

Karbapenemaz Üreticisi Enterobacteriaceae İzolatlarının Saptanmasında Modifiye Hodge Testi ile İnhibitör Tabanlı Testlerin Karşılaştırılması*

Comparison of the Modified Hodge Test and Inhibitor-Based Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates

Ebru Us^{1,2}, Hüseyin Haydar Kutlu³, Alper Tekeli¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

³ Sağlık Bakanlığı Muş Devlet Hastanesi

* Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 13L3330015 proje numarası ile desteklenmiştir.

Amaç: Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının hızlı ve doğru tanısı, yayılımı önleme ve tedavi stratejilerini belirlemede önemlidir. Modifiye Hodge testi (MHT) karbapenemaz aktivitesini fenotipik olarak saptamak için kullanılan kolay ve ucuz bir yöntemdir. Aynı amaçla kullanılan diğer yöntem inhibitör tabanlı testlerdir (İTT). Bu çalışmanın amacı bu iki fenotipik yöntemin *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenemazları saptama performanslarının karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: 2010-2014 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda farklı hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle ertapeneme orta duyarlılık ya da direnç gösteren *Enterobacteriaceae* ailesindeki 112 adet tekrar etmeyen klinik izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Bulgular: MHT, 1:10 sulandırım [0,05 McFarland (McF)] kullanılarak yapıldığında karbapenemaz kodlayan gen (KKG)'leri pozitif 94 izolatın 7'sinde yalancı negatif; KKG negatif 18 izolatın 16'sında yalancı pozitif sonuç alınmış ve MHT'nin karbapenemazları saptamadaki duyarlılığı % 92,6 bulunmuştur. Sulandırım adımı uygulanmadığında (0,5 McF) yalancı negatif izolat sayısı 3'e düşmüş ve testin duyarlılığı % 96,8'e yükselmiştir ($p<0,05$). İTT'nin karbapenemazları saptama başarısı değerlendirildiğinde KKG pozitif 94 izolatın tamamında İTT ile karbapenemaz pozitifliği saptanmıştır. Testin duyarlılığı % 100 olarak hesaplanmış ve MHT'ye göre (McF 0,05 ve 0,5) duyarlılığı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). KKG negatif 18 izolatın 6'sında İTT ile negatif sonuç alınırken 12 izolatta yalancı pozitiflik saptanmış ve bunların tümü İTT ile OXA-48 üreticisi olarak bulunmuştur. İTT ile KKG taşıyan 94 izolatın 89'unda karbapenemaz tipi, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonuçları ile uyumlu bulunmuştur ve testin karbapenemaz tipini belirlemedeki duyarlılığı %94,6 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Karbapenemaz aktivitesini saptamada İTT, MHT'ye göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. İTT karbapenemaz tipini belirlemede PZR ile %90'ın üzerinde uyum göstermekle birlikte bazen yalancı pozitiflikler karşımıza çıkabilmektedir. MHT ülkemiz gibi OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu bölgelerde %90'ın üzerinde duyarlılığa sahiptir. İmkani kısıtlı laboratuvarlar için MHT önerilmekle birlikte yalancı pozitiflik oranlarının yüksek olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. MHT'nin 0,5 McF türbiditedeki süspansiyon ile uygulanması, hem duyarlılığı artırması, hem de laboratuvar iş yükünü azaltması bakımından önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Enterobacteriaceae*, Karbapenemaz, Modifiye Hodge Testi, İnhibitör Tabanlı Testler

Aim: Rapid and accurate detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* isolates plays an important role in preventing the spread and defining treatment strategies. The modified Hodge test (MHT) is an easy and inexpensive tool that can be used to detect carbapenemase activity. Another method used for the same purpose are inhibitor-based tests (IBTs). The aim of this study is to compare the performances of these two phenotypic methods in the detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates.

Materials and Methods: A total of 112 non-repeat *Enterobacteriaceae* strains isolated from various clinical samples at İbni Sina Hospital Central Microbiology Laboratory between 2010-2014 that showed decreased sensitivity and resistance to ertapenem by Kirby-Bauer disk diffusion method were included in the study.

Results: When 1:10 dilution [0,05 McFarland (McF)] was performed, out of 94 isolates positive for carbapenemase-encoding genes (CEGs), false negativity was detected in seven isolates, whereas out of 18 isolates negative for CEGs, false positivity was detected in 16 isolates; so the sensitivity of MHT for carbapenemase detection was found to be 92,6%. Without dilution (0,5 McF) the number of false negative isolates decreased to three and the sensitivity of MHT increased to 96,8%, ($p<0,05$). When the performance of IBTs for detection of carbapenemases was evaluated, all isolates which were positive for CEGs were also found positive with IBTs for carbapenemase production. Sensitivity of IBTs was found 100% and significantly higher than MHT (for both McF 0,05 and 0,5) ($p<0,05$). Six of 18 strains negative for CEGs were also found negative with IBT; so false positivity was detected in 12 isolates, which were defined incorrectly as OXA-48 producers. With IBTs, carbapenemase types of 89 of 94 isolates which were positive for CEGs were found in accordance with polymerase chain reaction (PCR) results. The sensitivity of IBTs for defining carbapenemase types was calculated as 94,6%.

