

bla_{OXA-48} 'in Saptanması İçin İzotermal Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyon Tekniği ve Yanal Akım Yöntemine Dayalı Hızlı Bir Moleküler Test Formatının Geliştirilmesi

Development of a Rapid Molecular Test Format Based on Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Technique and Lateral Flow Method for Detection of bla_{OXA-48}

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

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

Özet

Amaç: 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 geliştirilmiş olan izotermal amplifikasyon yöntemlerinden biri olan rekombinaz polimeraz amplifikasyon (RPA) yöntemi hedefin denatürasyonunu gerektirmez ve prob tabanlı saptama yöntemleriyle RPA ürünleri özel bir cihaz olmadan bile saptanabilir. Bu çalışmada RPA tabanlı izotermal amplifikasyon yöntemiyle yanıl akım sistemi birleştirilerek bla_{OXA-48} 'i saptayacak hızlı ve sahada kolay uygulanabilir bir moleküler test formatının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Bu çalışmada hastanemiz hastane infeksiyon kontrol komitesine ait karbapeneme dirençli ve duyarlı kolleksiyon kökenleri (24 OXA-48-pozitif köken, birer VIM-, IMP-, NDM, KPC-pozitif köken ve 10 karbapeneme duyarlı OXA-48-negatif köken) çalışmaya dahil edildi. Kökenlerin Mueller-Hinton agarında 24 saatlik kültürleri hazırlandıktan sonra 1x polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tamponunda yoğunlukları 0.5 McFarland standardında olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı. Testin performansının ve alt saptama sınırının belirlenmesi için OXA-48-pozitif kökenden de dilüsyonlar hazırlandı. Bu örneklerden kaynatma yöntemiyle nükleik asid izolasyonu yapıldı. Örnekler, tasarlanan bla_{OXA-48} RPA primerleri ve NFO probuyla, RPA yöntemi kullanılarak üretici (TwistAmp® nfo kit, TwistDx, Cambridge, Birleşik Krallık) talimatları doğrultusunda amplifiye edildi. RPA ürünlerinin saptanması için yanıl akım yöntemi kullanıldı.

Abstract

Objective: 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, one of the isothermal amplification methods developed recently to overcome these problems, doesn't require denaturation of target, and RPA products can be determined by probe-base detection methods even without a specific instrumentation. In this study, we aimed to develop a rapid and easily applicable molecular test format in on-site settings based on RPA technique with combination of lateral flow system for detection of bla_{OXA-48} .

Methods: Bacterial strains were obtained from the collection of hospital infection control committee. Twenty-four OXA-48-, one from each of VIM-, IMP-, NDM-, KPC-positive strains and 10 carbapenem-susceptible OXA-48-negative strains were included. Fresh cultures were suspended in 1x polymerase chain reaction (PCR) buffer, the turbidity of the suspensions were adjusted to 0.5 McFarland standard. Serial dilutions of OXA-48-positive strain were prepared for evaluation of test performance and detection of lowest limit. Nucleic acid isolation was performed by boiling method. bla_{OXA-48} -specific RPA primers and NFO probe were designed and used. RPA reactions were performed according to the manufacturer's (TwistAmp® nfo kit, TwistDx, Cambridge, United Kingdom) instructions. Lateral flow method was used for detection of RPA products.

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 method for detection of bla_{OXA-48}]. *Klimik Derg.* 2018; 31(3): 185-9. Turkish.

XXVIIth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (9-12 Nisan 2016, Amsterdam, Hollanda)'de bildirilmiştir. Presented at the XXVIth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (9-12 April 2016, Amsterdam, Netherlands).

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Mert Ahmet Kuşkucu, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, 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)

DOI: 10.5152/kd.2018.46



Bulgular: OXA-48 enzimini kodlayan bütün kökenler yaklaşık 45 dakikada hiçbir özel cihaza gerek duymadan saptandı. Saptama alt limiti 10 bakteri olarak belirlendi. Karbapenem direncine neden olan diğer enzimleri kodlayan kökenlerde ya da OXA-48 kodlamayan kökenlerde pozitif sinyal saptanmadı.

Sonuçlar: Yeni geliştirilen bu test formatı, uygulanmasının basit olması ve özel bir cihaz gerektirmemesi dolayısıyla, bu tür enzimlerin taranması için gerek laboratuvar gerek saha koşullarında, diğer moleküler testlere (PCR, "real-time" PCR gibi) bir alternatif yöntem oluşturabilir. *Klimik Dergisi* 2018; 31(3): 185-9.

