



Kolistin duyarlılığı: sorunlar ve çözüm önerileri

Prof. Dr. Şöhret AYDEMİR

Ege Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

EKMUD İzmir Günleri, Nisan 2019

Kolistin (polimiksin E)

- 1950'lerde klinik kullanım

1970'lerde terk edildi

- Ciddi nefrotoksik (akut tübüler nekroz) ve nörotoksik

Kistik fibrozlu hastalarda

dirençli *Pseudomonas aeruginosa*

enfeksiyonlarında aerosol kullanım

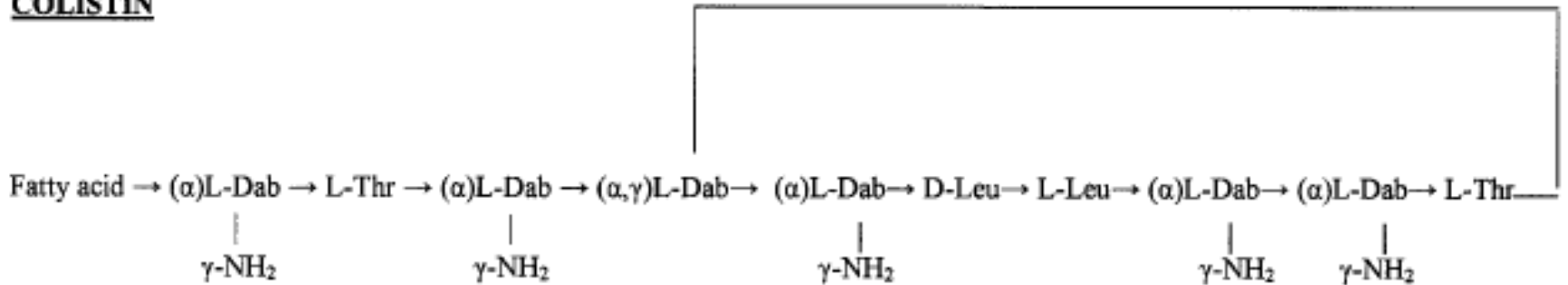
Kolistin

Kolistin sülfat:

- Oral formu: *bağırsak dekontaminasyonu (emilim yok)*
- Topikal formu: bakteriyel deri enfeksiyonları
- Damla formu: göz ve kulak enfeksiyonlarında

(katyonik siklik dekapeptid, alfa amid bağı ile yağ asidi zincirine bağlı)

COLISTIN

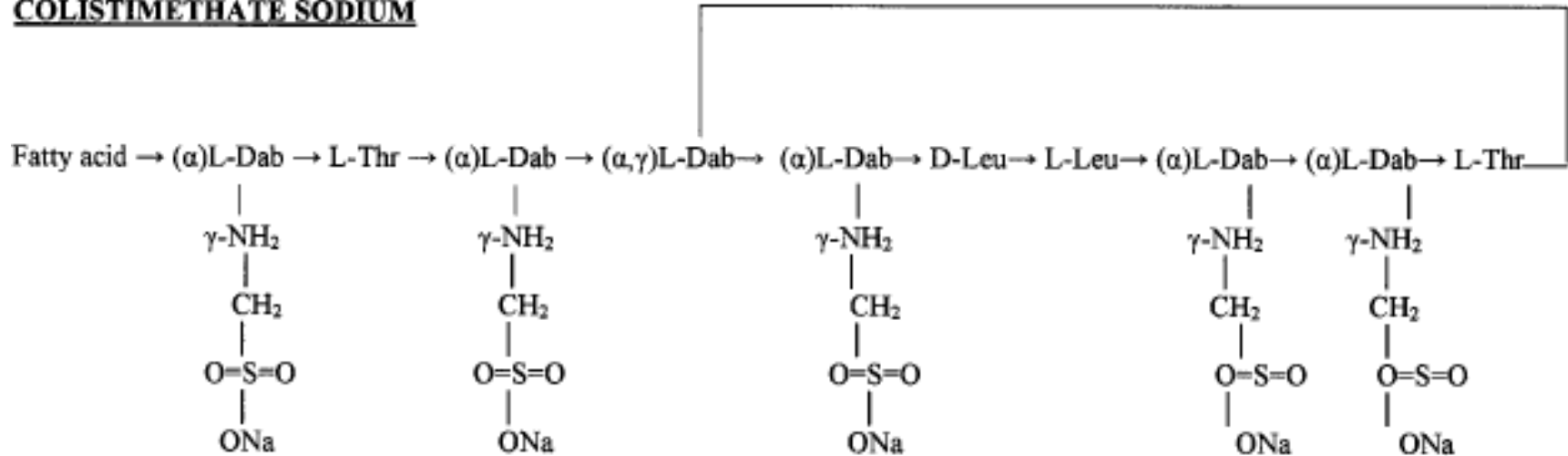


Kolistin

Kolistimetat sodyum:

- IV formu (Türkiye’de 2010 da ruhsat aldı)

COLISTIMETHATE SODIUM



Etki mekanizması

1) Dış membranın yapısını bozar

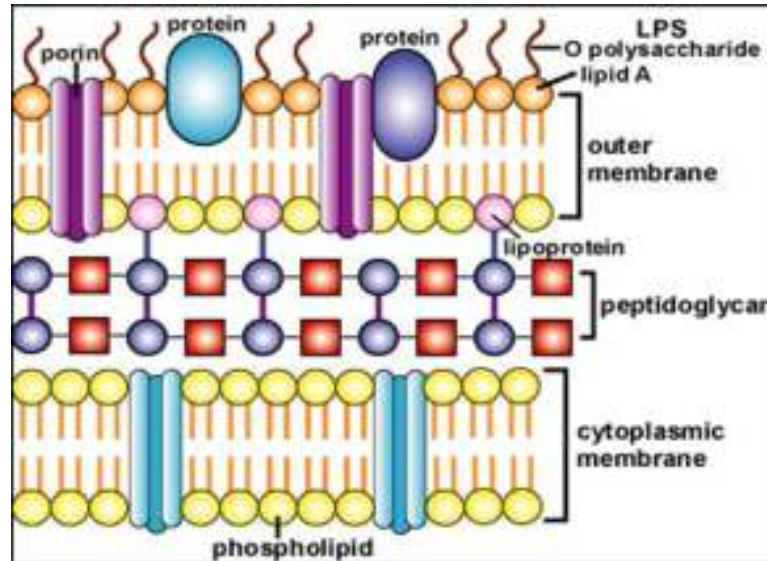
Polimiksinler; kuvvetli **katyonik** yapıda (kuvvetli **pozitif yüklü**) ve hidrofilik aril zincire sahip

Hedefi gram negatiflerin dış membranındaki **anyonik** yapıda (**negatif yüklü**) LPS yapıya bağlanma

Etki mekanizması

Hücrenin iki valanlı katyonları olan Ca^{+2} ve Mg^{+2} ile yer değiştirir.

