

Gram-Negatif Bakterilerde Moleküler ve Moleküler Olmayan Yöntemlerle Karbapenemazların Tanımlanmasının Karşılaştırılması

Comparison of Genotypic and Phenotypic Methods to Identify Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacteria

Ezgi Yılmaz¹, Seniha Başaran¹, Serap Yıldız-Süzük², Serap Şimşek-Yavuz¹, Atahan Çağatay¹, Oral Öncül¹, Halit Özsüt¹, Haluk Eraksoy¹

¹İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye; ²T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: Karbapenemlere dirençli Gram-negatif çomak (KRGNC) infeksiyonlarının tedavisini planlarken, karbapenemaz varlığının ve karbapenemaz tipinin değerlendirilmesi önemli olmakla birlikte genotipik yöntemlerin rutinde kullanımı teknik donanım ve deneyimli personel gerektirdiğinden uygulanması her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle özellikle kaynakları sınırlı ülkelerde ucuz, güvenilir, deneyim gerektirmeyen ve günlük pratikte kolaylıkla uygulanabilecek fenotipik yöntemler bir alternatiftir. Bu çalışmada, KRGNC'lerdeki karbapenemaz varlığı ve ülkemizde karbapenem direncinin en önemli nedenlerinden olan *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{NDM} genlerini veya her iki geni birden taşıyan suşları ayırt etmede kullanılan moleküler olmayan, ucuz ve kolay yapılabilen yöntemlerin etkinliği değerlendirilerek bir algoritma oluşturulmaya çalışıldı.

Yöntemler: Çalışmaya, klinik örneklerde üreyen ve karbapenem dirençli olduğu belirlenmiş 16 ardışık Gram-negatif çomak suşu dahil edildi. Karbapenemaz varlığını saptamak için fenotipik test olarak basitleştirilmiş karbapenem inaktivasyon metodu (simplified carbapenem inactivation method – sCIM) ve modifiye Hodge testi (MHT); *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} ve *bla*_{KPC} genlerini tanımlamak içinse moleküler yöntem olarak gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi kullanıldı. Karbapenemaz türlerinin ayırımı için fenotipik yöntemlerden yüksek düzey temosilin direnç testi ve seftazidim-avibaktam disk difüzyon duyarlılık testi uygulandı; testlerin sonuçlarıyla günlük pratikte karbapenemaz türlerinin fenotipik yöntemlerle tayini için bir algoritma oluşturuldu.

Bulgular: Toplamda 16 suş değerlendirilmiş olup 12'sinde karbapenemaz geni saptandı; 11'inde sCIM, 10'unda MHT pozitif bulundu (duyarlılık sırasıyla %91.9 ve %83.3 idi). *Enterobacterales* suşlarının yedisinde *bla*_{OXA-48}, birinde *bla*_{NDM} ikisinde *bla*_{NDM} ve *bla*_{OXA-48} birlikte saptanmış olup hepsinde sCIM pozitifliği. Karbapenemaz geni saptanan fakat sCIM negatif olan bir suş mevcuttu. Karbapenemaz geni saptanmayan dört suşun birinde sCIM pozitifliği. Yüksek düzey temosilin direnci (MİK >128 µg/ml) izole *bla*_{OXA-48} taşıyan tüm suşlarda saptanırken, izole *bla*_{NDM} taşıyan suşta gösterilemedi.

Sonuç: Çalışmamızda moleküler yöntemlerle karbapenemaz geni saptanan *Enterobacterales* suşlarının tamamında sCIM pozitif saptandı. Verilerimiz literatürle uyumlu olarak, KRGNC'lerde sCIM'in karbapenemaz varlığının araştırılmasında günlük pratikte kullanılabileceğini destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Karbapenemaz, karbapenem inaktivasyon, CIM, sCIM, fenotipik

ABSTRACT

Objective: Identifying the presence and type of carbapenemases is essential to determine the treatment choices for carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (CRB). Genotypic characterization of CRB needs technical support and experienced staff and is not an option for most laboratories due to its high cost. For this reason, especially in countries with limited resources, cheap, reliable phenotypic methods are an alternative, do not require experience, and can be easily applied in daily practice. The goal of the study was to evaluate the performance of phenotypic methods for carbapenemase production in CRB and to form a simple algorithm to differentiate carbapenemase types such as *bla*_{OXA-48} or *bla*_{NDM}, which are common in our country.

Methods: The study included 16 consecutive carbapenem-resistant, Gram-negative bacteria. Simplified carbapenem inactivation methods (sCIM) and modified Hodge test (MHT) were performed. Genes responsible for carbapenemase production (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, and *bla*_{KPC}) were detected by real-time polymerase chain reaction. Temocillin resistance and ceftazidime-avibactam disc diffusion test were also applied to define carbapenemase types.

