozaenae* ve biri (%1.3) *K. aerogenes* olarak tanımlandı. Bu izolatlar, 19 endotrakeal aspirat, 27 idrar, 2 balgam, 16 kan, dokuz yara, bir plevral sıvı ve bir bronşiyal lavaj sıvısının kültürlerinden elde edildi. Kombine disk testine göre izolatların hiçbirinde KPC tipi karbapenemaz bulunmazken, 24 (%31.5) izolatta MBL tipi karbapenemaz saptandı. MBL, *K. pneumoniae* izolatlarının 20 (% 35.7)'sinde, *E. coli* izolatlarının 3 (%17.6)'ünde ve *K. aerogenes* izolatlarının birinde (%100) tespit edildi.

Fenotipik olarak temosilin direnci bulunan toplam 31 (%40.7) izolatin 25'i (%44.6) *K. pneumoniae* ve altısı (%35.2) *E. coli* idi ve bunlar OXA-48 tipi karbapenemaz olarak tanımlandı. Yine kombine disk ve disk difüzyon yöntemlerine göre dokuzu (%16.0)

Tablo 1. β-laktamaz türlerinin mikroorganizmalara göre dağılımı

Mikroorganizma	β-laktamaz						
	GSBL n (%)	KPC n (%)	MBL n (%)	AmpC n (%)	OXA-48 n (%)	Tanımlanamayan Tip n (%)	Negatif n (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=56)	9 (16.0)	-	20 (35.7)	1 (1.3)	25 (44.6)	1 (1.7)	2 (3.5)
<i>Esherichia coli</i> (n=17)	7 (41.1)	-	3 (17.6)	3 (17.6)	6 (35.2)	1 (5.8)	1 (5.8)
<i>Klebsiella ozaenae</i> (n=1)	1 (100)	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella aerogenes</i> (n=1)	-	-	1 (100)	-	-	-	-
Toplam	17 (22.3)	0	24 (31.5)	4 (5.2)	31 (40.7)	2 (2.6)	3 (4)

KPC: *Klebsiella pneumoniae*'de tespit edilen Ambler sınıf A tipi karbapenemaz; MBL: Metallo-beta-laktamaz.

K. pneumoniae, yedisi (%41.1) *E. coli* ve biri (%100) *K. ozaenae* olmak üzere toplam 17(%22.3) izolatta GSBL saptandı (Tablo 1).

DDT ve DAT yöntemlerine göre biri GSBL ile birlikte olmak üzere izolatların dördünde (%5.2) AmpC tipi beta-laktamaz saptandı. İdrar örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarında üç plazmit aracılı AmpC tipi beta-laktamaz saptanırken, kandan izole edilen *K. pneumoniae* izolatında indüklenebilir AmpC tipi beta-laktamaz belirlendi.

GSBL ve AmpC tipi beta-laktamaz izolatlarının karbapenemlere duyarlılıkları Tablo 2'de verildi. GSBL ve AmpC üreten izolatların tamamı meropenem dirençli iken, bazı izolatlar diğer karbapenemlere duyarlı bulundu.

TARTIŞMA

Dünyada karbapenemlerin artan kullanımı hemen hemen tüm beta-laktamlara karşı direnç gelişmesine yol açmıştır⁽¹²⁾. Bu tip antimikrobiyal direnç, özellikle transfer edilebilir karbapenemaz kodlayan genlerin aracılık ettiği durumlarda, hızla yayılarak ciddi salgınlara neden olmakta ve tedavi seçeneklerini önemli ölçüde sınırlandırmaktadır^(3,13). Özellikle KPC ve MBL genleri sıklıkla plazmit aracılı GSBL, florokinolon ve aminoglikozit direnç genleri ile birlikte transfer edilmekte ve bu muhtemelen MBL ve/veya KPC üreticileri arasında ek direnç mekanizmalarının yayılmasına katkıda bulunmaktadır⁽⁶⁾.

Karbapenemaz üretiminin saptanmasında kullanılan yöntemler genotipik ve fenotipik tanı yöntemleridir.