Conclusion: IBTs had higher sensitivity and specificity than MHT. Although IBTs were more than 90% compatible with PCR for detection of carbapenemases, also false positivity can occur occasionally. MHT has a sensitivity more than 90% for OXA-48 producers in endemic regions such as our country. Although false positivity ratio is high, according to our results it's considered that MHT can be used in laboratories with poor facilities. Performing MHT with McF 0,5 turbidity without dilution which leads increased sensitivity and reduced laboratory workload is recommended.

Key Words: *Enterobacteriaceae*, Carbapenemase, Modified Hodge Test, Inhibitor-Based Tests

Geliş Tarihi: 09.09.2016 • Kabul Tarihi: 08.11.2016

İletişim

Doç. Dr. Ebru Us

E-posta: eus@medicine.ankara.edu.tr

Tel: +90 312 508 31 79

Faks: +90 312 508 30 47

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim

Dalı ve İbn-i Sina Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji

Laboratuvarı, 06100 Sıhhiye-ANKARA

Enterobacteriaceae ailesindeki türler arasında hızla ve artarak yayılan genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) bu yüzyılın başından beri araştırılmaktadır. GSBL üreten suşların neden olduğu toplumsal kaynaklı enfeksiyon sıklığı artmış ve GSBL üreten Enterobacteriaceae türlerinden kaynaklanan enfeksiyonlar son 10 yıl içinde kontrolden çıkarak uluslararası salgınlar oluşturmaya başlamıştır (1). Son yıllarda Enterobacteriaceae üyeleri arasında karbapenemaz enzimi üretimi sıklıkla görülmektedir. Bu fenomenin de tıpkı GSBL'de olduğu gibi kısa bir süre içinde kontrolden çıkmasından ve toplum kökenli enfeksiyonlarda bile karşımıza çıkacak kadar yaygın bir hal almasından korkulmaktadır. Bu durum, dirençli gram negatif bakteri enfeksiyonlarında kullandığımız son basamak ilaçlar olan karbapenem grubu antibiyotiklerin artık kullanılamaz hale gelmesi anlamına gelmektedir (1-3).

Karbapenemaz genleri konjugatif plazmitler aracılığıyla yüksek aktarım oranına sahiptir (4). Hem antibiyotik tedavisine doğru yön verebilmek hem de hastanede oluşabilecek bir salgın durumundan kaçınabilmek için karbapenemaz üreticilerinin hızlı ve doğru şekilde saptanmasına ihtiyaç vardır (4).

Modifiye Hodge testi (MHT) rutin laboratuvarlarda karbapenemaz aktivitesini saptamak amacıyla yaygınlıkla kullanılan fenotipik yöntemlerden biridir. Kolay kullanımı ve disk difüzyon testinde kullanılan malzemeler dışında ilave bir ekipman gerektirmemesi nedeniyle MHT laboratuvarlarda tercih edilmektedir (5).

“Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), karbapenemaz araştırılmasında MHT kullanımını önermektedir (6). MHT, Ambler sınıf A (KPC) ve sınıf D (OXA-48) karbapenemazları üreten enterobakteriyel izolatları saptamada üstün bir duyarlılığa sahiptir (5,7). Bununla beraber “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” kılavuzu bu testin kullanımını düşük özgüllüğü, duyarlılığının optimalin altında olması ve değerlendirilmesindeki güçlükler gibi nedenlerle önermemekte, bunun

yerine fenilboronik asit, etilendiamin-tetraasetik asit (EDTA), kloksasilin gibi karbapenemaz inhibitörleri ile meropenem sinerjisi varlığının test edildiği ve temosilin inhibisyon zon çapının değerlendirildiği inhibitör tabanlı testleri (İTT) ya da “Carba NP” (Carbapenemase Nordmann-Poirel) gibi biyokimyasal testleri önermektedir (8).

Ülkemizde EUCAST kılavuzlarının uygulanmasına geçiş sürecinin hızlandığı bu dönemde, MHT kullanımı terk edilmeli mi, yoksa sınıf D karbapenemazları (OXA-48 benzeri) saptamadaki başarısı göz önüne alınarak MHT kullanımına devam edilmeli midir? Ülkemizde sıklıkla belirlenen karbapenemaz tipleri göz önüne alındığında İTT'in karbapenemaz saptamada MHT'ne üstünlüğü var mıdır? Çalışmamızda bu sorulara yanıt verebilmek ve aynı zamanda MHT'nin uygulanması sırasında CLSI kılavuzunda belirtilen E.coli ATCC 25922 suşunun 0,5 McFarland (McF) türbiditedeki süspansiyonunun 1:10 sulandırım adımının gerekli olup olmadığının irdelenmesi amaçlanmıştır.

