

Karbapeneme Dirençli Gram-Negatif Çomak İnfeksiyonların Tanısı

Doç. Dr. Fatma Yılmaz Karadağ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi

Sancaktepe Şehit Prof Dr İlhan Varank EAH

KLİMİK İstanbul Aylık Toplantısı
31.01.2023

Sunu Planı

- Karbapenemaz enzim nedir ve sınıflandırılması
- Karbapenemaz enzim tarama yöntemleri
- Karbapenemaz enzim doğrulama yöntemleri

*Fenotipik Yöntemler

*Genotipik Yöntemler

Karbapenem Direnci Nasıl Gelişir ?

- Karbapenemaz üretimi (karbapenem hidrolizi)
- Porin kaybı
- Artmış eflüks pompa fonksiyonu

Bu mekanizmalar ertapenem >> meropenem veya imipenem

Karbapenemaz Enzimi

- Penisilinleri, çoğu zaman sefalosporinleri ve değişen derecelerde olmak üzere karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır.

Karbapenemaz Neden Önemli ?

- Tüm beta-laktamlara karşı direnç gelişmesi ve kolay yayılması
- Karbapenemaz üreten suşlar genellikle birden fazla direnç mekanizmaları taşıdıkları için çoklu dirence sahip
- Bu enzimleri kodlayan genler, plazmidler üzerinde olması nedeni ile kolay transfer edilebilir, direnci bu plazmidler yardımı ile hızla aynı ve farklı türler arasında yayılabilir
- Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında mortalite hızları yüksek

Tablo 1. Karbapenemazların sınıflaması ve başlıca özelliklerin karşılaştırılması.

Ambler sınıflaması	Sınıf A	Sınıf B	Sınıf D
Epidemiyolojik bölge	ABD, İngiltere	Japonya,Hindistan	Türkiye, Ortadoğu
Plazmid kaynaklı	KPC,GES	NDM	--
Kromozal	NmcA, SME	VIM-2,IMP-1, IMP-2	OXA-23, OXA-48, OXA-181
Enzim aktif bölgesi	Serin	Zn	Serin
Genel inhibitörleri	Boronik asit. Klavulanat ile zayıf inhibisyon	Dipikolinik asit, EDTA	-
Beta-laktamlar üzerine etkileri	Monobaktamlar da dahil tüm beta-laktamlara (sefamisinler hariç) etkili. GES, monobaktamlara etkili değil ve karbapenemler üzerinde etkisi zayıf	Aztreonam dışında tüm beta-laktamlara etkili.	Karbapenemler üzerinde zayıf hidrolitik aktivite. Aztreonama etkili değil. Oksasilin ve kloksasilin üzerinde etkili.
Modifiye Hodge Testi	Pozitif	Değişken	Pozitif

Table 1. Plasmid-encoded carbapenemases of primary concern.⁷

Molecular Class	Functional Group	Enzyme	Endemic region
A ^a	2f	KPC	Argentina, China, Colombia, Greece, Israel, Italy, North America, Poland
B ^b	3	GES	Brazil
		NDM	China, India, Kenya
		IMP	China, Greece, Japan, India
		VIM	Brazil, France, Germany, Greece, India, Ireland, Italy, Japan, Lebanon, Poland, Portugal, UK
D ^a	2d	OXA	Africa, Belgium, Canada, Germany, Israel, Lebanon, Middle East, Morocco, Switzerland, Turkey

Notes. Key: KPC-*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; GES-Guiana extended spectrum; NDM-New Delhi metallo- β -lactamase; IMP-active on imipenem; VIM-Verona integron-encoded metallo- β -lactamase; GIM-German imipenemase; SPM-Sao Paulo metallo- β -lactamase; OXA-oxacillin-hydrolyzing.

^aClass A and D β -lactamases have serine at active site and are inhibited by clavulanic acid.

^bClass B β -lactamases (metallo-enzymes) utilize zinc at active site and are inhibited by EDTA.

Sınıf	Enzim	En sık görülen tür
Sınıf A	KPC, SME, IMI, NMC, GES	Enterobacteriaceae (<i>P. aeruginosa</i> ; <i>Acinetobacter</i> daha az)
Sınıf B (metallo- laktamaz)	IMP, VIM, GIM, SPM, IND, NDM	<i>P. aeruginosa</i> Enterobacteriaceae <i>Acinetobacter</i> spp.
Sınıf D	OXA	<i>Acinetobacter</i> spp. Enterobacteriaceae (OXA-48)

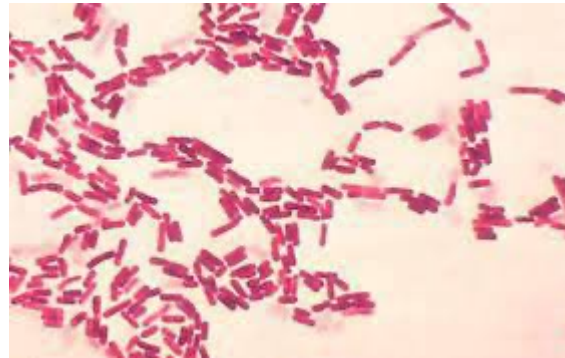
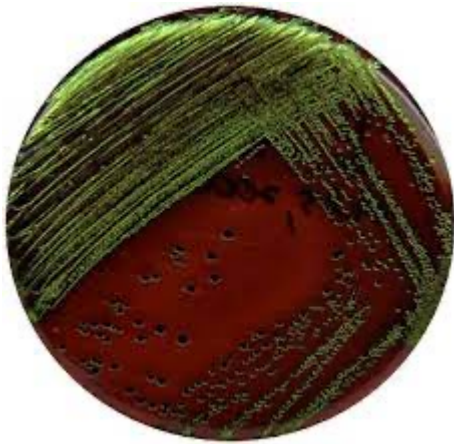
Direnç mekanizmasının saptanması önemli mi ?



Enfeksiyon kontrolü	EVET
Halk sağlığı	EVET
Antimikrobiyal duyarlılık saptanması için gereklidir	HAYIR

Karbapenemaz Tarama Testi Ne Zaman Yapılmalı ?

- Karbapenemlerden (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) birine karşı duyarlılığı azalmış suşlar tespit etmek için tarama gerekir



Carbapenems ¹	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R ≤	ATU
Doripenem	1	2		10	24	21	
Ertapenem	0.5	0.5		10	25	25	
Imipenem, <i>Enterobacterales</i> except <i>Morganellaceae</i>	2	4		10	22	19	
Imipenem ² , <i>Morganellaceae</i>	0.001	4		10	50	19	
Imipenem-relebactam, <i>Enterobacterales</i> except <i>Morganellaceae</i>	2 ³	2 ³		10-25	22	22	20-22
Meropenem (indications other than meningitis)	2	8		10	22	18	
Meropenem (meningitis)	2	2		10	22	22	
Meropenem-vaborbactam	8 ⁴	8 ⁴		20-10	20	20	15-19 ^A

Meropenem tarama önerisi

MIK değeri: > 0.125 mg/L

Zon çapı: < 28 mm



Piperasilin/ tazobaktam zon çapı 25-27 mm yada
temosilin direnci varsa doğrulama yapılmalı

Karbapenemaz Saptanmasında Kullanılan **Fenotipik** Yöntemler

- Kombinasyon Disk testi
- Biyokimyasal testler
- Karbapenem İnaktivasyon Testi (CIM)
- Maldi TOF MS
- Lateral Akım Yöntemleri
- Kültür Bazlı Metodlar
- Modifiye Hodge Testi
- Otomatize Sistem

Karbapenemaz Saptanmasında Kullanılan **Genotipik** Yöntemler

- PZR : polimeraz zincir reaksiyonu
- Klonlama ve sekanslama
- Oligonükleotid hibridizasyonu
- PGFE: Darbeli alan jel elektroforezi
- MLST: Çoklu bölge sekans tiplendirme

Modifiye Hodge Testi

Amaç: Karbapenemaz üreten suşların, testte kullanılan karbapenemi inhibe etmesi sonucu ve duyarlı indikatör (*E.coli*) suşunun inhibisyon zonundaki değişikliği yorumlanmasıdır.

