

Enterobacteriaceae İzolatlarında Karbapenemazların Saptanmasında Modifiye Hodge Testi ve Carba NP Testlerinin Karşılaştırılması*

Comparison of the Modified Hodge Test and the Carba NP Test for Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae* Isolates

Gülçin BAYRAMOĞLU¹, Gülşen ULUÇAM¹, Çiğdem GENÇOĞLU ÖZGÜR², Ali Osman KILIÇ¹, Faruk AYDIN¹

¹ Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

¹ Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

² Ahi Evren Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Trabzon.

² Ahi Evren Chest and Cardiovascular Surgery Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Trabzon, Turkey.

* Bu çalışma, 3. Ulusal KLİMİK Kongresi (18-22 Kasım 2015, Antalya)'nde sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 23.08.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 27.12.2015

ÖZ

Enfeksiyonların uygun olarak tedavi edilebilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanabilmesi için karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının hızlı, pratik ve doğru bir şekilde tanımlanması çok önemlidir. Bu amaçla çok sayıda fenotipik test yöntemi geliştirilmiş olmasına rağmen, hiçbirisi %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahip değildir. Testlerin duyarlılık ve özgüllüğü, çalışılan izolatların taşıdığı beta-laktamaz enzim tiplerine göre değiştiğinden, ülkeler ve bölgeler arasında farklılıklar görülebilmektedir. Bu çalışmada, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde karbapenemazların saptanmasında yaygın olarak kullanılan modifiye Hodge testi (MHT) ve "Karbapenemase Nordmann Poirer (Carba NP)" testlerinin performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve en az bir karbapenemaz (ertapenem, imipenem veya meropenem) azalmış duyarlılık gösteren ve karbapenemaz geni taşıdığı önceden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanan 65 *Enterobacteriaceae* izolatı (43 *bla*_{OXA-48}, 10 *bla*_{VIM}, 9 *bla*_{IMP}, 1 *bla*_{NDM-1}, 1 *bla*_{KPC-2} ve 1 *bla*_{OXA-48}+*bla*_{VIM} taşıyan suş) dahil edilmiştir. Karbapenemaz geni saptanmayan fakat karbapenemlere azalmış duyarlılık gösteren kontrol grubu olarak 78 izolat kullanılmıştır. Tüm izolatlar konvansiyonel yöntemlere ilaveten BD Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile tanımlanmıştır. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları, BD Phoenix otomatize sistemi ile saptanmış ve disk difüzyon yöntemi ile doğrulanmıştır. Sonuçlar CLSI kriterlerine

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Gülçin Bayramoğlu, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 61080, Trabzon, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 462 377 5653, **E-posta (E-mail):** gulcinbay@hotmail.com

göre yorumlanmıştır. MHT, CLSI'nin önerileri doğrultusunda yapılmış; Carba NP testi, modifiye protokole göre uygulanmıştır. Orijinal protokolde kullanılan imipenem monohidrat yerine, modifiye protokolde bildirildiği gibi, 6 mg/ml imipenem/silastatin kullanılmıştır. Çalışmamızda, MHT ile karbapenemaz üreten izolatların %90.8'i (59/65), Carba NP testi ile %93.9'u (61/65) tanımlanmıştır. MHT ile OXA-48 üreten dört *Klebsiella pneumoniae*, IMP üreten bir *Escherichia coli* ve NDM-1 üreten bir *K.pneumoniae*; Carba NP testi ile OXA-48 üreten bir *E.coli* ve bir *K.pneumoniae*, IMP üreten bir *E.coli* ve VIM üreten bir *Enterobacter cloacae* saptanamamıştır. Carba NP testinde, OXA-48 üreten üç izolatta (iki *K.pneumoniae* ve bir *E.coli*) geç ve zayıf pozitiflik görülmüştür. MHT ile 31 izolatta yalancı pozitiflik saptanırken, Carba NP testi ile yalancı pozitiflik saptanamamıştır. İki testin duyarlılık ve özgüllüğü karşılaştırıldığında; Carba NP'nin MHT'den biraz daha yüksek olmakla birlikte, duyarlılıkları benzer (%93.9'a karşı %90.8; $p = 0.754$) bulunmuş, ancak Carba NP testinin daha özgül (%100'e karşı %60.3; $p < 0.0001$) olduğu belirlenmiştir. Carba NP testi ile izolatların %26'sında ($n = 16$) 15 dakikada, %85'inde ($n = 52$) ise ilk bir saat içinde pozitif sonuç alınmıştır. Sonuç olarak, Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemaz varlığının saptanmasında, Carba NP testinin MHT'e göre duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğu ve kısa sürede sonuç verdiği saptanmıştır. Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemaz varlığının doğrulanmasında MHT'nin tek başına kullanılmaması önerilmektedir. Diğer taraftan Carba NP testi bu amaçla kullanılabilir, ancak şüpheli negatif sonuçların moleküler yöntemlerle araştırılması gereği göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar sözcükler: Enterobacteriaceae, karbapenemaz; modifiye Hodge testi; Carba NP testi.

