



Klebsiella pneumoniae Suşlarında Çift Karbapenem ve Kolistin Kombinasyonlarının in vitro Değerlendirilmesi

***Fatma Erdem, Ayham Abulaila, Mustafa Fevzi Ozsoy ,
Osman Şahingöz, Zerrin Aktaş, Oral Öncül***

İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi

Amaç



- Pan-drug Gram negatif bakterilerin ortaya çıkması kombinasyon tedavisini zorunlu hale getirmiştir.
- Bu çalışmada, kombinasyon tedavisine yol göstermek amacıyla,
- **Kolistin ve karbapenemlere dirençli**, OXA-48 (n=7) ve NDM-1 (n=3), OXA48/NDM-1 (n=1) pozitif *Klebsiella pneumoniae* suşlarında (n=10)
- Dama tahtası sinerji testi ve zamana bağlı öldürme yöntemleri kullanılarak ertapenem, meropenem, kolistinin tek başlarına ve kombinasyonlarının etkinlikleri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir

Gereç ve Yöntem



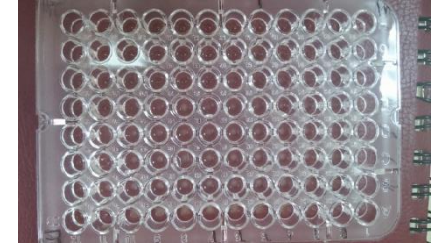
- Antibiyotik duyarlılıkları Gradient-test ve otomatize sistemler (Phoenix) kullanılarak araştırıldı.
- Sonuçlar CLSI'nın önerilerine göre yorumlandı .
- **Kolistin**, ertapenem, meropenem veya imipeneme dirençli bulunan *K. pneumoniae* suşları çalışmaya alındı.
- İzolatların beta laktamaz aktiviteleri
 - GSBL E test,
 - Blue-Carba (BCT)
 - OXA-48 K-Se T test
 - Modifiye Hodge test (MHT) ile tarandı.

CLSI_M100-S24

Sinerji testleri



- Dama tahtası yöntemi (1XMİK)
- Zamana bağlı öldürme yöntemi



- Ertapenem
- Meropenem
- Kolistin
- Ertapenem/meropenem,
- Meropenem/kolistin,
- Ertapenem/meropenem/kolistin

Sinerji testleri



- Dama tahtası yöntemi değerlendirilirken FİK FİK indeks değerleri kullanıldı;
- FİK indeksi $\leq 0,5$ sinerjist
- FİK indeksi $0,5-1$ aditif
- FİK indeksi $1-2$ indiferens
- FİK indeksi >2 antagonist

Zamana bağılı öldürme yöntemi



- Ertapenem (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$),
 - Meropenem (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
 - Kolistin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- **Cmax serum konsantrasyon değerleri** kullanıldı.
- Test edilen antibiyotiklerin izolatlar üzerindeki etkileri 2, 4, 6, 8 ve 24. saatlerde değerlendirildi.
- Kolistin ve kolistinin kombinasyonlarının etkisi 30. dakikada ayrıca değerlendirildi.

Zamana bağlı öldürme yöntemi

- İlaçların tek tek ve kombine olduğu tüplere ekim yapılır.(final inokulum 5×10^6 - 1×10^7 arasında olmalıdır)
- İnkübasyon sırasında tüplerden 0,2,4,6,8,12 ve 24 .saatlerde katı besiyerlerine pasaj alınır.
- Kombinasyon varlığında oluşan koloni sayısı,incelenen suşa karşı en etkili ajanın tek başına etkisi ile karşılaştırıldığında koloni sayısında 100 kat azalma sinerji
- Daha az azalma aditif etki,
- 100 kat artış ise antagonizma olarak tanımlanır.

