



BÖLÜM 40

GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN TANISI, DİRENÇ VE KONTROLÜNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KULLANIMI

Özgen ESER¹

Gram negatif bakteriler ile gelişen enfeksiyonlar dünyada hızlı artış göstermektedir. Antimikrobral direncin seçilmesi ile yeni antimikrobial direnç mekanizmalarının kazanılması *Escherichia coli*, *Klebsiella* gibi Enterobacterales ailesine ait gram negatif basillerde sık görülmektedir. Gram negatif bakterilerde direncin hızlı artışı, sağlık ilişkili mortaliteyi ve maliyeti artırmaktadır¹. Dünya Sağlık Örgütü, 2017 yılında üçüncü kuşak sefalosporin ve/veya karbapenem dirençli Enterobacterales, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*'da yeni antibiyotik keşfini ve geliştirilmesini küresel olarak öncelik verilmesi gereken en önemli konu olarak açıklamıştır (<https://www.who.int/news-room>).

Yeni enfeksiyonların ortaya çıkışları, dirençli mikroorganizmaların artışı, geleneksel yöntemlerle bakterilerin saptanmasında yaşanan zorluklar özellikle hastane enfeksiyonlarının artmasında önemli rol oynamaktadır. *P.aeruginosa*, gram negatif nozokomiyal enfeksiyonların ilk sırasında yer almaktı ve bunları bakteriyemi, pnömoni, endokardit ve menenjitin yanı sıra idrar yolu, oküler,

kemik ve deri/yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olan iki önemli gram negatif patojen olan *A. baumannii* ve *Stenotrophomonas maltophilia* takip etmektedir^{2,3}.

Multipleks moleküler tanı sistemleri, tek bir klinik sendroma neden olabilen birçok patojeni tanımlayabilme kapasitesine sahip sistemlerdir. İki binli yılların sonuna doğru ortaya çıkan bu yaklaşımı 'sendromik panel' adı verilmektedir. Bu testlerin tasarımda ve geliştirilmesinde yaşanan yenilikler, birçok üretici firmanın son 10 yıl içinde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında ileri düzeyde portföylerinin genişlemesine neden olmuştur⁴.

Antibiyotik direncinin saptanmasında mikroorganizmanın üremesine dayalı konvansiyonel fenotipik testler direncin saptanmasını sağlasa da, klinik örneğin alınmasından sonucun bildirilmesine kadar geçen sürenin 36-72 saat gibi uzun olması nedeniyle tanı ve tedavi açısından dezavantajlara sahiptir. Mikrobiyal üremeye dayalı moleküler yöntemler çok daha hızlı bir şekilde 1-4 saat içinde sonuç vererek tedavi kararının erken verilmesinde hayatı önem taşımaktadır⁵.

¹ Prof. Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tibbi Mikrobiyoloji AD, Ankara, ozgen.eser@hacettepe.edu.tr

moleküler tiplendirme yönteminin epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatların ayrım gücünü etkilemektedir. Birçok tiplendirme yönteminin avantajlı yönleri olduğu gibi kısıtlılık gösteren yönleri de bulunmaktadır. Bazı durumlarda moleküler tiplendirme yönteminin ayrıt ediciliği ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması söz konusuyken, diğer yandan aynı yöntemde elde edilen sonuçların yorumlanması zor olabilmekte ve pahalı ekipman gerektirmektedir. Gram negatif bakterilerin moleküler tiplendirmesinde seçilecek yöntemin amaçlanan hedefe uygun olarak laboratuvarın alt yapısı ve kaynakları göz önüne alınarak karar verilmesi doğru bir yaklaşım olacaktır.