- Yorumu açık
- Zamana bağlı
- Ulaşılabilir
- Maliyeti düşük

Modifiye Hodge Testi

- Besiyeri => Mueller Hinton Agar (MHA)
- Disk => Meropenem 10 µg ya da ertapenem 10 µg
- İndikatör => *E.coli* ATCC 25922 standart suşu

Uygulama

1. Standart suşu solüsyonu 1:10 oranında dilüe edilir (buyon yada serum fizyolojik ile 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlanır)
2. MHA besiyerine yayılır
3. Disk merkeze yerleştirilir

Modifiye Hodge Testi

4- Test edilecek suş yuvarlak öze ya da eküvyonla alınıp diskin etrafındaki bir noktadan başlayıp uzaklaşan 20-25 mm uzunluğunda çizgi şeklinde ekim yapılır

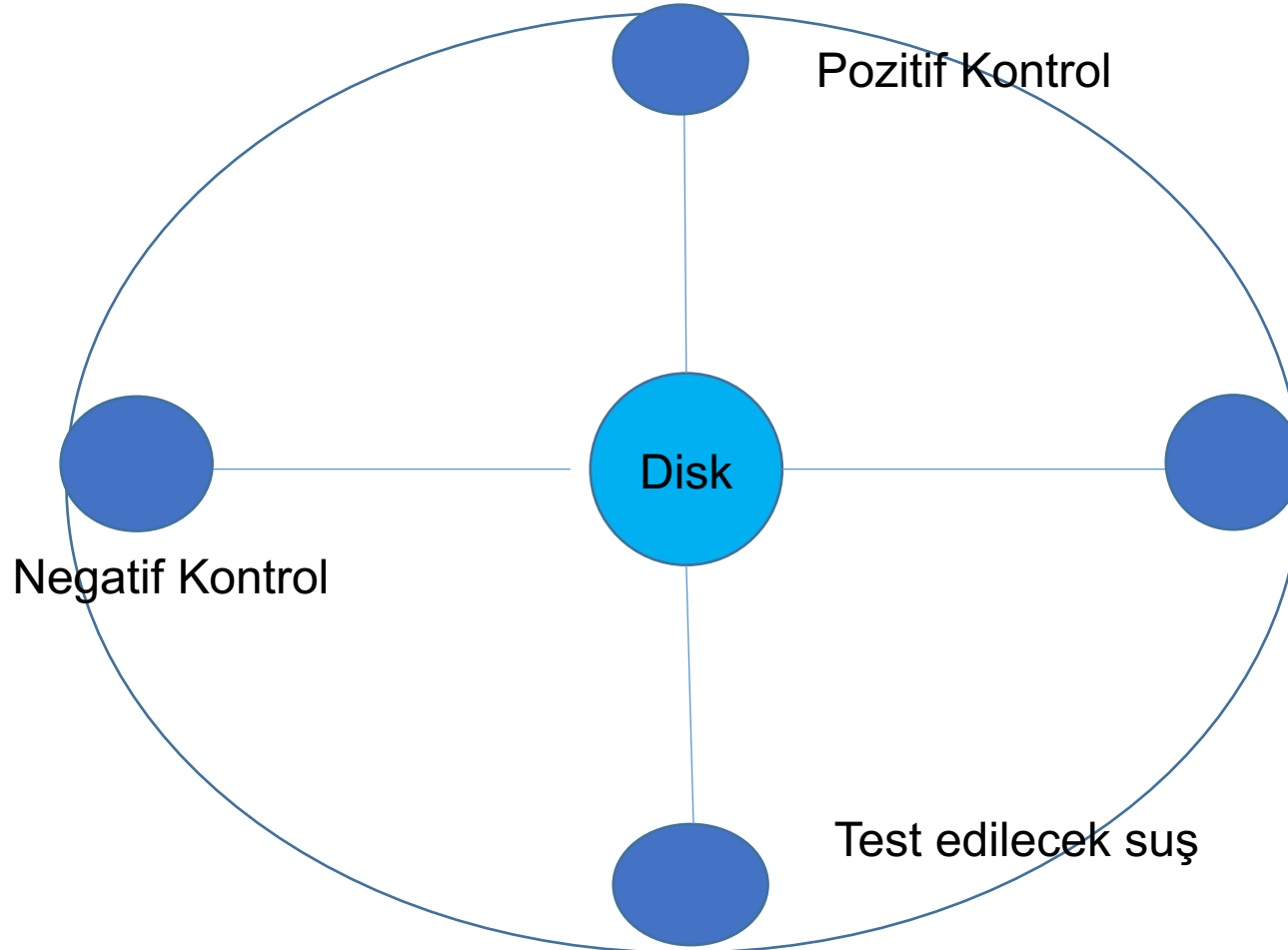
5- Etüvde, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16-24 saatlik inkübasyon