Direnç genleri PCR yöntemi ile araştırıldı



- **GSLB:** TEM, SHV ve CTX-M (CTX-M-1,CTX-M-2,CTX-M-8,CTX-M-9,CTX-M-25)
- **Karbapenem direnci:** OXA-48, OXA 181, KPC, IMP, VIM, GES, SPM, SIM
- **Kolistin direnci:** pmrA, pmrB, phoP, phoQ ve mgrB
- **Kazanılmış plazmidik kinolon direnci:** *qnrA*, *qnrB*, ve *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*
- **Kazanılmış AmpC beta laktamaz:** DHA, ACC, FOX, MOX, CIT ve EBC
- **Kazanılmış aminoglikozid direnci:** 16SrRNA rmt (A-E) genleri ve nmpA

Nordman P J Antimicrob Agents. 2015

Hanson ND J Clin Microbiol. 2002

Arakawa Y. Clin. Infect. Dis. 2007

Arakawa Y. Antimicrob. Agents Chemother 2007

PCR temelli plazmit replikon tiplendirmesi



- 25 replikon için 8 ayrı multipleks PCR uygulandı.
- Replikonlar:
- HI1, HI2,
- I1, I2,
- X1, X2,
- L/M, N,
- FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIK,
- W, Y, P, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M

Klonal İlişkinin Araştırılması



➤ PFGE analizi

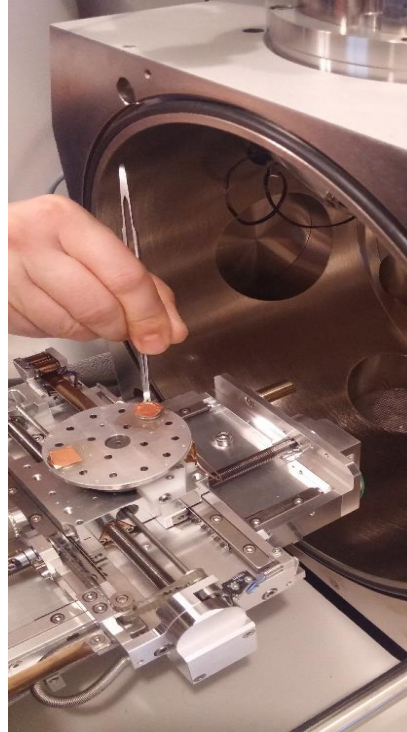
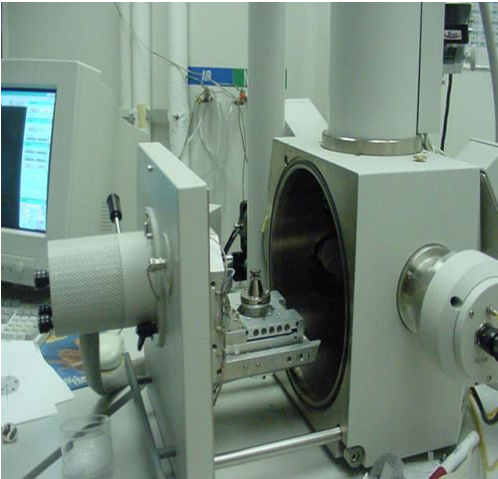
➤ MLST analizi (7 korunmuş gen)

<http://bigsdh.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>

Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri (SEM)



- Antibiyotiklerin hücre duvarına etkileri taramalı elektron mikroskobu ile görüntülendi.





BULGULAR

Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

(mg/L)