Results: The carbapenemase gene was detected in 12 of the 16 strains; sCIM positivity was found in 11, and MHT was positive in 10. Sensitivity for sCIM and MHT were 91.9% and 83.3%, respectively. All *Enterobacterales* strains were

positive for sCIM, and bla_{OXA-48} was the most common carbapenemase. sCIM false negativity was detected for only one strain. High-level temocillin resistance (MIC >128 µg/mL) was present in all strains with bla_{OXA-48} ; it wasn't detected in the strain carrying isolated bla_{NDM} .

Conclusion: sCIM positivity was present for all *Enterobacterales*, which were shown to carry the carbapenemase gene by RT-PCR. Our findings support the usage of sCIM in daily practice to screen for carbapenemase production in CRB.

Keywords: Carbapenemase, carbapenem inactivation, CIM, sCIM, phenotypic

GİRİŞ

Karbapenemlere dirençli Gram-negatif çomak (KRGNC) infeksiyonları gerek çok sınırlı tedavi seçenekleri gerekse yüksek mortalite oranları nedeniyle günümüzün en önemli küresel sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Avrupada 1990'lı yılların ikinci yarısından itibaren yayılmaya başlayan KRGNC'ler, 2018 yılına gelindiğinde 37 Avrupa ülkesinin tamamında tanımlanmıştır (1-3). Ülkemizde doksanlı yıllarda tanımlanmaya başlayan KRGNC infeksiyonları, yıllar içinde çok hızla yayılarak bir çok hastanede endemik hale gelmiştir. Karbapenem direnci, 2021 yılı ulusal sağlık bakımıyla ilişkili infeksiyon sürveyans verilerine göre, *Acinetobacter* türlerinde %97.5, *Pseudomonas aeruginosa*'da %80 ve *Klebsiella pneumoniae*'de %75'e ulaşmıştır (4).

KRGNC infeksiyonlarında karbapenem direncine yol açan en önemli mekanizma karbapenemaz üretimi olmakla birlikte, porin kaybı, efluks pompaları gibi diğer mekanizmalar da dirence yol açabilir. Bu infeksiyonların tedavisini planlarken, bakterideki karbapenem direncinin mekanizmasının, karbapenemaz varlığının ve varsa karbapenemazın tipinin tanımlanması oldukça önemli olup karbapenemaz varlığının gösterilmesi infeksiyonun kontrolü için de son derece önemlidir (2,5). Söz konusu infeksiyonlardaki karbapenemaz varlığının araştırılması için fenotipik ve genotipik testlerden yararlanılabilir. Genotipik testler oldukça pahalı olduğu ve yapımları teknik donanım ve tecrübeli eleman gerektirdiği için ülkemizdeki mikrobiyoloji laboratuvarlarının büyük çoğunluğunda rutin olarak çalışılmamaktadır. Bu nedenle, gerek karbapenemaz varlığının belirlenmesi, gerekse var olan karbapenemazın türünün saptanması için ucuz, hızlı, kolayca yapılabilen, güvenilir test yöntemlerine gereksinim vardır. Bu çalışmada, KRGNC'lerdeki karbapenemaz varlığı ve ülkemizde karbapenem direncinin en önemli nedenlerinden olan bla_{OXA-48} ve bla_{NDM} genlerini veya her iki geni birden taşıyan suşları ayırt etmede kullanılan moleküler olmayan, ucuz ve kolay yapılabilen yöntemlerin etkinliği değerlendirilerek bir algoritma oluşturulmaya çalışıldı.

