

Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* Suşlarının Saptanmasında Karbapenem İnaktivasyon Yönteminin Değerlendirilmesi*

Evaluation of Carbapenem Inactivation Method for the Identification of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Strains

Gülçin BAYRAMOĞLU¹, Gülşen ULUÇAM¹, Çiğdem GENÇOĞLU ÖZGÜR²

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 Education and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Trabzon, Turkey.

* Bu çalışma, 31. ANKEM Kongresi (4-8 Mayıs 2016, Bodrum)'nde sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 29.02.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 03.06.2016

ABSTRACT

The rapid and accurate identification of carbapenemases is of crucial importance in terms of infection control. Methods employed in the determination of carbapenemases should be constantly updated in the light of technical advances and newly emerging carbapenemase variants. The aim of this study was to evaluate the performance of the newly developed carbapenem inactivation method (CIM) for the identification of carbapenemases defined in the members of the family *Enterobacteriaceae*. *Enterobacteriaceae* isolates with resistance to at least one of the carbapenems (ertapenem, imipenem or meropenem) were included in the study. The study isolates were obtained from various clinical specimens between 2008-2014 and consisted of 56 *Enterobacteriaceae* strains (12 *Escherichia coli*, 32 *Klebsiella* spp., and 12 *Enterobacter* spp.) in which the presence of the 38 bla_{OXA-48}, 8 bla_{VIM}, 7 bla_{IMP}, 1 bla_{NDM-1}, 1 bla_{KPC-2} and 1 bla_{OXA-48}+bla_{VIM} genes had been previously determined using the polymerase chain reaction (PCR) and 78 in which no carbapenemase gene were detected. For the performance of the CIM, the test bacteria were suspended in sterile water and then a 10 µg meropenem disc was immersed in the suspension and incubated for 2 hours. This meropenem disc was then removed and subsequently placed on a Mueller-Hinton agar plate inoculated with *E. coli* ATCC 29522 and incubated at 35°C. The results were assessed after 6 hours and after overnight incubation. Development of an inhibition zone around the meropenem disk was interpreted as the absence of carbapenemase and the lack of an inhibition zone as the presence of carbapenemase.

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

The results of the CIM were obtained after 8 hours. With the CIM, all isolates with previously determined carbapenemase genes were found to be positive and the isolates with no genes revealed to be negative. The sensitivity and specificity of CIM were estimated as 100%. The high sensitivity and specificity, ease of application and interpretation, rapid production of results, and no necessity for additional equipment or chemical substances, makes CIM a promising high throughput method to be used in routine microbiology laboratories. Since this method indicates only the presence of a carbapenemase in a clinical isolate, the type of the carbapenemase present should be further identified by the use of molecular techniques.