Anahtar Sözcükler: *bla*_{OXA-48}, izotermal amplifikasyon rekombinaz polimeraz amplifikasyon tekniği, yanal akım yöntemi.

Giriş

Karbapenemazların neden olduğu direnç günümüzde özellikle Gram-negatif bakterilerde ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Günümüzde bu tarz dirence yol açan enzimleri saptamak için fenotipik testlerle birlikte moleküler testler de kullanılmaktadır. Ancak moleküler testlerin yüksek maliyetli olmaları ve iyi yetişmiş personel ve gelişmiş cihaz gerektirmeleri, her merkezde yaygın olarak kullanımını kısıtlamaktadır (1,2).

Bu amaçla, son yıllarda moleküler testler arasında izotermal amplifikasyon teknikleri, cihaz gereksinimlerini asgariye indirmeleri ve kolay uygulanabilmeleri nedeniyle öne çıkmaktadır. Rekombinaz enziminin polimeraz enzimi ve tek iplik bağlayan proteinlerle kombine biçimde kullanıldığı rekombinaz polimeraz amplifikasyon (RPA) yöntemi, 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 sıcaklığında da aktif olduğundan reaksiyonlar düşük sabit sıcaklıklarda (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 özgül probalarda değişiklikler yapılabilmekte ve böylece farklı uç işaretlemeleri ya da farklı floresans sinyallerinin oluşması mümkün olmaktadır. Yapılan farklı işaretlemelerle oluşturulan sinyaller de RPA ile çoklu saptama yapılabilmesini olanaklı kılmaktadır (3).

Bu sayede oluşan amplikonlar "real-time" PCR cihazları ya da florometrelerle saptanabilmekte, ayrıca uç işaretleme sayesinde oluşan ürünler de yanal akım yöntemiyle kolaylıkla belirlenebilmektedir (4-7). Antijen-antikor reaksiyonlarına dayalı yanal akım, 1980'lerde ilk tanımlanmasından itibaren basitliği ve hızlı tanı testlerine kolayca uygulanmasından dolayı, içine nükleik asid saptama testlerinin de dahil olduğu giderek genişleyen bir uygulama alanına sahiptir. Bu yöntemle gerçekleştirilen saptamalarda, oluşan bandın gözle gözlenmesiyle herhangi bir cihaza gerek kalmadan basit bir şekilde var/yok ayrımı yapılmaktadır. Testlerin genelde tümüne eklenen kontrol bandıyla eşzamanlı olarak kalite kontrolü de yapılabilmektedir (6). 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 amaçlanmıştır.

Results: OXA-48-positive strains were detected within about 45 minutes without any need for special instruments. Lowest detection limit of the test was 10 bacteria. Neither cross-reactions nor false positivity was observed with the strains having other resistance genes or carbapenem-susceptible strains.

Conclusions: Based on its simplicity and applicability without any need for special instruments, the newly-developed test can be an alternative tool to the other molecular tests (like PCR or real-time PCR) for screening of these type of enzymes for both laboratory and on-site settings. *Klimik Dergisi* 2018; 31(3): 185-9.

Key Words: *bla*_{OXA-48}, isothermal amplification recombinase polymerase amplification technique, lateral flow method.

Yöntemler

Bakteri Kökenlerinin Hazırlanması ve Nükleik Asidin Elde

Edilmesi: Bu çalışmada hastanemizin infeksiyon kontrol komitesi arşivinde saklanmış ve taşıdıkları enzimlerin karakterizasyonları daha önce "real-time" PCR yöntemiyle yapılmış olan bakteri kökenleri kullanıldı. Çalışmaya 24 OXA-48-pozitif köken (19 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Enterobacter* spp. ve 2 *Escherichia coli*), birer VIM (*K. pneumoniae*), IMP (*Pseudomonas aeruginosa*), NDM (*K. pneumoniae*) ve KPC (*E. coli*) -pozitif kökenle bu enzimlerin hiçbirinin saptanmadığı karbapeneme duyarlı 10 köken (5 *K. pneumoniae*, 1 *Enterobacter* sp. ve 4 *E. coli*) dahil edildi. Kökenler sıvı besiyerinde canlandırıldıktan sonra Mueller-Hinton agarında 24 saatlik kültürleri hazırlandı. Hazırlanan kültürlerden alınan taze kolonilerden 1× PCR tamponu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) içinde 0.5 McFarland standardı yoğunlukta (10⁸ bakteri/ml) olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Eşzamanlı olarak OXA-48-pozitif örneklerden biri 10¹-10⁹ bakteri/ml içerecek şekilde seri olarak dilüe edildi. Hazırlanan süspansiyonların 1 ml'si DNaz ve RNaz içermeyen 1.5 ml'lik steril Eppendorf tüpüne aktarıldı ve 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilerek bakterilerin çökmesi sağlandı. Karışımın üzerine 100 µl 1× PCR tamponu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) eklendikten sonra iyice vortekslendi ve ardından tüpler kaynar suda (100°C'de) 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücresel artıkların çökmesi için örnekler 14 000 rpm'de 1 dakika daha santrifüje edildi ve üstte kalan sıvıdan 10 µl alınarak RPA için hedef olarak kullanıldı (8,9).

