

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 DELIALIOĞLU¹⁹, Elif AKTAŞ²⁰, Nisel YILMAZ²¹, Şaban GÜRCAN²², Zeynep GÜLAY¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

² SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.

² SANKO University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Gaziantep, Turkey.

³ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı Daire Başkanlığı, Ankara.

³ Public Health Institution of Turkey, Department of Microbiology Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

⁴ Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Acibadem University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

⁵ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

⁵ Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Turkey.

⁶ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

⁶ Ankara Training and Research Hospital, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

⁷ Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

⁷ Bakırköy Dr. Sadi Konuk Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Istanbul, Turkey.

⁸ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

⁸ Baskent University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.

⁹ Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak.

⁹ Bulent Ecevit University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Zonguldak, Turkey.

¹⁰ Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas.

¹⁰ Cumhuriyet University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sivas, Turkey.

¹¹ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.

¹¹ Dicle University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Diyarbakır, Turkey.

¹² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹² Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

- ¹³ Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.
¹³ Gaziantep University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Gaziantep, Turkey.
¹⁴ İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.
¹⁴ Istanbul Training and Research Hospital, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.
¹⁵ İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
¹⁵ Istanbul University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.
¹⁶ Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
¹⁶ Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.
¹⁷ Anadolu Sağlık Merkezi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kocaeli.
¹⁷ Anadolu Medical Center, Microbiology Laboratory, Kocaeli, Turkey.
¹⁸ Konya Numune Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya.
¹⁸ Konya Numune Hospital, Clinical Microbiology Laboratory, Konya, Turkey.
¹⁹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.
¹⁹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.
²⁰ Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.
²⁰ Şişli Hamidiye Etfal Research and Training Hospital, Clinical Microbiology Laboratory, Istanbul, Turkey.
²¹ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.
²¹ Tepecik Research and Training Hospital, Clinical Microbiology Laboratory, Izmir, Turkey.
²² Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.
²² Trakya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Edirne, Turkey.

* Bu çalışma verilerinin bir bölümü, 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri (1-3 Nisan 2016, İstanbul)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 09.03.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.06.2017

ÖZ

Kolistin, son yıllarda çoklu ilaç direnci ve karbapenem direncine sahip gram-negatif bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kullanılan polimiksin grubu bir antibiyotiktir. Günümüzde bildirilen kolistin direnç mekanizmaları çoğunlukla kromozomal olup, genellikle özgül iki bileşenli düzenleyici sistemlerini kodlayan genlerde mutasyonlara neden olan mekanizmalardır. İlk kez 2015 yılında plazmit aracılı kolistin direncine yol açan MCR-1 proteini, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında tanımlanmıştır ve bunu 2016 yılında MCR-2 proteininin tanımlanması takip etmiştir. Plazmit aracılı direnç mekanizmalarının yatay gen transferi ile hızlı bir şekilde türler arasında yayılım göstermesi, kolistine dirençli kökenlerin sıklığının hızlı artışına ve bu kökenlerin yayılarak salgınlara oluşturma potansiyeli taşımaya bağlı olarak, bu direnç özelliğini klinik ve epidemiyolojik açılarından önemli kılmaktadır. Günümüze kadar birçok farklı ülkeden plazmit kaynaklı *mcr-1/mcr-2* geni taşıyan *Enterobacteriaceae* izolatları bildirilmiş olup ülkemize ait bir bildiri henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, ülkemizin farklı bölgelerine ait klinik *Enterobacteriaceae* izolatlarında *mcr-1/mcr-2* varlığının araştırılmasıdır. Bu amaçla, toplam 22 merkeze ait 329 *Enterobacteriaceae* izolatında *mcr-1* ve *mcr-2* gen varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm izolatların 217 (%66)'si *Klebsiella pneumoniae*, 75 (%22.8)'i *Salmonella* spp., 31 (%9.4)'i *E.coli*, 3 (%0.9)'ü *Enterobacter cloacae*, 2 (%0.6)'si *Klebsiella oxytoca* ve 1 (%0.3)'ü *Enterobacter aerogenes*'tir. Yapılan tüm PCR çalışmalarına ait agaroz jel elektroforezi görüntülerinde pozitif kontrol izolatlarında *mcr-1* gen bölgesi için 309 bp ve *mcr-2* gen bölgesi için 567 bp beklenen bant büyüklüğü elde edilmiştir. Ancak, çalışmaya alınan izolatların hiçbirinde *mcr-1* veya *mcr-2* gen bölgesi saptanmamıştır. Çok merkezli çalışma bulgularımız bu direnç mekanizmalarının ülkemizde henüz bulunmadığını işaret etmektedir. Kolistin çoklu ilaç direncine sahip ya da karbapenem dirençli gram-negatif bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kullanıldığı göz önüne alındığında direnç yayılım mekanizmasının anlaşılması ve dirençli izolatların takibi büyük önem