Keywords: *Enterobacteriaceae*; carbapenemase; carbapenem inactivation method

Sayın Editör,

Uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanabilmesi ve yayılımının önlenmesi için, karbapenemazların hızlı ve doğru bir şekilde saptanması çok önemlidir^{1,2}. Ancak karbapenemazların saptanması oldukça zordur ve çok sayıda fenotipik yöntem geliştirilmiş olmasına rağmen henüz yeterince standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır². Moleküler yöntemler altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, maliyetinin yüksek olması, deneyimli mikrobiyolog gerektirmesi ve yeni karbapenemaz tiplerinin saptanamaması gibi dezavantajlara sahiptir¹. Karbapenemaz saptama metodları, süregelen teknik gelişmeler ve yeni ortaya çıkan karbapenemaz varyantları nedeniyle sürekli güncellenmelidir². Karbapenem inaktivasyon yöntemi (KİY), yeni geliştirilmiş umut verici fenotipik yöntemlerden birisidir³. Bu çalışmada, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde karbapenemazların saptanmasında, KİY'nin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, 2008-2014 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve karbapenemlerden (ertapenem, imipenem ve meropenem) en az birine duyarlı olmayan, önceden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile karbapenemaz genlerinin varlığı saptanan 56 *Enterobacteriaceae* izolatı kullanılmıştır⁴. Çalışma izolatlarının %67.9'u bla_{OXA-48} (12 *Escherichia coli*, 3 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 19 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Klebsiella oxytoca*); %14.2'si bla_{VIM} (5 *E.cloacae*, 2 *K.pneumoniae*, 1 *K.oxytoca*); %12.5'i bla_{IMP} (2 *E.cloacae*, 3 *K.pneumoniae*, 2 *K.oxytoca*); %1.8'i bla_{NDM-1} (1 *K.pneumoniae*); %1.8'i bla_{KPC-2} (1 *K.pneumoniae*) ve %1.8'i bla_{OXA-48}+bla_{VIM} (1 *E.cloacae*) içermektedir. Çalışmada kontrol grubu olarak, karbapenemaz geni saptanmayan 32 *Enterobacter* spp. izolatı (21 *E.cloacae*, 11 *E.aerogenes*); 32 genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten izolat (23 *E.coli*, 9 *K.pneumoniae*); 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 kullanılmıştır⁴. İzolatlar konvansiyonel yöntemlere ilaveten Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile tanımlanmış ve bu sistemle antimikrobiyal duyarlılıkları saptanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile doğrulanmış ve CLSI kriterlerine göre değerlendirilmiştir⁵. KİY'nde, Mueller-Hinton II agarda (Oxoid) üreyen bakterilerden 10 µl öze dolusu alınarak 400 µl steril suda süspansiyon edilmiştir. Ardından 10 µg meropenem diski (Bioanalyse, Türkiye) bu süspansiyona eklenmiş ve 35°C'de en az 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra meropenem diski, duyarlı bir *E.coli* türü olan ATCC 29522'nin 0.5 McFarland standart süspansiyonunun ekildiği plağa yerleştirilmiştir. KPC pozitif olan *K.pneumoniae* ATCC BAA1705 ve KPC negatif olan *K.pneumoniae* BAA1706 kontrol suşları olarak kullanılmıştır. Sonuçlar 6 saat ve bir gece

inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir. Meropenem diski etrafında inhibisyon zonu oluşmaması karbapenemaz pozitifliği, zon oluşması karbapenemaz negatifliği olarak yorumlanmıřtır³. KİY, 6 saat sonra değerlendirilebilmiş, toplam 8 saatte sonuç alınmıştır. Bu yöntemle, PCR ile karbapenemaz geni saptanan tüm izolatlar pozitif, karbapenemaz geni saptanmayan tüm izolatlar negatif bulunmuş; yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızın sonuçları, KİY'nin değerlendirildiği diğer iki çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur^{3,6}. *Enterobacteriaceae* üyelerinde bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünü Van der Zwaluw ve arkadaşları³ sırasıyla %100 ve %100, Tijet ve arkadaşları⁶ ise sırasıyla %98.8 ve %100 olarak bildirmişlerdir. Bu iki çalışmada da, yöntemin bir gece inkübasyondan sonra değerlendirilmesi tercih edilmiş, Tijet ve arkadaşları⁶ yöntemin bir gece inkübasyon gerektirmesini en önemli dezavantaj olarak bildirmişlerdir. Buna rağmen çalışmamızda, değerlendirme 6 saat inkübasyondan sonra yapılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır.

Karbapenem inaktivasyon yöntemi, *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenemaz varlığının saptanmasında duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması, uygulama ve değerlendirmesinin kolay olması, aynı gün içinde sonuç alınabilmesi ve ilave ekipman ya da kimyasal maddelere gerek duyulmaması gibi avantajlara sahip olması ile rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanım için iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Bu yöntemle yalnızca karbapenemaz varlığı saptandığından, karbapenemaz tipinin belirlenmesinde moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Enterobacteriaceae*; karbapenemaz; karbapenem inaktivasyon yöntemi.

TEŐEKKÜR

Pozitif kontrol suşları için, Prof. Dr. Lutz von Müller (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene), Prof. Dr. Duygu Perçin Renders (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakóltesi) ve Doç. Dr. Cemal Sandallı (Recep Tayyip Erdođan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü)'ya teőekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. J Microbiol Methods 2014; 107: 106-18.
3. 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.
4. Bayramoğlu G, Uluçam G, Gençoğlu Özgür Ç, Kılıç AO, Aydın F. Comparison of the modified Hodge test and the Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* Isolates. Mikrobiyol Bul 2016; 50(1): 1-10.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement. CLSI Document M100-S23, 2013. CLSI, Wayne, PA.
6. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. J Antimicrob Chemother 2016; 71(1): 274-6.