Tablo 2. GSBL ve/AmpC tipi beta-laktamaz üreten izolatlarda karbapenem duyarlılığı

İzolat No	β-laktamaz	Karbapenem		
		İmipenem	Ertapenem	Meropenem
12 (<i>K. pneumoniae</i>)	GSBL	I	R	R
20 (<i>K. pneumoniae</i>)	GSBL	R	R	R
22 (<i>K. pneumoniae</i>)	GSBL	I	R	R
23 (<i>K. pneumoniae</i>)	İnd. AmpC	R	R	R
25 (<i>E. coli</i>)	GSBL+AmpC	S	R	R
26 (<i>E. coli</i>)	GSBL	S	R	R
27 (<i>K. pneumoniae</i>)	GSBL	R	R	R
28 (<i>K. pneumoniae</i>)	GSBL	S	R	R
30 (<i>E. coli</i>)	GSBL	R	R	R
31 (<i>K. ozaenae</i>)	GSBL	S	S	R
32 (<i>K. pneumoniae</i>)	GSBL	S	S	R
34 (<i>K. pneumoniae</i>)	GSBL	S	R	R
38 (<i>K. pneumoniae</i>)	GSBL	I	R	R
39 (<i>E. coli</i>)	GSBL	S	R	R
42 (<i>E. coli</i>)	GSBL+AmpC	I	S	R
43 (<i>E. coli</i>)	GSBL	I	S	R
44 (<i>E. coli</i>)	AmpC	S	S	R

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, İnd. AmpC: İndüklenebilir AmpC, GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz.

Fenotipik tanı yöntemlerinden biri olan KDT, test edilen bakterinin karbapenem direnç mekanizması ve genotipi hakkında fikir verebilecek, erişilebilir, ucuz bir testtir^(2,3).

Karbapenemazların tanımlanması için multipleks PCR yönteminin kullanıldığı bir çalışmada 155 izolattan 136'sında (OXA-48=%84.6; NDM=%6.3; VIM=%2.8; IMP=%1.4) karbapenemaz alt tipleri tek başına saptanmış ve karbapenemaz varlığının doğrulanması için yapılan KDT ile moleküler test arasında %100 uyum bulunmuştur⁽¹⁴⁾.

Çalışmamızda KDT ile karbapenem direnci olan *K. pneumoniae* izolatlarının 20'sinde (%35.7), *E. coli* izolatlarının üçünde (%17.6) ve *K. aerogenes* izolatlarının birinde (%100) MBL saptanmıştır. Temosilin direncine göre 25'i (%44.6) *K. pneumoniae* ve altısı (%35.2) *E. coli* olmak üzere toplam 31 (%40.7) örnekte OXA-48 tipi karbapenemaz tespit edildi. Ancak temosilin direnci sadece OXA-48 tipi karbapenemaz için spesifik bir test olmayıp, direnç mekanizması genotipik yöntemlerle doğrulanmalıdır⁽³⁾.

Genel olarak, temosilin duyarlılık testi, Ambler sınıfı tip A ve B karbapenemaz inhibitörlerinden etkilenmeyen suşlarda ESBL+porin kaybı ile OXA-48 benzeri enzimleri ayırt etmek için kullanılmaktadır⁽³⁾. Bunun yanında OXA-48'in endemik olduğu ülkelerde, meropenem sınır değerlerinin tarama amacıyla kullanılabilmesi ancak özgüllüğünün düşük olduğu bildirilmiştir⁽³⁾.

EUCAST, karbapenemaz tarama testlerinden sonra fenotipik değerlendirme yöntemi olan Rosco'nun KPC, MBL ve OXA-48 kiti ile doğrulama yapılmasını önermektedir. Bu testin karbapenemazları tanımlamada genotipik testlere göre duyarlılık ve özgüllüğü %95-100 arasında bulunmuştur⁽³⁾.

Baykal ve ark.⁽¹⁵⁾ kan izolatları *E. coli* ve *K. pneumoniae* türlerinde GSBL, AmpC ve KPC-tipi karbapenemaz için tarama testlerini aynı plakta değerlendirmiş ve KPC-tipi karbapenemaz için modifiye Hodge testi (MHT),

plazmid kökenli AmpC beta-laktamaz tanısında boronik asitli inhibisyon test yöntemini uygulamıştır. Çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında beta-laktamaz oranları sırasıyla GSBL için %26.2 ve %61.4; AmpC için %1 ve %0.9; GSBL + AmpC için %6 ve %3.5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca ertapeneme dirençli üç izolat boronik asitli inhibisyon testi ile pozitif bulunmasına karşın, MHT ile negatif saptanmıştır⁽¹⁵⁾. Çalışmamızda benzer şekilde karbapeneme dirençli izolatlarda GSBL oranı %22.3 (n=17), AmpC oranları *E. coli* izolatlarında %17.6 (n=3) ve *K. pneumoniae* izolatlarında %1.3 (n=1) bulunmuştur.

Kumar ve ark.⁽¹⁶⁾ yaptıkları çalışmada *Enterobacterales* izolatlarında KPC ve MBL tipi karbapenemaz üretiminin saptanmasında KDT yönteminin MHT'ye göre daha üstün olduğunu belirtmişlerdir.

