

**Manuscript Type: Özgün Araştırma / Original Article**

**DOI: 10.5152/kd.2018.46**

**blaOXA-48'in Saptanması İçin İzotermal Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyon Tekniği  
ve "Lateral Flow" Saptama Yöntemine Dayalı Hızlı Moleküler Bir Test Formatının  
Geliştirilmesi**

*Development of a Rapid Molecular Test Format Based on Isothermal Recombinase  
Polymerase Amplification Technique and Lateral Flow Detection Method for Detection of  
blaOXA-48*

Mert Ahmet Kuşkucu, Gökhan Aygün, Asiye Karakullukçu, Nergiz İmamova, Ömer  
Küçükbasmacı, Kenan Midilli

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul,  
Türkiye

**Cite this article as:** Kuşkucu MA, Aygün G, Karakullukçu A, İmamova N, Küçükbasmacı Ö,  
Midilli K. [Development of a rapid molecular test format based on isothermal recombinase  
polymerase amplification technique and lateral flow detection method for detection of  
blaOXA-48]. *Klinik Derg.* 2018; DOI: 10.5152/kd.2018.46

*XXVI. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2016)  
(9-12 April 2016, Amsterdam, Hollanda)'da bildirilmiştir.*

*Presented at XXVIth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases  
(ECCMID 2016) (9-12 April 2016, Amsterdam, Netherlands).*

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:**

Mert Ahmet Kuşkucu, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**E-posta/E-mail:** kuskucum@gmail.com

(Geliş / Received: 16 Ocak / January 2018; Kabul / Accepted: 18 Mart / March 2018)

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Kuşkucu MA, Aygün G, Karakullukçu A, İmamova N, Küçükbaşmacı Ö, Midilli K. [Development of a rapid molecular test format based on isothermal recombinase polymerase amplification technique and lateral flow detection method for detection of blaOXA-48]. *Klinik Derg.* 2018; DOI: 10.5152/kd.2018.46

© Copyright 2018 by Turkish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Available on-line at [www.klimikdergisi.org](http://www.klimikdergisi.org)

**Özet**

**Amaç:** Karbapenem direnci son yıllarda dünya genelinde hastanelerde önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olmasıyla ciddi bir tehlike oluşturmaktadır. blaOXA-48 ilk kez 2004 yılında Türkiye’de tanımlandı ve günümüzde karbapenem direncinden sorumlu başlıca mekanizmalardan biri haline gelmiştir. Karbapenemazları kodlayan genlerin saptanmasında moleküler testlerin hızlı, güvenilir ve çeşitli seçeneklerinin bulunmasına karşın; maliyet, iyi eğitilmiş teknisyen ihtiyacı ve cihaz gereksinimleri bu testlerin yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. Bu sorunları aşabilmek için son yıllarda yeni bazı izotermal amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu tarz yöntemlerden biri olan rekombinaz polimeraz amplifikasyon (RPA) yöntemi hedefin denatürasyonunu gerektirmez ve prob tabanlı saptama yöntemleriyle RPA ürünleri özgün bir cihaz olmadan bile saptanabilmektedir. Bu çalışmada RPA tabanlı

izotermal amplifikasyon yöntemiyle “lateral flow” sistemi birleştirilerek blaOXA-48'i saptayacak hızlı ve sahada kolay uygulanabilir bir test formatının geliştirilmesi amaçlandı.

**Yöntemler:** Bu çalışmada hastanemiz hastane infeksiyon kontrol komitesine ait karbapeneme dirençli ve duyarlı koleksiyon kökenleri (24 blaOXA-48-pozitif köken, birer adet blaVIM-, blaIMP-, blaNDM-, blaKPC-pozitif köken ve 10 adet karbapeneme duyarlı blaOXA-48-negatif köken) çalışmaya dahil edildi. Kökenlerin Müller-Hinton agarda 24 saatlik kültürleri hazırlandıktan sonra 1xPCR tamponunda yoğunlukları 0.5 McFarland olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı. Testin performansının ve alt saptama sınırının belirlenmesi için blaOXA-48-pozitif kökenden de ayrıca dilüsyonlar hazırlandı. Bu örneklerden kaynatma yöntemiyle nükleik asid izolasyonu yapıldı. Örnekler tasarlanan blaOXA-48 RPA primerleri ve nfo probuyla RPA yöntemi kullanılarak üretici talimatları doğrultusunda amplifiye edildi. RPA ürünlerinin saptanması için “lateral flow” yöntemi kullanıldı.