GSBL veya AmpC beta-laktamazların porin kaybı ile birlikteliği, modifiye Hodge testinde yalancı pozitifliklere yol açabildiğinden izolatların fenotipik olarak GSBL ve AmpC beta-laktamaz üretimleri de araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Klinik İzolatlar

2010-2014 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen, farklı hastalara ait kan, yumuşak doku, idrar, solunum yolu ve steril vücut sıvısı örneklerinden izole edilen ve CLSI 2010-2014 önerilerine göre karbapenemaz üretiminin en duyarlı göstergesi olarak ertapenem duyarlılığında azalmanın kabul edilmesi nedeniyle Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle ertapeneme orta duyarlılık ya da direnç gösteren (9); tür tayinleri, Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemiyle yapılmış; multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (M-PZR) yöntemiyle (10)

karbapenemaz kodlayan gen (KKG)'leri (blaIMP, blaVIM, blaSPM, blaKPC, blaNDM, blaOXA-48, blaGIM, blaSIM, blaAIM, blaDIM ve blaBIC) önceden araştırılmış olan (11) Enterobacteriaceae ailesindeki 112 adet tekrar etmeyen klinik izolat [79 (%70,5) *Klebsiella pneumoniae*, 15 (%13,4) *Escherichia coli*, 10 (%8,9) *Enterobacter cloacae*, 4 (%3,6) *Enterobacter aerogenes* ve 4 (%3,6) *Klebsiella oxytoca*] çalışmaya dahil edildi (83 blaOXA-48, 2 blaVIM, 2 blaNDM-1 ve 7 blaOXA-48+blaVIM pozitif izolat ve 18 KKG negatif izolat).

Modifiye Hodge testi (MHT)

Bakteri inokülüm yoğunluğunun MHT üzerindeki etkisini araştırmak üzere PhoenixSpec nefelometre cihazı (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak indikatör organizma *E.coli* ATCC 25922 suşundan 0,5 McF bulanıklığında iki adet bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bakteri süspansiyonlarından bir tanesi CLSI önerileri doğrultusunda steril fizyolojik tuzlu su ile 1:10 oranında sulandırılan (0.05 McF) ve sulandırılmayan (0,5 McF) indikatör organizma *E.coli* ATCC 25922 Mueller Hinton agar plağının yüzeyine inoküle edildi ve merkeze 10 μ g meropenem veya ertapenem diski yerleştirildi. Test edilecek organizma disk kenarından plak kenarına kadar sürüldü. $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de bir gecelik inkübasyonun ardından duyarlı indikatör organizmanın test suşu ile kesişme noktasında yonca yaprağı şeklinde girinti yaparak üretmesi, test organizması tarafından karbapenemaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi (5,12). OXA-48-pozitif *K.pneumoniae* 1943 (Eu SCAPE-European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae) suşu pozitif kontrol, *E.coli* ATCC 25922 suşu negatif kontrol olarak kullanıldı.

İnhibitör Tabanlı Testler (İTT)

Bakteri süspansiyonları PhoenixSpec nefelometre cihazı (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak 0,5 McF türbiditede olacak şekilde hazırlandı. Her bir Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri üzerine meropenem (10µg), meropenem-boronik asit, meropenem-EDTA, meropenem-kloksasilin ve temosilin (30µg) diskleri (Liofilchem, İtalya) yerleştirildi. İnhibitör disklerin meropenem ile sinerjilerine göre karbapenemaz varlığı ve tipleri değerlendirildi. Temosilin zon çapı, hiçbir inhibitörle sinerji olmaması durumunda dikkate alındı ve 11 mm'nin altındaki zon çapı değerleri OXA-48 benzeri karbapenemaz tipleri açısından pozitif olarak kabul edildi (4,8,13) (Tablo 1).

GSBL ve AmpC beta-laktamaz üretimi

İzolatların fenotipik olarak çift disk sinerji ve kombine disk testi yöntemleriyle (8) GSBL ve Coudron (14) tarafından tarif edilen yöntemle AmpC beta-laktamaz üretimleri araştırıldı.

Verilerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin analizi SPSS for Windows 15 paket programında yapıldı. Kategorik değişkenler arasındaki farkın anlamlılığı Pearson Ki-Kare veya Fisher Exact testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

KKG pozitif izolatların 53'ü (35 *K.pneumoniae*, 12 *E.coli*, 5 *E.cloacae*, 1 *E.aerogenes*), KKG negatif izolatların ise 12'si (7 *K.pneumoniae*, 2 *E.cloacae*, 2 *E.aerogenes*, 1 *E.coli*) fenotipik olarak GSBL pozitif bulunurken; OXA-48 geni pozitif 6 izolat ve KKG negatif 1 izolat olmak üzere toplam 7 izolat fenotipik olarak AmpC beta-laktamaz üreticisi olarak saptandı.

MHT, CLSI'nin önerdiği şekilde *E. coli* ATCC 25922 şuşununun 0,5 McF türbiditedeki süspansiyonununun 1:10 oranında sulandırımı (0,05 McF) kullanılarak yapıldığında, herhangi bir KKG'yi pozitif 94 izolatın 87 tanesinde pozitif

