ÖZET

Direk Karbapenemaz Üçlü (Kpc-2, Oxa-48, Ndm-1) PCR Tanı Kiti

Buluş, bir karbapenemazların tespitinde kullanılan PCR temelli hızlı tanı kiti ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Antibiyotik direncine sahip karbapenemaz tespitini sağlayan PCR temelli tan□kiti olup özelliği; karbapenemaz grubundan olan *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC), New Delhi metallo-β-laktamaz (NDM), oxacillinase-48 (Oxa-48) enzim çeşitlerinin tespitini sağlayacak şekilde NO:1, NO:2 ve NO:3, NO:4, NO:5, NO:6 DNA primer çiftlerini içermesidir.

2. İstem 1'e göre PCR temelli tan□kitinin çal□şma yöntemi olup özelliği,

- Karbapenemaz pozitif *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin (1) -80 °C'de biriktirilerek üretilmesi,
- Kan, endotrakeal aspirat veya balgam gibi klinik örneklerden (2), bakteri kültürü (3) eldesi,
- Klinik örneklerden direk DNA izolasyonu (4) ve bakteri kültüründen DNA izolasyonu (5),
- DNA izolasyonu standardizasyonu, özgüllük ve hassasiyet belirlenmesi (6),
- Enzim tespitini sağlayan kitler Konvansiyonel Tekli (7) veya Multipleks (8) ve Sybr-Green (9) teknikleriyle üretimesi,
- DNA sekans ve varyant analizi (10)

işlem ad□mlar□n□□içermesidir.

TARİFNAME

Direk Karbapenemaz Üçlü (Kpc-2, Oxa-48, Ndm-1) PCR Tan□Kiti

Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

Buluş, antibiyotik (karbapenem) direncine sebep olan karbapenemazlar□n tespitinde kullan□lan, PCR temelli, h□zl□ tan□ kiti ile ilgilidir.

Buluşla İlgili Tekniğin Bilinen Durumu (Önceki Teknik)

Karbapenemazlar penisilinleri, çoğu olguda sefalosporinleri, belirli dereceye kadar karbapenemleri ve monobaktamlar□ hidrolize eden β- laktamazlard□r.

Gram negatif bakterilerde son y□llar içerisinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) ve karbapenemaz üreten etkenlerle gelişen enfeksiyonlar, özellikle hastanede yatmakta olan hastalarda ve altta yatan immünsüpresif durumu olanlarda ciddi tedavi sorunlar□na neden olmaktad□r.

Dünyada Enterobacteriaceae ailesinde en yayg□n olarak saptanan karbapenemazlar; Klebsiella pneumoniae karbapenemaz (KPC), , New Delhi metallo-β-laktamaz (NDM) ve oxacillinase-48 OXA-48 enzimleridir.

Karbapenemler beta-laktam s□n□f□ içerisinde en geniş spektruma sahip, h□zl□ bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerdir ve geniş antibakteriyel spektrumlar□ ya aerob ve anaerob birçok mikroorganizma taraf□ndan oluşturulan enfeksiyonlarda yayg□n kullan□lmaktad□rlar.

Tekniğin bilinen durumunda; Karbapenemazlar rutin mikrobiyoloji laboratuvarlar□nda klasik kültür ve antibiyogram tayini şeklinde identifiye edilmektedir.

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlar□nda kullan□lan bakteri tan□mlama ve antibiyogram şeklindeki klasik tan□mlama metoduyla, öncelikle hastadan gelen materyalin kültüre edilerek 24 saatlik inkübasyonundan sonra otomatize sistemler kullan□larak, bakteri ismi konmaktad□r. Sistemlerin çal□şma prensibi, bakterinin üreme esnas□nda kulland□ğ□ metabolitler ve sonucunda oluşturduğu enzim ve pH değişiklikleri temel al□narak, özetle biyokimyasal özelliklerine göre isimlendirilmektedir. Bu yöntemlerin kullan□lmas□nda söz konusu Enterobacteriaceae üyesi bakteriler için teknik bir sorun olmamakla birlikte, tespiti için en az

48 saate ihtiyaç duyulması ve bu süre zarfında direnç enzimlerinin hızla hastadan hastaya yayılması söz konusu olmaktadır.

İkincil işlem olarak da Antibiyogram ile söz konusu bakterinin hangi antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu yine otomatize sistemler tarafından belirlenmektedir. Söz konusu işlem sırasında, direnç enziminin varlığına işaret edilirken, direnç detayı ve tipi hakkında kesin bir yargıya varılamamaktadır. Böylelikle tehlike arz eden, hastalar arasında hızla yayılan, plazmid aracılıklı enzim tipinin belirlenmesi ve hastanın diğer hastalardan izole edilerek bulaşıcılığın dolayısıyla da salgınların oluşması engellenememektedir.