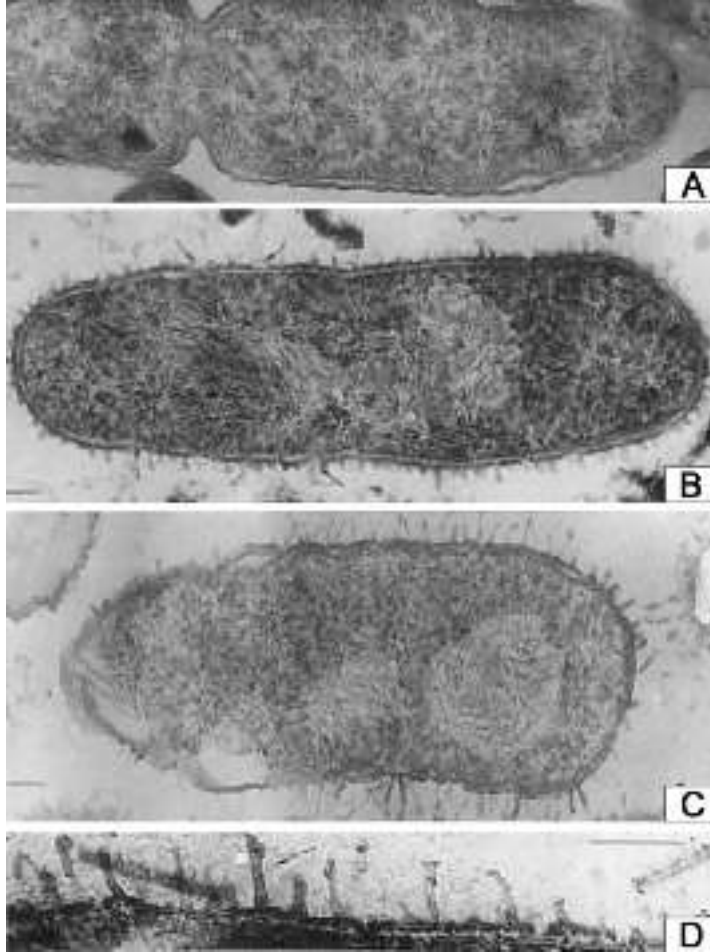
Hidrofilik zincirin de katkısı ile membran geçirgenliği bozulur, hücre içeriği dışarı sızar ve sonucunda bakteri ölümü



Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections

Matthew E. Falagas^{1,2*} and Sofia K. Katsikou¹

¹1st Department of Bacteriology, Galatasaray (SBS) and ²Department of Medicine, "Papanicolaou" Hospital, Athens, Greece, and ³Istanbul University School of Medicine, Istanbul, Turkey



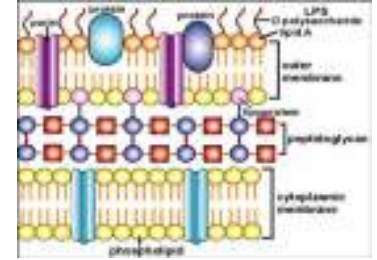
→ Kolistin kullanımından önce

Kolistin kullanımıyla bakterinin membran yapısı bozuluyor

Hücre içeriği dışarıya sızıyor

Bakteri ölüyor

Etki mekanizması



2) anti-endotoksin etki

Gram negatiflerin LPS moleküllerinin Lipid A bölümüne bağlanarak endotoksin aktivitesini nötralize eder

Bakterilerin kolistine duyarlılığı,
hücre membranınının içerdiği fosfolipid miktarı ve ortamda bulunan divalan katyonların düzeyi ile ilişkilidir

Etki spektrumu

aerop gram negatif bakterilere etkili

En sık kullanım alanı; çoklu dirençli nozokomiyal patojenler

Pseudomonas aeruginosa

Acinetobacter baumannii

***Klebsiella* spp. (karbapenemlere dirençli)**

ayrıca

- ***Escherichia coli***
- *Bazı Enterobacter spp*
- *Salmonella spp*
- *Shigella spp*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Haemophilus influenzae*
- *Bordetella pertussis*
- *Legionella pneumophila*

Etki spektrumu

Kolistine doğal dirençli bakteriler

Serratia marcescens,

Providencia spp,

Morganella morganii

Proteus spp,

Moraxella catarrhalis,

Burkholderia cepacia,

Gram pozitif bakteriler ve anaeroplarda doğal dirençli

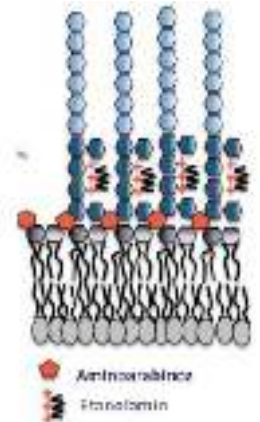
Direnç mekanizması

➤ Adaptif / mutasyonel mekanizmalar

1. Bakteri (-) yüklü yüzey LPS'lerini +Lipid A yapısını değiştirir

PmrA-PmrB regulatuar sistem *PmrE* ve *PmrHFIJKLM* gen ekspresyonunu sağlar

LPS 'in fosfat gruplarına etanolamin ekler ve lipid A'ya aminoarabinoz iliştırir, böylece katyonik polimiksinlerin bağlanma affinitesi azalır



Direnç mekanizması

- PmrA-PmrB regulatuar sistem *PmrE* ve *PmrHFIJKLM* gen ekspresyonunu uyararak çevresel faktörler;

Düşük PH

Düşük magnezyum konsantrasyonu

Yüksek demir konsantrasyonu

Direnç mekanizması

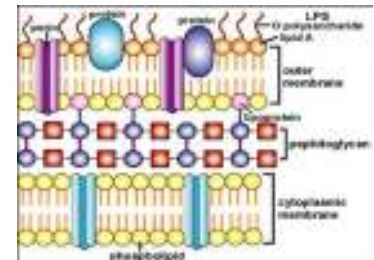
2. Bakterilerin dış membran proteini OprH aşırı sentezlenir, membrandaki Mg yerlerine geçer

PhoP-PhoQ regulatuar sistem *OprH* gen ekspresyonunu sağlar.
OprH proteinleri sentezlenir

eksojen poliaminler &

düşük magnezyum konsantrasyonu → regulatuar sistemi uyarır

ve kolistinlerin bağlanmasını engeller



Direnç mekanizması

Kasım 2015

Horizontal geçiş!!