MHT yöntemi ile karbapenemazların tanısında yüksek oranda yanlış pozitif sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir. Bunlar esas olarak CTX-M tipi GSBL'lerin neden olduğu ve daha az ölçüde indüklenebilir AmpC ve porin kaybıyla birlikte GSBL üretimi veya porin mutasyonlarının bulunduğu durumlardır⁽¹⁶⁾.

AmpC tipi beta laktamazlara sıklıkla çoklu ilaç direnci eşlik etmekte ve dünya çapında prevalansı artmaktadır⁽¹⁷⁾. Sefoksitin duyarlılığı fenotipik bir tarama testi olarak AmpC ve GSBL üretimini doğru bir şekilde ayırt edebilmektedir.

Plazmit aracılı AmpC beta-laktamazlar esas olarak kromozomal olarak kodlanmış genlerden türemiştir ve sefepim ve karbapenemler hariç tüm beta-laktam antibiyotikleri hidroliz etmektedir. Bu tip direnç fenotipine çoğunlukla *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* türlerinde rastlanmaktadır^(17,18).

Ashok ve ark.⁽⁸⁾ Gram negatif bakterilerde DAT ve AmpC disk testini birlikte kullanarak sefoksitin dirençli izolatlarda %4 oranında plazmid aracılı ve %4.8 oranında indüklenebilir AmpC bulmuşlardır. Yine DAT ve AmpC disk testi birlikte kullanılarak yapılan bir çalışmada, *E. coli* ve *K. pneumoniae*

izolatlarında indüklenebilir AmpC β -laktamaz saptanmazken, *Enterobacter* izolatlarının %20 'sinde indüklenebilir AmpC ve yüksek oranda GSBL birlikteliği belirlenmiştir⁽¹⁸⁾.

Akiyemi ve ark.⁽¹⁷⁾ DDT ile sefoksitine %80 direnç saptadıkları *Salmonella* izolatlarında ÇDS ve DAT kullanarak GSBL ve AmpC'yi sırasıyla %25 ve %40 oranında bulmuşlardır. Bu durum *Salmonella* ile ilişkili enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri açısından endişe verici bulunmuştur.

Sefoksitin direnci AmpC üretimini düşündürse de, sefoksitin direncine bazı A sınıfı beta-laktamazların ve dış membran porinlerinin üretimindeki azalmanın aracılık edebileceği ve spesifik bir test olmadığı belirtilmektedir⁽¹⁹⁾.

AmpC fenotipik doğrulama testleri genellikle AmpC'nin kloksasilin veya boronik asit türevleri ile inhibisyonuna dayanmaktadır. Ancak bunlar A sınıfı karbapenemazları da inhibe etmektedir⁽³⁾. Çalışmamızda plazmit türevi AmpC'nin saptanması için sefoksitin ve/veya seftazidim direnci ile sefepim duyarlılığı birlikte değerlendirilmiştir.

Plazmid kökenli AmpC enzimleri, üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı *in vitro* dirençleri nedeniyle kolayca saptanabilir olsa da, indüklenebilir AmpC içeren suşlar, bir indükleyici ajanın yokluğunda yanlış duyarlılık değerlendirmelerine neden olabilirler.

Çalışmamızda bazı izolatlarda AmpC ile birlikte GSBL'nin bulunması, sinerjik bir etki ile MİK değerlerini artırdığını düşündürmektedir.

Dördüncü kuşak sefalosporinler sadece AmpC taşıyan *Enterobacteriales* üyeleri için bir tedavi seçeneği olsa da GSBL üreten suşların neden olduğu enfeksiyonlarda önerilmemektedir. Ayrıca mutasyonlar nedeniyle, AmpC beta-laktamazı kodlayan bir kromozomal genin ifadesi, üçüncü kuşak sefalosporin ile tedavi sırasında artabilmektedir⁽²⁰⁾.

Ertapenem duyarlılığının büyük ölçüde AmpC/ESBL birlikteliği ve porinlerdeki değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmektedir⁽¹¹⁾. Ertapenem *Enterobacter* spp. türlerinde GSBL ve AmpC ve porin kaybı ile sonuçlanan karbapenem direncinde duyarlılığı oldukça iyi fakat özgüllüğü göreceli olarak düşüktür. Öte yandan, vahşi tip ve diğer karbapenemaz türleri arasında yetersiz ayırım gücü nedeniyle karbapenem tarama testinde imipenem kullanılması önerilmez. EUCAST, tarama testlerinde yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle meropenemi önermektedir⁽³⁾.