ABSTRACT

A rapid, practical, and accurate identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates is crucial for the implementation of appropriate infection control measures and proper treatment of the infections. For this purpose, a large number of phenotypic test methods have been developed, although none has 100% sensitivity and specificity. Variations in sensitivity and specificity of these tests based on the type of beta-lactamase enzymes carried by that isolates might result in differences between regions and countries. The aim of this study was to compare the performances of widely used modified Hodge test (MHT) and Carbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP) test in the detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae family members. A total of 65 Enterobacteriaceae isolates (43 *bla*_{OXA-48}, 10 *bla*_{VIM}, 9 *bla*_{IMP}, 1 *bla*_{NDM-1}, 1 *bla*_{KPC-2} and 1 *bla*_{OXA-48}+*bla*_{VIM} carrying strains) that showed decreased sensitivity to at least one carbapenem (ertapenem, imipenem or meropenem), and carriage of carbapenemase gene confirmed by polymerase chain reaction (PCR), were included in the study. Seventy-eight isolates showing decreased susceptibility to carbapenems but lacking carbapenemase genes were used as controls. All isolates were identified by using conventional methods as well as automated BD Phoenix System (Becton Dickinson, USA). The antimicrobial susceptibility testing was performed using the same automated system, and was confirmed by disk diffusion method. Results were evaluated according to the CLSI criteria. MHT was performed in accordance with the CLSI guideline, and Carba NP test was carried out by a modified protocol. Instead of imipenem monohydrate, which was used in the original protocol, 6 mg/ml imipenem/cilastatin was used in the modified protocol. In the study, MHT identified 90.8% (59/65) of carbapenemase-producing isolates, while 93.9% (61/65) of the isolates were identified by Carba NP test. With MHT, four *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48, one *Escherichia coli* producing IMP, and one *K.pneumoniae* producing NDM-1, and with Carba NP test, one *E.coli* and one *K.pneumoniae* producing OXA-48, one *E.coli* producing IMP, and one *Enterobacter cloacae* producing VIM could not be detected. Three OXA-48-producing isolates (two *K.pneumoniae* and one *E.coli*) yielded late and weak positive results with Carba NP test. MHT had false positivity for 31 isolates, while Carba NP test showed no false positivity. In comparison of the sensitivity and specificity of the two tests, sensitivities were found to be similar although the Carba NP has a slightly higher sensitivity than the MHT (93.9% versus 90.8%, respectively; $p = 0.754$), Carba NP was found more specific (100% versus 60.3%, respectively; $p < 0.0001$). With Carba NP test, 26% of the isolates ($n = 16$) were positive within 15 minutes, and 85% ($n = 52$) were positive within the first hour. It was concluded that, Carba NP test showed high sensitivity and specificity than the MHT and the results can be obtained more rapidly for the presence of carbapenemases in Enterobacteriaceae. The use of MHT alone is not recommended to confirm the

presence of carbapenemases produced by *Enterobacteriaceae*. On the other hand Carba NP test can be used for this purpose, however molecular analysis should be considered for suspicious negative results.

Keywords: *Enterobacteriaceae*; carbapenemase, modified Hodge test, Carba NP test.

GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri, özellikle de *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*, ciddi hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenleri arasında yer almaktadır^{1,2}. Karbapenemler, çoğul dirençli izolatların tedavisinde son sıra antibiyotikler olarak büyük bir öneme sahiptir; ancak özellikle son 10 yılda karbapenemlere dirençli izolatlarda da büyük bir artış görülmektedir³. Karbapenemlere dirençli izolatların neden olduğu enfeksiyonlar da, tedavi seçenekleri kısıtlı ve mortalite oranları yüksek olduğundan büyük bir sorun oluşturmaktadır^{2,3}. Karbapenemaz enzimleri, tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize etme yeteneğine sahip en güçlü beta-laktamazlar olup, yayılma potansiyeli taşıdıklarından, karbapenem direncinin nedenleri arasında en önemlisidir⁴. Plazmidler gibi mobil elemanlarla aktarılma, karbapenemazların bakteriler arasında kolaylıkla yayılmasına ve karbapenemaz bulunan bakterilerde sıklıkla beta-laktam dışındaki antibiyotiklere karşı da dirence neden olmaktadır^{2,3,5}. Bu enzimler, KPC enzimleri gibi sınıf A karbapenemazları, VIM, IMP, NDM gibi sınıf B veya metallo-beta-laktamazları ve OXA-48 benzeri sınıf D oksasilinazları içermektedir¹⁻⁶. OXA-48 oksasilinazlar Türkiye’de endemik olarak bulunmakta, VIM ve IMP gibi metallo-beta-laktamazlar ise az da olsa bildirilmektedir⁶.

Enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanabilmesi ve enfeksiyonların uygun bir şekilde tedavisi için, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin pratik, hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması çok önemlidir³⁻⁵. Günümüzde karbapenemazların saptanması için çok sayıda fenotipik test yöntemi geliştirilmiş olmasına rağmen, hiçbirisi %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahip değildir⁴. Testlerin duyarlılık ve özgüllüğü, çalışılan izolatların taşıdığı beta-laktamaz enzim tiplerine göre değiştiğinden, ülkeler ve bölgeler arasında farklılıklar görülebilmektedir. Fenotipik testler arasında yer alan modifiye Hodge testi (MHT), *Enterobacteriaceae*’de karbapenemaz üretiminin doğrulanması için “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” tarafından önerilen ve yıllardır yaygın olarak kullanılan bir testtir⁷. “Karbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP)” testi ise, “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” tarafından önerilen ve 2015 yılında CLSI tarafından da önerilmeye başlayan yeni bir testtir^{8,9}. Bu çalışmada, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde karbapenemazların saptanmasında MHT ve Carba NP testlerinin performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik İzolatlar

Çalışmada, en az bir karbapenem (Ertapenem, imipenem veya meropenem) azalmış duyarlılık gösteren *Enterobacteriaceae* izolatları kullanıldı. 2008-2014 tarihleri arasında hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarında farklı hastalara ait kan, beyin omurilik

sıvısı (BOS), idrar, trakeal aspirat, balgam, yara, periton ve plevral sıvı gibi çeşitli klinik örneklerden izole edilen 63 ve diğer merkezlerden alınan bir NDM-1 ve bir KPC-2 üreten *K.pneumoniae* olmak üzere, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile bla_{KPC} , bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{NDM} ve bla_{OXA-48} genlerinin varlığı¹⁰⁻¹⁴ doğrulanarak toplam 65 karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatı çalışmaya dahil edildi. Çalışma izolatlarının %66.2'sinde bla_{OXA-48} (14 *E.coli*, 21 *K.pneumoniae*, 3 *Klebsiella oxytoca*, 4 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter aerogenes*), %15.4'ünde bla_{VIM} (5 *E.cloacae*, 1 *E.aerogenes*, 2 *K.pneumoniae*, 2 *K.oxytoca*), %13.9'unda bla_{IMP} (2 *E.coli*, 2 *E.cloacae*, 3 *K.pneumoniae*, 2 *K.oxytoca*), %1.5'inde bla_{NDM-1} (1 *K.pneumoniae*), %1.5'inde bla_{KPC-2} (1 *K.pneumoniae*) ve %1.5'inde bla_{OXA-48} 'e ilaveten bla_{VIM} (1 *E.cloacae*) pozitifliği. Çalışmada karbapenemaz geni saptanmayan fakat karbapenemlere orta duyarlı/dirençli saptanan kontrol grubu olarak 32 *Enterobacter* spp. izolatı (21 *E.cloacae*, 11 *E.aerogenes*), kombine disk yöntemi⁷ ile saptanmış 32 genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten izolat (23 *E.coli*, 9 *K.pneumoniae*), sefoksitin-kloksasilin kombine disk testi¹⁵ ile saptanmış 4 AmpC üreten izolat (3 *E.coli*, 1 *K.pneumoniae*) ve 10 GSBL ile AmpC saptanmayan izolat (8 *E.coli* ve 2 *K.pneumoniae*) olmak üzere toplam 78 izolat kullanıldı. Tüm izolatlar konvansiyonel yöntemlere ilaveten Phoenix otomatize mikrobiyoloji sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile tanımlandı. Antimikrobiyal duyarlılıkları, BD Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile saptandı ve disk difüzyon yöntemi ile doğrulandı. Sonuçlar CLSI kriterlerine göre yorumlandı⁷.