**Bulgular:** blaOXA-48 enzimi kodlayan bütün kökenler yaklaşık 45 dakika gibi kısa bir sürede hiçbir özel cihaza gerek duymadan saptanabildi. Saptama alt limiti 10 bakteri olarak belirlendi. Karbapenem direncine neden olan diğer enzimleri kodlayan kökenlerde ya da blaOXA-48 kodlamayan kökenlerde pozitif sinyal saptanmadı.

**Sonuçlar:** Basit uygulanabilirliği ve taşınabilir olması dolayısıyla geliştirilen test formatı gerek laboratuvar gerek saha uygulamalarında diğer moleküler testler (polimeraz zincir reaksiyonu [PCR], “real-time” PCR gibi) için bir alternatif olabilecektir.

**Anahtar Sözcükler:** blaOXA-48, izotermal amplifikasyon, rekombinaz polimeraz amplifikasyon, lateral flow.

## Abstract

**Objective:** Carbapenem resistance is related with significant morbidity and mortality and has become a real threat to hospitals worldwide in recent years. *bla*OXA-48 was described first in 2004 in Turkey and became one of the most prevalent mechanisms of carbapenem resistance. Molecular tests are rapid, reliable tools for the detection of carbapenem resistance, but their use is limited due to their cost, requirement for well-trained technicians and highly sophisticated instrumentation. The recombinase polymerase amplification (RPA) assay is isothermal amplification method which doesn't require specific instrumentation. RPA doesn't require denaturation of target, can be performed at low, constant temperatures. In this study, we aimed to develop a rapid molecular test format based on RPA technique with combination of lateral flow test format for detection of *bla*OXA-48.

**Methods:** Bacterial strains were obtained from the collection of Hospital Infection Committee. Twenty-four *bla*OXA-48, one from each of *bla*VIM, *bla*IMP, *bla*NDM, *bla*KPC encoding strains and 10 carbapenem-susceptible *bla*OXA-48-negative strains were included. Fresh cultures were suspended in 1xPCR buffer, the turbidity of the suspensions were adjusted to 0.5 McFarland. Serial dilutions of *bla*OXA-48-positive strain were prepared for evaluation of test performance and detection of lower limit. Nucleic acid isolation was performed by boiling method. *bla*OXA-48-specific RPA primers and nfo probe were designed and used. RPA reactions performed according to the manufacturer's instructions. Lateral flow method was used for detection of RPA products.

**Results:** *bla*OXA-48-positive strains were detected within about 45 minutes without any instrument. Lower detection limit of the test was 10 bacteria. Neither cross-reaction nor false positivity was observed with the strains encoding other resistance genes or carbapenem-susceptible strains.

**Conclusions:** Based on its simplicity, applicability without any special instrument, the newly-developed test can be an alternative tool to the other molecular tests (like polymerase chain reaction [PCR], or real-time PCR) for screening of these type of enzymes for both laboratory and on-site settings.