sonuç verirken, 7 izolatta MHT ile yalnızca negatif sonuç elde edildi. KKG negatif 18 izolatın [(*K.pneumoniae* (12), *E.coli* (1), *E.cloacae* (3), *E.aerogenes* (2))] 16'sında ise [(*K.pneumoniae* (11), *E.coli* (1), *E.cloacae* (2), *E.aerogenes* (2))] MHT ile yalnızca pozitif sonuç alındı (Tablo 2 ve 4). MHT ile yalnızca negatif bulunan 7 izolattan 6 tanesinde OXA-48 geni tek başına, bir tanesinde ise OXA-48 ve VIM geni birlikte pozitif. MHT ile yalnızca pozitif bulunan 16 izolattan 10 tanesi fenotipik yöntemlerle GSBL pozitif olarak belirlenirken, bir izolatta AmpC beta-laktamaz pozitifliği tespit edildi (Tablo 2). MHT, CLSI'nin önerdiği şekliyle 1:10 sulandırımı kullanılarak yapıldığında testin duyarlılığı % 92,6 [0,85-0,96 %95 güven aralığı (GA)]; özgüllüğü ise % 11,1 [0,03-0,33 %95 GA] olarak hesaplandı (Tablo 4). Farklı KKG'ler için MHT testinin duyarlılıkları incelendiğinde bu oran OXA-48 geni pozitif izolatlarda (OXA-48+VIM birlikteliği olanlar dahil) % 92,2 (0,85-0,96 %95 GA); VIM pozitiflerde (OXA-48+VIM birlikteliği olanlar dahil) % 88,9 (0,56-0,98 %95 GA); NDM pozitiflerde ise %100 (0,34-1,00 %95 GA) olarak bulundu.

Tablo 1: Karbapenem-dirençli *Enterobacteriaceae* doğrulanmasında karbapenem inhibitörleri ile meropenem sinerjisi (8,13)

İnhibitör varlığında meropenem inhibisyon zonunda artış			Temosilin*	β-laktamaz
Fenilboronik asit	Dipikolinik asit/ EDTA	Kloksasilin		
≥4 mm	<5 mm	<5 mm	---	KPC
<4 mm	≥5 mm	<5 mm	---	MBL
≥4 mm VE	<5 mm	≥5 mm	---	AmpC+porin kaybı veya atım pompası
<4 mm	<5 mm	<5 mm	<11 mm	OXA-48 benzeri

*Temosilin duyarlılık testi yalnızca sinerji saptanmayan durumlarda önerilir
EDTA, Etilendiamintetraasetik asit; MBL, Metallo-beta-laktamaz; KPC, *K.pneumoniae* karbapenemase

Tablo 2: Karbapenemaz saptamada MHT'nin (0,05 McF) GSBL ve AmpC beta-laktamaz pozitifliği dağılımına göre değerlendirilmesi

	0,05 McF								Genel Toplam (KKG)		
	MHT negatif				MHT pozitif						
	GSBL+		GSBL-		GSBL+		GSBL-				
	AmpC +	AmpC -	AmpC +	AmpC -	AmpC +	AmpC -	AmpC +	AmpC -			
KKG pozitif	1	6	-	-	7 (yalancı negatif)	4	42	-	41	87 (gerçek pozitif)	94
KKG negatif	1	1	-	-	2 (gerçek negatif)	1	9	-	6	16 (yalancı pozitif)	18

MHT CLSP'nin önerdiği 1:10 oranında sulandırım adımı uygulanmayarak *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0,5 McF türbidedeki süspansiyonu ile yapıldığında yalnızca negatiflik sayısının 7'den 3'e düştüğü gözlemlendi (Tablo 3). MHT 1:10 sulandırımı yapıldığında yalnızca negatif sonuç alınan 3 adet OXA-48 geni pozitif izolat ve bir adet OXA-48

ile VIM geni birlikte pozitif olan izolat, sulandırım adımı uygulanmadığında MHT ile pozitif sonuç verdi. Buna göre testin duyarlılığı % 96,8'e yükseldi (0,91-0,99 %95 GA) (Tablo 4). Sulandırım adımı uygulanmadığında OXA-48 geni pozitifler için (OXA-48+VIM birlikteliği olanlar dahil) duyarlılık % 96,7'ye yükselirken

(0,91-0,99%95 GA) VIM ve NDM pozitiflerde bu değer % 100 oldu (0,34-1,00%95 GA). MHT ile yalnızca pozitif bulunan 17 izolatın [(*K.pneumoniae* (11), *E.coli* (1), *E.cloacae* (3), *E.aerogenes* (2))] 11 tanesi fenotipik yöntemlerle GSBL pozitif olarak belirlenirken, bir izolatta AmpC pozitifliği tespit edildi (Tablo 3 ve 4)

Tablo 3: Karbapenemaz saptamada MHT'nin (0,5 McF) GSBL ve AmpC pozitifliği dağılımına göre değerlendirilmesi

	0,5 McF								Genel Toplam (KKG)
	MHT negatif				MHT pozitif				
	GSBL+		GSBL-		GSBL+		GSBL-		
	AmpC +	AmpC -	AmpC +	AmpC -	AmpC +	AmpC -	AmpC +	AmpC -	
KKG pozitif	-	3	-	-	5	45	-	41	94
	(yalancı negatif)				(gerçek pozitif)				
KKG negatif	1	-	-	-	1	10	-	6	18
	(gerçek negatif)				(yalancı pozitif)				

Tablo 4: MHT (0,05 McF ve 0,5 McF) ve İTT ile Karbapenemaz Pozitif ve Negatif Saptanan *Enterobacteriaceae* İzolatlarının KKG Varlığına Göre Dağılımı