6- Mutlaka her plak pozitif ve negatif kontrol olmalı

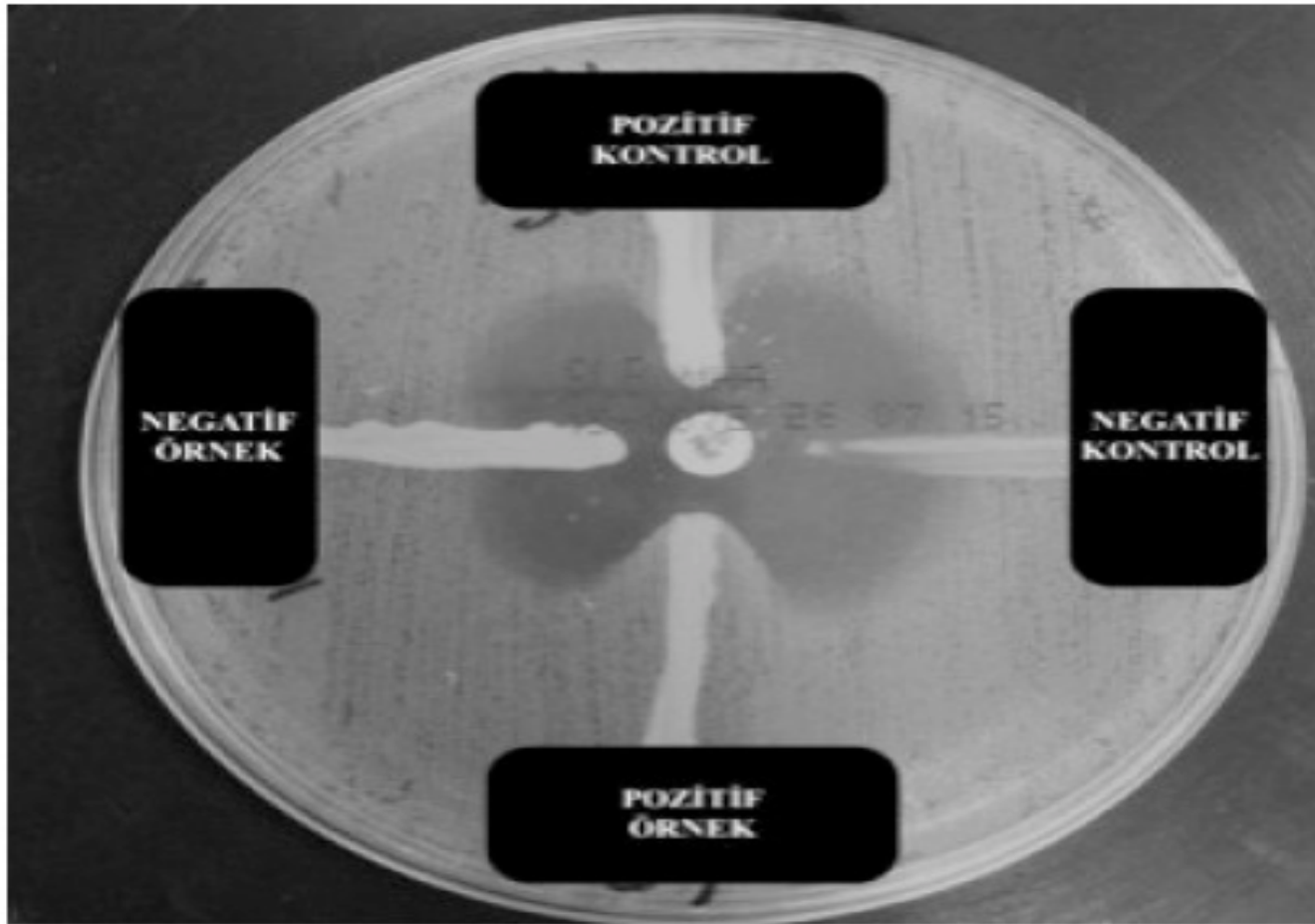
* Pozitif Kontrol : *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1705

* Negatif Kontrol : *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1706

Modifiye Hodge Testi



Modifiye Hodge Testi



Modifiye Hodge Testi

- KPC ve OXA-48 üreten suşlarda sonuçlar daha başarılı
- MBL üreten suşları saptamada duyarlılık daha düşük
- MBL tespitinde duyarlılık artırmak için MHA besiyerine **çinko** (Zn),
- AmpC üretimi ve porin kaybı gibi direnç mekanizmalarına bağlı yanlış pozitiflik oranını engellemek için besiyerine **kloksasilin** ilavesi yapılması önerilmektedir.

Hirsch EB et al. J Infect Chemother 2014;20(3):224-7.

Kim HK et al. Ann Lab Med 2015;35(3):298-305.

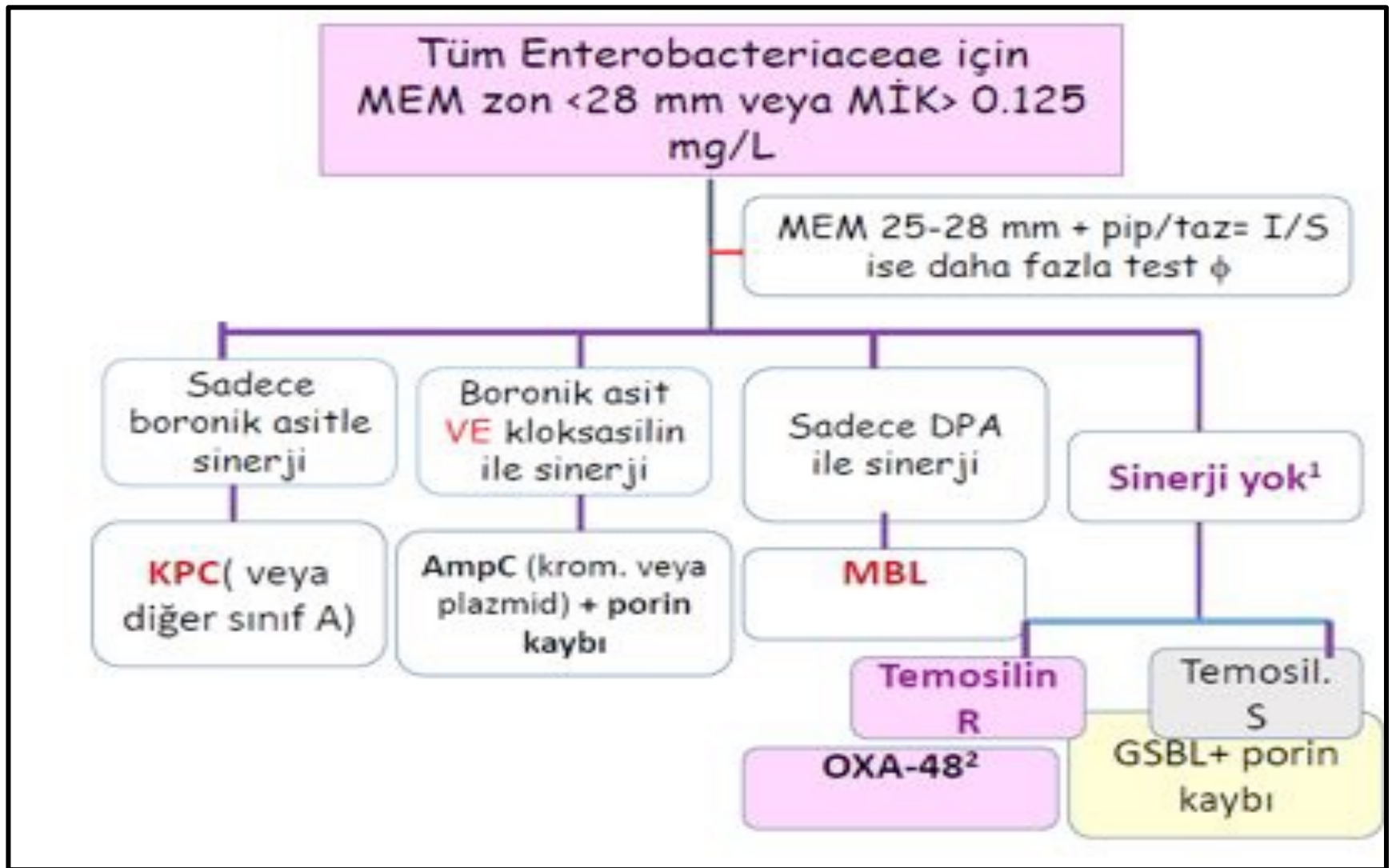
Modifiye Hodge Testi

- Test duyarlılığı ve özgüllüğü değişmektedir
- Yorumlanması zordur
- EUCAST bu testi artık önermemektedir.
- Kombinasyon disk testi
- Temosilin inhibisyon zon çapının değerlendirilen testler
- Biyokimyasal testler (örn: Carba NP)