**Key Words:** blaOXA-48, isothermal amplification, recombinase polymerase amplification, lateral flow.

## Giriş

Penem halkasıyla  $\beta$ -laktam halkasının kombinasyonunu içeren karbapenem sınıfı antibiyotikler Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı oldukça etkili antimikrobiyal ajanlardır. Pek çok  $\beta$ -laktamaza karşı stabilite sağlayan bu moleküler yapısına karşın karbapenemler karbapenemaz olarak adlandırılan enzimler tarafından yıkılabilmektedirler. Karbapenemazlar, karbapenemlerle birlikte diğer  $\beta$ -laktam antibiyotikleri de yıkabilme özelliğine sahiptirler ve bu enzimleri kodlayan genlerin bakteriler arasında plazmidler ve transpozonlar gibi genetik elemanlarla horizontal olarak aktarılabilmeleri karbapenemazların hızla yayılmasına yol açabilmektedir. Bu bakımdan karbapenemazların neden olduğu direnç günümüzde özellikle Gram-negatif bakterilerde ciddi bir problem teşkil etmektedir. Ambler sınıflamasına göre sınıf A blaKPC, blaGES/IBC, blaIMI/NMC-A, blaSFC-1, sınıf B blaIMP, blaNDM, blaGIM, blaAIM, blaDIM ve blaPOM olarak isimlendirilen ve karbapenemaz aktivitesine sahip enzimleri içerir. Sınıf D, karbapenemleri etkin biçimde hidrolize edebilen blaOXA-48 enzimini içermektedir (1,2). blaOXA-48'in 2004'te ilk defa Türkiye'den bildiriminden sonra bu enzimi taşıyan kökenlerle oluşan salgınlar ve enzimin karbapeneme dirençli mikroorganizmalarda yayılımı ülkemizden ve tüm dünyadan bildirilmiştir (3-8). Bu enzim günümüzde ülkemizdeki karbapenem direncinin gelişmesinde başlıca yollardan biridir (6,7).

Karbapeneme dirençli bakterilerin kontrolü ve izlemi bu kökenlerle oluşacak ve tedavide ciddi problemlere yol açabilecek hastane infeksiyonlarının önlenmesi ve kontrol altına alınması açısından önem taşımaktadır. Fenotipik testlerle birlikte günümüzde bu tarz dirence yol açan enzimleri saptamak için kullanılmalarına karşın, moleküler testlerin maliyet, iyi yetişmiş personel ve gelişmiş cihaz gereksinimleri bu testlerin tüm merkezlerde yaygın olarak kullanımını kısıtlamaktadır (1,2). Bu amaçla son yıllarda moleküler testler arasında cihaz gereksinimlerini asgariye indirmeleri ve kolay uygulanabilirlikleri nedeniyle izotermal amplifikasyon teknikleri öne öne çıkmaktadır. Rekombinaz enziminin polimeraz enzimi ve tek iplik bağlayan proteinlerle kombine biçimde kullanıldığı rekombinaz polimeraz amplifikasyon (RPA) yöntemi, bu kombinasyonla herhangi bir denatürasyon işlemine gerek duymadan hedef bölgenin amplifikasyonunu gerçekleştirebilen izotermal bir yöntemdir. Yöntemde ısı ya da kimyasal denatürasyon işlemine gerek duyulmadığından ve kullanılan enzimler oda ısısında da aktif olduğundan reaksiyonlar düşük sabit ısılarda (37-42°C) gerçekleştirilebilmektedir. RPA, klasik moleküler testlere göre inhibisyona yol açan etkenlerden daha az etkilenmektedir. Ayrıca RPA sırasında oluşan amplikonların saptanması için farklı enzim sistemleri kullanılarak tasarlanan özgün problarda değişiklikler yaparak farklı uç işaretlemelere ya da farklı floresans sinyallerinin oluşumuna olanak verebilmektedirler. Sonuç olarak yapılan farklı işaretlemelerle oluşturulan sinyaller RPA ile çoklu saptama yapılabilmesini olanaklı kılmaktadır (9).

Bu sayede oluşan amplikonların “real-time” PCR cihazları ya da fluorometrelerle saptanması mümkün olabilmekte, ayrıca uç işaretleme sayesinde oluşan ürünler “lateral flow” yöntemiyle de kolaylıkla saptanabilmektedir (10-12). Antijen antikor reaksiyonlarına dayalı “lateral flow”, 1980’lerde ilk tanımlanmasından itibaren basitliği ve hızlı tanı testlerine kolayca uygulanmasından dolayı, içine nükleik asit saptama testlerinin de dahil olduğu giderek genişleyen bir uygulama alanına sahiptir. Bu yöntemle gerçekleştirilen saptamalarda basit bir şekilde var/yok ayrımı oluşan bandın gözle gözlenmesiyle herhangi bir cihaza ihtiyaç

duymadan yapılabilmektedir. Testlerin genelde tümüne eklenen kontrol bandıyla kalite kontrol de eşzamanlı olarak yapılabilmektedir (12). Bu sayılan nedenlerden dolayı bu çalışmada, ülkemizde karbapenem direncinin önde gelen nedenlerinden biri olan bla-OXA-48 genini taşıyan kökenleri hızlıca, özel bir cihaza gereksinim duymadan saptayabilecek bir test formatının geliştirilmesi amaçlandı.