KKG (n)	Bakteri türü (n)	Karbapenemaz pozitif bulunan izolat sayısı (%)				
		MHT ile (0,05 McF)	MHT ile (0,5 McF)	İTT ile		
Pozitif (94)	OXA-48	<i>K.pneumoniae</i> (60)	58 (96,7)	58 (96,7)	60 (100)	
		<i>K.oxytoca</i> (4)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	
		<i>E.coli</i> (12)	8 (66,7)	11 (91,7)	12 (100)	
		<i>E.cloacae</i> (5)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	
		<i>E.aerogenes</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	
		Toplam (83)	77 (92,8)	80 (96,4)	83 (100)	
		VIM	<i>K.pneumoniae</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
			<i>E.cloacae</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
		Toplam (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	
		NDM	<i>K.pneumoniae</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
	Toplam (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)		
	OXA-48+VIM	<i>K.pneumoniae</i> (4)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	
		<i>E.coli</i> (2)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	
		<i>E.cloacae</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	
	Toplam (7)	6 (85,7)	7 (100)	7 (100)		
Negatif (18)		<i>K.pneumoniae</i> (12)	11 (91,6)	11 (91,6)	9 (75)	
		<i>E.coli</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	
		<i>E.cloacae</i> (3)	2 (66,7)	3 (100)	1 (33,3)	
		<i>E.aerogenes</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	
		Toplam (18)	16 (88,9)	17 (94,4)	12 (66,7)	
Duyarlılık			92,6	96,8	100	
Özgüllük			11,1	5,6	33,3	

MHT: Modifiye Hodge testi, İTT: İnhibitör tabanlı testler, KKG: Karbapenemaz kodlayan gen

CLSP'nin önerdiği sulandırım adımı uygulanmadığında MHT'nin duyarlılığı % 92,6'dan % 96,8'e yükseldi ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). İTT'in karbapenemazları saptama başarısı değerlendirildiğinde, KKG'leri pozitif olan 94 izolatın tamamı İTT ile karbapenemaz pozitif olarak saptandı. Testin duyarlılığı % 100 (0,96-1,00 %95 GA) olarak hesaplandı ve MHT'ye göre (McF 0,05 ve 0,5) duyarlılığı anlamlı olarak yüksek

bulundu ($p<0,05$). KKG negatif 18 izolatın 6'sında İTT ile de negatif sonuç alınırken 12 izolatta [(*K.pneumoniae* (9), *E.cloacae* (1), *E.aerogenes* (2))] yalnızca pozitiflik saptandı (Tablo 4). MHT 0.05 McF, MHT 0.5 McF ve İTT ile yalnızca pozitiflik elde edilen izolatların dağılımına bakıldığında; MHT 0.05 McF ve 0.5 McF ile karbapenemaz üretimi açısından yalnızca pozitif bulunan, sırasıyla 16 ve 17 izolatın, İTT ile yalnızca pozitif bulunan 12 izolatla örtüştüğü gözlemlendi.

Hem MHT 0.05 McF hem de MHT 0.5 McF ile karbapenemaz pozitif bulunan 11 *K.pneumoniae* izolatından 9'u İTT ile de yalnızca pozitif bulunurken; hem MHT 0.05 McF hem de MHT 0.5 McF ile karbapenemaz pozitif bulunan 1 *E.coli* izolatı İTT ile karbapenemaz üretimi açısından negatif bulundu. MHT 0.05 McF ile karbapenemaz pozitif bulunan 2 *E.cloacae* izolatından biri İTT ile karbapenemaz üretimi açısından nega-

tif bulunurken; MHT 0.5 McF ile karbapenemaz pozitif bulunan 3 *E.cloacae* izolatından 2'si İTT ile karbapenemaz üretimi açısından negatif olarak saptandı. Hem MHT 0.05 McF hem de MHT 0.5 McF ile karbapenemaz pozitif bulunan 2 *E.aerogenes* izolatının her ikisi de İTT ile de yalancı pozitif olarak bulundu (Tablo 4). İTT ile yalancı pozitif izolatların tamamı OXA-48 pozitif olarak belirlendi. Testin özgülüğü % 33,3 olarak saptanırken (0,16-0,56 %95 GA) bu değer MHT ile (McF 0,05 ve 0,5) karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 4). İTT ile, KKG pozitif 94 izolatın 89'unda karbapenemaz tipi uyumlu bulundu. OXA-48 ve VIM [Metallo-beta-laktamaz (MBL) üreticisi] genlerinin birlikte pozitif olduğu 7 izolatın 2 tanesi İTT ile MBL üreticisi olarak, 5 tanesi ise OXA-48 üreticisi olarak saptandı. Geriye kalan 5 izolatta ise karbapenemaz sınıfı uyumsuz sonuç verdi. OXA-48 geni pozitif 3 izolat İTT ile MBL üreticisi olarak bulundu. VIM geni pozitif bir izolat İTT ile OXA-48 üreticisi olarak saptanırken, OXA-48 geni pozitif bir izolat ise KPC tipi karbapenemaz üreticisi olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre testin karbapenemaz tipini belirlemedeki duyarlılığı %94,6 (0,88-0,98 %95 GA) olarak hesaplandı. OXA-48 geni pozitif 90 izolatın 84'ü İTT ile OXA-48 üreticisi olarak saptandı ve duyarlılık %93,3 (0,86-0,97 %95 GA) olarak bulundu. VIM geni pozitif 9 izolatın sadece 3 tanesi İTT ile MBL üreticisi olarak saptandı ve duyarlılık oranı %33,3 (0,12-0,65 %95 GA) bulundu. NDM geni pozitif 2 izolatın her ikisi de İTT ile MBL üreticisi olarak saptandı ve testin duyarlılığı %100 olarak belirlendi (0,34-1,00 %95 GA).