Kaynaklar

- Cassini A, Höglberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European economic area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2019;19(1): 56-66.
- Khan HA, Baig FK, Mehboob R. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017;7(5): 478-82.
- Alqahtani JM. Emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* nosocomial isolates in a Saudi children's hospital. Risk factors and clinical characteristics. *Saudi Med J* 2017;38(5): 521-7.
- Couturier MR, Bard JD. Direct-from-specimen pathogen identification: evolution of syndromic panels. *Clin Lab Med* 2019;39(3): 433-451.
- Burnham CD, Leeds J, Nordmann P, O'Grady J, Patel J. Diagnosing antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol* 2017;15: 697e703.
- Lutgring JD, Limbago BM. The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-Enterobacteriaceae detection. *J Clin Microbiol* 2016;54(3): 529-34.
- Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med* 2017;37(2): 303-315.
- Traczewski MM, Carretto E, Canton R, Moore NM; Carba-R Study Team. Multicenter evaluation of the Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase genes in gram-negative isolates. *J Clin Microbiol* 2018; 56(8): e00272-18.
- She RC, Bender JM. Advances in rapid molecular blood culture diagnostics: healthcare impact, laboratory implications, and multiplex technologies. *J Appl Lab Med* 2019;3: 617-30.
- Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(9): 944-955.
- De Angelis G, Grossi A, Menchinelli G, Boccia S, Sangüinetti M, Posteraro B. Rapid molecular tests for detection of antimicrobial resistance determinants in Gram-negative organisms from positive blood cultures: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(3): 271-280.
- Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care* 2015;5(1): 61.
- Dien Bard J, Alby K. Point-counterpoint: Meningitis/encephalitis syndromic testing in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2018;56(4):e00018-18.
- Banerjee R, Teng CB, Cunningham SA, Ihde SM, Steckelberg JM, Moriarty JP, et al. Randomized trial of rapid multiplex polymerase chain reaction-based blood culture identification and susceptibility testing. *Clin Infect Dis* 2015; 61(7): 1071-80.
- Juttukonda LJ, Katz S, Gillon J, Schmitz J, Banerjee R. Impact of a rapid blood culture diagnostic test in a children's hospital depends on gram-positive versus gram-negative organism and day versus night shift. *J Clin Microbiol* 2020;58(4): e01400-19.
- Holmquist L, Russo CA, Elixhauser A. Meningitis-Related Hospitalizations in the United States, 2006. In: Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2006.
- Tansarli GS, Chapin KC. Diagnostic test accuracy of the BioFire(R) FilmArray(R) meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(3): 281-290.
- Garau J, Baquero F, Pérez-Trallero E, Pérez JL, Martín-Sánchez AM, García-Rey C, et al. Factors impacting on length of stay and mortality of community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(4): 322-9.
- Torres A, Lee N, Cilloniz C, Vila J, Van der Eerden M. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur Respir J* 2016;48(6): 1764-1778.
- Jamal W, Al Roomi E, AbdulAziz LR, Rotimi VO. Evaluation of Curetis Unyvero, a multiplex PCR-based testing system, for rapid detection of bacteria and antibiotic resistance and impact of the assay on management of severe nosocomial pneumonia. *J Clin Microbiol* 2014;52(7): 2487-92.
- Lee SH, Ruan SY, Pan SC, Lee TF, Chien JY, Hsueh PR. Performance of a multiplex PCR pneumonia panel for the identification of respiratory pathogens and the main determinants of resistance from the lower respiratory tract specimens of adult patients in intensive care units. *J Microbiol Immunol Infect* 2019;52(6): 920-928.
- Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2015;53(3): 915-25.
- Harrington SM, Buchan BW, Doern C, Fader R, Ferraro MJ, Pillai DR, et al. Multicenter evaluation of the BD max enteric bacterial panel PCR assay for rapid detection of *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. (*C. jejuni* and *C. coli*), and *Shiga* toxin 1 and 2 genes. *J Clin Microbiol* 2015; 53(5): 1639-4.
- Mhaiissen MN, Rodriguez A, Gu Z, Zhu H, Tang L, Sun Y, et al. Epidemiology of diarrheal illness in pediatric oncology patients. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2017;6(3): 275-280.
- Beal SG, Tremblay EE, Toffel S, Velez L, Rand KH. A gastrointestinal PCR panel improves clinical management and lowers health care costs. *J Clin Microbiol* 2018;56(1):



- e01457-17.
26. Khalifa HO, Okanda T, Abd El-Hafeez AA, El Latif AA, Habib AGK, Yano H, et al. Comparative evaluation of five assays for detection of carbapenemases with a proposed scheme for their precise application. *J Mol Diagn* 2020;22(9): 1129-1138.
 27. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2017;55(8): 2321-2333.
 28. Tenover FC, Dela Cruz CM, Dewell S, Le VM, Tickler IA. Does the presence of multiple β -lactamases in gram-negative bacilli impact the results of antimicrobial susceptibility tests and extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase confirmation methods? *J Glob Antimicrob Resist* 2020;23: 87-93.
 29. Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77(3): 179-94.
 30. Yamamoto N, Hamaguchi S, Akeda Y, Santanirand P, Kerdsin A, Seki M, et al. Clinical specimen-direct LAMP: A useful tool for the surveillance of bla_{OXA-23} -positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2015;10(7): e0133204.
 31. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC, Jacobs MR, et al. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type beta-lactamase genes in gram-negative isolates. *J Clin Microbiol* 2010;48(7): 2618-22.
 32. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18(6): 426-39.
 33. MacCannell D. Bacterial strain typing. *Clin Lab Med* 2013;33(3): 629-50.
 34. McDade JE, Anderson BE. Molecular epidemiology: applications of nucleic acid amplification and sequence analysis. *Epidemiol Rev* 1996;18(1): 90-7.
 35. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 2013;16: 38-53.
 36. Ehrlich GD, Post JC. The time is now for gene- and genome-based bacterial diagnostics: "you say you want a revolution". *JAMA Intern Med* 2013;173(15): 1405-6.
 37. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2004;186(5): 1518-1530.
 38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington County Fair-New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48(36): 803-5.
 39. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Schuetz F, et al. Origins of the *E.coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med* 2011;365(8): 709-17.
 40. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(1): 43-8.
 41. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(12): 4606-10.
 42. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(11): 4930-3.
 43. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant gram negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35(5): 736-55.
 44. Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(9): 2022-7.
 45. Berg DE, Akopyants NS, Kersulyte D. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Method Mol Cell Bio* 1994;5(1): 13-24.
 46. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Method Mol Cell Biol* 1994;5(1): 25-40.
 47. Johnson JR, O'Bryan TT. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(2): 265-73.
 48. Ribot EM, Fair MA, Gautam R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 2006;3(1): 59-67.