YÖNTEMLER

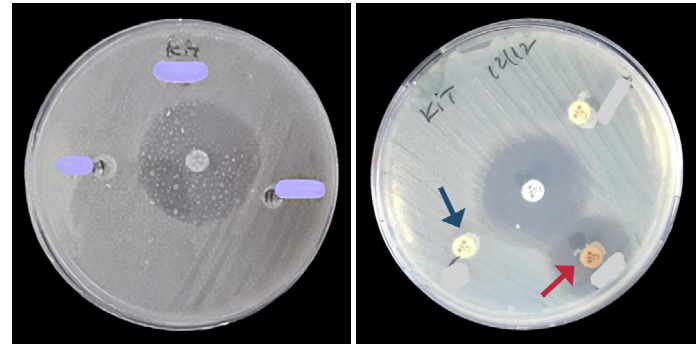
Çalışmaya, klinik örneklerde üreyen ve karbapeneme dirençli olduğu belirlenmiş 16 ardışık Gram-negatif çomak suşu (*K. pneumoniae*, n=9; *P. aeruginosa*, n=3; *Escherichia coli*, n=1; *Achromobacter* spp., n=1; *Acinetobacter baumannii*, n=1; *Stenotrophomonas maltophilia*, n=1) dahil edildi. Bakterilerin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve BD Phoenix™ (Becton Dickinson, ABD) tam otomatize sistemi kullanıldı. Duyarlılık testleri Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) tarafından belirlenen zon çaplarına göre disk difüzyon yöntemiyle değerlendirildi ve 10 µg meropenem (Oxoid Ltd, İngiltere) diski çevresindeki inhibisyon zonu <16 mm olanlar karbapeneme dirençli kabul edildi (5). Karbapenemaz varlığını saptamak için fenotipik test olarak basitleştirilmiş karbapenem inaktivasyon metodu ("simplified carbapenem inactivation method" – sCIM) ve modifiye Hodge testi (MHT); bla_{OXA-48} , bla_{NDM} ve bla_{KPC} genlerini tanımlamak içinse moleküler yöntem olarak gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyon (RT-PCR) testi kullanıldı. Karbapenemaz türlerinin ayırımı için fenotipik yöntemlerden yüksek düzey temosilin direnç testi [gradyan test yöntemi (Etest[®]; bioMerieux, Marcy l'Etoile, Fransa)] ve seftazidim-avibaktam disk difüzyon duyar-

lılık testi (10/4 µg; Thermo-Scientific[®] Oxoid[®], İngiltere) uygulandı ve testlerin sonuçlarıyla günlük pratikte karbapenemaz türlerinin fenotipik yöntemlerle tayini için bir algoritma oluşturuldu. Örneklerin barkod numarası, bakteri tanımlama sonucu, disk difüzyon yönteminde saptanan karbapenem zon çapları, sCIM ve genotipik yöntem sonuçları takip formuna kaydedildi.

Fenotipik Testler

Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Testi (sCIM)

Disk difüzyon yöntemiyle, Mueller-Hinton ya da koyun kanlı agarda 24-48 saat inkübasyon sonrasında karbapenem direnci saptanan Gram-negatif çomaktan bir steril öze (10 µl) dolusu mikroorganizma alınıp 10 µg meropenem (Oxoid Ltd, Hampshire, İngiltere) diski üzerine ekildi ve steril bir besiyerine yerleştirilip kapağı kapatıldı. Genotipik testlerin yapılabilmesi için araştırılan suşlardan birer öze dolusu mikroorganizma, 5 ml triptik soya buyyonuna (TSB) ekilip -20°C'de saklandı. Üzerine bakterilerin inoküle edildiği diskler en az 2 saat (2-4 saat) 35°C'de inkübe edildi. Mueller-Hinton agara karbapenemlere duyarlı olduğu bilinen kontrol *E. coli* suşundan (ATCC 29522) süspansiyon (0.5 MacFarland) hazırlanıp eküvyonla yayıldı ve agarın kapağı kapatılıp oda havasında 10 dakika kurumaya bırakıldı. İki saatlik inkübasyon sonrasında steril besiyerinde bekleyen, üzerine karbapenemlere dirençli bakteri inoküle edilmiş olan diskler duyarlı *E. coli* suşu (ATCC 29522)'nun olduğu Mueller-Hinton agarına yerleştirildi. Besiyerinin merkezine kontrol amacıyla yeni bir meropenem diski yerleştirildi. 35°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında sCIM sonuçları değerlendirildi. Kontrol meropenem diski etrafında duyarlı olduğunu bildiğimiz *E. coli* kontrol suşu (ATCC 29522) tarafından bir inhibisyon zonu oluştu. Karbapeneme dirençli suşla inoküle edilen meropenem disklerinin etrafında inhibisyon zonunun <23 mm olması pozitif (karbapenemaz üretiminin göstergesi), >27 mm olması negatif olarak yorumlandı (6,7) (Resim 1).



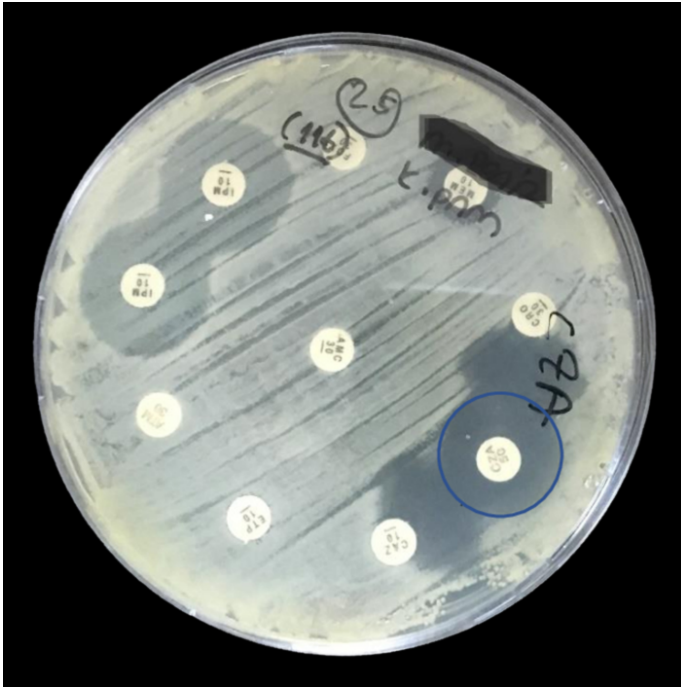
Resim 1. Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Testi.