Modifiye Hodge Testi (MHT)

MHT, CLSI'nin önerileri doğrultusunda uygulandı⁷. İndikatör mikroorganizma olarak kullanılan *E.coli* ATCC 25922 suşundan 0.5 McFarland standart süspansiyonu hazırlandı ve serum fizyolojik ile 1/10 sulandırıldı. Mueller-Hinton II agar (BBL/Becton Dickinson, Fransa) plağının yüzeyine rutin disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekildi. Plakların merkezine ertapenem (10 µg) diski yerleştirildi. Kalite kontrol ve test suşları, bu diskin dört bir kenarından dışarıya doğru çizgi şeklinde öze ile ekildi. 35 ± 2°C'de 16-20 saatlik inkübasyondan sonra kalite kontrol veya test bakterisinin ekim çizgisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üremede artış pozitif sonuç olarak değerlendirildi. *K.pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC pozitif) pozitif, *K.pneumoniae* ATCC BAA-1706 (KPC negatif) negatif kontrol olarak kullanıldı.

Carba NP Testi

Carba NP testi, orjinal protokolde¹⁶ küçük değişiklikler yapılarak uygulandı. Mueller-Hinton agarda (BBL/Becton Dickinson, Fransa) 24 saatlik inkübasyondan sonra üreten izolatlardan 10 µL'lik bir öze dolusu alınarak, 20 mmol/L Tris-HCl lizis tamponunun (B-PERII, Bacterial Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific Pierce, ABD), 100 µL'sinde süspanse edilerek 1 dakika vortekslenildi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Bakteriyel süspansiyon 10.000xg'de 5 dakika oda ısısında santrifüj edildi. Her izolatın 30'ar µL supernatant 96 kuyucuklu mikropleytin iki kuyucuğuna koyuldu. İlk kuyucuk negatif kontrol olarak kullanıldı ve 0.1 mmol/L ZnSO₄ (Fluka, Almanya) içeren 100 µL fenol kırmızısı (pH 7.8) çözeltisi içeriyordu. İkinci kuyucukta 6 mg/mL imipenem/silastatin, 0.1 mmol/L ZnSO₄ (Fluka, Almanya) içeren 100 µL fenol kırmızısı (pH 7.8) çözeltisi

bulunuyordu. Fenol kırmızısı çözeltisi; %0.5 (ağırlık/hacim) fenol kırmızısı çözeltisinin (Sigma, ABD) 2 mL'si 16.6 mL distile suya karıştırılarak hazırlandı ve 1N NaOH ile pH'sı 7.8'e ayarlandı. Orijinal protokolde¹⁶ kullanılan imipenem monohidrat yerine modifiye protokolde¹⁷⁻¹⁹ bildirildiği gibi, 6 mg/mL imipenem/silastatin (Tienam, MSD) kullanıldı. Plaklar 37°C'de 2 saat inkübe edilerek, 15 dakikada bir değerlendirildi ve kırmızıdan sarıya renk değişimi pozitif sonuç olarak yorumlandı. *K.pneumoniae* ATCC BAA-1705 ve *K.pneumoniae* BAA-1706, sırasıyla pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Uyumsuz sonuçlar üç kez tekrarlandı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel hesaplamaları SPSS 13.0 programı kullanılarak yapıldı. İki testin duyarlılık ve özgüllüğü McNemar testi kullanılarak karşılaştırıldı. Hesaplamalarda $p \leq 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Testlerin Performansı