Plasmid aracılı *mcr-1* geni

Konjugasyon (*E.coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*)

*Lipid A'ya fosfoetanolamin eklenmesi

Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al. *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2016; 16: 161–68*

Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al. *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study.*
Lancet Infect Dis 2016; 16: 161–68

- Domuzda; *mcr-1* geni *E coli* SHP45 kökeni



Nisan 2011-Kasım 2014

E coli ve *Klebsiella pneumoniae mcr-1*

Çiğ etten, 523 *E coli*'de 78 (%15)

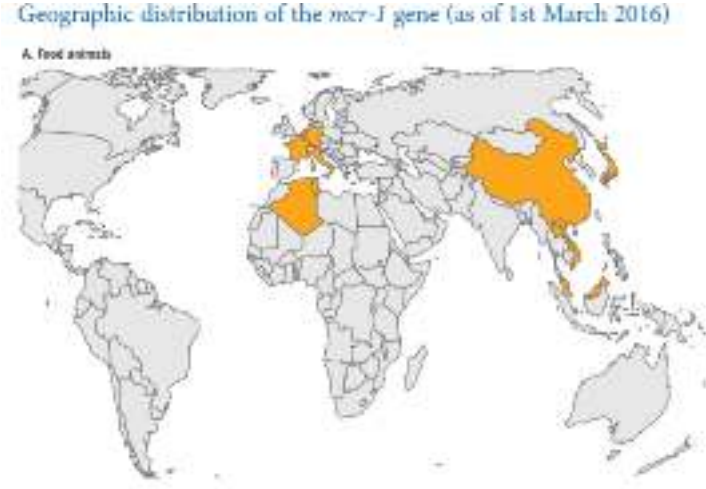
Besi hayvanlarından, 804 *E coli*'de 166 (%21)

Yatan hastalardan, 902 *E coli*'de 13 (%1.4)

420 *K pneumoniae*'da (%0.7)

Veteriner tıbbında kolistin kullanımı

- 50 yıldır
- Tavuk ve domuz ishale seyreden hastalıklarının kontrolünde yaygın kullanım
- 2012; Avrupa Birlięinin 19 üye ülkesinde hayvanlarda insanlardan 600 kat fazla tüketilmiş (ECDC ve EFSA)



- RL Skov, DL Monnet
Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, story unfolds
Euro Surveill. 2016

RL Skov, DL Monnet

Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, story unfolds

Euro Surveill. 2016

mcr-1 geni; kıtaların çoğuna yayılmış olup,

gıda hayvanlarından, çevresel örneklerden, enfekte hastalar & uluslararası seyahat eden asemptomatik kişilerden üretilen bakterilerde gösterilmiştir.

Kolistin-ADT



The screenshot shows the EUCAST website interface. At the top, there is a navigation bar with 'HOME', 'ABOUT', and 'CONTACT' links. Below this is the EUCAST logo and the text 'EUROPEAN COMITTEE FOR CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION SUSCEPTIBILITY TESTING' and 'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases'. A search bar is visible on the right. Below the navigation bar, there is a section titled 'AST of bacteria'. Underneath, there is a warning message: 'EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures.' with a 'View all' link.

3. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - problems detected with several commercially available products.

This warning was issued July 2016 and modified and extended 26 August and 28 November, 2016. The current text is from **20 June 2017** and is a summary of the previous warnings and includes the results following further testing of more broth microdilution tests and more organisms. Warnings will be modified or removed when issues have been resolved.

Antimicrobial susceptibility testing of colistin has been fraught with difficulties. A joint EUCAST and CLSI subcommittee recently issued recommendations confirming that broth microdilution (BMD) is so far the only valid method and that disk diffusion does not work because of the poor diffusion of the large colistin molecule. The report did not evaluate gradient tests of colistin, but reports in the literature have questioned the validity of MICs obtained with gradient tests.

We used a collection of clinical isolates (n=75) obtained from international contacts (acknowledge: SENTRY collection (P. Rhombert, JMI Laboratories, USA), S. Gatermann, Bochum, Germany, R. Henriksen, DTU, Copenhagen, Denmark, O. Samuelsen, Tromsø, Norway, J. Vila, Barcelona and L. Martinez-Martinez, Santander, Spain) of *Escherichia coli* (n= 14), *Klebsiella pneumoniae*, (n=18), *Pseudomonas aeruginosa* (n=21) and *Acinetobacter* spp (n=22) without and with various resistance mechanisms and with different levels of resistance to colistin. Several Enterobacteriaceae had the *mcr-1* gene. Broth microdilution MIC values of the four species were 0.25 – 128 mg/L.



Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group

Colistin (polymyxin E) MIC determination is associated by several methodological issues. The issues have been extensively investigated by the CLSI-EUCAST joint Polymyxin Breakpoints Working Group and the following method for determination of colistin MIC was agreed:

1. Reference testing of Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. is by the ISO-standard broth microdilution method (20776-1). Note:
 - a. Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth is used
 - b. No additives may be included in any part of the testing process (in particular, no polysorbate-80 or other surfactants)
 - c. Trays must be made of plain polystyrene and not treated in any way before use
 - d. Sulphate salts of polymyxins must be used (the methanesulfonate derivative of colistin must not be used - it is an inactive pro-drug that breaks down slowly in solution)
2. Susceptibility testing by other methods, including agar dilution, disk diffusion and gradient diffusion, cannot be recommended until historical data have been reviewed or new study data have been generated. Work on these methods is ongoing.

Published on www.eucast.org 22 March 2016

ADT-Kolistin

- Sıvı mikrodilüsyon
- Agar dilüsyon?
- Strip test?
- Disk difüzyon?
- Yarı otomatize cihazlar (Vitek, Phoenix, Microscan)?
- Diğer fenotipik testler?
- Gentotipik yöntemler

Kolistin ADT-Dilüsyon yöntemleri

- Sıvı mikrodilüsyon (SMD)
 - Uluslararası referans metod (ISO 20776-1) ve EUCAST Dokümanları (http://www.eucast.org/guidance_documents/)
 - Sülfat tuzları
 - Standart polistrien plaklar
 - Plaklara herhangi bir madde ilave edilmemeli
 - In house hazırlanabilir (taze/dondurulmuş) veya ticari kitler (kuru-dondurulmuş) kullanılabilir
- Agar dilüsyon
 - Referans metod olarak yeterince veri yoktur, önerilmez
 - Ticari kit de bulunmamaktadır

Kolistin ADT-Difüzyon yöntemleri

- Strip test
 - SMD ile uyumu düşük
 - EUCAST Uyarı www.eucast.com
- Disk difüzyon test
 - Dirençli ve duyarlı izolatların ayırımını yapamaz
 - EUCAST Uyarı www.eucast.com
- Kolistin agarda iyi diffüze olmadığı için difüzyon testlerinin performansı düşüktür
- Duyarlı ve dirençli izolatların ayırımını sağlamak için besiyerine ilave kalsiyum eklenebilir
 - EUCAST Uyarı www.eucast.com