Solda ortada kontrol meropenem diski çevresinde oluşan inhibisyon zonu ve karbapenemaz üretimi olan iki ayrı suşla yapılmış test (sCIM pozitif).

Sağda ortada kontrol meropenem diski çevresinde oluşan inhibisyon zonu; mavi ok ile gösterilen pozitif sCIM, kırmızı okun ucunda ise negatif sCIM.

Tablo 1. Araştırılan Karbapenemaz Genleri İçin Kullanılan Primerler

Karbapenem Genleri	Primerler
<i>bla</i> _{OXA-23}	F (5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3'), R (5'- ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3')
<i>bla</i> _{OXA-48}	F (5'- TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG-3'), R (5'- GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3')
<i>bla</i> _{OXA-51}	F (5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'), R (5'- TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3')
<i>bla</i> _{OXA-58}	F (5'- AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'), R (5'- CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3')
<i>bla</i> _{NDM-1}	(5'- GTA GTG CTC AGT GTC GGC AT-3'), R (5'- GGG CAG TCG CTT CCA ACG GT-3')
<i>bla</i> _{IMP}	F (5'- GGA ATA GAG TGG CTT AAT TCT C-3'), R (5'- CCA AAC CAC TAC GTT ATC-3')
<i>bla</i> _{VIM}	F (5'- GTG TTT GGT CGC ATA TCG C-3'), R (5'- CGC AGC ACC AGG ATA GAA G-3')
<i>bla</i> _{KPC}	F (5'- ATG TCA CTG TAT CGC CGT C-3'), R (5'- TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC-3')

**Resim 2.** *bla*_{OXA-48} Taşıyan *Klebsiella pneumoniae* Seftazidim-Avibaktam Disk Difüzyon Testi inhibisyon Zonu (>13mm; duyarlı)

Temosilin Direnç Testi, Seftazidim-Avibaktam Disk Difüzyon Testi

*bla*_{OXA-48} ve *bla*_{NDM} genlerinden birini veya her ikisini birden içeren suşları tanımlamak üzere; gradyan test (Etest; bioMerieux, Marcy l'Etoile, Fransa) yöntemiyle yüksek düzey temosilin direnci (minimum inhibitör konsantrasyon, MİK >128 µg/ml) (8,9) ve disk difüzyon testiyle seftazidim-avibaktam duyarlılığı veya direnci bakıldı. Seftazidim-avibaktam diski çevresinde inhibisyon zonu ≥13mm olması duyarlı, <13mm olması ise dirençli olarak değerlendirildi (5) (Resim 2).

Genotipik Testler

Karbapeneme dirençli bulunan izolatlarda, EURGen-NET protokolüne göre belirlenen, ülkemizde yaygın görülen karbapenemaz genleri (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{KPC}) RT-PCR yöntemiyle araştırıldı. Araştırılan karbapenemaz genleri için kullanılan primerler Tablo 1'de verildi (10).

BULGULAR

Disk difüzyon yöntemiyle karbapeneme dirençli olduğu belirlenen 16 suşun, 10'u *Enterobacterales* ailesi üyesi olup (*K. pneumoniae*, n=9; *E. Coli*, n=1), üçü *P. aeruginosa*, bir suş *A. baumannii*, bir suş *S. maltophilia*, bir suş *Achromobacter* spp. idi (Tablo 2). On altı suşun 12'sinde karbapenemaz geni saptandı; 11'inde sCIM, 10'unda MHT pozitif bulundu (duyarlılık sırasıyla %91.9 ve %83.3 idi) (Tablo 3). Karbapenemaz geni saptanan 12 suşun birinde sCIM ile, ikisinde MHT ile karbapenemaz gösterilemedi. Karbapenemaz geni saptanmayan dört suşun ise birinde sCIM pozitif bulunurken hiçbirinde MHT pozitif değildi (Tablo 2).