taşımaktadır. Bu nedenle, bu mekanizmaların sürekli takibinin yapılması ve farklı direnç profillerinde klinik ve özel önem gösteren klinik dışı izolatlarda (besi hayvanları, çığ et, çevresel örnekler için izolatlar vb.) dikkatle araştırılması önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: Colistin; *mcr-1*; *mcr-2*; *Enterobacteriaceae*.

ABSTRACT

Colistin is a polymyxin antibiotic which is considered as one of the last line agents against infections due to multidrug resistant or carbapenem resistant gram-negative pathogens. Colistin resistance is associated with chromosomal alterations which can usually cause mutations in genes coding specific two component regulator systems. The first plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-1* was described in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in December 2015 and followed by another plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-2* in 2016. The rapid and interspecies dissemination of plasmid-mediated resistance mechanisms through horizontal gene transfer, have made these genes considerably threatening. After the first reports, although *mcr-1/mcr-2* producing *Enterobacteriaceae* isolates have been reported from many countries, there have been no reports from Turkey. Thus, the aim of this study was to investigate the presence of *mcr-1/mcr-2* in clinical *Enterobacteriaceae* isolates from different parts of our country. A total of 329 *Enterobacteriaceae* isolates from 22 laboratories were collected which were isolated between March, 2015 and February, 2016. *mcr-1/mcr-2* were investigated by polymerase chain reaction during February-March, 2016. Two hundred and seventeen of *Klebsiella pneumoniae* (66%), 75 of *Salmonella* spp. (22.8%), 31 of *Escherichia coli* (9.4%), 3 of *Enterobacter cloacae* (0.9%), 2 of *Klebsiella oxytoca* (0.6%) and 1 of *Enterobacter aerogenes* (0.3%) isolates were included to the study. Agarose gel electrophoresis results of PCR studies have shown expected band sizes for positive control isolates as 309 bp for *mcr-1* and 567 bp for *mcr-2*. However, the presence of *mcr-1/mcr-2* genes was not detected among the tested study isolates of *Enterobacteriaceae*. Although *mcr-1/mcr-2* were not detected in our study isolates, it is highly important to understand the mechanism of resistance dissemination and determine the resistant isolates by considering that colistin is a last-line antibiotic against infections of multidrug or carbapenem resistant gram-negative bacteria. Thus, it is suggested that these mechanisms should be followed-up in both clinical and non-clinical (e.g. isolates from food animals, raw meats and environment) isolates of special populations.

Keywords: Colistin; *mcr-1*; *mcr-2*; *Enterobacteriaceae*.