Çalışmamızda KDT yöntemi ile hem KPC hem de MBL tanısında meropenem tercih edilmiştir.

Karbapenemazların genotipik ve fenotipik çeşitliliği, bu enzimlerin tanımlanmasında zorlukları da beraberinde getirmektedir. Her ne kadar bu testlerin standardize edilmesi için ek çalışmalara gereksinim olsa da, fenotipik ve genotipik yöntemlerin arasından laboratuvarın sahip olduğu olanaklara uygun bir algoritma oluşturulması mümkündür.

Çalışmanın sınırlılığı; fenotipik yöntemlerle saptanamayan karbapenemazların, OXA-48 tipi karbapenemazların doğrulanmasında olduğu gibi genotipik yöntemlerle doğrulanmasının gerekliliğidir. Moleküler tanı yöntemleri ile aynı gün içinde sonuç almak mümkün olsa da rutin çalışmalarda uygulanması zordur. Bundan dolayı moleküler testlerin yapılmadığı laboratuvarlarda kombine disk, disk antagonizma testi ve çift disk sinerji testinin rutin antibiyograma entegrasyonu, çoklu direnç mekanizmalarını izlemek için kolay ve basit bir yaklaşım gibi görünmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamıza çizimleriyle teknik destek sağlayan Mustafa Toker'e ve makalenin düzenlenmesinde yardımcı olan Kezban Tülay Yalçinkaya'ya teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik

Kurulu tarafından (21.03.2018 tarih ve 15/2018-06 karar numarası) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Sütçü İmam University, Clinical Research Ethics Committee (03.21.2018; 15/2018-6).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Kılıç Ü, Demiray T, Altındış M. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *Ankem Derg.* 2016;30(2):62-75.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2016.062>
2. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al. Acquired carbapenemases in gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):112-22.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x>
3. Leclercq R, Cantón R, Brown DF, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 2017;19(2):141-60.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x>
4. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI document M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, ABD: 2017.
5. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1323-32.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01771-09>
6. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(2):249-51.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkp431>
7. Milillo M, Kwak YI, Snedrud E, Waterman PE, Lesho E, McGann P. Rapid and simultaneous detection of blaKPC and blaNDM by use of multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2013;51(4):1247-9.
<https://doi.org/10.1128/JCM.03316-12>
8. Ashok AK, Jaryal SC, Thakur K, Sood A, Gupta PK, Thakur S. Detection of inducible and non-inducible (constitutive) AmpC β -lactamase producing Gram-Negative bacteria among family *Enterobacteriaceae* by two phenotypic methods - Disk Antagonism Test (DAT) and AmpC disk test at a tertiary care hospital, Himachal Pradesh, India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2016;5(4):133-9.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.504.018>
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 12.0, valid from 2022-01-01 [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf] (Erişim tarihi: 20.06.2022).
10. Sanders CC, Sanders WE Jr, Goering RV. In vitro antagonism of beta-lactam antibiotics by ceftioxin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;21(6):968-75.
<https://doi.org/10.1128/AAC.21.6.968>
11. Cheng L, Nelson BC, Mehta M. Piperacillin-tazobactam versus other antibacterial agents for treatment of bloodstream infections due to ampc β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6): e00276-17.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00276-17>
12. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem resistance: A review. *Med Sci.* 2018;6(1):1-28.
<https://doi.org/10.3390/medsci6010001>
13. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):15-21.
<https://doi.org/10.1177/2049936115621709>
14. Akar A. Türkiye'de 2014 yılı içinde izole edilen karbapeneme dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2016;50(1):21-33.
<https://doi.org/10.5578/mb.10695>
15. Baykal A, Çöplü N, Şimşek H, Esen B, Gür D. Kan izolatu *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, KPC-tip karbapenemaz ve plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2012;46(2):159-69.
16. Kumar S, Mehra SK. Performance of modified Hodge test and combined disc test for detection of carbapenemases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2015;4(5):255-61.

17. Akinyemi KO, Iwalokun BA, Oyefolu AO, Fakorede CO. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in multiple drug resistant *Salmonella* isolates from clinical samples in Lagos, Nigeria. *Infect Drug Resist.* 2017;10:19-25.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S123646>
18. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):31103.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3110-3113.2005>
19. Manobalan K, Menezes GA, Harish BN. Study of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. in a tertiary care hospital. *Res J Pharmaceut Biol Chem Sci.* 2014;5869:184-9.
20. Apfalter P, Assadian O, Daxböck F, Hirschl AM, Rotter ML, Makristathis A. Extended double disc synergy testing reveals a low prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter* spp. in Vienna, Austria. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(5):854-9.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkm060>