On *Enterobacterales* üyesinin hepsinde en az bir karbapenemaz geni belirlendi; yedisinde *bla*_{OXA-48}, birinde *bla*_{NDM} ve ikisinde de *bla*_{NDM} ve *bla*_{OXA-48} beraber bulunmaktaydı. Genotipik olarak karbapenemaz geni saptanan 10 *Enterobacterales* üyesi suşun hepsinde sCIM pozitif saptandı. *Achromobacter* spp. suşunda PCR ile *bla*_{OXA-48} saptandı ve sCIM pozitif bulundu. *Pseudomonas* spp. suşlarının (n=5) birinde *bla*_{OXA-48} saptandı ve bu suşta sCIM negatif (yanlış negatiflik). Genotipik olarak karbapenemaz geni saptanmayan *Pseudomonas* spp. suşunda sCIM negatifti. *Acinetobacter* spp. suşunda *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} veya *bla*_{KPC} genotipik yöntemlerle saptanamamış olup ve sCIM pozitifti. *Stenotrophomonas* spp. suşunda genotipik yöntemlerle karbapenemaz geni saptanmadı ve hem sCIM hem de MHT negatifti (Tablo 2).

Enterobacterales suşlarının hepsine yüksek düzey temosilin direnci bakılıp, seftazidim-avibaktamla disk difüzyon testi yapıldı; *bla*_{OXA-48} geni olan suşların hepsinde yüksek düzey temosilin direnci saptanırken (MİK >128 µg/ml), tek başına *bla*_{NDM} taşıyan suşta direnç gösterilmedi. Tek başına *bla*_{OXA-48} taşıyan suşlar seftazidim-avibaktama duyarlı bulunurken, tek başına *bla*_{NDM} taşıyan suş dirençliydi.

İRDELEME

Çalışma kapsamında, moleküler yöntemlerle karbapenemaz genleri tanımlanmış olan *Enterobacterales* türlerinin hepsinde sCIM yöntemiyle karbapenemaz üretimi olduğu gösterildi. Bu veri CIM testinin karbapenemaz varlığını göstermede rutin olarak kullanılabileceğini belirten Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Standards Institute - CLSI)'nin önerisini desteklemektedir (11). Literatürde de çalışmamıza benzer olarak karbapenemaz taşıdığı moleküler yöntemlerle belirlenmiş *Enterobacterales* suşlarında sCIM'in karbapenemaz varlığının gösterilmesinde kullanışlı olduğu gösterilmiştir (6,12). Bununla birlikte sCIM'in duyarlılığının modifiye CIM ile benzer ve laboratuvar rutin kullanım için uygun olduğu belirtilmiştir (6).

Karbapenem direnci, karbapenemaz üretimine ek olarak porin kaybı, efluks pompalarının aşırı üretimi gibi birçok başka mekanizmayla da ilişkili olabilir. Özellikle *P. aeruginosa*'da karbapenem direncinden esas olarak bu mekanizmalar sorumludur. Çalışmamızda yer alan *P. aeruginosa* suşlarında sCIM testi negatif bulundu. Bu sonuçlar eğer bir yalancı negatifliği gösteriyorsa nedeninin disk üzerine yerleştirilen inokulumun yetersiz olması ya da daha uzun süre inkübasyon gerektirmesi olabilir (12). Bir diğer açıklama ise fermenter olmayan Gram-negatif çomaklarda sCIM'in duyarlılığının, kullanılan kontrol suşunun (*E.coli* ATCC 29522) farklı konsantrasyonlarında değişmesi olabilir (6). Ayrıca CIM'in perfor-

Tablo 2. Gram-Negatif Çomak Suşlarının Test Sonuçları

No	Suşlar	sCIM	MHT	Seftazidim-Avibaktam Disk Difüzyon	Temosilin MİK (µg/ml)	Genotipik Test Sonucu
1	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Duyarlı	>1024	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{NDM}
2	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Dirençli	>256	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{NDM}
3	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Duyarlı	>1024	<i>bla</i> _{OXA-48}
4	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Dirençli	24	<i>bla</i> _{NDM}
5	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Duyarlı	>1024	<i>bla</i> _{OXA-48}
6	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Duyarlı	>1024	<i>bla</i> _{OXA-48}
7	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Duyarlı	>1024	<i>bla</i> _{OXA-48}
8	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Duyarlı	>1024	<i>bla</i> _{OXA-48}
9	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	Duyarlı	>1024	<i>bla</i> _{OXA-48}
10	<i>E. coli</i>	+	+	-	-	<i>bla</i> _{OXA-48}
11	<i>Achromobacter spp.</i>	+	-	-	-	<i>bla</i> _{OXA-48}
12	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	<i>bla</i> _{OXA-48}
13	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	Negatif
14	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	Negatif
15	<i>Acinetobacter spp.</i>	+	-	-	-	Negatif
16	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	Negatif

sCIM: Basitleştirilmiş karbapenem inaktivasyon metodu ("simplified carbapenem inactivation method"),

MHT: Modifiye Hodge testi, **MİK:** Minimum inhibitör konsantrasyonu.