	TGC	OF	AMC	LEV	DOR	PTc	AK	CI	CRO	XM	TZ/TZL	IP/IPL	TOB	CT/CTL
E.coli ATCC 25922/35218*	0,25	0,94	16*	0,06	0,012	1.5*	2	0,64	0,12	6	-	<4/<1*	0,25	<0.025/0.064*
1	3	>32	128	>32	>32	>256	>256	16	>32	>256	>32/>4	<4/<1	192	>16/>1
2	0,38	>32	>32	>32	>32	>256	4	>32	>32	>256	>32/>4	<4/1,5	24	>16/>1
14	0,50	>32	>256	>32	4	>256	12	>32	>256	>256	>32/>4	4/0,5	24	>16/>1
21	0,5	>32	>256	>32	4	>256	8	>32	>32	>256	>32/>4	<4/1,5	24	>16/>1
22	1	>32	>256	32	>32	>256	>256	>32	>32	>256	>32/>4	<4/<1	>1024	>16/>1
24	0,50	>32	>256	32	>32	>256	6	>32	>32	>256	>32/>4	4/1,5	24	>16/>1
28	0,38	>32	>256	>32	4	>256	4	>32	>32	>256	>32/>4	<4/1	32	>16/>1
31	2	32	>256	>32	6	>256	8	>32	>32	>256	>32/>4	<4/2	32	>16/>1
37	0,50	>32	>256	>32	4	>256	>256	>32	>32	>256	>32/>4	<4/<1	>1024	>16/>1
B6	0,38	>32	>256	>32	12	>256	>256	>32	>32	>256	>32/>4	<4/<1	192	>16/>1

Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları (mg/L)



	TGC	OF	AMC	LEV	DOR	PTc	AK	CI	CRO	XM	TZ/TZL	IP/IPL	TOB	CT/CTL
E.coli ATCC 25922/35218*	0.25	0,94	16*	0,06	0,012	1.5*	2	0,64	0,12	6	-	<4/<1*	0,25	<0.025/0.064*
1	3	>32	128	>32	>32	>256	>256	16	>32	>256	>32/>4	<4/<1	192	>16/>1
2	0,38	>32	>32	>32	>32	>256	4	>32	>32	>256	>32/>4	<4/1,5	24	>16/>1
14	0,50	>32	>256	>32	4	>256	12	>32	>256	>256	>32/>4	4/0,5	24	>16/>1
21	0,5	>32	>256	>32	4	>256	8	>32	>32	>256	>32/>4	<4/1,5	24	>16/>1
22	1	>32	>256	32	>32	>256	>256	>32	>32	>256	>32/>4	<4/<1	>1024	>16/>1
24	0,50	>32	>256	32	>32	>256	6	>32	>32	>256	>32/>4	4/1,5	24	>16/>1
28	0,38	>32	>256	>32	4	>256	4	>32	>32	>256	>32/>4	<4/1	32	>16/>1
31	2	32	>256	>32	6	>256	8	>32	>32	>256	>32/>4	<4/2	32	>16/>1
37	0,50	>32	>256	>32	4	>256	>256	>32	>32	>256	>32/>4	<4/<1	>1024	>16/>1
B6	0,38	>32	>256	>32	12	>256	>256	>32	>32	>256	>32/>4	<4/<1	192	>16/>1

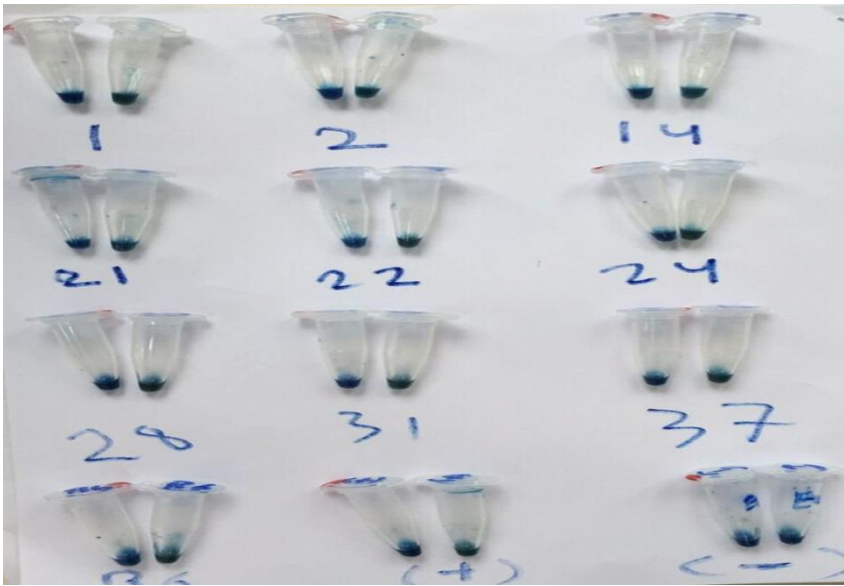
Antibiyotik Duyarlılık Sonuları-2 (mg/L)