## Yöntemler

### ***Bakteri Kökenlerinin Hazırlanması ve Nükleik Asid Eldesi:***

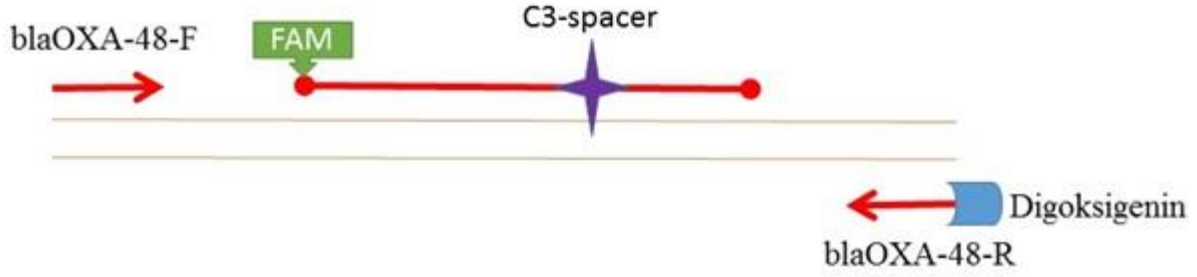
Bu çalışmada hastanemizin enfeksiyon kontrol komitesi arşivinde saklanmış ve taşıdıkları enzimlerin karakterizasyonları daha önce “real-time” PCR yöntemiyle yapılmış olan bakteri kökenleri kullanıldı. Çalışmaya 24 adet blaOXA-48-pozitif örnek (19 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Enterobacter* spp. ve 2 *Escherichia coli*), birer adet blaVIM- (*K. pneumoniae*), blaIMP- (*Pseudomonas aeruginosa*), blaNDM- (*K. pneumoniae*) ve blaKPC- (*E. coli*) pozitif kökenle bu enzimlerin hiçbirinin saptanmadığı karbapeneme duyarlı 10 köken (5 *K. pneumoniae*, 1 *Enterobacter* spp. ve 4 *E. coli*) dahil edildi. Kökenler sıvı besiyerinde canlandırıldıktan sonra Müller-Hinton agarda 24 saatlik kültürleri hazırlandı. Hazırlanan kültürlerden alınan taze koloniler 1 x PCR tamponu (Thermo Fisher Scientific, İngiltere) içinde 0.5 McFarland yoğunlukta ( $10^8$  bakteri/ml) olacak şekilde süspansiyon edildi. Eşzamanlı olarak blaOXA48-pozitif örneklerden biri  $10^1$ - $10^9$  bakteri/ml içerecek şekilde seri olarak dilüe edildi. Hazırlanan süspansiyonlardan 1 ml'si steril DNaz RNaz içermeyen 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı ve 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bakterilerin çökmesi sağlandı. Karışımın üzerine 100 µl 1xPCR buffer (Thermo Fisher Scientific, İngiltere) eklendikten sonra iyice vortekslendi ve ardından tüpler kaynar suda ( $100^{\circ}\text{C}$ 'de) 10 dakika inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra hücresel artıkların çökmesi için örnekler 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan sıvıdan 10 µl alınarak RPA için hedef olarak kullanıldı (8,3).

*bla*OXA-48'in Rekombinaz Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Çoğaltılması ve “Lateral Flow” Yöntemiyle Saptanması: *bla*OXA-48 özgün RPA primerleri ve *nfo* probu, daha önce “real-time” PCR için kullandığımız *bla*OXA-48 primerleri RPA primer ve prob tasarım kurallarına uygun olarak değiştirilerek tasarlandı (Tablo 1, Şekil 1) (7,10). RPA primerleri rekombinaz enziminin optimum çalışması için klasik PCR primerlerinden daha uzun (30 baz ve üzeri) tasarlanmaktadır. *nfo* prob hedefine bağlandığında, polimeraz enziminin probu uzatmaması için 5' ucunda bir bloklayıcı (C3-spacer), 3' ucunda amplikonun saptanmasında kullanılan işaret (karboksifluoresein/FAM) ve RPA karışımı içinde bulunan nükleazın (*nfo*) tanıyıp çentik açacağı orta rezidüv (tetrahidrofuran rezidüvü/THF) içerir. Prob hedefine bağlandığında nükleaz, THF rezidüvünü yıkar ve polimeraz probu primer gibi kullanarak sentez işlemini gerçekleştirir. Böylelikle probun dahil olduğu amplikon ürünleri probun işaretini taşıyacak biçimde işaretlenmiş olur (Şekil 1).

**Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Özgü Primerler ve *nfo* Probu**

Oligo İsmi	Dizi	5'	3'
		Yakalayıcı Grup	Bloklama Grubu
<i>bla</i> OXA-48-F	ggtggcatcgattatcggaatgcctgcggtagc	Yok	Yok
<i>bla</i> OXA-48-R	tagattatgatcgcgattccaagtggcgatatcg	Digoksijenin	Yok
<i>bla</i> OXA-48-Prb	cagggcgtagttgtgctctggaatgagaataagc [THF] gcaaggatttac	FAM	C3-spacer





**Şekil 1.** RPA sisteminde kullanılan primer ve problemlerin şematik gösterimi.

RPA reaksiyonları kit üreticisinin talimatları (TwistAmp nfo kit, TwistDx, İngiltere) doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu amaçla liyofilize olarak gelen enzim karışımı 29.5 µl rehidratasyon tamponuyla sulandırıldı, karışıma 2.1 µl (10 pM) işaretli blaOXA-48-F primeri, 2.1 µl (10 pM) digoksinenin işaretli blaOXA-48-R primeri ve 0.6 µl (10 pM) FAM-işaretli nfo probe eklendi, son hacim 3.2 µl DNase, RNase içermeyen saf suyla 37.5 µl'ye tamamlandı, karışımın üzerine nükleik asit ekstraksiyonundan 10 µl eklendikten sonra her bir tüpe 2.5 µl magnezyum asetat eklenerek (son reaksiyon hacminin 50 µl olması sağlandı) kısa santrifüj, vorteksleme ve kısa santrifüj işlemiyle reaksiyon başlatıldı. Amplifikasyon örnekler 38°C'de ilk 4 dakikalık inkübasyonu takiben kısa santrifüj, vorteksleme ve kısa santrifüj işleminden sonra tekrar 38°C'de 20 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. RPA ürünlerinin saptanması için ticari olarak sağlanan "lateral flow" sistemi (Milenia® HybriDetect 2T strip, Almanya) kullanıldı. Amplifikasyon tüplerinden alınan örnek, 1/50 oranında fosfat tamponlu tuzlu suyla sulandırıldı. Elde edilen dilüentin 20 µl'si kitle sağlanan 80 µl analite özgü solüsyonla birleştirilerek oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Milenia® HybriDetect 2T strip hazırlanan karışıma daldırıldı ve 5 dakika sonra sonuçlar okundu (10,14).

## **Bulgular**

Çalışmada ilk önce karbapeneme dirençli blaOXA-48-pozitif iki örnek (*K. pneumoniae*), blaVIM (*K. pneumoniae*), blaIMP (*P. aeruginosa*), blaNDM (*K. pneumoniae*) ve blaKPC (*E. coli*)

taşıyan örneklerle karbapeneme duyarlı bir örnek (*K. pneumoniae*) test edildi. Test sonucunda blaOXA48-pozitif örneklerde pozitif band elde edilirken diğer örneklerde band elde edilmedi (Resim 1).



**Resim 1.** Sırasıyla blaOXA-48-pozitif, blaIMP-, blaVIM-, blaKPC- ve blaNDM-pozitif kökenlerle karbapeneme duyarlı kökenlere ait RPA sonuçları.

blaOXA48-pozitif örnekten hazırlanan ve  $1-10^8$  bakteri/ml içeren örnekler testin alt saptama duyarlılığını kontrol etmek için test edildiğinde  $10^8-10^1$  hedef içeren örnekler pozitif bulunurken 1 bakteri içeren örnekte sinyal alınamadı. Testin 10 bakteriye kadar saptayabildiği belirlendi (Resim 2).



