

## İKİ YILLIK SÜREÇTE YAPILAN MODİFİYE HODGE TESTİ SONUÇLARININ İRDELENMESİ\*

Hikmet Eda ALIŞKAN<sup>1</sup>, Şule ÇOLAKOĞLU<sup>1</sup>, Ebru BOSTANOĞLU<sup>2</sup>, Tuba TURUNÇ<sup>3</sup>,  
Jülide Sedef GÖÇMEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ADANA

<sup>2</sup>Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

<sup>3</sup>Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ADANA

### ÖZET

Antibiyotiklere çoklu direnci olan Enterobacteriaceae suşları ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde karbapenemler tercih edilmekte; ancak son yıllarda Klebsiella pneumoniae karbapenemazı (KPC) üreten suşlar ile enfeksiyonlar da görülmektedir.

Direnç tespiti için altın standart moleküler yöntemler olmakla birlikte bu yöntemlerin çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bu yüzden Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) KPC'lerin tespitinde fenotipik yöntem olan "cloverleaf" testini (modifiye Hodge testi) önermektedir.

Çalışmada, Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarında modifiye Hodge testi uygulanmış ve sonuçları pozitif bulunmuş olan klinik örnekler retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya Temmuz 2009-Mart 2011 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemaz üretimi şüpheli 952 adet Enterobacteriaceae izolatı dahil edilmiştir. CLSI standartlarına göre modifiye Hodge testi yapılmış ve 13 izolatta (% 1.4) pozitif olarak saptanmıştır. Yarı otomatize sistem kiti kullanılarak izolatların 8'i (% 62) K.pneumoniae, 2'si (% 15) Escherichia coli, 2'si (% 15) Enterobacter aerogenes, 1'i (% 8) Klebsiella oxytoca olarak tanımlanmıştır. Bu suşların 5'i idrar, 4'ü kan, 2'si doku, 1'i batın içi ve 1'i plevra sıvısından izole edilmiştir. Hodge testi pozitif bulunan suşların ikisi (E.aerogenes, E.coli) imipenem ve meropenem disk difüzyon yöntemi ile duyarlı bulunmuştur. Diğer izolatlarda en az bir karbapenem direnci saptanmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, karbapenem grubu antibiyotiklerin kullanılması gereken klinik durumlarda tedavinin başarılı olabilmesi için fenotipik yöntemlerle karbapenemaz varlığının araştırılmasının gerektiği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Enterobacteriaceae, GSBL, karbapenemaz, modifiye Hodge testi

### SUMMARY

#### Evaluation of Modified Hodge Test Results Performed in Two Years Period

Although carbapenems are preferred for treatment of multidrug resistant Enterobacteriaceae, infections with Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) producing strains are encountered in recent years. Despite molecular methods are gold standard for resistance detection, they have some disadvantages. For this reason Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recommends cloverleaf test (modified Hodge test) for KPC detection as a phenotypic method.

This is a retrospective study on strains with positive Hodge test results in Baskent University Adana Application and Research Center since 2009 July to March 2011. 952 Enterobacteriaceae isolates were included. Hodge test was positive in 13 of 952 isolates (1.4 %) according to CLSI standards. These 13 isolates were identified as 8 (62 %) K.pneumoniae, 2 (15 %) E.coli, 2 (15 %) Enterobacter aerogenes, 1 (8 %) Klebsiella oxytoca by using semi automated system kits. Five of the isolates were from urine samples, 4 from blood, 2 from tissue, 1 from periton fluid samples and 1 from pleural effusion. Two of the positive samples with Hodge test (E.aerogenes, E.coli) were found sensitive to imipenem and meropenem with disk diffusion methods. The others were resistant to at least one carbapenem by the same method.

We believed that phenotypic methods for carbapenemase production will be helpful to decide the use of carbapenem group antibiotics for therapy of the multidrug resistant Enterobacteriaceae strains.