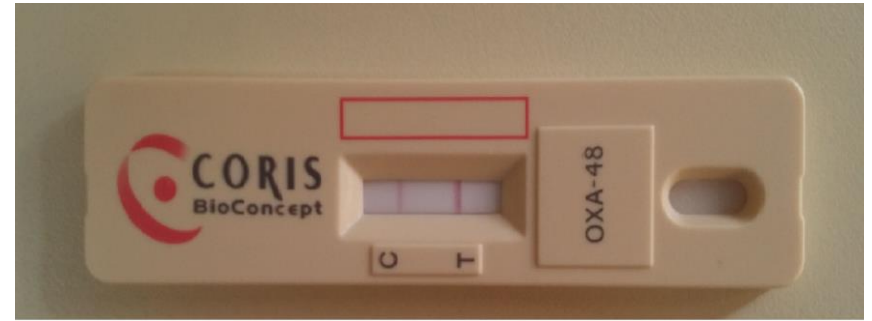
Su	Kolistin	Ertapenem	Meropenem	Doripenem
1	16	>256	64	>32
2	16	>128	32	>32
14	4	32	24	4
21	16	>128	32	4
22	16	128	32	>32
24	16	>128	32	>32
28	16	>128	16	4
31	16	>128	64	6
37	16	128	32	4
B6	8	256	64	12

Karbapenemaz Tarama Testleri

BLUE CARBA TEST



OXA-48 K-Set



Bütün suşlar her iki test ile de pozitif sonuç vermiştir.

Sinerji testleri sonuçları



- **Dama tahtası yöntemi**
 - Ertapenem/meropenem (5/10)
Meropenem/kolistin (7/10)
Ertapenem/meropenem/kolistin (9/10)
oranında sinerji saptandı.
 - Antagonist etki saptanmadı.