MHT ve Carba NP testleri ile pozitif ve negatif saptanan *Enterobacteriaceae* izolatlarının karbapenemaz enzimi varlığına göre dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir. MHT ile karbapenemaz üreten 65 izolatın 59'u (%90.8), Carba NP testi ile 65 izolatın 61'i (93.9) saptanmıştır. MHT ile 31 izolatta yalancı pozitiflik saptanırken, Carba NP testi ile yalancı pozitiflik tespit edilmemiştir. MHT ve Carba NP testlerinin pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; %65.6, %88.7 ve %100, %95.1 olarak hesaplanmıştır. MHT ile; OXA-48 üreten 4 *K.pneumoniae*, IMP üreten 1 *E.coli* ve NDM-1 üreten 1 *K.pneumoniae*; Carba NP testi ile OXA-48 üreten 2 izolat (1 *E.coli*, 1 *K.pneumoniae*), IMP üreten 1 *E.coli* ve VIM üreten 1 *E.cloacae* saptanamamıştır. Carba NP testinde, OXA-48 üreten 3 izolatta (2 *K.pneumoniae* ve 1 *E.coli*) geç ve zayıf pozitiflik (turuncu) görülmüştür. İki testin duyarlılık ve özgüllüğü karşılaştırıldığında; Carba NP'nin MHT'den biraz daha yüksek olmakla birlikte, duyarlılıkları benzer (%93.9'a karşı %90.8; $p = 0.754$), ancak Carba NP'nin daha özgül (%100 karşı %60.3; $p < 0.0001$) olduğu bulunmuştur.

Testlerin Pozitiflik Süresi

Modifiye Hodge testi 16-20 saatte sonuçlanmış; Carba NP testinin pozitif saptanma süresi ise Tablo II'de gösterilmiştir. Carba NP testi ile pozitif kontrol suş olan *K.pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC pozitif)'de ilk 15 dakikada pozitif sonuç alınmıştır. Test izolatlarının ise %26.2'sinde (16/61) 15 dakikada, %85.2'sinde (52/61) 60 dakikada pozitif sonuç elde edilmiştir. Enzim tipine göre süre belirlendiğinde; OXA-48 üreten izolatların %4.9'unda (2/41) 15 dakikada, %85.4'ünde (35/41) 60 dakikada; VIM üreten izolatların %66.7'sinde (6/9) 15 dakikada, %88.9'unda (8/9) 60 dakikada; IMP üreten izolatların %75'inde (6/8) 15 dakikada, %87.5'inde (7/8) 60 dakikada test pozitif sonuç vermiştir.

TARTIŞMA

Karbapenemaz genlerinin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olmakla birlikte, her laboratuvarında uygulanamaması, maliyetinin yüksek olması ve yeni karbapenemaz genlerinin saptanamaması gibi nedenlerden dolayı fenotipik yöntemler geliş-

Tablo 1. MHT ve Carba NP Testleri ile Pozitif ve Negatif Saptanan Enterobacteriaceae İzolatlarının Karbapenemaz Enzimi Varlığına Göre Dağılımı