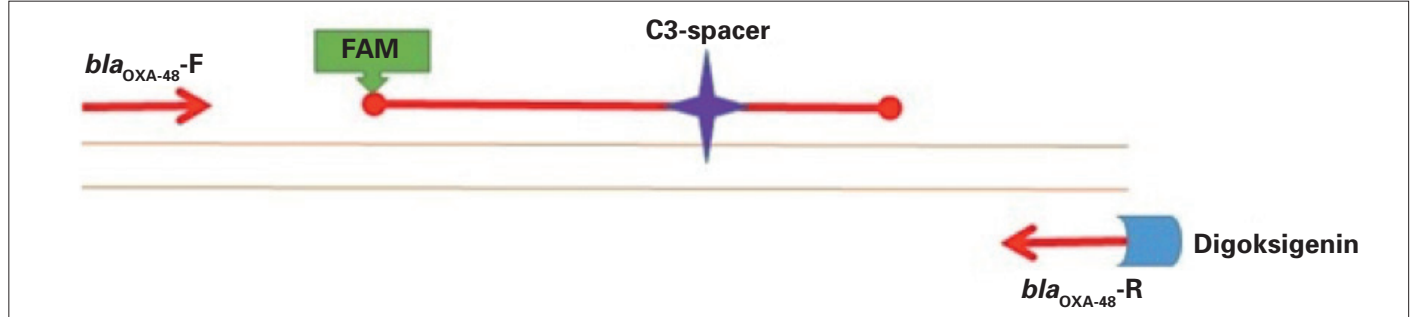
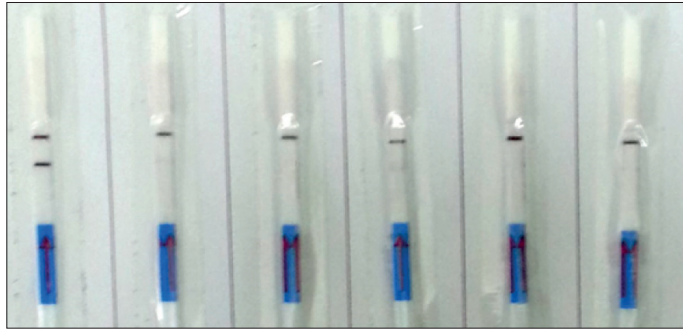
*bla*_{OXA-48}'in Rekombinaz Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla

Çoğaltılması ve Yanal Akım Yöntemiyle Saptanması: *bla*_{OXA-48} özgül RPA primerleri ve NFO probu, daha önce "real-time" PCR için kullandığımız *bla*_{OXA-48} primerleri, RPA primer ve prob tasarımı kurallarına uygun biçimde değiştirilerek tasarlandı (4,10) (Tablo 1). RPA primerleri rekombinaz enziminin optimum olarak 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 (karboksiflorosein/FAM) ve RPA karışımı içinde bulunan nükleazın (NFO) tanıyıp çentik açacağı orta rezidü (tetrahidrofuran rezidüsü/THF) içerir. Prob hedefine bağlandığında nükleaz, THF rezidüsünü yıkar ve polimeraz probu primer gibi kullanarak sentez işlemi gerçekleştirir. Böylelikle probun dahil olduğu amplikon ürünleri probun işaretini taşıyacak biçimde işaretlenmiş olur (Şekil 1).