Sıvı Mikrodilüsyon

- Sıvı mikrodilüsyon
 - 96 kuyucuklu plaklar
 - Antibiyotiğin iki kat dilüsyonu
- MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyonu)
 - Bakteriyi tamamen inhibe eden antibiyotik konsantrasyonu
 - Çıplak gözle değerlendirme
 - mg/L veya $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak ifade edilir
- MİK değerine etki eden faktörler
 - İnokulum miktarı, besiyeri, inkübasyon süresi, sıcaklık,
 - atmosfer, kalite kontrol suşu kullanımı

Testin sonuçları güvenilir ve tekrarlanabilir olmalı

SMD'da Okuma

- Okuma için mutlaka pozitif ve negatif kontrollerin çalışıldığı ilgili kuyucuklarda tam üreme gözlenmeli
- **Manuel okuma referans yöntemidir**
- Otomatize okuma sistemleri bulunmakla birlikte bu kamera sistemlerinin mutlaka kalibre edilmesi gerekir

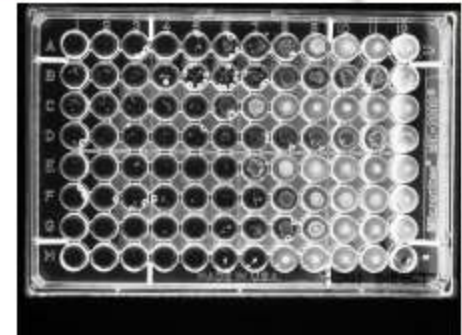
EUCAST Referans Laboratuvarı Kolistin Duyarlılık Çalışma Sonucu

- Disk difüzyon testi duyarlı ve dirençli izolatlar arasında ayırım yapamaz, tekrarlanabilirlik düşük düzeydedir
- Kalite kontrol test sonuçları strip testte uygun olsa bile kolistin duyarlılığının belirlenmesinde yetersiz kalabilmektedir
- Otomatize sistemler laboratuvar tarafından kontrol edilme şansı olmamış ancak ciddi bir kalite kontrol çalışması ile sonuç verilebilir
- Kalite kontrol suşları olarak
 - Kolistin duyarlı: *E. coli* ATCC 25922 veya *P. aeruginosa* ATCC 27853
 - Kolistin dirençli: *E. coli* NCTC 13846 (mcr-1 pozitif)
 - Hedef Mik **4 mg/L (nadiren 2 veya 8 mg/L'de olabilir)**



UAMDS Laboratuvarı deneyimi

- Ekim 2017-Aralık 2017
 - 107 izolat
 - 44 AB, 23 PA, 40 E
 - 64 Dirençli (%59,81)
 - 43 Duyarlı (%40,19)
 - Otomatize sistemlerde 15 duyarlı bulunan izolat Dirençli (Çok Büyük HATA)
 - Otomatize sistemlerde 9 dirençli bulunan izolat Duyarlı (Büyük HATA)



Sensititre-Thermo Scientific

- Kuru-dondurulmuş
- 2 yıl raf ömrü var
- Oda sıcaklığında saklama
- Duyarlılık/özgüllük yüksek
- Müşteri isteğine yönelik panel hazırlayabiliyorlar*
- Türkiye distribütörü Hemakim



**maliyet? validasyon?*

30 Kasım 2018, Ankara

Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı (UAMDS)- CAESAR Yıllık Toplantısı

Micronaut MIC-Bruker

- Kuru-dondurulmuş
- 2 yıl raf ömrü var
- Oda sıcaklığında saklama
- Duyarlılık/özgüllük yüksek
- 64-0,0625 mg/L
- Türkiye distribütörü Savaş Medikal




SensiTest™ Colistin, Liofilchem

- Kuru-dondurulmuş
- Raf ömrü ??
- 2-8°C
- Duyarlılık/özgüllük ?
- 0,25-16 mg/L
- 4 izolat değerlendirilir
- Türkiye distribütörü Kemiteks

Liofilchem®
SensiTest™ Colistin
0.25-16 µg/mL

A compact panel containing the antibiotic in 7 two-fold dilutions, that allows for four samples to be tested with the broth micro dilution method for the antimicrobial susceptibility testing of colistin (polymyxin E) as recommended by international standards (i.e. CLCAST, CLSI, BCL).



Packaging: 16 tests
Catalog Ref. no. 73001

Liofilchem® srl
Via...
www.liofilchem.it

Umic-Biocentric

- Kuru-dondurulmuş
- Raf ömrü ??
- Oda sıcaklığında
- Duyarlılık/özgüllük ?*
- 64-0,0625 mg/L
- Tek izolat çalışmasına imkan tanır
- Türkiye distribütörü ?



ADT Karşılaştırması

Firma Adı	Marka Adı	Yöntem	Test Sayısı	Dilüsyon sayısı
Thermo Scientific	Sensititre EURGNCOL	EN ISO 20776/ SMD	Plakta 8 Test	0,25-8 (11)
Thermo Scientific	Sensititre FRCOL	EN ISO 20776/ SMD	Plakta 3 Test	0,125-128 (6)
Bruker	Micronaut MIC	EN ISO 20776/ SMD	Plakta 8 Test	0,0625-64 (11)
Bruker	Micronaut MIC-Strip	EN ISO 20776/ SMD	Stripte 1 Test	0,0625-64 (11)
Liofilchem	SensiTest Colistin	EN ISO 20776/ SMD	Plakta 4 Test	0,25-16 (7)
Biocentric	Umic	EN ISO 20776/ SMD	Plakta 8 Test	0,125-64 (11)
HSGM	In house	EN ISO 20776/ SMD	Plakta 8 Test	0,0625-32 (11)

EUCAST Referans Laboratuvarı Kolistin Duyarlılık Çalışma Sonucu

SMD Yöntemi	Essential agreement* (%)	Categorical agreement** Büyük Hata	Categorical agreement Çok Büyük Hata
Sensititre (Thermo Fisher Scientific)	99	4/75	0/75
MICRONAUT-S (Bruker)	96	6/75	2/75
MICRONAUT MIC-Strip (Bruker)	99	5/75	2/75
SensiTest (Liofilchem)	88	7/75	1/75
UMIC (Biocentric)	82	3/75	3/75

*Essential agreement: Referans MİK yöntemi ile ± 1 dilüsyon ($\geq \%90$)

**Categorical agreement: Referans MİK yöntemi ile Duyarlı/Orta duyarlı/Dirençli arasındaki uyum



Uluslararası
International
XXXVIII.
Türk Mikrobiyoloji Kongresi
Turkish Microbiology Congress

Sunlight Hotel & Convention Center, Antalya

4-8 Kasım
November 2018

SÖZEL BİLDİRİLER



International Society of Food Preservation Mycology, Food & Infection
Türk Mikrobiyoloji Derneği
Turkish Society of Microbiology



SS-074

KLEBSIELLA PNEUMONIAE VE ESCHERİCHIA COLI KÖKENLERİNDE POLİSTREN VE CAM PLEYTLERDE UYGULANAN SIVI MİKRODİLÜSYON YÖNTEMLERİ, KALSİYUM EKLENMİŞ MUELLER-HINTON AGARDA E-TEST YÖNTEMİ VE VITEK2 KOLİSTİN DUYARLILIK SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Yeşim Besli¹, Meltem Ayaş², Deniz Ece Kaya², Ayça Pamukçu², Omer Özden⁴, Özgür Asar², Işın Akyar¹

¹Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

²Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoteknoloji Doktora Programı, İstanbul, Türkiye.

³Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

⁴Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İstatistik Bölümü, Eskişehir, Türkiye.

Amaç: CLSI-EUCAST Polimiksin Klinik Sınır Değer Çalışma Grubu, kolistin duyarlılığının saptanmasında referans yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemini önermiştir. Ancak bu yöntemin uygulanmasında yaşanan güçlükler araştırmacıları uygulamayı daha kolay ve maliyet etkin yöntemlerin araştırılmasına itmiştir. Gwozdziński ve ark. kalsiyum eklenmiş Mueller-Hinton agarın (Ca-MHA) kullanıldığı agar dilüsyon yöntemi ile güvenilir kolistin duyarlılık sonuçları elde ettiklerini belirtmişler ve bu besiyerinin kolistin gradiyent difüzyon yöntemi için de kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak kolistin molekül yapısı nedeniyle agar içinde difüzyonun yetersiz olduğu pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Ayrıca kolistin duyarlılık testlerinde kolistin polistren ile bağlandığı ve bu durumun SMD test sonucunu etkileyebileceği çeşitli yayınlarda bildirilmiştir. Bunların yanı sıra rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıkça kullanılmakta olan otomatize sistemlerin kolistin duyarlılık sonuçlarının değerlendirildiği araştırma sayısı kısıtlıdır. Bu çalışmada amacımız Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae) ve Escherichia coli (E. coli) kökenlerinde polistren ve cam pleytlerde uygulanan SMD yöntemleri, Ca-MHA ile uygulanan E-test yöntemi ve VITEK2 ile elde edilen kolistin duyarlılık sonuçlarının güvenilirliğinin değerlendirilmesidir.

Yöntem: Çalışmaya dahil edilen 48 K. pneumoniae ve 12 E. coli klinik kökenlerin tür düzeyinde tanımlanması Bruker Daltonics Microflex LT sistemi ve Bruker Biotyper software ver3.4 (Bruker Daltonics, Germany) ile gerçekleştirilmiştir. Kökenlerin antibiyotik duyarlılık testleri VITEK2 AST-N325 test kartları ile çalışılmıştır. mcr-1 geninin varlığı polimeraz zincir tepkimesi ile araştırılmıştır. Kolistin SMD testleri, EUCAST önerilerine göre cam ve polistren pleytlerde ayrı ayrı çalışılırken gradiyent difüzyon test 5 mM kalsiyum klorür içeren Mueller-Hinton agar kullanılarak çalışılmıştır. Çalışmalarda E. coli ATCC 25922, P. aeruginosa ATCC 27853 ve E. coli NCTC 13846 kontrol kökenleri olarak kullanılmıştır.

Bulgular: Kökenlerin hiçbirinde mcr-1 saptanmamış olup elde edilen kolistin duyarlılık sonuçları Şekil 1 ve Tablo 1'de özetlenmiştir.



Uluslararası
International
XXXVIII.
Türk Mikrobiyoloji Kongresi
Turkish Microbiology Congress

Sunlight Hotel & Convention Center, Antalya

4-8 Kasım
November 2018

SÖZEL BİLDİRİLER



International Society of Microbiology and Immunology
Türk Mikrobiyoloji ve İmmünoloji Derneği



Turkish Society of Microbiology and Immunology
Türk Mikrobiyoloji ve İmmünoloji Derneği

SS-037

KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUŞLARINDA KOLİSTİN DİRENÇ MEKANİZMALARININ TÜM GENOM DİZİLEMESİ İLE ORTAYA ÇIKARILMASI

Ayşegül Ulu Kılıç¹, Ö. Ufuk Nalbantoğlu², Hüseyin Kılıç³, Emine Alp¹, Aycan Gundogdu²

¹Erciyes Üniversitesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Kayseri

³Erciyes Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

Amaç: Son yıllarda çoklu ilaç direnci gösteren enfeksiyon etkenlerinin yaygınlığı, tüm dünya ile birlikte Türkiye'de de enfeksiyon hastalıklarında tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Bu durum, son çare olarak kabul edilebilecek kolistin tedavide sıklıkla kullanımına yol açmıştır. Ancak, kolistin sık kullanımı ile birlikte Klebsiella pneumoniae başta olmak üzere bir çok patojende kolistin direnci rapor edilmeye başlanmıştır. Bu çalışmada, yatan hastalardan izole edilen 6 kolistin dirençli ve 1 kolistin duyarlı *K. pneumoniae* suşları için tüm genom dizileme yapılarak karşılaştırmalı genomik ve biyoinformatik yöntemler üzerinden söz konusu suşlarda kolistin direncine sebep olan genetik faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya dahil edilen 7 *K. pneumoniae* suşunun kolistin duyarlılık broth mikrodilüsyon ile doğrulandıktan sonra kromozom ve plazmitlere ait DNA'lar ticari kitlerle izole edilmiştir. Elde edilen genetik materyaller için Illumina MiSeq platformlarında tüm genom dizileme yapılmıştır. Dizileme verileri için tüm genom ve plazmit genom birleştirme (SPAdes) işlemlerinden sonra anotasyonu (Prodigal ve NCBI PGAP) gerçekleştirilmiştir. Kolistin direncinden sorumlu mobil genetik elemanlar blastx ile taranmıştır. Lipopolisakarit sentez yollarına ait genler veri tabanlarında bulunan 4294 adet *K. pneumoniae* tüm genomuna ait dizilerle karşılaştırılarak çalışma suşlarının genetik varyasyonları araştırılmıştır.

Bulgular: Yapılan incelemelerde çalışmaya dahil edilen 6 kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşunda mobil kolistin direnç genlerince (*mcr-tip*) rastlanamazken, suşların biri hariç tamamında *pmrHFUKLM* operonu ifadesini inhibe eden *MgrB* geninin mutasyona uğradığı görülmüştür. Bu mutasyonların tamamının okuma çerçevesini kaydırarak proteinin sentezlenmesini engelleyen insersiyon ve delesyonlar olduğu tesbit edilmiştir. Bunun yanında lipopolisakarit sentez yollarında diğer de novo mutasyonların varlığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma ile, kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşlarında Lipopolisakarit modifikasyon mekanizmasını inhibe eden regülatörlerin mutasyona uğrayarak köreldiği ortaya konulmuştur. Bu durum, çalışma suşlarında *mcr-tip* gene rastlanmamış olması ile birlikte, eldeki vakalarda direncin kolistin baskısı ile ortaya çıkması olabileceği fikrini güçlendirmektedir. Çalışma sonuçlarına göre direncin belli antibiyotik rejimi stratejileriyle geri döndürülebilir potansiyelinden bahsetmek mümkün görünmektedir.