**Keywords:** carbapenemase, Enterobacteriaceae, GSBL, modified Hodge test

İletişim adresi: Jülide Sedef Göçmen. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ADANA

GSM: (0535) 943 36 16

e-posta: jsedef@yahoo.com

Alındığı tarih: 28.09.2011, yayına kabul: 10.10.2011

\*26.ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi'nde sunulmuştur. Poster No.74 (18-22 Mayıs 2011, Kızılağaç, Manavgat)

## GİRİŞ

Antibiyotiklere çoklu direnci olan *Enterobacteriaceae* suşları ile oluşan infeksiyonlar ciddi seyretmekte olup bunların tedavisinde karbapenemler (imipenem, meropenem, ertapenem) kullanılmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda karbapenemlere dirençli *Enterobacteriaceae* suşları ile gelişen infeksiyonlar da görülmektedir. Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* suşu ilk olarak 2001 yılında Kuzey Carolina'dan bildirilmiştir<sup>(3)</sup>. Özellikle son beş yılda *K.pneumoniae* karbapenemazı (KPC) üreten izolatların sayısındaki artışlar dikkati çekmektedir<sup>(4)</sup>. Bu beta-laktamaz enzimleri karbapenemleri hidroliz etmektedir ve bu yüzden bu bakterilerin etken olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlükler yaratmaktadır. Ambler sınıflandırmasına göre beta-laktamaz enzimleri, aminoasit sekanslarındaki benzerlikler temelinde dört sınıfa (A-D) ayrılmaktadır. Sınıf A, C ve D beta-laktamaz gruplarındaki ortak bölge serin aminoasiti iken, sınıf B'de (metallo-beta-laktamazlar) aktif bölge çinkodur<sup>(4)</sup>. Karbapenem direncinin sıklıkla görüldüğü *Klebsiella* türleri içerisinde en sık mekanizma Ambler sınıf A içerisinde özellikle KPC (*K.pneumoniae* karbapenemazı) veya B metallo-beta-laktamazı (MBLs) örneğin IMP ve VIM türleridir<sup>(4)</sup>. Karbapenemazlar özellikle *K.pneumoniae* izolatlarında bildirilmesinin yanı sıra *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* ve *Serratia* spp. gibi diğer *Enterobacteriaceae* bakterileri için de bildirilmektedir<sup>(3)</sup>.

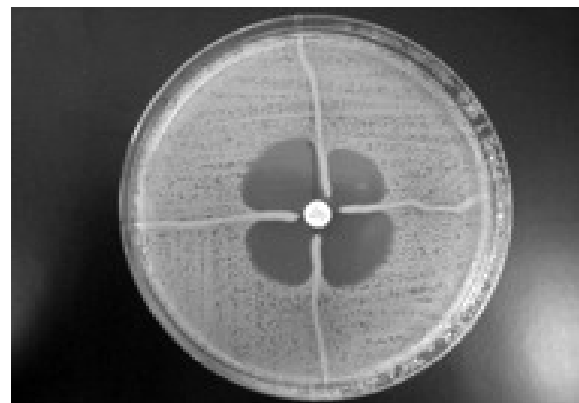
KPC enzimlerinin varlığı her zaman karbapenemlere yüksek düzey direnç ile sonuçlanmayabilir. Bakterilerin minimal inhibitör konsantrasyon (MIK) değerleri duyarlı ve orta duyarlı kategorilerinde kalabilir. Kullanılan otomatize sistemler değişken sonuçlar verebilirken, buyyon dilüsyon tekniği karbapenemler için en yüksek duyarlılıkta sonuç vermektedir (>% 90)<sup>(8)</sup>.

KPC enzimlerinin tespiti için altın standart olan yöntem PCR ile *blaKPC* geninin varlığının gösterilmesidir<sup>(2)</sup>. Bu genotipik yöntem hızlı sonuç veren fakat iş gücü ve ekipman gerektiren pahalı bir yöntemdir. Bu yüzden KPC'lerin tespiti için çeşitli fenotipik yöntemler geliştirilmiştir. Clinical Laboratory Standards