Sayın Editör,

Kolistin (polimiksin E), katyonik polipeptitler olan polimiksinler grubundan bir antibiyotiktir ve *Enterobacteriaceae* üyelerinin çoğu ile beraber gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu etkiye sahiptir¹. 2015 yılının sonlarına kadar bildirilen polimiksin direnç mekanizmaları kromozom kaynaklı olup, genellikle özgül iki bileşenli düzenleyici sistemlerini kodlayan genlerde mutasyonlara neden olan mekanizmalardır². 2015 yılının sonlarında Liu ve arkadaşları³, ilk kez plazmit aracılı kolistin direnç mekanizması olan ve bir fosfoetanol amintransferaz proteinini kodlayan *mcr-1* genini tanımlamışlardır. İlk kez 2016 yılında Belçika'dan bildirilen *mcr-2* ise, *mcr-1* ile nükleotit dizi benzerliği %76.7 olan bir diğer plazmit aracılı direnç genidir⁴. Bugüne kadar ülkemize ait herhangi bir *mcr-1/mcr-2* bildiri yapılmamış olup, bu çalışmada farklı bölgeleri kapsayacak şekilde çok merkezli olarak plazmit aracılı kolistin direnci araştırılmıştır. Çalışmamıza 22 merkezden toplam 329 *Enterobacteriaceae* izolatı dahil edilmiştir. Tüm merkezlerden Mart 2015 ve Şubat 2016 tarihleri arasında izole edilen ve EUCAST kriterlerine göre kolistine

dirençli 174 izolat toplanmıştır (> 2 mg/L)⁵. Geri kalan 155 izolat ise güncel literatür verileri doğrultusunda, kolistin MİK değeri bilinmeden tarama amaçlı olarak çalışmaya dahil edilen ve çalışmanın yürütüldüğü Dokuz Eylül Üniversitesinde izole edilen izolatlardır. Tüm izolatların %84.3'ü karbapenem direncine sahiptir. İzolatların 171'i Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinden izole edilmiş olup 158 izolat diğer merkezlerden toplanmıştır [Adana (n= 5), Ankara (n= 23), Antalya (n= 7), Diyarbakır (n= 6), Edirne (n= 9), Gaziantep (n= 8), İstanbul (n= 48), İzmir (n= 188), Kocaeli (n= 4), Konya (n= 9), Mersin (n= 8), Sivas (n= 2), Trabzon (n= 10) ve Zonguldak (n= 2)]. İzolatların tür düzeyinde tanımlanmasında geleneksel yöntemler ile beraber merkezlere göre farklılık gösteren otomatize sistemler kullanılmıştır. Tüm izolatların 217 (%66)'si *Klebsiella pneumoniae*, 75 (%22.8)'i *Salmonella* spp., 31 (%9.4)'i *Esherichia coli*, 3 (%0.9)'ü *Enterobacter cloacae*, 2 (%0.6)'si *Klebsiella oxytoca* ve 1 (%0.3)'i *Enterobacter aerogenes*'tir. Çalışma izolatlarının izole edildiği örnek tipleri kan, beyin omurilik sıvısı, intraabdominal sıvı, kateter ucu, yara, trakeal sekresyon, balgam ve idrar örnekleridir. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlarda *mcr-1* ve *mcr-2* gen bölgeleri, özgül öncüller ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle Şubat- Mart 2016 tarihleri arasında araştırılmıştır^{3,4}. Tüm PCR çalışmaları sonucunda pozitif kontrol izolatlarında *mcr-1* gen bölgesi için 309 baz çifti (bp) ve *mcr-2* gen bölgesi için 567 bp beklenen bant büyüklüğü elde edilmiştir. Ancak, çalışmaya alınan izolatların hiçbirinde *mcr-1* veya *mcr-2* gen bölgesi saptanmamıştır. Plazmit aracılı tüm direnç mekanizmaları gibi, *mcr-1/mcr-2* genleri de kolay ve hızlı yayılarak, kolistin direncinde hızlı artışa sebep olma potansiyallerinden dolayı tüm dünyada endişe yaratmaktadır. Çok merkezli çalışmamıza dahil edilen izolatlarda plazmit aracılı kolistin direnç genleri bulunmamış olmakla birlikte, çalışma izolatlarımızın tümü klinik izolatlardan oluşmaktadır. *mcr-1* ya da *mcr-2*'nin tespit edildiği klinik izolatlar ile yapılan çalışmaların çoğunda, bu izolatların kaynağı belirlenememiş olmasına rağmen, direnç genlerinin daha çok hayvanlarda görüldüğü düşünülmektedir^{6,7}. Bu durum göz önüne alındığında, ülkemizde besi hayvanları, çığ et kaynaklı veterinerlik alanından elde edilecek izolatlar ile yapılacak çalışmalar önem taşımaktadır. Çalışma izolatlarımızın 174'ü kolistin MİK değeri daha önceden belirlenmiş izolatlar olup, EUCAST verilerine göre dirençli izolatlardır. Geri kalan 155 izolat ise *mcr-1*'in farklı türlerde (*Salmonella* spp. vb.) bulunduğunu ve kolistin duyarlılığının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntem olan antibiyotik gradiyent şerit yönteminin bu genlerin neden olduğu düşük düzey kolistin direncini belirlemede yetersiz kalabildiğini bildiren çalışmaların yayımlanmasının ardından, tarama amaçlı olarak çalışmaya dahil ettiğimiz izolatlardır. Günümüzde kolistin direncinin belirlenmesinde kullanılan in vitro yöntemler, yüksek hata oranları, düşük tekrarlanabilirlik ve uygulama için uzun zaman gerektirme gibi önemli kısıtlamalara sahiptir. Bununla birlikte, rutin laboratuvar tanıda diğer antibiyotiklere duyarlı bulunan izolatlarda kolistin direncinin araştırılmaması da plazmit aracılı kolistin direnç genlerine sahip izolatların atlanmasına neden olmuş olabilir. Bunun nedeni, *mcr-1/mcr-2* gen varlığının diğer grup antibiyotiklere duyarlı izolatlarda da bulunabilmesidir⁸. Ayrıca, EUCAST verilerine göre kolistine duyarlı bazı izolatlarda da *mcr-1* varlığının gösterildiği çalışmalar bulunmaktadır^{9,10}. Yine bu genlere sahip izolatların atlanabileceği ihtimaline işaret eden bu bildirimler direncin sessiz yayılımına karşı dikkatli olunması gerektiğini vurgulamaktadır.