SS-114

KOLİSTİN DİRENCİNİN TESPİTİNDE YANLIŞ TANI: YALANCI MCR-1 POZİTİFLİĞİ

Tülay Kandemir, Toğrul Nağiyev, Fatih Köksal

Çukurova Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

Amaç: Aminoglikozidlerin ve genişlemiş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin, özellikle de karbapenemlerin her ikisine direnç geliştiren yaygın ilaç dirençli (YİD/XDR) Gram negatif bakterilerin prevalansındaki küresel artışa bağlı kombine tedaviye alternatif olarak kolistin kullanımının artması maalesef bu suşların kolistine karşı da direnç geliştirmesine yol açmaktadır. Güncel çalışmalarda kolistin direncinin sadece kromozomlar aracılığı ile değil, plazmid aracılı *mcr* genlerinin kazanımı ile de gelişebileceği gösterilmiştir. Plazmidler birçok direnç genini bir arada barındırabilir, bu genler tür içinde ve türler arasında horizontal olarak da taşınabilir. Biz, kolistin direncinin hızlı tanısında önem kazanan *mcr-1* geninin varlığını Çukurova Üniversitesi Balçalı Hastanesinde sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyon tanılı hastalardan izole edilen YİD Gram negatif bakteri izolatlarında araştırmayı amaçladık.

Yöntem: Çalışmamızda 75 Acinetobacter baumannii, 19 Pseudomonas aeruginosa ve 9 Klebsiella pneumoniae olmak üzere toplam 103 YİD izolatla PCR yöntemiyle *mcr-1* genini tespit etmek için, spesifik CLR5-F(5-CGGTCAGTCCGTTTGTC-3) ve CLR5-R(5-CTTGTCGGT-CTGTAGGG-3) primer dizileri kullanıldı. PCR(+) izolatlarda *mcr-1* geninin varlığını doğrulamak amacıyla DNA dizi analizi yapıldı.

Bulgular: Fenotipik olarak kolistine dirençli bulunan bir *A. baumannii* ve üç *K. pneumoniae* izolatında PCR yöntemiyle *mcr-1* tespit edilemedi. Fenotipik olarak kolistine duyarlı dört (%3.9) *A. baumannii* izolatında ise hedeflenen 309 bp'lik DNA fragmentleri görüldü ve *mcr-1* PCR(+) olarak değerlendirildi. Bu *mcr-1*-PCR(+) örnekler DNA dizi analiziyle incelendiğinde, amplifikasyon ürünlerinin hedeflenen bölge olmadıkları, ancak yaklaşık aynı baz çifti uzunluğunda oldukları ve hedeflediğimiz gen bölgesiyle % 60-80 oranlarında benzerlik gösterdikleri belirlendi.

Sonuç: Çarpıcı bir şekilde *mcr-1*-PCR(+) olarak tespit edilen amplifikasyon ürünlerimizin hedeflediğimiz *mcr-1* gen bölgesi olmaması, ancak büyük ölçüde benzerlik göstermesi plazmidle taşınabilen değişken bölgeler olabileceğini düşündürdü. Her ne kadar çalışmaların birçoğunda *mcr-1*-PCR genini tespit etmek için kullanılan bu ve diğer primerlerin spesifitesinin %100 olduğu belirtilse de, hızlı rutin tanıda bu yöntemlerin tek başına veya antibiyotik duyarlılık testleri ile birlikte kullanılmalarının henüz yeterli olmadığı, belli bir süre için en azından pozitif çıkan örneklerin mutlaka DNA dizi analizi ile doğrulanmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: DNA dizi analizi, gram negatif bakteri, kolistin direnci, *mcr-1* geni, PCR, yaygın ilaç direnci



Ulusal ve 10. Uluslararası
Türk Mikrobiyoloji Kongresi
TMMOB Mikrobiyoloji Derneği



Uluslararası International XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Turkish Microbiology Congress

Sunlight Hotel & Convention Center, Antalya

4-8 Kasım
November 2018

SÖZEL BİLDİRİLER



International Society of
Microbiology, Travel & Infection
Turkish Society of Microbiology
TMMOB Society for Parasitology



PS-025

KLEBSIELLA PNEUMONIAE KÖKENLERİNDE PLAZMİD ARACILI KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

Gülşen Altınkanat, Şerife Satılmış, Ufuk Hasdemir, Güner Söyletir

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul

Amaç: Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* kökenleri ile gelişen enfeksiyonların küresel yayılımı ile son seçenek ilaç olan kolistin kullanımı önemli ölçüde artmıştır. Bu artış sonucu olarak son yıllarda kolistin direnci tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir. *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde kolistin direnci genellikle kromozomal (*mgrB* genindeki değişiklikler, *pmhA* geninin aktivasyonu ve PhoP/Pho sisteminin up-regülasyonu nedeniyle lipopolisakarit modifikasyonu) olmakla beraber son yıllarda plazmid aracılı kolistin direnci de Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki çeşitli ülkelere bildirilmeye başlanmıştır. Çalışmamızda 2017-2018 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde kolistin direnç genlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Rutin laboratuvarımızda 2017-2018 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen, VITEK2 (BioMérieux) otomatize sistemi ile kolistin sını değeri ≥ 2 mg/L olan 75 *K. pneumoniae* kökeni çalışmaya dahil edilmiştir. Bu kökenlerin minimal inhibitör konsantrasyonları (MK) EUCAST'ın önerileri doğrultusunda sıvı mikrodüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. Kontrol köken olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* NCTC 13846 kullanılmıştır. Kolistin direnç genlerinin (*bla_{mpc-1}*, *bla_{mpc-2}*, *bla_{mpc-3}*, *bla_{mpc-4}*, *bla_{mpc-5}*) yanlığı spesifik primerler kullanılarak multiplex PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Sıvı mikrodüzyon yöntemi ile test edilen kökenlerin 74'ünün kolistin MK'si ≥ 2 mg/L olup dirençli saptanırken 1 kökenin kolistin MK'si 1 mg/L olup duyarlı olarak saptanmıştır. Multiplex PCR yöntemi ile test edilen kökenlerin hiçbirinde *bla_{mpc-1}*, *bla_{mpc-2}*, *bla_{mpc-3}*, *bla_{mpc-4}*, *bla_{mpc-5}* genlerine rastlanmamıştır.