Karbapenemazların identifikasyonunda ayrıca tekniğin bilinen durumunda, fenotipik Carba NP ve Modifiye Hodge Test (MHT) de kullanılmaktadır. MHT *Klebsiella pneumoniae'*de oldukça duyarlı olmasına rağmen diğer Enterobacteriaceae üyelerinde iyi sonuç vermemektedir. Ayrıca tekniğin bilinen durumundaki bu testler genel bir karbapenemaz varlığını doğrulamakta fakat dirence neden olan enzimin tam ismini belirtememektedir. Carba NP test, güvenilir bir test olmasına rağmen maliyeti yüksek olduğundan dolayı tercih edilmemektedir.

Ülkemizde enzimlerin belirlenmesinde genellikle konvansiyonel PCR ya da uluslararası üretimli kitler kullanılmaktadır. Bu kitler ülkemizde sıklıkla görülen ve probleme sebebiyet veren üç önemli (Kpc-2, Oxa-48, Ndm-1) enzimin dışında çok sayıda enzimi içerdiği ve yurt dışı üretimli olduğu için maliyeti oldukça yüksektir. Ayrıca, direnç tayini daha uzun zaman almaktadır.

US 9,914,980 B2 patenti karbapenemaz genlerinin identifiye edilmesinde kullanılan ve 170 den fazla karbapenemaz enzim çeşidi tayin eden bir kit ile ilgilidir. Bu nedenle direnç tayini işlemi oldukça uzun sürmektedir.

Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları

Buluşta, antibiyotik direncine sahip karbapenemazların tespitini sağlayan PCR temelli, hızlı tanı kiti dizayn amaçlanmıştır.

Buluştaki PCR temelli hızlı tanı kiti sayesinde antibiyotiğe karşı direnç oluşturan enzimler hızlı bir şekilde (1-2 saat) tanımlanmakta ve hangi enzimin dirence neden olduğu tespit edilmektedir. Plazmid aracılıklı bir enzim ise hastanın izolasyonu hızla sağlanmakta ve direnç yayılımı önlenmektedir.

Yoğun bakım ünitelerinde yatan komorbiditesi yüksek hastalar için önem arz eden direnç enzimlerinin hızla hastadan hastaya yayılmasının önlenmesi ve hastanın diğer hastalardan izole edilerek bulaşıcılığın gerçekleşmesi önlenmektedir.

Buluş kit içeriği basit bir şekilde kullanım amacına uygun olarak dizayn edilebilmektedir. Örneğin, mikrobiyoloji rutin laboratuvarlarda, tanı amaçlı kullanılacak olan kitler prob hibridizasyon tekniğine dayalı, epidemiyolojik araştırma çalışmalarında kullanılacak olanlar ise isteğe uygun olarak, Konvansiyonel Tekli veya Multipleks ve Sybr-Green teknikleriyle üretilebilmektedir.

Buluş kiti, ülkemizde sıkça karşılaşılan ve tehlike arz eden üç önemli (Kpc-2, Oxa-48, Ndm-1) karbapenemaz enzimini içerdiğinden direnç tayini hızlıca (1-2 saat) yapılabilmektedir ve maliyeti oldukça düşüktür.

Buluşu Açıklayan Şekillerin Tanımları

Şekil 1: İş akış şeması

Buluşu oluşturan unsurların/kısımların/parçaların tanımları

1. Karbapenemaz pozitif Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae vb. bakteri
2. Klinik örnek
3. Klinik örnekten bakteri kültürü
4. Klinik örnekten direk DNA izolasyonu
5. Bakteri kültüründen DNA izolasyonu
6. DNA izolasyonu standardizasyonu, özgüllük ve hassasiyet belirleme
7. Konvansiyonel PCR (blaKPC-2, blaOXA-48, blaNDM-1)
8. Multiplex PCR
9. Sybr-Green PCR
10. DNA sekans ve varyant analizi