RPA reaksiyonları kit (TwistAmp® nfo kit, TwistDx, Cambridge, Birleşik Krallık) üreticisinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu amaçla liyofilize olarak gelen enzim ka-

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Özgül Primerler ve NFO Probu

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

**Şekil 1.** Rekombinaz polimeraz amplifikasyon sisteminde kullanılan primer ve problemlerin şematik gösterimi.**Resim 1.** Sırasıyla, OXA-48-, IMP-, VIM-, KPC- ve NDM-pozitif kökenlerle karbapeneme duyarlı kökenlere ait rekombinaz polimeraz amplifikasyon sonuçları.

rışımı 29.5 µl rehidratasyon tamponuyla sulandırıldı; karışım 2.1 µl (10 pM) işaretli *bla*_{OXA-48}-F primeri, 2.1 µl (10 pM) digoksininle işaretlenmiş *bla*_{OXA-48}-R primeri ve 0.6 µl (10 pM) FAM'la işaretlenmiş NFO probu eklendi. Son hacim 3.2 µl DNaz ve RNaz içermeyen saf suyla 37.5 µl'ye tamamlandı; karışımın üzerine nükleik asit ekstraksiyonundan 10 µl ekledikten sonra her bir tüpe 2.5 µl magnezyum asetat eklenerek (son reaksiyon hacminin 50 µl olması sağlanmış oldu) kısa santrifügasyon, vorteksleme ve kısa santrifügasyon işlemiyle reaksiyon başlatıldı. Amplifikasyon, örnekler 38°C'de ilk 4 dakikalık inkübasyonu takiben kısa santrifügasyon, vorteksleme ve kısa santrifügasyon işleminden sonra tekrar 38°C'de 20 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. RPA ürünlerinin saptanması için ticari olarak sağlanan yanak akım sistemi (HybriDetect® 2T, Milenia, Giessen, 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 sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. HybriDetect® 2T stripi, hazırlanan karışıma daldırıldı ve 5 dakika sonra sonuçlar okundu (4,11).

Bulgular

Çalışmada ilk önce karbapeneme dirençli OXA-48-pozitif iki köken (*K. pneumoniae*), *bla*_{VIM} (*K. pneumoniae*), *bla*_{IMP} (*P.*

**Resim 2.** Sırasıyla 10⁸⁻¹ bakteri içeren örneklerle ait test sonuçları.

aeruginosa), *bla*_{NDM} (*K. pneumoniae*) ve *bla*_{KPC} (*E. coli*) genlerini taşıyan kökenlerle karbapeneme duyarlı bir köken (*K. pneumoniae*) test edildi. Test sonucunda OXA-48-pozitif kökenlerde pozitif band elde edilirken diğer kökenlerde band elde edilmedi (Resim 1).

OXA-48-pozitif kökenden hazırlanan ve 1-10⁸ bakteri/ml içeren örneklerin alt saptama duyarlılığını kontrol etmek için test edildiğinde 10⁸⁻¹⁰ hedef içeren örnekler pozitif bu-

lunurken 1 bakteri içeren örnekte sinyal alınamadı. Testin, 10 bakteriye kadar pozitifliği saptayabildiği belirlendi (Resim 2).