Sonuç: Son yıllarda hastanemizde özellikle karbapenem dirençli kökenlerin artmasına paralel olarak kolistin direnç sıklığı da artmaya başlamıştır. Çalışmamıza dahil edilen 75 kökenin 45'i aynı zamanda karbapeneme dirençlidir. Tüm dünyada plazmid aracılı kolistin direnci %1-36 gibi değişen oranlarda bildirilmesine rağmen hastanemizdeki *K. pneumoniae* kökenlerindeki kolistin direncinden bu mekanizma sorumlu değildir. Ülkemizden herhangi bir çalışmada plazmid aracılı kolistin direncinin bildirilmemiş olması ülkemizdeki kolistin direncinin daha çok kromozomal kaynaklı olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: plazmid aracılı kolistin direnci, *mcr*, *K.*

Ülkemizde mcr-1 ve mcr-2 tespit edilemedi (Henüz)

Editöre Mektup/Letter to Editor

Mikrobiyol Bul 2017; 51(3): 299-303

doi: 10.5578/mb.57515

Ülkemizde Klinik *Enterobacteriaceae* İzolatlarında Plazmit Aracılı Kolistin Direnç Genlerini (*mcr-1* ve *mcr-2*) Araştıran Çok Merkezli Çalışmaya Ait Sonuçlar

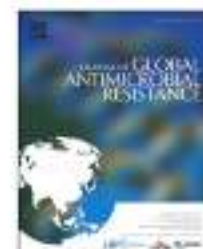
Results of a Multicenter Study Investigating Plasmid Mediated Colistin Resistance Genes (*mcr-1* and *mcr-2*) in Clinical *Enterobacteriaceae* Isolates from Turkey

Ayşe Nur SARI^{1,2}, Serap SÜZÜK³, Onur KARATUNA⁴, Dilara ÖĞÜNÇ⁵, Ayşe Esra KARAKOÇ⁶, Zeynep ÇİZMECİ⁷, Hikmet Eda ALIŞKAN⁸, Füsün CÖMERT⁹, Mustafa Zahir BAKICI¹⁰, Nezahat AKPOLAT¹¹, Fatma Feriha ÇİLLİ¹², Yasemin ZER¹³, Aysel KARATAŞ¹⁴, Bahar AKGÜN KARAPINAR¹⁵, Gülçin BAYRAMOĞLU¹⁶, Melda ÖZDAMAR¹⁷, Fatma KALEM¹⁸, Nuran DELİALİOĞLU¹⁹, Elif AKTAŞ²⁰, Nisel YILMAZ²¹, Şaban GÜRCAN²², Zeynep GÜLAY¹



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Global Antimicrobial Resistance

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

Letter to the Editor

First report of *Escherichia coli* carrying the mobile colistin resistance gene *mcr-1* in Turkey



Four Col^R *E. coli* strains (A1, A5, A7 and A9) were isolated from different chicken meat samples ($n = 80$) purchased from butchers and retail markets in two Turkish provinces (Hatay and Adana). All isolates were identified using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of Col^R *E. coli* strains was performed following *Xba*I restriction. Antimicrobial susceptibility testing of Col^R *E. coli* isolates was performed using a VITEK[®]2 system, and the broth microdilution method was performed to determine the colistin minimum inhibitory concentration (MIC). Extraction of total bacterial DNA was performed using a commercial kit (QIAGEN, Hilden, Germany). PCR was run to determine the presence of the *mcr-1* gene as previously described [3]. Whole-genome sequencing (WGS) of the strains was performed using a NextSeq500 sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA). Sequencing reads were assembled using SPAdes genome assembler and the resulting contigs were annotated using Blast tool. Multilocus sequence typing (MLST) and characterisation of plasmid replicon types and resistance gene content of the strains were performed in silico (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

Among 80 chicken meat samples analysed in this study, 4 *E. coli* strains (5%) displaying a colistin MIC > 8 µg/mL were isolated and all isolates were confirmed by PCR to harbour the *mcr-1* gene. To the best of our knowledge, this is the first report of *mcr-1*-positive *E. coli* in Turkey. Among the four Col^R *E. coli* isolates, PFGE revealed three different pulsotypes (Fig. 1). One strain from each pulsotype

Cemil Kurekci^a

Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, 31030 Antakya, Hatay, Turkey

Muhsin Aydin

Department of Biology, Faculty of Science and Letters, Adiyaman University, 02040 Adiyaman Merkez, Adiyaman, Turkey

Ozkan Ufuk Nalbantoglu^{a,b}

^aDepartment of Computer Engineering, Erciyes University, 38030 Kayseri, Turkey

^bGenome and Stem Cell Center (GenKök), Erciyes University, 38030 Kayseri, Turkey

Aycan Gundogdu^{a,b}

^aGenome and Stem Cell Center (GenKök), Erciyes University, 38030 Kayseri, Turkey

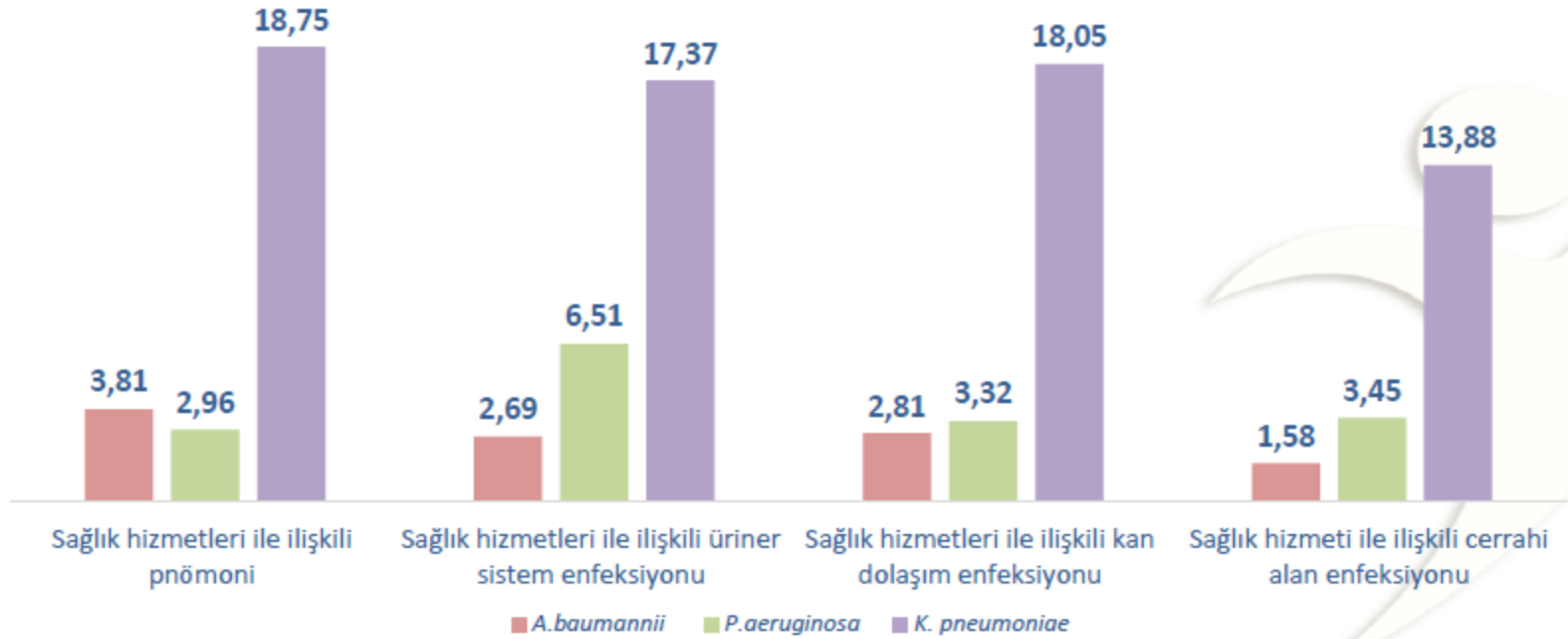
^bDepartment of Microbiology and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Erciyes University, 38030 Kayseri, Turkey