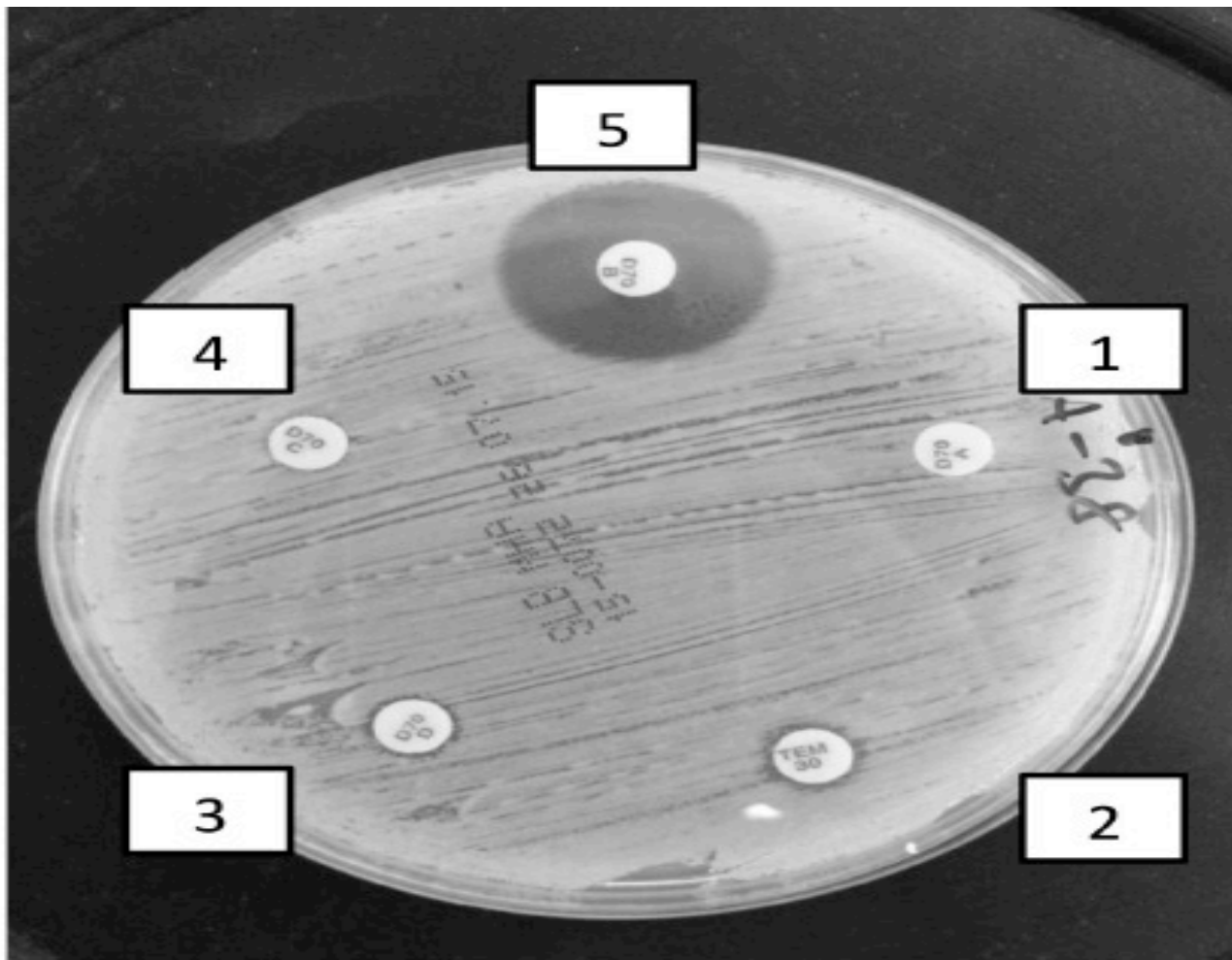
Kombine Disk Metodu

Karbapenem ve karbapenemaz inhibitörlerinin sinerjisine dayalı

	İnhibitör
MBL	Dipikolinik asit (DPA) (1000µg) EDTA
KPC	Fenilboronik asit (600 µg)
AmpC ve porin kaybı	Kloksasilin (750 µg)
OXA-48	Temosilin (30µg)



* Yüksek düzey temosilin direnci (MIC > 128 mg/L veya temosilin diski ile <11 mm zon: OXA-48 için fenotipik belirleyicidir.



Şekil 2. NDM-1 üreten *Klebsiella pneumoniae* suşunun meropenem+DPA diski ile inhibisyonu.

1-Meropenem, 2-Temosilin, 3-Meropenem+Kloksasilin-AmpC inhibitörü, 4-Meropenem+Boronik Asit-KPC inhibitörü, 5-Meropenem+Dipikolinik Asit (Metallobeta-laktamaz inhibitörü)

Kombine Disk Metodu

- Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek (> % 95)
- Maliyeti düşük
- Laboratuvarı kolay ulaşılabilir
- Ticari olarak bulunabilmesi (Mast, ROSCO)
- Bakterinin genotipi hakkında bilgi vermesi
- Dezavantajı ise bir gece inkübasyon (ortalama:18 saat)

Karbapenem İnaktivasyon Metodu

Karbapenemaz üretimi test edilecek suşla birlikte inkübasyona bırakılan karbapenem diskinin, bakterinin enzimiyle inaktivasyonunu test etmesidir.

- Standardizasyon gerekir →
 - Basit (pratik)
 - Ucuz
 - Kısa sürede sonuç verir
- Bakteri miktarı
 - İnkübasyon süreleri
 - Disk içeriği,
 - İnhibisyon zon çapı

Karbapenem İnaktivasyon Metodu

- Suda hazırlanan şüpheli bakteri süspansiyonu içine meropenem diski atılır
- İki saat inkübasyonda bekletilir.
- Disk alınır ve karbapenem duyarlı standart suşun (*E.coli* ATCC 25922) yayıldığı MHA agar plağına konur.
- Altı saat inkübasyonda bekletilir

Fig 1



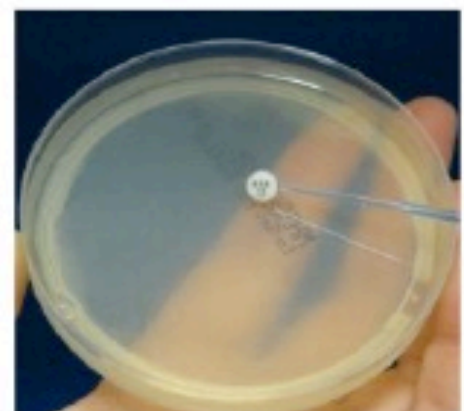
Suspend full loop of bacteria in H_2O



Add 10 μg meropenem disk



Incubate for 2 hours 35°C



Place on Mueller Hinton agar inoculated with *E. coli* ATCC 25922



Incubate for at least 6 hours 35°C



Read presence or absence of inhibition zone

+

Carbapenemase activity

-

No carbapenemase activity

Karbapenem İnaktivasyon Metodu

- Test edilen bakteride karbapenemaz varlığında meropenem diski inaktif olması nedeni ile *E.coli* suşu inhibisyon zonu oluşturmaz.
- *E.coli* suşu etrafında inhibisyon zonu oluşmuş ise test edilen bakteride karbapenemaz yoktur.

Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Karbapenem İnaktivasyon Testi ve Modifiye Hodge Testinin Karşılaştırılması

Comparison of Carbapenem Inactivation Test and Modified Hodge Test in Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Strains

Ismail Davarcı¹, Mücahide Esra Koçoğlu², Ferhat Zengin²

¹Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Erzincan, Türkiye

²İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

	Meropenem	İmipenem	Ertapenem
Modifiye Hodge Testi	60.9	62.5	68.8
Karbapenem İnaktivasyon testi (6.saat)	32.8	75.0	96.9
Karbapenem İnaktivasyon testi (24.saat)	64.1	84.4	96.9

Biyokimyasal Yöntemler

- Karbapenem hidroliz reaksiyonunun oluşturduğu pH değişikliğinin indikatör maddeler (fenol kırmızısı, brom-timol mavisi vb.) kullanılarak renk değişimi ile gösterilmesi esasına dayanan yöntemlerdir.
- Ucuz
- Hızlı (2 saat)
- Tekrarlanabilir
- Duyarlılık ve özgüllük yüksek

Biyokimyasal Yöntemler

- Fenol kırmızısı bazlı Carba NP testi (kırmızı => sarı)
- Brom timol bazlı Blue-Carba testi => (mavi => sarı)
- Karbapenemaz üreten tüm suşlar için kuyucukların rengi değişir.
- Karbapenemaz üretmeyenlerde renk değişikliği olmaz.