Tablo 3. sCIM, MHT ve Genotipik Testlerinin RT-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

	RT-PCR (+) (n=12)	RT-PCR (-) (n=4)
sCIM		
sCIM (+)	11	1
sCIM (-)	1	3
Duyarlılık	%91.6	
Özgüllük	%75	
MHT		
MHT (+)	10	0
MHT (-)	2	4
Duyarlılık	%83.3	
Özgüllük	%100	

Duyarlılık=Söz konusu yöntemle belirlenmiş gerçek karbapenemaz üreticiler/ Karbapenemaz geni taşıyıcısı olanların toplamı x 100.

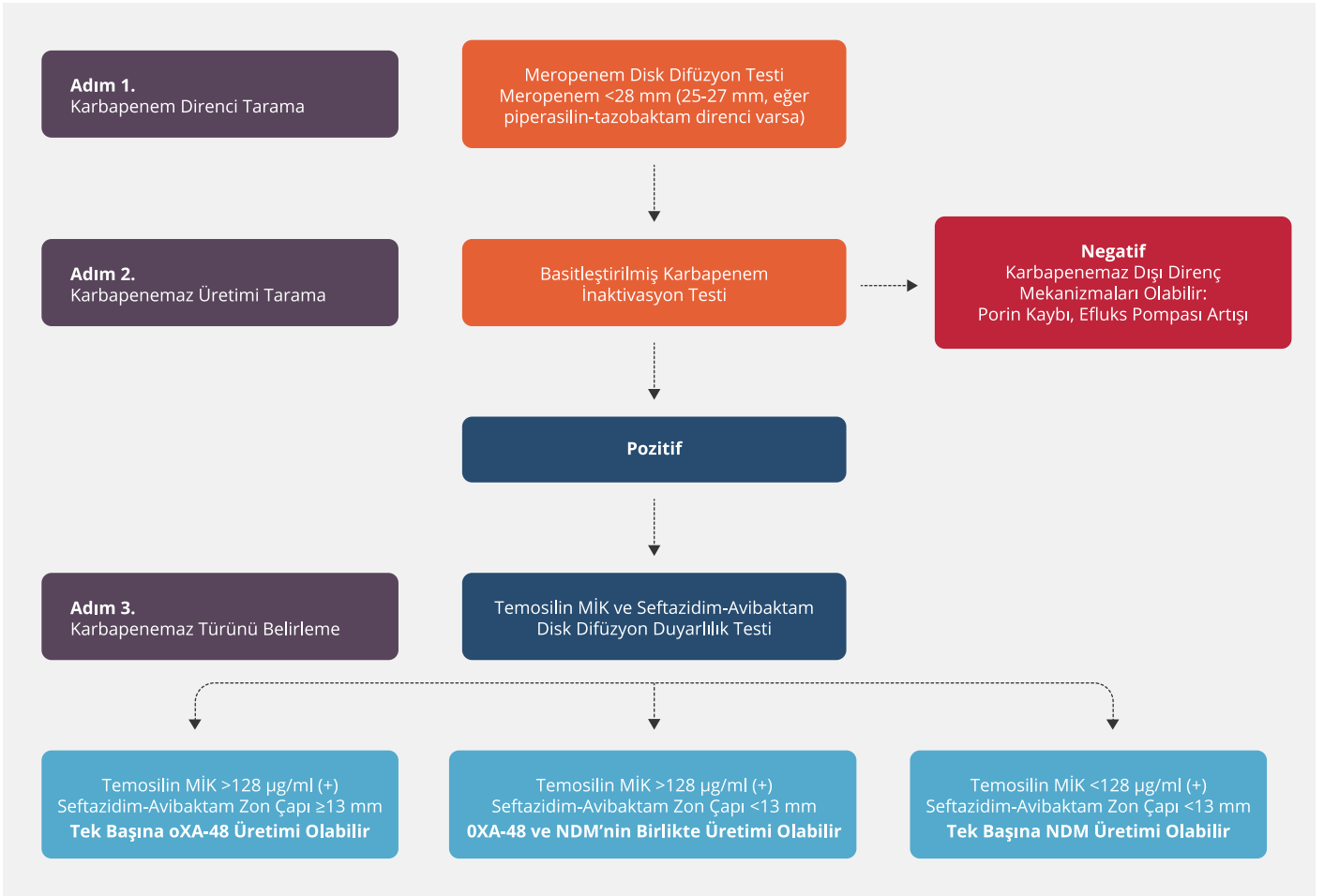
Özgüllük=Söz konusu yöntemle belirlenmiş gerçek karbapenemaz üretmeyenler/ Karbapenemaz geni taşımayanların toplamı x 100.