Institute (CLSI) tarafından önerilen en son yöntem cloverleaf testi (modifiye Hodge testi)'dir. CLSI standartlarına göre ertapenem veya meropenem zon çapı <21 mm olan *Enterobacteriaceae* izolatlarına, ayrıca genişlemiş spektrumlu beta-laktamazı pozitif bulunan *Enterobacteriaceae* izolatlarına fenotipik konfirmasyon testi olan modifiye Hodge testi yapılması önerilmektedir. Bu çalışmada, Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarında modifiye Hodge testi yaptığımız ve sonuçlarını pozitif bulduğumuz örnekleri retrospektif olarak değerlendirmek amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Klavulanik asit kombinasyon diskleri ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamazı pozitif bulunan, disk difüzyon yöntemi ile meropenem zon çapı <21 mm olan ve karbapenemlerden herhangi birine dirençli olan suşlara modifiye Hodge testi 2009 CLSI standartlarına göre uygulanmıştır. Bunun için, *E.coli* ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland bulanıklık standardındaki süspansiyonunun, triptik soy buyyon ile 1:10 dilüsyonu Mueller-Hinton agar plağına yayılmış, 3-10 dk bekletildikten sonra petrinin merkezine ertapenem diski yerleştirilmiştir. Şüpheli kolonilerden 3-5 adet alınıp, diske doğru 20-25 mm'lik hat şeklinde çizgi çekilmiştir<sup>(2)</sup>. 35°C'de 16-20 saat inkübasyon sonucunda test bakterisinin çizgisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üreme artışı (yonca yaprağı görünümü) pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Şekil).



Şekil. Modifiye Hodge testi pozitif bulunan izolatlarda yonca yaprağı (cloverleaf) görünümü.

Modifiye Hodge testi pozitif bulunan izolatlar yanı otomatize sistem kitleri kullanılarak (BBL Crystall, Becton Dickinson, USA) tanımlanmıştır.

## BULGULAR

Laboratuvarımızda Temmuz 2009-Mart 2011 tarihleri arasında 952 karbapenemaz üretimi şüpheli olan *Enterobacteriaceae* izolatına modifiye Hodge testi yapılmış, 13'ünde test sonucu pozitif bulunmuştur (% 1.4). Modifiye Hodge testi pozitif bulunan izolatların 8'i *K.pneumoniae*, 2'si *E.coli*, 2'si *Enterobacter aerogenes*, 1'i *Klebsiella oxytoca* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların 5'i idrar, 4'ü kan, 2'si doku, 1'i batın içi sıvı ve 1'i plevra sıvısından izole edilmiştir. Modifiye Hodge testi pozitif bulunan *Enterobacteriaceae* bakterilerinin izole edildiği örnekler aşağıdaki tabloda yer almaktadır. Hodge testi pozitif bulunan suşların ikisi imipenem ve meropenem disk difüzyon yöntemi ile duyarlı bulunmuştur. Duyarlı bulunan izolatların biri (*E.aerogenes*) doku kültüründen, diğeri (*E.coli*) idrar örneğinden izole edilmiştir. Diğer izolatlarda en az bir karbapenem direnci saptanmıştır.

Tablo 1. Modifiye Hodge testi pozitif bulunan 13 suşun dağılımı.

Bakteri	İdrar	Kan	Steril sıvı	Doku
<i>K.pneumoniae</i> (8)	3	3	2	-
<i>E.coli</i> (2)	1	1	-	-
<i>E.aerogenes</i> (2)	1	-	-	1
<i>K.oxytoca</i> (1)	-	-	-	1

## TARTIŞMA

Son yıllardaki karbapenemaz üreten suşların sayısındaki artışlar nedeni ile bu bakterilerin etken olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Karbapenemaz üreten suşlar diğer antibiyotiklere, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve karbapenemlerin yanı sıra kinolonlara, aminoglikozidlere ve ko-trimoksazole de direnç gösterebilirler<sup>(7)</sup>.

Bazı KPC üreten türlerde düşük düzey karbapenem direnci görülürken, bazen porin kaybı gibi sellüler direnç mekanizmalarının

eklenmesi ile karbapenemlerin MİK değerleri artmaktadır<sup>(1)</sup>. KPC üreten suşlar hastanelerde salgınlara yol açabilmektedir. Bu bakterilerin etken olduğu infeksiyonların tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması ve laboratuvarında bu izolatların tanımlanmasında birtakım zorlukların bulunması nedeni ile hastane infeksiyonları açısından en çok korkulan bakterilerden biri haline gelmişlerdir. Daha önceki raporlarda otomatize sistemlerin bu izolatları tespit etmedeki başarısızlıkları da bildirilmektedir<sup>(1)</sup>.