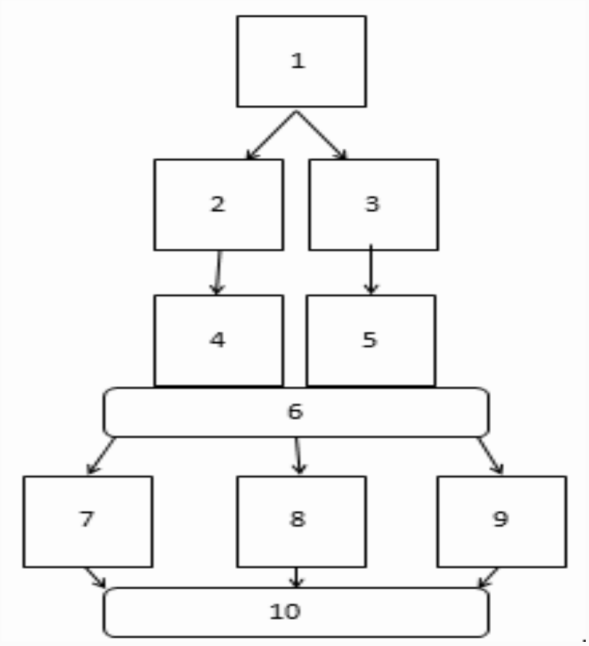
Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Buluş Şekil 1 de belirtilen işlem adımı sırasına göre; öncelikle Karbapenemaz pozitif *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* vb. bakterileri (1) -80 °C'de biriktirilerek üretilmektedir. Sonrasında klinik örnekler (2) rutin tanı laboratuvarlarında, laboratuvara gönderilen kan, endotrakeal aspirat ve balgam gibi örnekler seçilen DNA izolasyon kitinde önerilen şekilde hazırlanmakta ve klinik örneklerden bakteri kültürü (3) üretilmektedir. Klinik örneklerden direk DNA izolasyonu (4) ve bakteri kültüründen DNA izolasyonu (5), eş zamanlı olarak DNA izolasyon kiti ya da kaynatma metodu ile gerçekleşmektedir. PCR basamağına hemen geçilmeyecekse, örnekler kısa süre (birkaç hafta) için +4 °C' de ve 6 aylık bir süre -80°C' de bekletilmektedir. DNA izolasyonu standardizasyonu, özgüllük ve hassasiyet belirlenmesi yapıldıktan sonra (6), çalışma amacına uygun sayıda enzim tespitini sağlayan kitler Konvansiyonel Tekli (7) veya Multipleks (8) ve Sybr-Green (9) teknikleriyle üretilerek ölçüm yapılabilmektedir. Tekli konvansiyonel PCR *bla*KPC-2, *bla*OXA-48, *bla*NDM-1' den herhangi birisi ile oluşurken, Multipleks PCR; *bla*KPC-2, *bla*OXA-48, *bla*NDM-1' den istenilen ikisi veya üçü tek reaksiyondan, Prob hibridizasyon ise tekli ve/veya çoklu enzimden oluşabilecektir. Bu teknikte, sorun teşkil eden direnç enzimlerini kodlayan DNA bölgelerini hedef alan primerler kullanılarak, çalışmanın amacına uygun farklı tipte dizayn edilecek olan hazır seçilen DNA bölgelerinin çoğalmasını sağlayan PCR kitleri üretilmektedir. Kitte bulunan ve farklı karbapenemaz genlerin tespiti için spesifik olan DNA primer çiftleri Tablo 1'de gösterilmektedir.

	İleri primer	Geri primer
NDM-1	GGTTTGGCGATCTGGTTTT (NO: 1)	CGGAATGGCTCATCACGATC (NO: 2)
KPC-2	ATGTCACTGTATCGCCGTCT (NO: 3)	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC (NO: 4)
OXA-48	GCGTGGTTAAGGATGAACAC (NO: 5)	CGGTTGGGTTGAACTTGATG (NO: 6)

Bu kitlerin içeriğinde Master mix olarak adlandırılan ana karışımda Taq DNA polimeraz enzimini de içeren ve çoğaltılacak bölgeye özgü primerleri içeren ayrıca kontrol olarak

hazırlanan tüplerden oluşan solüsyon ve malzemeler yer almaktadır. Şüpheli direnç enzimine uygun olarak seçilen PCR kiti ile kısa sürede (yaklaşık 1-2 saat) sıcaklık döngü cihazında reaksiyon tamamlanmaktadır. Son adım olan DNA sekans ve varyant analizi (10) için; Klasik PCR kiti seçilmiş ise PCR örnekleri % 1'lik agaroz jelde, 100V' da, 30 dakika yürütülür. Real-Time PCR kiti seçilmiş ise Melt-Curve analizi ve doğru erime noktaları ile ayrıca internal amplifikasyon kontrolleri (IAK) değerlendirilerek sonuçlar kaydedilmektedir. Seçilen örneklerin DNA Sekans Analizi sonucuna göre nükleotid farklılıkları incelenerek, enzim varyasyonu istatiksel olarak da değerlendirilecektir.



Şekil 1