SB, UAMDS 2016 verileri

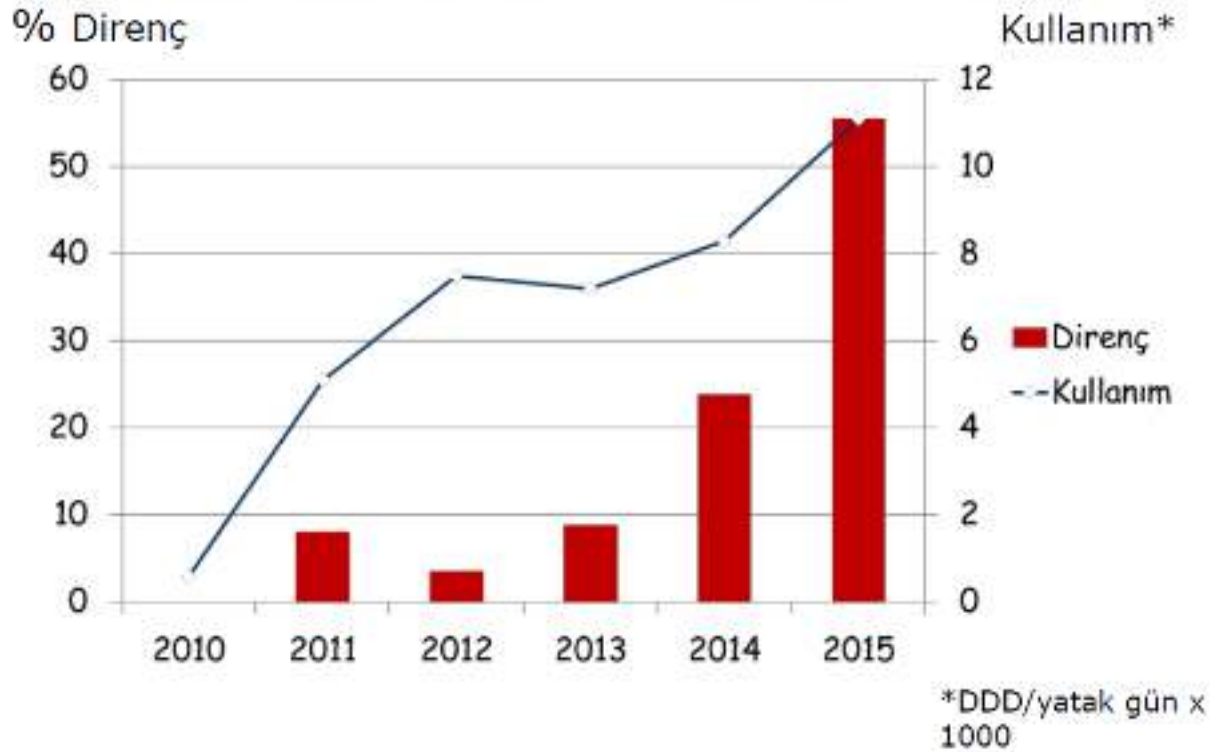
Bakteri Adı	İzolat Sayısı (%)	Kolisitin Çalışılan İzolat Sayısı	Kolisitin Dirençli İzolat Sayısı	Kolisitin Direnç Oranı	Yöntem
<i>E. coli</i>	4342 (% 23,8)	2742	83	% 3 (1,2)	DD, GS, OT
<i>K. pneumoniae</i>	3218 (% 17,6)	2262	395	% 17,5 (11,3)	DD, GS, OT
<i>P. aeruginosa</i>	1466 (% 8)	1038	56	% 5,2	DD, GS, OT
<i>A. baumannii</i>	2751 (% 15,5)	2322	155	% 6,7 (2,87)	DD, GS, OT



Sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonlarda kolistin direnci



Kolistin kullanımı ve karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında direnç gelişimi



P0694

ECCMID 2016

Paper Poster Session

Emergence and worldwide outbreaks of carbapenemase-producing bacteria

Multiclonal outbreaks with colistin-resistant carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates responsible for bloodstream infections in Turkey

Aur lie Jayol¹, Patrice Nordmann², Zeynep G lay³, M. Bicmen⁴, S. Alpcavus⁴, Laurent Poirel^{*2}

317 Karbapenem dirençli kan izolatu; 2012'de kolistin direnci **%5**, 2013- %10, 2014- %31, **2015-%68'e** yükselmiş.

- NDM (+) kolistin dirençli *K.pneumoniae* salgınına bağlı
- PmrB ve mgrB gen mutasyonları

Antimicrob. Agents Chemother. Mart 2016

Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, Liu Y
Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in
multidrug resistant Gram-negative bacteria

Jayol A, Nordmann P, Desroches M, Decusser
JW, Poirel L.
*Acquisition of broad-spectrum cephalosporin
resistance leading to colistin resistance in Klebsiella
pneumoniae.*

- Kolistin dirençli MDR Gram negatiflerde özellikle *Acinetobacter baumannii* ve *Stenotrophomonas maltophilia* için test ortamına 10 mg/L CCCP (siyanid 3-Klorfenilhidrazon) MİK'leri anlamlı şekilde düşürmüş.
- Kolistin direncini baskılayabilir ve hatta geri döndürebilir
- Geniş spektrumlu sefalosporin kullanımının seçici baskısı nedeniyle kolistin direnci de beraberinde seçiliyor (kromozomal *mgrB* genindeki transpozisyon)