**Resim 2.** Sırasıyla 108-0 bakteri içeren örneklere ait test sonuçları.

Test edilen 24 blaOXA-48-pozitif örneğin hepsinde pozitif sinyal saptanırken, karbapeneme dirençli blaIMP, blaVIM, blaKPC ve blaNDM taşıyan örneklerle karbapeneme duyarlı kökenlerin hiçbirinde sinyal saptanmadı.

### **İrdeleme**

Yoğun antibiyotik kullanımının söz konusu olduğu alanlar olan hastanelerde gelişen infeksiyonlarda antibiyotik direnci giderek baş edilmesi güçleşen bir sorun olarak karşımızda çıkmaktadır. Antibiyotiklere dirençli kökenlerle oluşan infeksiyonlarda karbapenemler, geniş spektrumları ve  $\beta$ -laktamazların çoğuna dayanıklı olmaları nedeniyle en sık tercih edilen antimikrobiyallerdir. Bununla birlikte dünyada ve ülkemizde bu antibiyotik sınıfına karşı özellikle *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında artan oranlarda direnç bildirilmektedir (1,2,15). Bu dirence farklı mekanizmalar yol açabilse de blaOXA-48 ülkemizde bu dirençten sorumlu başlıca enzimdir ve ülkemizden bu kökenlerin sorumlu olduğu birçok salgın bildirilmiştir

(3,7,8). Türkiye’de ilk saptanmasından sonra bu enzimi taşıyan kökenlerin kalıcı olduğunu ve salgınlar oluşturduğunu bildiren 2008’deki ilk yayınlardan sonra (3,4), 2016 yılında Alp ve arkadaşları (6) yaptıkları bir çalışmada karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarının %91.5’inin blaOXA-48 ürettiğini bildirmişlerdir. İlave olarak bu enzimi kodlayan plazmidin ülkemiz ve çevre coğrafyalarda yayılımını gösteren çalışmalar (16) ve blaOXA-48 ile birlikte eşlik eden diğer bir karbapenamazı (blaNDM) taşıyan kökenlerin ülkemizden bildirilmesi (17,18) karbapenem direncinin yayılımında blaOXA-48’in önemli etken olduğunu ve sıkı bir şekilde izlenerek kontrol altına alınması gerektiğini göstermektedir. Bu direncin saptanmasında fenotipik testlerin kullanımı söz konusu olsa da bu testlerle ilgili olarak süre ve duyarlılık gibi problemler bulunmaktadır. McMullen ve arkadaşları (19) yaptıkları bir çalışmada karbapenem inaktivasyon yöntemi, 2 kromojenik agarı ve moleküler karşılaştırmışlar, kromojenik agarların analitik duyarlılıklarının düşük olduğunu ve karbapenamazların belirlenmesinde test stratejisi olarak duyarlılık ve özgüllük açısından en güvenilir yolun karbapenem inaktivasyon yöntemiyle tarama sonrası moleküler test uygulaması olduğunu bildirmişleridir. Bununla birlikte PCR, “real-time” PCR gibi klasik moleküler tanı yöntemleri, maliyetleri, karmaşık cihaz altyapısı ve yetişmiş personel gerekliliklerinden dolayı kısıtlılıklar içermektedir. Çözüm olarak pek çok çalışmada yeni nesil izotermal amplifikasyon yöntemleri, kolay ve genelde cihazdan bağımsız kullanımlarından dolayı, özellikle sahada kullanılacak minyatürize edilmiş sistemler için iyi bir alternatif oluşturmaktadırlar (20,21). RPA yöntemi özellikle ısı ya da kimyasal yollarla yapılan denatürasyon işlemine gerek duyulmadığından ve inhibitör maddelerden daha az etkilendiğinden, son yıllarda öne çıkan bir izotermal amplifikasyon yöntemidir (10). Bu yöntemin HIV-1 proviral DNA’yı, Rift Vadisi ateşi virusu gibi virusları, *Mycobacterium tuberculosis*’i, *Chlamydia trachomatis*’i, *Francisella tularensis*’i, *Plasmodium falciparum*’u, biyolojik tehdit oluşturan etkenleri ve bakterilerdeki direnç genlerini (blaCTXM, blaNDM, SCCmec gibi) on kopyanın altına düşen bir duyarlılıkla saptamaya olanak verdiğini