Karbapenemaz (n)		Bakteri türü (n)	Pozitif bulunan suş sayısı (%)	
			MHT ile	Carba NP ile
Pozitif (65)	OXA-48	<i>E.coli</i> (14)	14 (100)	13 (92.9)
		<i>K.pneumoniae</i> (21)	17 (80.9)	20 (95.2)
		<i>K.oxytoca</i> (3)	3 (100)	3 (100)
		<i>E.cloacae</i> (4)	4 (100)	4 (100)
		<i>E.aerogenes</i> (1)	1 (100)	1 (100)
		Toplam (43)	39 (90.7)	41 (95.3)
	VIM	<i>K.pneumoniae</i> (2)	2 (100)	2 (100)
		<i>K.oxytoca</i> (2)	2 (100)	2 (100)
		<i>E.cloacae</i> (6)	6 (100)	5 (83.3)
		Toplam (10)	10 (100)	9 (90)
	IMP	<i>E.coli</i> (2)	1 (50)	1 (50)
		<i>K.pneumoniae</i> (3)	3 (100)	3 (100)
		<i>K.oxytoca</i> (2)	2 (100)	2 (100)
		<i>E.cloacae</i> (2)	2 (100)	2 (100)
		Toplam (9)	8 (88.9)	8 (88.9)
	NDM-1	<i>K.pneumoniae</i> (1)	0	1 (100)
	KPC-2	<i>K.pneumoniae</i> (1)	1 (100)	1 (100)
	OXA - 48 + VIM	<i>E.cloacae</i> (1)	1 (100)	1 (100)
Negatif (78)		<i>E.coli</i> (34)	6 (17.6)	0
		<i>K.pneumoniae</i> (12)	4 (33.3)	0
		<i>E.cloacae</i> (21)	15 (71.4)	0
		<i>E.aerogenes</i> (11)	6 (54.5)	0
		Toplam (78)	31 (39.7)	0
		Genel toplam (143)	90 (62.9)	61 (42.7)
MHT: Modifiye Hodge testi.				

MHT: Modifiye Hodge testi.

tırılmıştır²⁰⁻²². Karbapenemazların fenotipik yöntemler ile saptanması ise; enzimin tipi-ne, karbapenemaz enzimi bulunan bakteri türüne, enzimi kodlayan genin ekspresyon düzeyine, karbapenemazlar dışında geçirgenlik azalması ve/veya atım pompası ve/veya AmpC ve GSBL'ler gibi diğer direnç mekanizmalarının varlığına bağlı olarak değiştiğinden oldukça zordur^{3,5}.

Bu çalışmada, fenotipik yöntemlerden MHT ve Carba NP testi, doğruluk ve hızlı sonuç verme açısından analiz edilmiştir. MHT, karbapenemaz üreten bakteri ile ertapenem gibi bir karbapenemin inaktivasyonuna dayanmaktadır. Çalışmamızda, MHT'nin duyarlılığı %90.8, özgüllüğü %60.3 olarak bulunmuştur. Van Dijk ve arkadaşları²³ da, çalışmamızla uyumlu olarak, MHT'nin duyarlılığının %99 gibi yüksek, özgüllüğünün %59 gibi düşük olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, bu yöntemin duyarlılığı %58-99 ve özgüllüğü %38.9-100 arasında büyük değişkenlik göstermekte; çalışılan izolatların taşıdığı karbapenemaz tipi duyarlılığı, karbapenemazlar dışında mekanizmaların varlığı ise özgüllüğü belirgin ölçüde etkilemektedir^{1,17,20,22-24}. Genel olarak MHT ile KPC ve OXA

Tablo II. Carba NP Testinin Pozitif Saptanma Süresi

Karbapenemaz (n)	Bakteri türü (n)	Süre (Dakika)					
		15	30	45	60	75	120
OXA-48 (41)	<i>E.coli</i> (13)	1	2	6	2	1	1
	<i>K.pneumoniae</i> (20)	1	6	5	4		4
	<i>K.oxytoca</i> (3)			3			
	<i>E.cloacae</i> (4)			2	2		
	<i>E.aerogenes</i> (1)			1			
	Toplam (41)	2	8	17	8	1	5
OXA-48 + VIM (1)	<i>E.cloacae</i> (1)					1	
VIM (9)	<i>K.pneumoniae</i> (2)	2					
	<i>K.oxytoca</i> (2)	1				1	
	<i>E.cloacae</i> (5)	3		1	1		
	Toplam (9)	6		1	1	1	
IMP (8)	<i>E.coli</i> (1)						1
	<i>K.pneumoniae</i> (3)	2			1		
	<i>K.oxytoca</i> (2)	2					
	<i>E.cloacae</i> (2)	2					
	Toplam (8)	6			1		1
NDM-1 (1)	<i>K.pneumoniae</i> (1)	1					
KPC-2 (1)	<i>K.pneumoniae</i> (1)	1					
Genel toplam (61)		16	8	18	10	3	6