sCIM: Basitleştirilmiş karbapenem inaktivasyon metodu ("simplified carbapenem inactivation method"), **MHT:** Modifiye hodge testi, **RT-PCR:** "Real-time polymerase chain reaction".

mansı kullanılan karbapenem disk içeriğine göre değişiklik gösterebilir (7,13). Farklı karbapenem diskleriyle sCIM'in performansının değerlendirildiği bir çalışmada, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* için imipenemle yapılan test sonuçlarının daha iyi olduğu gösterilmiştir (7). Çalışmamızda genotipik testler fermenter olmayan suşların hepsinde yapılamadığından gözlemimiz bir suşla sınırlı kaldı. Bu nedenle, yukarıda bahsedilen modifikasyonların uygulanarak sCIM'in *P. aeruginosa*'daki performansının değerlendirildiği çalışmalar planlanabilir.

A. baumannii suşlarında karbapenem direncine yol açan ana karbapenemaz türü *bla*_{OXA-23} tür. Çalışmamızda yer alan *A. baumannii* suşunda *bla*_{OXA-48}, *bla*_{ONDM}, *bla*_{KPC} genleri belirlenememişken, sCIM testinin pozitif çıkması da sCIM testinin, moleküler yöntemlerde yer alamamış karbapenemazların varlığını göstermedeki başarısı olarak değerlendirilebilir.

Temosilin, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve Amp-C üreten *Enterobacteriales* türlerine etkinliği olan, yarı sentetik, beta-laktam grubundan bir antibiyotiktir. Ambler sınıf D tipi karbapenemaz taşıyan suşlarda karbapenemazı saptamaya yönelik iyi tanımlanmış bir fenotipik metot yoktur. Bu konuyla ilgili bugüne dek yapılan çalışmalarda, *bla*_{OXA-48} taşıyan suşlarda yüksek düzey temosilin direncinin (MİK>128 µg/ml, zon çapı ≤10 mm) olduğu, bu durumun doğrudan *bla*_{OXA-48} varlığına işaret etmesi de ek fenotipik yöntemlerle karbapenemaz türünü saptamaya yarayabileceği ve temosilin direncinin saptanması için disk difüzyon testinin de güvenilir olduğu gösterilmiştir (8-9,14-16). Biz de çalışmamızda tek başına *bla*_{OXA-48} taşıyan tüm suşlarda yüksek düzey temosilin direnci (MİK >1024 µg/ml) olduğunu gösterdik. Aynı suşlara seftazidim-avibaktam disk difüzyon testi uyguladığımızda tek başına *bla*_{OXA-48} taşıyan suşların duyarlı, tek başına *bla*_{NDM} taşıyan suşların ise dirençli olduğunu gördük. Çalışmamızda izole *bla*_{OXA-48} taşıyan suşların hepsinde temosi-



Şekil 1. Karbapeneme Dirençli *Enterobacteriales* Suşlarında Fenotipik Yöntemlerle Tarama İçin Algoritma

lin direncinin $>1024 \mu\text{g/ml}$ olması, direnç için bu yeni sınır değer tek başına kullanımının da $bla_{\text{OXA-48}}$ taşıyıcılığına dair fikir verebileceğini desteklemektedir. Seftazidim-avibaktam disk difüzyon ile inhibisyon ve yüksek düzey temosilin direncinin birlikte kullanımının $bla_{\text{OXA-48}}$ 'i öngördürebileceğini destekleyen verilerimizin farklı karbapenemaz türlerini ($bla_{\text{OXA-48}}$, bla_{KPC} , bla_{NDM}) taşıyan daha çok sayıda suşla değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç vardır (8) (Şekil 1).

Karbapenemaz varlığının araştırılmasında kullanılan modifiye karbapenem inaktivasyon metodu son güncel rehberlerde önerilen fenotipik yöntemler arasındadır (11). Çalışmamızda sCIM'in duyarlılığı %91.6 olup $bla_{\text{OXA-48}}$ taşıyan suşlarda ise %100 olarak tespit edildi. Çalışmamızın verileri, özellikle *Enterobacteriales* suşlarında sCIM'in duyarlılığının oldukça yüksek olduğunu, sCIM'in fenotipik testler arasında önemli bir alternatif olabileceğini destekledi.