ortaya koyan çeşitli çalışmalar mevcuttur (10,22-30). Allen ve arkadaşları (31)'nin yaptığı bir çalışmada RPA yöntemiyle blaOXA-48'i "real-time" floresans oluşumuna dayanan saptama sistemiyle farklı bakterilerde saptamaya çalışmışlar ve testin PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılığını %99.4, özgünlüğünü %100, pozitif prediktif değerini %100 ve negatif prediktif değerini 99.8 olarak bildirmişlerdir (31). Yöntemin avantajlarından biri de sabit ve vücut sıcaklığı gibi düşük ısılarda bile reaksiyonu sürdürebilmesidir. Bu bakımdan tasarlanan sistemde hiçbir alet kullanılmadan sadece koltukaltı ısıyla reaksiyonların gerçekleştiği testler tasarlanmıştır (32). Nitekim bizim çalışmamızda da amplifikasyon sabit ve vücut ısısına yakın (38°C) bir ısıda gerçekleştirilmiştir. Yöntemin, farklı enzim sistemlerinin ilavesine, böylelikle farklı prob sistemleri kullanılarak farklı sinyaller oluşturmaya açık olması oluşan amplikonların, görsel olarak, basit florometreler gibi cihazlarla, antijen antikora dayalı sistemler gibi pek çok farklı yoldan saptanabilmesine olanak vermektedir (10-12). Bu farklı saptama sistemleri ve geniş sinyal oluşturma kapasitesi sayesinde RPA çoklu hedeflerin saptanması için de kullanılabilir (9). Bu çalışmada kullanım kolaylığı ve saptama için objektif veri sağlayabilen "lateral flow" yöntemi kullanıldı. Sonuç olarak elde edilen RPA ürünlerinin saptanması yaklaşık 10 dakika gibi bir sürede, oda ısısında ve cihaz gereksinimi olmadan yapılabildi. Bu sayede geliştirilen testin sahada kullanım kolaylığı sağlanmış oldu. Özellikle son yıllarda geri ödeme politikalarında meydana gelen değişikliklerle birlikte hastane kaynaklı infeksiyonlar sağlık bakımı kuruluşları üzerinde ciddi finansal baskıya yol açmaktadır. Direncin doğru ve hızlı saptanabilmesi ve izlenmesiyle alınacak önlemler bu tip infeksiyonları azaltmada ve yayılımlarını kontrol altına almada yardımcı olacaktır (33).

Çalışmada geliştirilen test her ne kadar kültür örnekleriyle sınanmış olsa da, 10 bakteri gibi çok düşük bakteri sayılarını saptayabilmesi, testin kolay uygulanabilir olması, özel donanım gerektirmemesi gibi nedenlerle hasta başında uygulanabilecek sistemlerin geliştirilmesi için kullanım potansiyeli olduğunu göstermektedir (21,34). Bu tarz test formatları

kullanılarak kolonize/infekte hastaların saptanması ve izolasyonları hızla yapılabileceği gibi ampirik antibiyotik tedavilerinin seçiminde yol gösterici olabilecek bilgiler kısa süre içerisinde elde edilebilecektir.

### **Çıkar Çatışması**

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

### **Teşekkür**

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1501/43239).

### **Kaynaklar**

1. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016; 3(1): 15-21.
2. Teo JQ, Cai Y, Lim TP, Tan TT, Kwa AL. Carbapenem resistance in Gram-negative bacteria: the not-so-little problem in the little red dot. *Microorganisms.* 2016; 4(1): pii: E13.
3. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy.* 2008; 54(2): 101-6.
4. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8): 2950-4.
5. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, *et al.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(5): 413-31.