tipi enzimlerin daha iyi saptandığı, metallo-beta-laktamazların saptanmasının zayıf olduğu bildirilmektedir^{1,4,20,22}. Ancak çalışmamızda, MHT ile dört OXA-48 (*K.pneumoniae*), bir NDM-1 (*K.pneumoniae*) ve bir IMP (*E.coli*) saptanamamıştır. Girlich ve arkadaşları²², NDM-1 üreten izolatlarda MHT'nin duyarlılığının %50'ye kadar düştüğünü, besiyerine ZnSO4 ilavesiyle %85.7'ye yükseldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, izolatların çoğunu (%66.2) OXA-48 üreten suşların oluşturması, OXA-48 üreten izolatların saptanmasındaki sorunların daha belirgin olarak görülmesine neden olmuş olabilir. MHT testinde en önemli sorun, yalancı pozitiflik oranının yüksek olmasıdır. Çalışmamızda testin özgüllüğü %60.3 gibi düşük bir oranda bulunmuştur. GSBL (özellikle CTX-M tipi) veya AmpC beta-laktamazların azalmış geçirgenlik ile birlikteliğinin, MHT'de yalancı pozitifliklere neden olabildiği bildirilmiştir^{3,5,20-23,25}. Ülkemizde GSBL enzimleri yaygın olup, en sık CTX-M tipi enzimler saptanmaktadır²⁶. MHT ile yüksek oranda yalancı pozitif sonuçlar elde edilmesi ve özgüllüğünün düşük bulunması, ülkemizde CTX-M tipi enzimlerin yüksek oranda görülmesi ve çalışmamızda da GSBL pozitif izolatların kullanılması ile ilişkili olabilir. Yapılması kolay bir test olmasına rağmen en az 16 saat sonra sonuç vermesi, testin diğer bir dezavantajı olarak görülmektedir.

Carba NP testi ise, imipenemin karbapenemaz enzimi ile hidrolizi sonucunda pH'nın düşmesine ve indikatör olarak bulunan fenol kırmızısının sarı-portakal rengine renk değiştiğine dayanan basit bir biyokimyasal testtir^{16,27}. Çalışmamızda, Carba NP testinin

duyarlılığı %93.9 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Yusuf ve arkadaşları¹⁸ çalışmamızla benzer şekilde, Carba NP testinin duyarlılığını %91.1 ve özgülüğünü %100 olarak bildirmişlerdir. Diğer çalışmalarda da, *Enterobacteriaceae* üyelerinde testin özgüllüğü %100 bulunmakla birlikte, duyarlılığı %72.5-100 arasında değişmektedir^{16,17,19,27}. Çalışmamızda, iki OXA-48 (bir *K.pneumoniae*, bir *E.coli*), bir IMP (*E.coli*) ve bir VIM (*E.cloacae*) saptanamamıştır. Üç OXA-48 üreten izolatla da geç ve zayıf pozitiflik görülmüştür. Tijet ve arkadaşları²⁸ da çalışmamızla uyumlu olarak, Carba NP testinin OXA-48 üreten izolatları saptamasının daha zayıf olduğunu bildirmişlerdir. Carba NP testinin duyarlılığını, bazı çalışmalarda^{16,17,27} bildirildiği gibi %100'lere varan oranda yüksek bulamamamız, muhtemelen çalışma izolatlarının çoğunu (%66.2) OXA-48 üreten suşların oluşturmasıdır. Bu durum, aslında Türkiye'de mevcut direnç paternini yansıtmaktadır⁶.

Carba NP testi ile izolatların %26.2'sinde 15 dakikada, %85.2'sinde 60 dakikada pozitif sonuç alınmıştır. Bu süre; OXA-48 üreten 41 izolatın %4.9'unda 15 dakika, %85.4'ünde 60 dakika; VIM üreten dokuz izolatın %66.7'sinde 15 dakika, %88.9'unda 60 dakika; IMP üreten sekiz izolatın %75'inde 15 dakika, %87.5'inde 60 dakika bulunmuştur. Vasoo ve arkadaşları¹⁷, çalışma izolatlarının %93.9'unda 15 dakikada, %98.5'unda 60 dakikada pozitif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların çalışmasında, izolatların çoğu (%90.8) KPC üreten suşlardan oluşmakta olup, OXA-48 üreten izolat sayısı çok düşüktür (%0.8)¹⁷. Yusuf ve arkadaşları¹⁸, KPC üreten 25 izolatın %96'sının 30 dakikada, OXA-48 üreten 10 izolatın %50'sinin 30 dakikada, %80'nin 60 dakikada pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre, Carba NP testi ile OXA-48 üreten izolatlarda, KPC ve metallo-beta-laktamaz üreten izolatlara göre daha geç pozitif sonuç alındığı söylenebilir.