CarbaNP (Carbapenemase Nordmann-Poirel) Testi

1) Fenol kırmızısı: pH belirteci

2) Karbapenem: imipenem
(karbapenemaz substrat)
+ Çinko, metallo-bağımlı
karbapenemaz üreten suşların
tespit edilmesi için gereklidir



OXA-48 üreten bakterilere karşı
duyarlı olmayabilir

DÜNYADAKİ TÜM LABORATUVARLARA UYARLANABİLİR

TARAMA

ChomIDTM CARBA
ChomIDTM CARBA SMART
ChomIDTM OXA - 48

Yetersiz biyokütle olması
halinde önerilen besiyeri
üzerinde pasaj

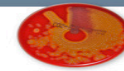


TEYİT



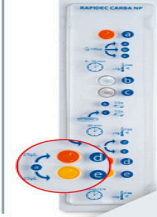
DIAGNOSTIC

ID AST yöntemi +
saf koloni olan petri



Karbapenemaz üreticileri
TEYİDİ

Genişletilmiş karbapenem MİK
Etect™, ETP, IP, MP, DOR



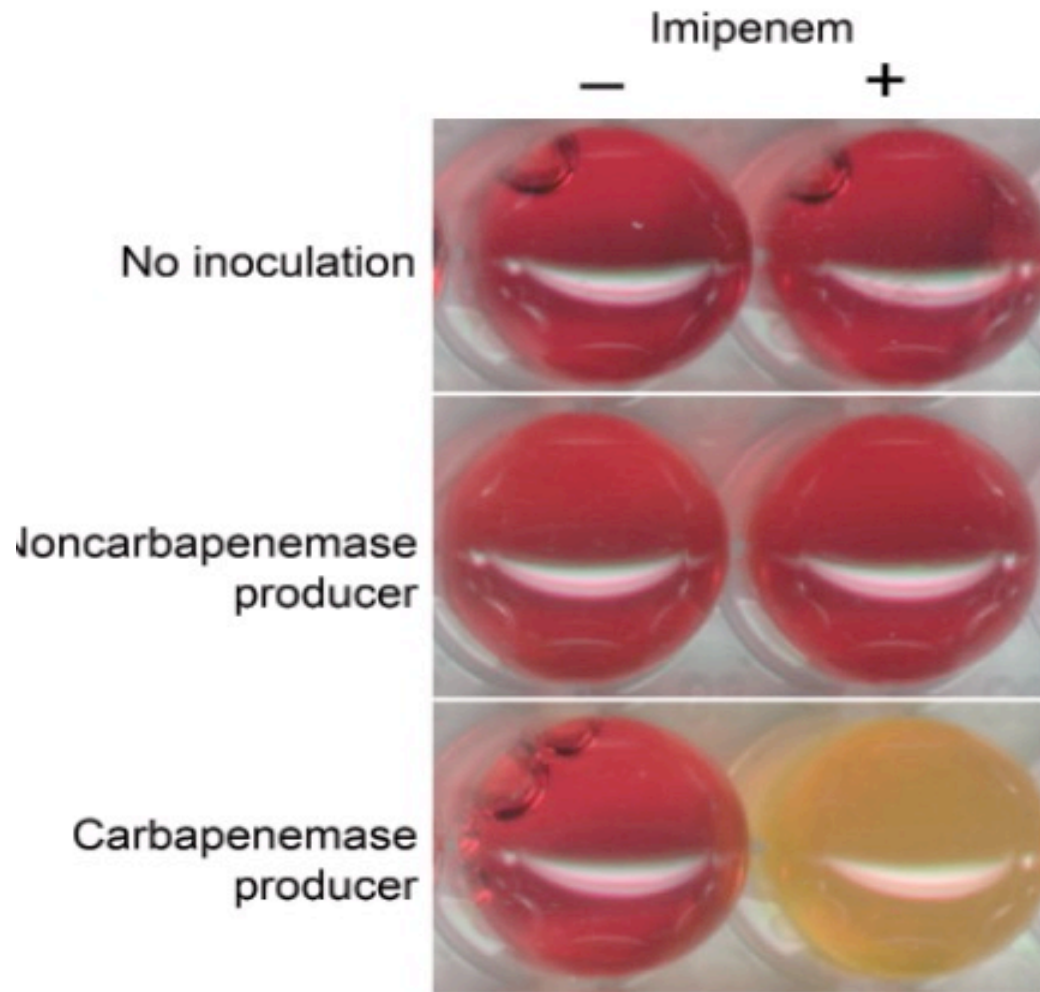
OKUMA VE YORUMLAMA

POZİTİF

NEGATİF



Biyokimyasal Yöntemler



Strategy for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae

Article in *Emerging Infectious Diseases* · September 2012

DOI: 10.3201/eid1809.120355 · Source: PubMed

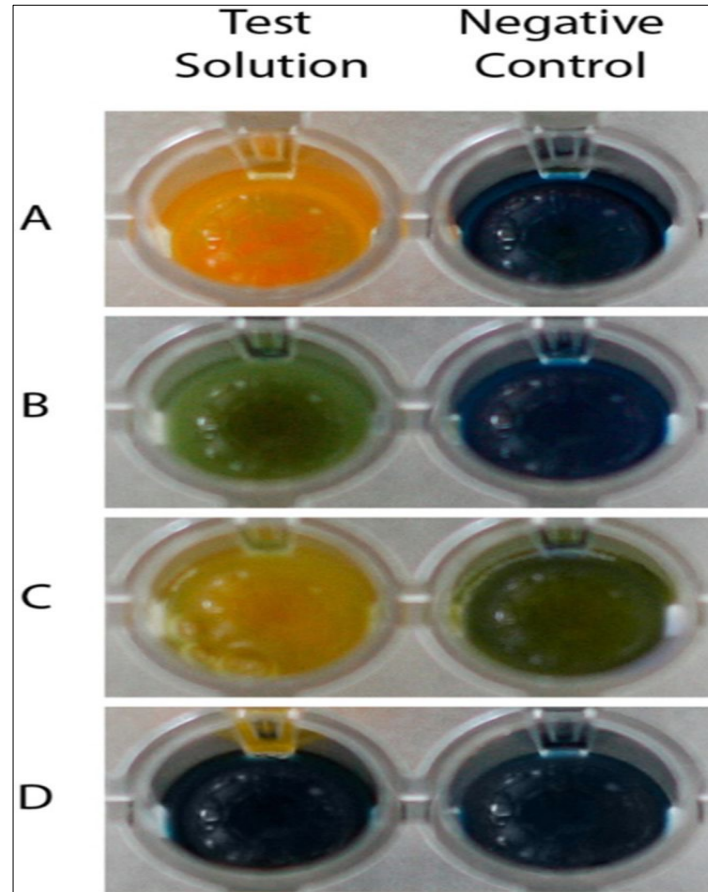
- Rapidec Carba NP
- 162 adet karbapenemaz üreten suşlar incelenmiş.
- Tüm test edilen suşlarda renk değişikliği meydana gelmiş
- KPC üreten suşlarda renk değişikliği 5- 10 dk içinde oluşmuş
- Duyarlılık ve özgüllük % 100 olarak bildirilmiş.