Çalışma izolatlarımızda plazmit aracılı kolistin direncinin bulunmaması bu mekanizmaların ülkemizde henüz yaygın olmadığına işaret etmektedir. Fakat farklı genetik çevrelerde bulunabilen ve yayılım mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamış olan bu direnç genlerinin izlemi konusunda dikkatli olunmalı, farklı direnç profilinde ve klinik dışı izolatlar ile çalışmalar planlanmalıdır. Aynı zamanda plazmit aracılı direnç mekanizmalarının, farklı bakteri türleri arasında yatay gen transferi ile geçebildiği göz önüne alınarak, çoklu ilaç direncinin yaygın olduğu nonfermentatif türlerde de kolistin direnci üzerinde hassasiyetle durulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol* 2016; 7: 1789.
2. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(12): 5761-9.
3. Liu YY, 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(2): 161-8.
4. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 2016; 21(27).
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016.
6. Yanat B, Machuca J, Yahia RD, Touati A, Pascual Á, Rodríguez-Martínez JM. First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 48(6): 760-1.
7. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human blood stream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill* 2015; 20(49).
8. Al-Tawfiq JA, Laxminarayan R, Mendelson M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *Int J Infect Dis* 2017; 54: 77-84.
9. Liassine N, Assouvie L, Descombes MC, et al. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *Int J Infect Dis* 2016; 51: 4-5.
10. Kawanishi M, Abo H, Ozawa M, et al. Prevalence of colistin resistance gene *mcr-1* and absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* isolated from healthy food-producing animals in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 61(1); e02057-16.