Sonuç olarak, MHT'nin duyarlılığı Carba NP testinden daha düşük olup, özgüllüğü yetersiz bulunmuştur ve geç sonuç alınmaktadır. MHT, tarama amaçlı uygulansa da, doğrulama testi olarak kullanılmaması ve yalnızca bu teste göre sonuç verilmemesi önerilmektedir. Carba NP testinin kısa sürede sonuç vermesi önemli bir avantaj sağlamaktadır ve çalışmamızda OXA-48 karbapenemazlarda diğer karbapenemazlara göre daha geç sonuç verdiği saptanmıştır. Carba NP testi, süre avantajına ilaveten duyarlılık ve özgülüğünün de daha yüksek olmasıyla klinik laboratuvarlarda *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenemaz varlığının doğrulanması için kullanılabilir. Ancak Carba NP testi ile de OXA-48 gibi bazı karbapenemazların varlığı saptanamayabileceğinden, şüpheli negatif sonuçların moleküler yöntemler ile araştırılması gereği göz önünde bulundurulmalıdır.

TEŞEKKÜR

Pozitif kontrol suşları için, Prof. Dr. Lutz von Müller (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene), Prof. Dr. Duygu Perçin Renders (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi) ve Doç. Dr. Cemal Sandallı'ya (Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji), istatistiksel analiz konusundaki desteği için Prof. Dr. Gamze Çan'a (Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Doyle D, Peirano G, Lascos C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. Clin Microbiol 2012; 50(12):3877-80.
2. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev 2012; 25(4): 682-707.
3. Voulgari E, Poulou A, Koumaki V, Tsakris A. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? Future Microbiol 2013; 8(1): 27-39.
4. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect 2012; 18(5): 432-8.
5. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA; Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Int J Antimicrob Agents 2010; 36(3):205-10.
6. Canton R, Akova M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect 2012; 18(5): 413-31.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement. CLSI Document M100-S23, 2013. CLSI, Wayne, PA.
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms, v 1.0. Available at: http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-five Informational Supplement. CLSI Document M100-S25, 2015. CLSI, Wayne, PA.
10. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, et al. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the *Enterobacteriaceae* family. J Clin Microbiol 2009; 47(10):3261-5.
11. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 544-7.
12. Biendo M, Canarelli B, Thomas D, et al. Successive emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. J Clin Microbiol 2008; 46(3): 1037-44.
13. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of *bla*NDM-1-positive *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(11): 5403-7.
14. Poirel L, Heritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 15-22.
15. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(1): 146-9.
16. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis 2012; 18(9): 1503-7.
17. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 2013; 51(9): 3097-101.
18. Yusuf E, Van Der Meeren S, Schallier A, Piérard D. Comparison of the Carba NP test with the Rapid CARB Screen Kit for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33(12): 2237-40.
19. Osterblad M, Hakanen AJ, Jalava J. Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(12): 7553-6.

20. Birgy A, Bidet P, Genel N, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2012; 50(4): 1295-302.
21. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. Clin Microbiol Infect 2014; 20(9): 839-53.
22. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol 2012; 50(2): 477-9.
23. 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.
24. Saito R, Koyano S, Dorin M, et al. Evaluation of a simple phenotypic method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Microbiol Methods 2015; 108: 45-8.
25. Eser OK, Altun Uludağ H, Ergin A, Boral B, Sener B, Haşcelik G. Carbapenem resistance in ESBL positive *Enterobacteriaceae* isolates causing invasive infections. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 59-69.
26. Copur Cicek A, Saral A, Ozad Duzgun A, et al. Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. J Antibiot (Tokyo) 2013; 66(11): 647-50.
27. Dortet L, Bréchart L, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Strategy for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(4): 2441-5.
28. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(9): 4578-80.