Sonuç olarak; karbapenemaz üretiminin saptanması, hızlıca izolasyon önlemlerinin uygulanarak karbapenemaz üreten suşların yayılımına engel olmak için önemlidir. Uygulanması oldukça kolay, deneyim gerektirmeyen, ucuz fenotipik yöntemler özellikle kaynakları sınırlı laboratuvarlar için rutin kullanımda düşünülmelidir. sCIM'e ek olarak disk difüzyon yöntemiyle yüksek düzey temosilin direncinin saptanması ve seftazidim-avibaktam disk difüzyonuyla direncin gösterilmesi ülkemiz gibi $bla_{\text{OXA-48}}$ 'in yaygın olduğu ülkelerde karbapenemaz türünün oldukça düşük maliyetlerle saptanarak enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasını ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesini sağlayacaktır. Çalışmamızdaki verilerin daha fazla sayıda suşla ve testlerin performansını etkileyen faktörlerin değerlendirildiği çalışmalarla desteklenmesi gereklidir.

Etik Kurul Kararı

Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan karbapeneme dirençli Gram negatif çomak suşları ile çalışma yapıldığı için etik kurul onayı alınmıştır.

Danışman Değerlendirmesi

Bağımsız dış danışman.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram – S.Ş.Y.; Tasarım – S.Ş.Y., E.Y.; Denetleme – S.Ş.Y., H.E., E.Y., A.Ç., O.Ö., H.Ö.; Kaynak ve Fon Sağlama – S.Ş.Y., H.E., S.Y.S., E.Y.; Malzemeler/Hastalar – S.Ş.Y., E.Y., S.Y.S.; Veri Toplama ve/veya İşleme – E.Y., S.Y.S.; Analiz ve/veya Yorum – S.Ş.Y., E.Y., S.B., A.Ç., O.Ö., H.Ö.; Literatür Taraması – E.Y., S.Ş.Y., S.B.; Makale Yazımı – E.Y., S.Ş.Y.; Eleştirel İnceleme – S.Ş.Y., E.Y., S.B., A.Ç., O.Ö., H.Ö., H.E.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek

Yazarlar finansal destek beyan etmemiştir.

Sunulan Bilimsel Etkinlik

13-16 Mart 2019 tarihinde gerçekleştirilen 20. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. 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(45). Erratum in: *Euro Surveill.* 2015;20(49). Erratum in: *Euro Surveill.* 2016;21(38). [\[CrossRef\]](#)
2. Pierce VM, Simmer PJ, Lonsway DR, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2321-33. [\[CrossRef\]](#)
3. İñigo M, Del Pozo JL. Treatment of infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriales*. *Rev Esp Quimioter.* 2022;35(Suppl 3):46-50. [\[CrossRef\]](#)
4. Kara F, Çömçe M. [Internet]. Ankara: Ulusal Sağlık Hizmetiyle İlişkili Enfeksiyonlar Surveyans Ağı. Etken Dağılımı ve Antibiyotik Direnç Raporu 2021. [erişim 16 Ocak 2023]. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/bulasici-hastaliklar-ve-erken-uyari-db/Dokumanlar/Raporlar/ETKEN_DAGILIM_VE_DIRENC_2020.pdf
5. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0, July 2017 [Internet]. Vaxjö: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). [erişim 10 Ocak 2023]. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
6. Jing X, Zhou H, Min X, et al. The Simplified carbapenem inactivation method (sCIM) for simple and accurate detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Front Microbiol.* 2018;9:2391. [\[CrossRef\]](#)
7. Wang Y, Liu H, Zhang L, Sun B. Application of modified carbapenem inactivation method and its derivative tests for the detection of carbapenemase-producing *Aeromonas*. *Infect Drug Resist.* 2021;14:3949-60. [\[CrossRef\]](#)
8. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(5):E230-2. [\[CrossRef\]](#)
9. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(2):168-72. [\[CrossRef\]](#)
10. Süzük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, et al; Ulusal Karbapenemaz Sürveyans Çalışma Grubu. [The epidemiology of carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in 2019 in Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* 2021;55(1):1-16. Turkish. [\[CrossRef\]](#)
11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33rd Edition. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
12. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123690. [\[CrossRef\]](#)
13. Davarcı İ, Koçoğlu ME, Zengin F. [Comparison of carbapenem inactivation test and modified Hodge test in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains]. *Klimik Derg.* 2018;31(3):223-6. Turkish. [\[CrossRef\]](#)
14. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(4):345-9. [\[CrossRef\]](#)
15. Aguirre-Quinonero A, Cano ME, Gamal D, Calvo J, Martínez-Martínez L. Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) for detecting carbapenemase activity in enterobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;88(3):214-8. [\[CrossRef\]](#)
16. Özmen C, Şimşek-Yavuz S, Başaran S, Çağatay A, Özsüt H, Eraksoy H. [Comparison of classical methods and chromogen media for detection of stool colonisation by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*]. *Klimik Derg.* 2022;35(3):171-8. Turkish. [\[CrossRef\]](#)