- Rapidec Carba NP testin duyarlılık ve özgüllük % 96
Poirel L et al. J Clin Microbiol 2015; 53: 3003-8
- Rapidec Carba NP testinde yanlış negatif test sonuçlar olabilir
**Proteus mirabilis*, *Providencia* türlerinde,
*Mukoid izolatlarda ve NDM enzimi pozitif izolatlar
Hombach M et al. J Clin Microbiol 2015; 53: 3828.
- Rapidec Carba NP testin duyarlılık % 99 ve özgüllük %100
Aktaş E et al. Microb Drug Resist 2017; 23: 457

Blue-Carba testi (BCT)

- Doğrudan bakteri kültürlerinden karbapenemaz üreten suşların saptanması için onaylanmış, modifiye edilmiş bir test (Blue-Carba)
- Önceden lizis yapılmadan doğrudan teste eklenen bakteri kolonilerinin imipenemi hidrolize etmesini; pH değişikliği oluşması ve bunun sonucunda indikatör olan brom timol mavisinin renginin, maviden yeşil/sarıya veya yeşilden sarıya değişmesi ile saptamaktadır

Blue-Carba testi (BCT)



Evaluation of the Blue-Carba Test for Rapid Detection of Carbapenemases in Gram-Negative Bacilli

Fernando Pasteran, Omar Veliz, Paola Ceriana, Celeste Lucero, Melina Rapoport, Ezequiel Albornoz, Sonia Gomez, Alejandra Corso, ReLAVRA Network Group

Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional y Regional de Referencia en Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

- A ve B sınıfı enzimler açısından mükemmel duyarlılık gösterir
- OXA-48 enzimlerinin saptanmasında daha düşük performans sergiler

Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

João Pires ¹, Regula Tinguely ², Bodmer Thomas ³, Francesco Luzzaro ⁴, Andrea Endimiani ⁵

*30 karbapenemaz salgılayan

*33 karbapenemaz salgılamayan suş

- Her iki testte duyarlılık % 100
- Özgüllük

* Carba-NP => % 98.9

* Blue-Carba => % 91.7

Rutin laboratuvarlarda kullanıma uygun olarak değerlendirilmektedir

J Antimicrob Chemother 2016

doi:10.1093/jac/dkv283

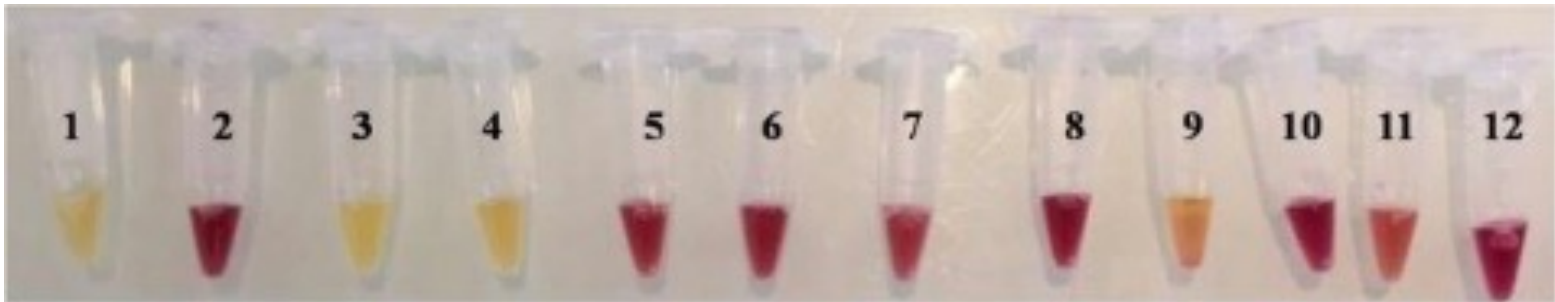
Advance Access publication 15 September 2015

Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test

- Carba NP (bioMérieux, Fransa) ile CIM
- Duyarlılık benzer
- Daha kısa (10 dk-2 saat)
- CIM özgüllüğü düşük
- OXA-48 üretenlerde yalancı negatif sık gözlenmiş (CarbaNP)

Beta Carba Testi

- 1- 3 koloni test reaktifleri ile karıştırılmalı
- Değerlendirme 30 dk inkübasyon sonunda yapılır
- Renk sarıdan turuncu, kırmızı veya mora değişmesi pozitif
- OXA-48 üreten izolatlar için inkübasyon süresi 60 dk olması önerilir



Kültür Bazlı Metotlar

Klasik CDC

- Rektal sürüntü örnekleri 5 ml triptik soya buyyon besiyeri 10 µg'lık karbapenem diski konulur
- Sıvıya konulan rektal sürüntü örneği 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon
- İnkübasyon sonrasında vortekslenip 100 µl'lik öze ile MacConkey agara ekilir ve bir gece inkübe edilir.
- Laktoz pozitif, oksidaz negatif koloni Modifiye Hodge Testi yapılır.
- Sadece *E.coli* ve *Klebsiella spp* için doğrulanmıştır

Direkt Karbapenem Disk Yöntemi

- Kültür bazlı metotlardan biridir.
- Klinik örnekler MacConkey agar ekilir
- Ekim sahalarına karbapenem diski konulur
- İnkübasyon sonrası zon içinde üreyen koloniler değerlendirilir

Kromojenik Besiyerleri

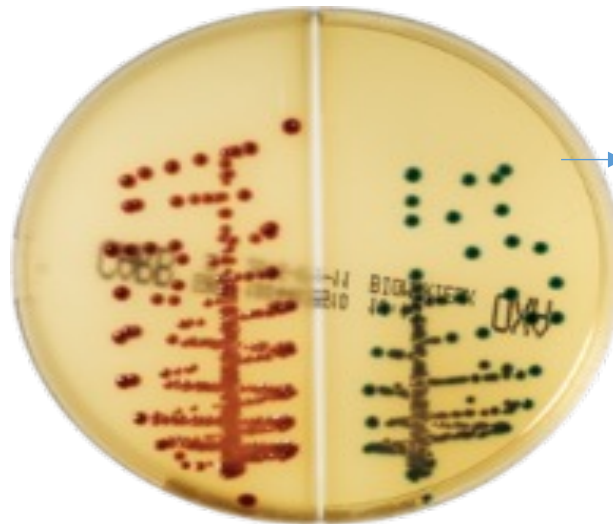
- Taramalarda kullanılır
- Besiyerlerin içinde Gram pozitif ve karbapenemaz üretmeyen Gram negatif bakterilerin üremesini inhibe eden spesifik ajanlar vardır.
- Klinik örneklerde ve rektal taramalarda hedeflenen kolonilerin rahatça seçilmesini sağlar
- Renk değişimine göre değerlendirilir.

Kromojenik Besiyerleri

- ChromID CARBA
- SUPERCARBA
- Brilliance CRE
- CHROMagar KPC
- OXA-48 besiyeri

chromID® CARBA SMART

- KPC, NDM-1 ve OXA-48 taraması yapılır.
- Hem rektal eküvyon hemde dışkı örnekleri için onaylı
- 18-24 saat inkübasyon süresi



POZİTİF



ELSEVIER

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio



Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems ☆,☆☆

Delphine Girlich, Laurent Poirel, Patrice Nordmann *

Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 "Emerging Resistance to Antibiotics", Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine et Université Paris Sud, K-Bicêtre, France

Sensitivity and specificity of SUPERCARBA, Brilliance CRE, and CHROMagar KPC media.