Cloverleaf yöntemi olarak da isimlendirilen modifiye Hodge testi, karbapenemaz aktivitesini *Enterobacteriaceae* türlerinde test etmek için CLSI tarafından önerilen tek fenotipik yöntemdir<sup>(6)</sup>. Testin mekanizması karbapenem antibiyotığının test edilen organizma tarafından inaktive edilmesi ve zemine yayılmış olan karbapenem duyarlı indikatör suş ile zonun birleşme yerinde üremenin artması sonucunda yonca yaprağı görünümünün elde edilmesidir. Yöntemin karbapenemaz üretimini test etmede duyarlılığı yüksektir ancak karbapenemaz enziminin tipini belirleyememektedir<sup>(6)</sup>. CTX-M tipi beta-lakta-maz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarında bazen dış membran permeabilitesinin geçirgenliğinin azalmasından dolayı test yanlış pozitiflik verebilmektedir. Raporlarda özellikle metallo-beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarında, zayıf karbapenemaz aktivitesinden dolayı testin yorumlanmasının güçleştiği bildirilmektedir.

Tedavi etkinliği açısından karbapenem direnci şüpheli olan *Enterobacteriaceae* izolatlarında modifiye Hodge testi yapılması önerilmektedir. Hodge testi sonuçlarının karbapenemaz üretiminin tespiti için oldukça yüksek etkinlikte olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatları bildirilmektedir<sup>(6,9)</sup>. Çalışmamızda laboratuvarımızda iki yıllık süreçte çeşitli klinik örneklerden izole ettiğimiz karbapenem direnci şüpheli 952 *Enterobacteriaceae* izolatlarına yapılan modifiye Hodge testi sonucunda % 1.4 oranında pozitiflik bulunmuştur. Modifiye Hodge testinde kullandığımız ertapenem diski, karbapenemaz tanımlanmasında en duyarlı karbapenemdir. Etkenin modifiye Hodge testi sonucuna göre antibiyoterapi

yeniden düzenlenmelidir<sup>(5)</sup>.

Karbapenemaz pozitif *K.pneumoniae*'nın neden olduğu infeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin kullanımı güvenli değildir. Hodge testi pozitif olan izolatların karbapenem MİK sonuçlarını bildirmek gereklidir.

Klinikte uygun tedavi etkinliği açısından mikrobiyoloji laboratuvarlarının rutinde karbapenemaz üretimi şüpheli olan *Enterobacteriaceae* suşlarına modifiye Hodge testi yapması düşünülmelidir.

### KAYNAKLAR

1. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK et al. Evaluation of methods to identify in Klebsiella pneumoniae carbapenemase in Enterobacteriaceae, *J Clin Microbiol* 2007;45(8):2723-5. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00015-07> PMID:17581941 PMCID:1951220
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Nineteenth Informational Supplement, CLSI Document M100-S19, CLSI, Wayne, PA (2009).
3. Fontana C, Favaro M, Sarmati L et al. Emergence of KPC-producing Klebsiella pneumoniae in Italy, *BMC Res Notes* 2010;3:40. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-3-40> PMID:20178590 PMCID:2844393
4. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection, *J Antimicrob Chemother* 2010;65(6):1119-25. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq108> PMID:20378670
5. Kuzucu Ç, Yetkin F, Görgeç S, Ersoy Y. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten E.coli ve Klebsiella spp. suşlarının ertapenem ve diğer karbapenemlere karşı duyarlılıklarının araştırılması, *Mikrobiyol Bült* 2011;45(1):21-8. PMID:21341155
6. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues, *Clin Microbiol Infect* 2010;16(2):112-22. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x> PMID:20085605
7. Stuart CJ, Leverstein-Van Hall MA, Al Neimi N et al. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae, *Int J Antimicrob Agents* 2010;36(3):205-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.05.014> PMID:20598859
8. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP et al. Carbapenem resistance in Klebsiella pneumoniae not detected by automated susceptibility testing, *Emerg Infect Dis* 2006;12(8):1209-13. PMID:16965699
9. Us E, Tekeli A, Arıkan Ö ve ark. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesinde 2004-2007 yılları arasında izole edilen karbapenem dirençli *K.pneumoniae* suşlarının moleküler epidemiyolojisi, *Mikrobiyol Bült* 2010;44(1):1-10. PMID:20455393