Tartışma

MHT rutin laboratuvarlarda karbapenemaz aktivitesini saptamak amacıyla yaygın olarak kullanılan fenotipik yöntemlerden bir tanesidir (5). Testin her ne kadar Sınıf A ve Sınıf D karbapenemazları saptamada yüksek duyarlılığa sahip olduğu ifade edilse de MBL'lerin saptanmasında duyarlılığının düşük olduğu bildirilmektedir (4,5,7). Kim ve arkadaşları (15) da

MHT'nin MBL üreticilerinin en fazla % 60,6'sını tespit edebildiğini ancak testin performansının MBL tipine göre değiştiğini ve VIM üreticilerinde NDM üreticilerine göre daha iyi sonuç alındığını belirtmektedirler. MHT'nin NDM üreticilerini saptamadaki düşük duyarlılığına dikkat çeken bir diğer çalışmada ise MHA besiyerine ZnSO4 ilavesinin (100 µg/mL) NDM üreticileri için testin duyarlılığını % 50'den % 85,7'ye yükselttiği bildirilmiştir (7).

Çalışmamızda MHT testi iki şekilde yapıldı. CLSI'nın önerdiği şekilde 1:10 sulandırım (0,05 McF) yapıldığında testin duyarlılığı % 92,6; özgülüğü ise % 11,1 olarak hesaplandı, farklı KKG'ler için testin duyarlılıkları incelendiğinde ise oranlar OXA-48 pozitif izolatlarda % 92,2; VIM pozitiflerde % 88,9 ve NDM pozitiflerde ise % 100 olarak bulundu ve testin MBL yakalama duyarlılığı % 91 olarak belirlendi.

Testin duyarlılığının % 90'ın üzerinde yüksek bir değerde bulunmasında çalışmamıza dahil edilen izolatların çoğunun OXA-48 üreticisi olmasının etkili olduğu düşünüldü. Girlich ve arkadaşları (7) MHT'nin duyarlılığını % 77,4 ve özgülüğü % 38,9 olarak bulmuşlardır, ancak çalışmalarında kullandıkları izolatların arasında önemli oranda NDM üreticileri yer almıştır ve bunların yarısı MHT ile negatif sonuç vermiştir. Bu nedenle çalışmamızdaki test duyarlılığının yüksek olması açıklanabilir. Yine aynı çalışmada OXA-48 üreticileri için MHT'nin duyarlılığının % 100 olduğu ifade edilmiştir (7). Çalışmamızda ise OXA-48 için daha düşük (% 92,2) duyarlılık saptanmıştır. Girlich ve arkadaşları (7) OXA-48 geni pozitif 10 izolat kullanmışlardır, bizim çalışmamızda 90 adet OXA-48 geni pozitif izolat bulunmaktadır. Bu farklılığın kullanılan OXA-48 pozitif izolat sayısından ileri geldiği düşünülmektedir. MHT ile OXA-48 üreticilerinde elde edilen yalancı negatif sonuçların nedenlerini belirlemek için ileri araştırmaların yapılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

MHT'nin NDM üreticilerini saptama duyarlılığının oldukça düşük olduğu bildirilmektedir (7,15). Çalışmamızda

NDM üreticilerinde duyarlılık % 100 olarak tespit edilmekle birlikte bu uyumsuzluğun test edilen örnek sayısının azlığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda MHT'nin MBL'leri yakalama duyarlılığı % 91 oranında bulunmuştur. Halbuki Miriagou ve arkadaşları (16) MHT'nin Sınıf B karbapenemazları saptama problemleri olduğunu bildirmişlerdir. Kim ve arkadaşları (15) ise yaptıkları çalışmada MHT'nin MBL üreticilerinin en fazla % 60,6'sını tespit edebildiğini, testin performansının MBL tipine göre değiştiğini ve VIM üreticilerinde NDM üreticilerine göre daha iyi sonuç alındığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz yüksek duyarlılık oranı hem MBL pozitif izolatların çoğunluğunu VIM üreticilerinin oluşturması, hem de VIM pozitif izolatların çoğunda aynı zamanda OXA-48 pozitifliği de bulunması ile açıklanabilir.

MHT CLSI'nın önerdiği sulandırım adımı uygulanmayarak 0,5 McF türbiditedeki süspansiyonla yapıldığında testin duyarlılığı % 96,8'e yükselmiştir. OXA-48 üreticileri için duyarlılık % 96,7'ye yükselirken VIM ve NDM üreticilerinde bu değer % 100 olmuştur.