	Selection medium		
	SUPERCARBA	Brilliance CRE	CHROMagar KPC
Sensitivity (%)	96.5	76.3	43
Specificity (%)	60.7	57.1	67.8
Sensitivity class A ^a	100	85	70
Sensitivity class B	92	78.4	58.8
Sensitivity class D	100	69.8	11.6

^a Sensitivity was determined for each Ambler class of carbapenemase.

Tablo 1. Rektal Karbapeneme Dirençli *Enterobacteriaceae* Saptama Yöntemlerinin 24. Saatteki Duyarlılık ve Özgüllüklerinin Değerlendirilmesi

Yöntemler	KDE Taşıyıcılığı Var (n=46)			KDE Taşıyıcılığı Yok (n=54)			Toplam (n=100)		
	ChromID CARBA	Direkt MacConkey	Klasik CDC	ChromID CARBA	Direkt MacConkey	Klasik CDC	ChromID CARBA	Direkt MacConkey	Klasik CDC
Test (+)	42	40	36	1	11	31	43	51	67
Test (-)	4	6	16	53	43	23	57	49	33
Toplam	46	46	46	54	54	54	100	100	100
Duyarlılık (%)							91	87	78
Özgüllük (%)							98	80	42

DUYARLILIK = Söz Konusu Yöntemle Belirlenmiş Gerçek KDE Taşıyıcıları / KDE Taşıyıcısı Olanların Toplamı x 100

ÖZGÜLLÜK = Söz Konusu Yöntemle Belirlenmiş Gerçek KDE Taşıyıcılığı Olmayanlar / KDE Taşıyıcısı Olmayanların Toplamı x 100

Table 3. Evaluations of culture-based CRE screening methods on rectal or perirectal swabs.

Method	No. of specimens tested	Carbapenemases (no. isolates)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	References
CDC protocol	177	KPC (85)/VIM (1)	98.8	80.2	55
	200	KPC (63)/VIM (29)	89.1	86.4	58
	149	KPC (33)	65.6	49.6	57
	126	KPC (46)	78.3	100	56
	302	OXA-48 (33)	57.6	95.2	59
MacConkey agar with carbapenem disk	139	KPC (33)	75.8	89.6	51
	122	KPC (41)	92.7	95.9	61
	187	KPC (54)	87	100	62
	150	KPC (47)	83	73.8	63
	189	KPC (60)/VIM (9)/KPC & VIM (26)/OXA-48 (3)	96.9	98.9	64
MacConkey agar with imipenem	139	KPC (33)	84.9	94.3	51
	755	KPC (64)	87.5	99.4	65
	177	KPC (85)/VIM (1)	89.5	31.9	55
	126	KPC (33)/VIM (13)	78.3	97.5	66
MacConkey agar with meropenem	200	KPC (63)/VIM (29)	89.1	85.2	58
CHROMagar KPC	139	KPC (33)	84.9	88.7	51
	122	KPC (41)	100	98.4	61
	95	KPC (66)	77.3	100	70
	150	KPC (47)	76	75.7	63
	126	KPC (33)/VIM (13)	97.8	98.7	66
chromID Carba	177	KPC (85)/VIM (1)	96.5	91.2	55
	200	KPC (63)/VIM (29)	92.4	96.9	58
	302	OXA-48 (33)	57.6	98.9	59
chromID OXA-48	302	OXA-48 (33)	75.8	99.3	59
Brilliance CRE	77	OXA-48 (10)	80	86.6	83
HardyChrom	126	KPC (46)	76.1	100	56
Supercarba	77	OXA-48 (10)	80	98.5	83
SpectraCRE	150	KPC (47)	97.8	86.4	63

MALDI-TOF MS

- Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
- Bakteri ve fungusların identifikasyonunda
- Araştırma laboratuvarlarında ve rutin diagnostik pratiğinde kullanılır

MALDI-TOF MS

- Analitik bir yöntem (Lazer ile küçük kütlelere ayrılan ve iyonize olan moleküllerin uçuş patern analizi)
- Bakteride karbapenemaz varlığı durumunda karbapenem kullanılarak hidrolitik ürünlerin analizi sayesinde kısa sürede karbapenemaz üretimini saptayabilmektedir



MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials

B. Ghebremedhin^{1*†}, A. Halstenbach^{1†}, M. Smiljanic¹, M. Kaase² and P. Ahmad-Nejad¹

- Katı besiyerindeki koloni ve kan kültür şişesinden direkt ekim
- 63 tane karbapenemaz üreten /35 tane karbapenemaz üretmeyen
- Katı kültürden => % 100, Kan kültür => % 96
- 1-4 saat arasında sonuçlanır.
- *A.baumannii* => katı besiyerinde direkt koloni pasaj

and sequencing.

Results: For culture isolates the concordance of hydrolysis assay to genetic results was 98 % for OXA variants, KPC, VIM, IMP, GIM, and NDM. In contrast, only 14 of 29 *Acinetobacter baumannii* isolates carrying the OXA and NDM genes could be identified from blood culture. However, from blood culture vials our method allowed the detection of carbapenemases in 98 % of *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* isolates harboring different genes.

Conclusions: This MALDI-TOF MS–based assay permitted the detection of carbapenemases either from solid culture media (98–100 %) or blood culture vials (96 %) for all non-*A. baumannii* isolates within 4 h. In case of *A. baumannii* isolates the assay was highly sensitive for the detection of carbapenemases directly from solid culture media.

Keywords: MALDI-TOF MS, Carbapenemases, *Acinetobacter baumannii*, MDR Gram-negative bacteria, Hydrolysis

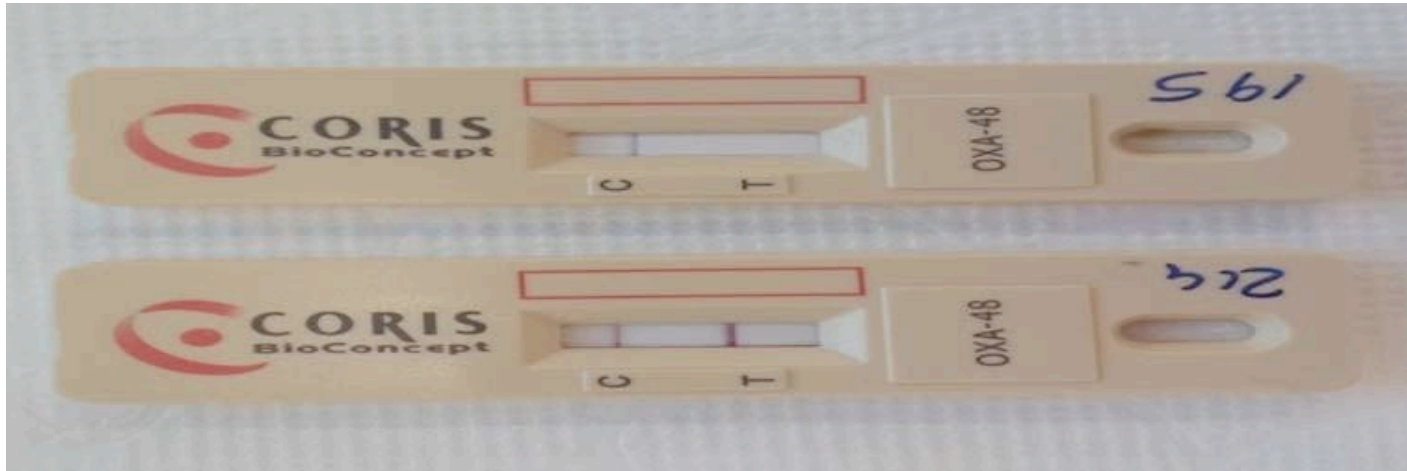
İmmünokromatografik Yöntem

- İmmünolojik reaksiyon temeline bağlıdır.
- Kromatografik kağıtta sabitlenmiş antikorla örnekte bulunan antijenin birleşmesi sonucu oluşan immune kompleks, kağıtta renk değişimi oluşturmakta ve böylece antijen ya da antikor varlığı test edilebilmektedir.