6. Alp E, Percin D, Colakoglu S, *et al.* Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect.* 2013; 84(2): 178-80.
7. Balkan II, Aygun G, Aydin S, *et al.* Blood stream infections due to OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: treatment and survival. *Int J Infect Dis.* 2014; 26: 51-6.
8. Kuskucu MA, Karakullukcu A, Ailiken M, Otlu B, Mete B, Aygun G. Investigation of carbapenem resistance and the first identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme among *Escherichia coli* isolates in Turkey: a prospective study. *Travel Med Infect Dis.* 2016; 14(6): 572-6.
9. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Mikrochim Acta.* 2014; 181(13-14): 1715-23.
10. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. *Clin Chem.* 2016; 62(7): 947-58.
11. James A, Macdonald J. Recombinase polymerase amplification: emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015; 15(11): 1475-89.
12. Jauset-Rubio M, Svobodová M, Mairal T, *et al.* Ultrasensitive, rapid and inexpensive detection of DNA using paper based lateral flow assay. *Sci Rep.* 2016; 6: 37732.
13. Costa GL, Weiner MP. Colony PCR. *CSH Protoc.* 2006 Jun 1;2006(1). pii: pdb.prot4141.
14. Tu PA, Shiu JS, Lee SH, Pang VF, Wang DC, Wang PH. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *J Virol Methods.* 2017; 243: 98-104.

15. Crannell ZA, Rohrman B, Richards-Kortum R. Quantification of HIV-1 DNA using real-time recombinase polymerase amplification. *Anal Chem.* 2014; 86(12): 5615-9.
16. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, *et al.* Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): 1369-73.
17. Haciseyitoglu D, Dokutan A, Abulaila A, Erdem F, Cag Y, Ozer S, *et al.* The first *Enterobacter cloacae* co-producing NDM and OXA-48 carbapenemases and interhospital spread of OXA-48 and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Clin Lab.* 2017; 63(7): 1213-22.
18. Kilic A, Baysallar M. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med.* 2015; 35(3) :382-3.
19. McMullen AR, Yarbrough ML, Wallace MA, Shupe A, Burnham CD. Evaluation of genotypic and phenotypic methods to detect carbapenemase production in Gram-negative bacilli. *Clin Chem.* 2017; 63(3): 723-30.
20. Lillis L, Siverson J, Lee A, *et al.* Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Mol Cell Probes.* 2016; 30(2): 74-8.
21. Giuffrida MC, Spoto G. Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: Recent advances. *Biosens Bioelectron.* 2017; 90: 174-86.
22. Euler M, Wang Y, Heidenreich D, *et al.* Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(4): 1110-7.
23. Rohrman BA, Richards-Kortum RR. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. *Lab Chip.* 2012; 12(17): 3082-8.
24. Boyle DS, McNerney R, Teng Low H, *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification. *PLoS One.* 2014; 9(8): e103091.



25. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malar J*. 2014; 13: 99.
26. Euler M, Wang Y, Otto P, *et al*. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(7): 2234-8.
27. Euler M, Wang Y, Nentwich O, Piepenburg O, Hufert FT, Weidmann M. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus. *J Clin Virol*. 2012; 54(4): 308-12.
28. Krölov K, Frolova J, Tudoran O, *et al*. Sensitive and rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by recombinase polymerase amplification directly from urine samples. *J Mol Diagn*. 2014; 16(1): 127-35.
29. Hu C, Kalsi S, Zeimpekis I, *et al*. Ultra-fast electronic detection of antimicrobial resistance genes using isothermal amplification and Thin Film Transistor sensors. *Biosens Bioelectron*. 2017; 96: 281-7.
30. Hill-Cawthorne GA, Hudson LO, El Ghany MF, *et al*. Recombinations in staphylococcal cassette chromosome mec elements compromise the molecular detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2014; 9(6): e101419.
31. Allen C, Turner C, Meunier D, *et al*. Is an assay specific for detection of OXA-48-like carbapenemase genes a useful addition to front-line diagnostics? [Abstract] *In: Abstracts of XXVIth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2016)* (9-12 April 2016, Amsterdam, Netherlands). Basel, Switzerland: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2016.
32. Crannell ZA, Rohrman B, Richards-Kortum R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. *PLoS One*. 2014; 9(11): e112146.

33. Renner LD, Zan J, Hu LI, Martinez M, Resto PJ, Siegel AC, et al. Detection of ESKAPE bacterial pathogens at the point of care using isothermal DNA-based assays in a portable degas-actuated microfluidic diagnostic assay platform. *Appl Environ Microbiol.* 2017; 83(4). pii: e02449-16.

34. Lutz S, Weber P, Focke M, et al. Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). *Lab Chip.* 2010; 10(7): 887-93.

UNCORRECTED