Lee ve arkadaşlarının (12) yaptıkları çalışmada MHT MacConkey agarda yapıldığında düşük inokulum konsantrasyonunun (0,05 McF) testin performansını artırmadığını bildirmişlerdir. Kim ve arkadaşları (15) ise laboratuvarlarda MHT yapılırken 1:10'luk sulandırım basamağının uygulanmamasını önermekte, sulandırım adımının testin duyarlılığında artışa neden olmadığını, hatta düşük inokulumdan kaynaklanan zayıf üremelerin yalancı negatif bildirimlere neden olabileceğini ifade etmektedirler. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu çalışmalarla uyumlu olup MHT yapılırken CLSI'nın önerdiği sulandırım adımının uygulanmamasının hem daha güvenilir sonuç elde etmek, hem de iş yükünü azaltmak açısından daha faydalı olacağını göstermektedir.

MHT'de en önemli sorun özgülüğün düşük olmasıdır. GSBL (özellikle CTX-M tipi) veya AmpC beta-laktamazların

porin kaybı ile birlikteliğinin, modifiye Hodge testinde yalancı pozitifliklere yol açabildiği bildirilmiştir (17-19). Çalışmamızda MHT'nin özgüllüğü %11,1 (0,05 McF) bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda testin özgüllüğünün %38,9-100 arasında değişkenlikler gösterebildiği bildirilmektedir (7,20). Bayramoğlu ve arkadaşları (21) çalışmalarında bu değerini %60,3 olduğunu bildirmiştir. Fenotipik yöntemlerin değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise MHT ile karbapenemaz negatif 29 izolatin 9'unda şüpheli, 3'ünde pozitif, 17'sinde ise negatif sonuç alındığı; şüpheli sonuçların pozitif lehine değerlendirildiği taktirde MHT'nin özgüllüğünün %59 olarak hesaplandığı bildirilmiştir (19). Çalışmamızda MHT ile yalancı pozitiflik elde ettiğimiz 16 izolatin 0,05 McF türbiditede 10'unda; 0,5 McF türbiditede 11'inde GSBL, 1'inde AmpC beta-laktamaz varlığı saptanmıştır. MHT için bulunan düşük özgüllük bu durumla ilişkili olabileceği gibi, konuyu daha iyi açıklamak için yalancı pozitif sonuç elde ettiğimiz bu izolatlarda GSBL tipleri ve GSBL veya AmpC beta-laktamazların porin kaybı ile birlikteliği açısından ileri araştırma yapılması yararlı olacaktır.

Çalışmamızda İTT, karbapenemaz saptamada MHT'ye göre daha başarılı sonuçlar vermiştir. PZR ile herhangi bir KKG'si pozitif olan 94 izolatin tamamı İTT ile karbapenemaz üreticisi olarak belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda da bu testlerin %90-100 arasında değişen duyarlılığa sahip olduğu ve MHT'den daha başarılı olduğu, fakat birden fazla mekanizmanın olduğu durumlarda değerlendirmenin güçleşebileceği bildirilmektedir (19,22-24). Çalışmamızda KKG negatif 18 izolatin 12'sinde yalancı pozitiflik saptanmış ve bu izolatların tamamı, İTT ile hatalı olarak OXA-48 üreticisi olarak tespit edilmiştir. İTT'de herhangi bir inhibitör ile sinerji göstermeyen izolatlarda temosilin zon çapına bakılmakta

ve 11 mm'nin altındaki değerlere sahip olanlar OXA-48 üreticisi olarak değerlendirilmektedir (13). Huang ve arkadaşlarının (25) 1354 Enterobacteriaceae izolatu üzerinde yaptıkları çalışmada 457 izolatin zon çaplarında daralma tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen OXA-48 pozitif 323 izolatin 317'si temosilin için sınır değer altında zon çapına sahipken, karbapenemaz enzimi açısından negatif bulunan 919 izolatin 92'sinde de (%10) aynı şekilde sınır değer altında zon çapları ölçülmüştür. Dolayısıyla temosilin zon çapında daralma olan izolatlarda OXA-48 enziminin bulunmadığı durumlar da olabilmektedir. Çalışmamızda İTT ile hatalı olarak OXA-48 üreticisi olarak tespit edilen bu 12 izolatla karbapenem direncinin karbapenemaz enzimi üretimi dışındaki başka mekanizmalarla ortaya çıkmış olabileceği ve temosilin direnci gözlenmesinin de bu mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu durumu aydınlatmak için bu izolatlardaki karbapenem direnç mekanizmalarını araştırmak gerekmektedir.