İmmünokromatografik Yöntem

- Karbapenemaz enzimlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikolarlar sayesinde karbapenemaz saptanabilir.
- Duyarlılık ve özgüllük çok yüksek
- Test yaklaşık 4 dakika sürmektedir.

KPC-K-SeT

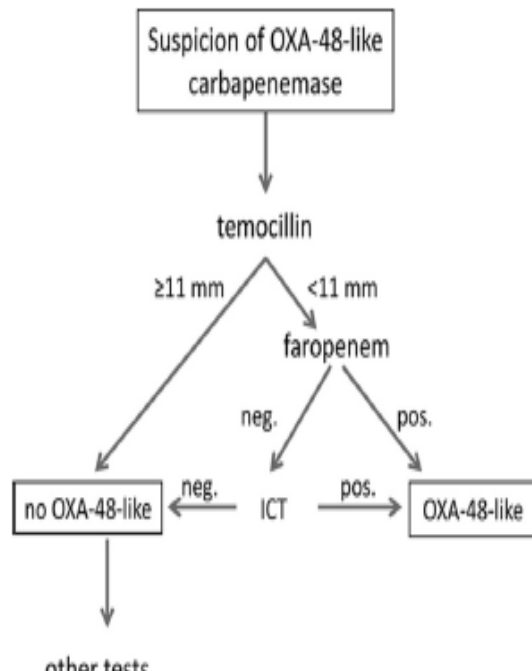


OXA-48 K-SeT ve KPC-K-SeT (Coris BioConcept, Belçika)



Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases

Florian Koroska,^a Stephan Göttig,^b Martin Kaase,^{c*} Jörg Steinmann,^d
Sören Gatermann,^c Julian Sommer,^b Thorsten Wille,^{a,e} Georg Plum,^a
Axel Hamprecht^{a,e}



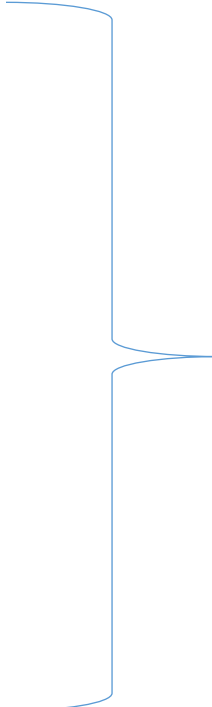
- 166 Enterobacteriaceae izolat
- OXA-48 karbapenemaz : 84
- Sınıf A ve B karbapenemaz :41
- Karbapenemaz üretmeyen : 41

İmmünokromatografik yöntem

- Duyarlılık % 100
- Pahalı bir yöntem

GENOTİPİK TESTLER

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

- *blaVIM*,
 - *blaKPC*,
 - *blaIMP*,
 - *blaNDM*,
 - *blaOXA-48*
- 
- 40 dk- 6 saat
 - Duyarlılık ve özgüllük yüksek

Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria

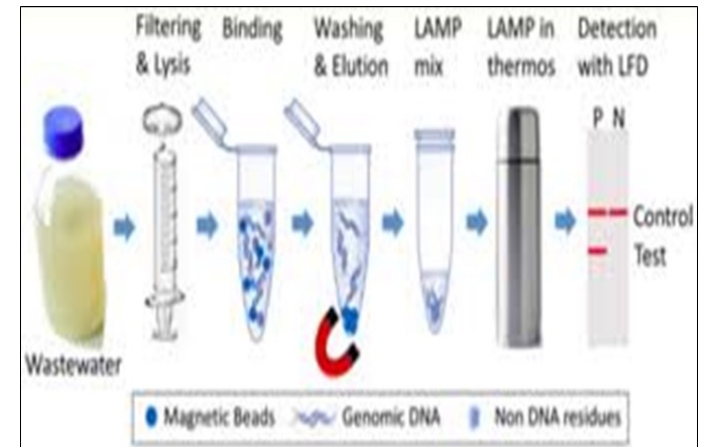
Jacqueline Findlay, Katie L. Hopkins, Daniele Meunier and Neil Woodford*

Table 2. Performance of three commercial kits for detecting carbapenemase genes in bacterial isolates

	Check-Direct CPE on the ABI 7500	Check-Direct CPE on the BD MAX TM	eazyplex [®] SuperBug complete A	Xpert [®] Carba-R
Assay coverage	KPC, OXA-48-like, NDM/VIM ^a	KPC, OXA-48-like, NDM, VIM ^a	KPC, OXA-48, NDM, VIM	KPC, OXA-48, NDM, VIM, IMP-1-like
Big five carbapenemases NOT detected	IMP family	IMP family	some OXA-48-like; IMP family	some OXA-48-like; some IMP subgroups
Hands on time per sample	<5 min	<5 min	~3–4 min	~1–2 min
Assay run time	~1.75 h	~2.5 h	20 min	~50 min
Sample throughput	up to 94 tests in a batch	up to 22 tests in a batch	1 or 2 independent tests	1–80 independent tests ^b
Assay performance				
KPC (n=100)	100%	100%	100%	100%
OXA-48-like (n=100)	100%	100%	83% ^c	83% ^c
NDM (n=100)	100% ^a	100%	100%	100%
VIM (n=100)	100% ^a	100%	100%	100%
IMP (n=24)	N/A	N/A	N/A	71% (17/24) ^d
NDM+OXA-48-like (n=2)	2x NDM; 2x OXA-48	2x NDM; 2x OXA-48	2x NDM; 1x OXA-48 ^c	2x NDM; 1x OXA-48 ^c
non-carba (n=24)	0%	0%	0%	0%

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

- 4-6 primer kullanılır
- İzotermal şartlarda (60-65°C)
- Süre 60 dakika
- NDM-1 geni tespitinde % 100 duyarlı
- Pahalı
- Sadece tanımlanmış genleri tespit eder.



Oligonükleotid Hibridizasyon Yöntemi

- DNA hibridizasyon yöntemi mikroçip formatında, bir örnekten kısa sürede önemli alt tipleri çalışabilen, duyarlı ve özgül bir karbapenemaz saptama yöntemi
- Rutin laboratuvarlarda kullanımının yaygınlaşması zor
- Araştırma ve referans laboratuvarları için uygun

Genotipik Testler

- Klonal ilişkinin moleküler analizi
- Pulsed field gel electrophoresis” (PFGE)
- Multilokus sekans tipleme (MLST)

*Epidemiyolojik çalışmalar

*Yüksek riskli suşların analizi

*Salgın durumlarında (salgın ve sporadik suş)

TEŞEKKÜR EDERİM