Test edilen 24 OXA-48-pozitif kökenin hepsinde pozitif sinyal saptanırken, karbapeneme dirençli bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{KPC} ve bla_{NDM} genlerini taşıyan kökenlerle 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 β -laktamazların çoğuna dayanıklı olmaları nedeniyle en sık başvurulan antimikrobiyaller arasındadır. Bununla birlikte dünyada ve ülkemizde bu antibiyotik sınıfına karşı özellikle *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında artan oranlarda direnç bildirilmektedir (1,2,12). OXA-48 enziminin 2004'te ilk defa Türkiye'den bildiriminden sonra, ülkemizden ve tüm dünyadan bu enzimi taşıyan kökenlerle oluşan salgınlar bildirilmiş ve bu enzim karbapeneme dirençli mikroorganizmalarda gitikçe yaygınlaşmıştır (8-10,13-15). Bu enzimi taşıyan kökenlerin kalıcı olduğunu bildiren 2008'deki ilk yayınlardan sonra (8,13), 2016 yılında Alp ve arkadaşları (15) karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarının %91.5'inin OXA-48 ürettiğini bildirmişlerdir. İlave olarak bu enzimi kodlayan plazmidin ülkemiz ve çevre coğrafyalarda yayılımını gösteren çalışmalar (16) ve ülkemizden OXA-48 ile birlikte eşlik eden diğer bir karbapenamazi (NDM) taşıyan kökenlerin de bildirilmesi (17,18), karbapenem direncinin yayılımında OXA-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 süre ve duyarlılık gibi problemler bulunmaktadır. McMullen ve arkadaşları (19) yaptıkları bir çalışmada karbapenem inaktivasyon yöntemini, 2 ayrı kromojenik agarı ve moleküler yöntemi karşılaştırmışlar; kromojenik agarların analitik duyarlılıklarının düşük olduğunu ve karbapenemazların belirlenmesinde test stratejisi olarak duyarlılık ve özgüllük açısından en güvenilir yolun karbapenem inaktivasyon yöntemiyle tarama sonrası moleküler test uygulaması olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte PCR ve "real-time" PCR gibi klasik moleküler tanı yöntemleri, maliyetleri, karmaşık cihaz altyapısı ve yetişmiş personel gerektirdiklerinden dolayı kısıtlılıklar içermektedir. Çözüm olarak, yeni nesil izotermal amplifikasyon yöntemlerinin, kolay ve genelde cihazdan bağımsız kullanımlarından dolayı, özellikle sahada kullanılabilecek minyatürize edilmiş sistemler için iyi bir alternatif oluşturduğu bildirilmektedir (20,21). RPA yöntemi, özellikle ısı ya da kimyasal yollarla yapılan denatürasyon işlemine gerek duymadığından ve inhibitör maddelerden daha az etkilendiğinden, son yıllarda öne çıkan bir izotermal amplifikasyon yöntemidir (4). Bu yöntemin, HIV-1 proviral DNA'yı (22), Rift Vadisi ateşi virusu gibi virusları (23), *Mycobacterium tuberculosis*'i (24), *Chlamydia trachomatis*'i (25), *Francisella tularensis*'i (26), *Plasmodium falciparum*'u (27), biyolojik tehdit oluşturan etkenleri (28) ve bakterilerdeki bla_{CTX-M} , bla_{NDM} , SCC_{mec} gibi direnç genlerini (29,30) on kop-

yanın altına düşen bir duyarlılıkla saptamaya olanak verdiğini ortaya koyan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Allen ve arkadaşları (31), bla_{OXA-48} 'i RPA yöntemiyle "real-time" floresans oluşumuna dayanan sistemle farklı bakterilerde saptamaya çalışmışlar ve testin PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılığını %99.4, özgüllüğünü %100, pozitif prediktif değerini %100 ve negatif prediktif değerini %99.8 olarak bildirmişlerdir. Yöntemin avantajlarından biri de sabit ve vücut sıcaklığı gibi düşük sıcaklıklarda bile reaksiyonu sürdürebilmesidir. Bu bakımdan reaksiyonların hiçbir alet kullanılmadan sadece koltukaltı sıcaklığıyla gerçekleştirildiği testler tasarlanmıştır (32). Nitekim amplifikasyon, bizim çalışmamızda da sabit ve vücut sıcaklığına yakın (38°C) bir sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Yöntemin, farklı enzim sistemlerinin ilave edilmesine, 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 (4-6). Bu farklı saptama sistemleri ve geniş sinyal oluşturma kapasitesi sayesinde RPA çoklu hedeflerin saptanması için de kullanılabilir (3).

Bu çalışmada kullanım kolaylığı olan ve saptama için objektif veri sağlayabilen yanal akım yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak elde edilen RPA ürünlerinin saptanması yaklaşık 10 dakika gibi bir sürede, oda sıcaklığında ve cihaz gereksinimi olmadan yapılabilmektedir. Bu sayede geliştirilen testin sahada kullanım kolaylığı sağlanmıştır. 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 yayılmalarını kontrol altına almada yardımcı olacaktır (33).

Çalışmada geliştirilen test her ne kadar kültür örnekleriyle sınırlı 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 de 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. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase ampli-

- fication for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Mikrochim Acta*. 2014; 181(13-14): 1715-23.
4. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. *Clin Chem*. 2016; 62(7): 947-58.
 5. 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.
 6. 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.
 7. Costa GL, Weiner MP. Colony PCR. *CSH Protoc*. 2006; 2006(1): pii: pdb.prot4141.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Balkan I, 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Carrèr 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, 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. 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.
 23. 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.
 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. 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.
 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. 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.
 28. 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.
 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? (EP0232). XXVIth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (9-12 April 2016, Amsterdam, Netherlands) [Internet]. Basel, Switzerland: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [erişim 16 Ocak 2018]. https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/
 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.