Çalışmamızda OXA-48 pozitif 3 izolat, İTT ile meropenem/EDTA ile sinerji göstermiş ve MBL üreticisi olarak değerlendirilmiştir. Yapılan değişik çalışmalarda da EDTA sinerjisinin MBL saptamada özgüllüğünün düşük olabileceği ve yalancı pozitifliklerin göz önünde bulundurulması gerektiği bildirilmiştir (26,27). Giske ve arkadaşlarının (27) yaptığı çalışmada, 9 GSBL üreten izolatin birinde, 34 KPC üreten izolatin 4'ünde ve 9 OXA-48 üreten izolatin 4'ünde EDTA ile sinerji saptanmıştır. Yine aynı çalışmada OXA-48 üreten izolatların birinde yalancı KPC pozitifliği belirlenmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde OXA-48 pozitif bir izolat sadece boronik asit sinerjisi göstermiş ve PCR ile uyumsuz olarak KPC üreticisi olarak değerlendirilmiştir. İTT ile bulunan KPC poziti-

tifliklerinde dikkatli olmak ve moleküler testler ile doğrulamadan KPC pozitifliği bildirmemek yararlı gözükmektedir. Her ne kadar Labarca ve arkadaşları (28) 2014 yılında Romanya'dan İstanbul'daki bir yoğun bakım ünitesine transfer edilen 80 yaşında bir hastada KPC-2 üreten ST-258 klonuna ait bir *K.pneumoniae* izolatu bildirmiş olsalar da, yakın zamanda yapılan başka yayınlarda ülkemizde KPC üreten izolata rastlanmamıştır (29-31).

Sonuç olarak karbapenemaz saptamada İTT, MHT'ye göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Karbapenemaz tipini belirlemede PCR ile %90'ın üzerinde uyum göstermekle birlikte İTT'de yalancı pozitiflikler karşımıza çıkabilmektedir. Ayrıca sadece boronik asit sinerjisi gösteren izolatlarda KPC geni pozitif olarak bildirilmeden önce mutlaka moleküler yöntemlerle doğrulanmalıdır. MHT ülkemiz gibi OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu bölgelerde %90'ın üzerinde duyarlılığa sahiptir. Çalışmamızın sonuçlarına göre imkanı kısıtlı laboratuvarlar için MHT'nin hala kullanılabilirliği düşünülmekle birlikte yalancı pozitiflik oranlarının yüksek olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre MHT'yi 0,5 McF türbiditedeki süspansiyon ile yapmak hem duyarlılığı artırması, hem de laboratuvar iş yükünü azaltması bakımından önerilmektedir.

Teşekkür

Kontrol şuşlarının sağlamlasındaki katkılardan dolayı Prof. Dr. J. Sedef Göçmen'e, Doç. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç'a ve Uzm.Dr. Aslı Çakar'a; istatistiksel analiz konusundaki katkılardan dolayı Zeynep Gençtürk'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Cornaglia G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action! Clin Microbiol Infect 2012; 18:411-412.
2. Budak S, Aktaş Z, Erdem H. Enterik gram-negatif bakterilerde laboratuvarından kliniğe karbapenemazlar. Mediter J Infect Microbes Antimicrob 2012; 1:1-11.
3. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J of Antimicrob Agents 2010; 36:S8-14.
4. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2013; 68:487-489.
5. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. J Microbiol Methods 2014; 107:106-118.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25, 2015. CLSI, Wayne, PA.
7. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2012; 50:477-479.
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement. CLSI Document M100-S24, 2014. CLSI, Wayne, PA.
10. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70:119-123.
11. Kutlu HH. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Gram Negatif Enterik Bakterilerde Karbapenemaz Varlığının ve Tiplerinin Araştırılması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi. Ankara. 2015
12. Lee K, Kim CK, Yong D, et al. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. J Microbiol Methods 2010; 83:149-152.
13. Liofilchem® KPC&MBL&OXA-48 disc kit (acc. to EUCAST). Available at: http://www.liofilchem.net/login/pd/pi/99007_PI.pdf
14. Coudron PE. Inhibitor-Based Methods for Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2005; 43:4163-4167.
15. Kim H, Park JS, Sung H, et al. Further Modification of the Modified Hodge Test for Detecting Metallo- β -Lactamase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Ann Lab Med 2015; 35:298-305.
16. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect 2010; 16:112-122.
17. 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; 36:205-210.
18. Eser OK, Altun Uludağ H, Ergin A, ve ark. İnvazif enfeksiyonlara neden olan GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenem direnci. Mikrobiyol Bul 2014; 48:59-69.
19. 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; 20:345-349.
20. 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; 108:45-48.
21. Bayramoğlu G, Uluçam G, Gençoğlu Özgür Ç, ve ark. *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenemazların saptanmasında modifiye Hodge testi ve Carba NP testlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2016; 50:1-10.
22. Lutring JD, Limbago BM. The problem of carbapenemase producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* detection. J Clin Microbiol 2016; doi:10.1128/JCM.02771-15.
23. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2010; 65:1664-1671.
24. Seah C, Low DE, Patel SN, et al. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2011; 49:1965-1969.
25. Huang TD, Poirel L, Bogaerts P, et al. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 445-450.
26. Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, et al. Evaluation of Rosco Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. APMIS 2012; 120:724-732.
27. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect 2011; 17:552-556.
28. Labarca J, Poirel L, Ozdamar M, et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. New Microbes New Infect 2014; 2:50-51.
29. Demir Y, Zer Y, Karaoglan I. Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains. Pak J Pharm Sci 2015; 28(3 Suppl):1127-1133
30. Sahin K, Tekin A, Ozdas S, et al. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in *Enterobacteriaceae* isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015; 14:44.
31. Iraz M, Özad Düzgün A, Sandallı C, et al. Distribution of β -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. Ann Lab Med 2015; 35: 595-601.