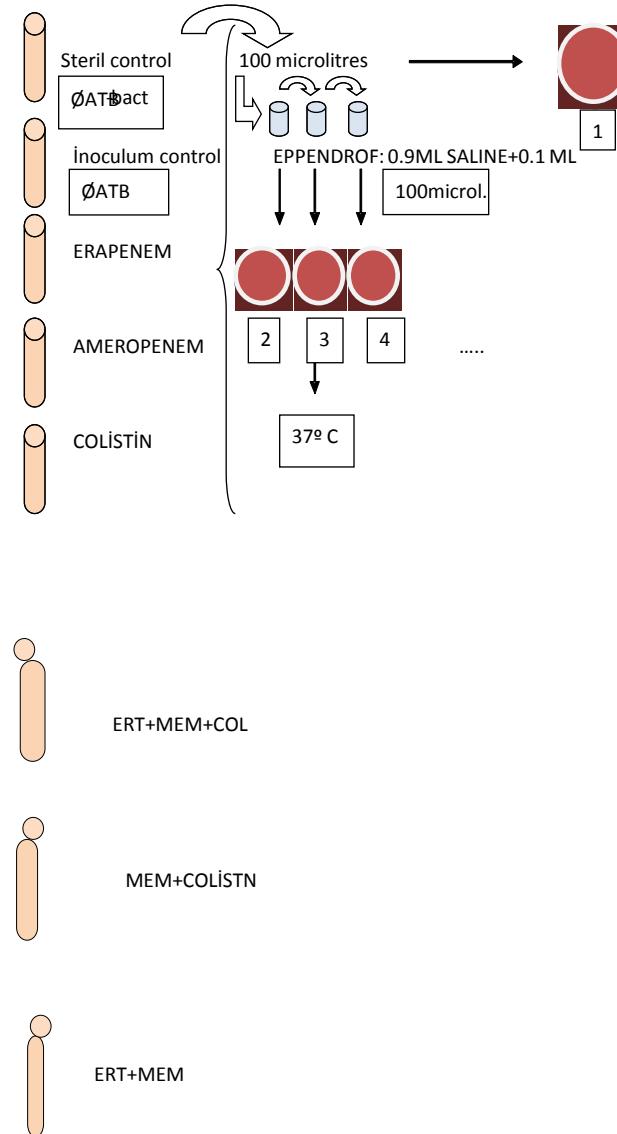
Sinerji testleri Sonuçları

Zamana bağlı öldürme yöntemi

- Kolistin+ertapenem+meropenem kombinasyonu bakterisidal aktivite gösterdi.
- İnokulumda > 2 log azalma sinerjistik etki , > 3 log azalma bakterisidal etki olarak yorumlandı.

TİMES:

T0, T1, T2, T4, T6, T12, T24



Sinerji testleri

Zamana bağlı öldürme yöntemi

Ertapenem ve meropenem  indifirens etki

Meropenem/kolistin  sinerjistik etki

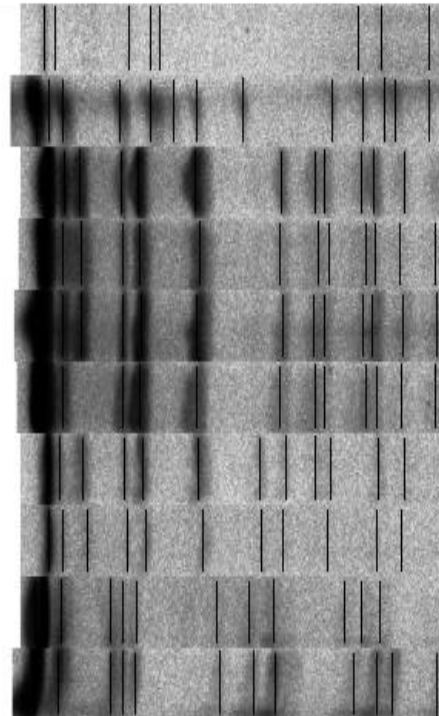
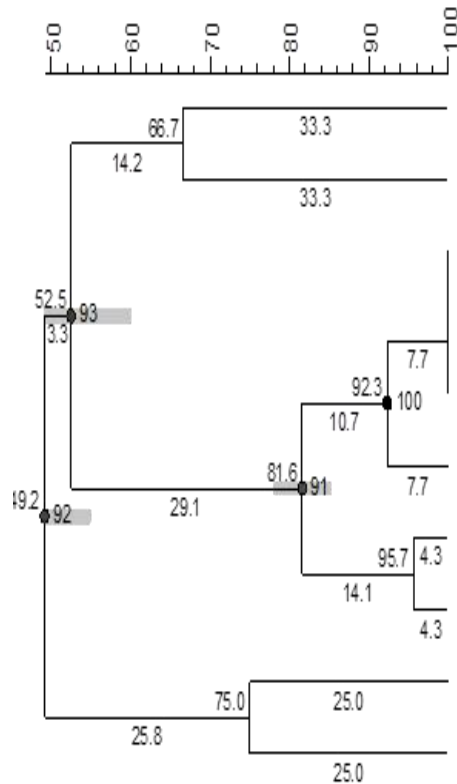
Ertapenem/meropenem/
Kolistin  sinerjistik etki

PCR, plazmit tiplendirmesi sonuçları.



Suş	PCR	PLAZMİT	PFGE	MLST
1	NDM-1 CTX-M-15 TEM, SHV, rmtB, rmA	INCR, INCH1b M, INCF1b, INCFII	A	ST 14
2	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV, rmtD	INCR, INCL	B	ST101
14	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV, rmtD	INCR, INCL	B	ST101
21	OXA-48 CTX-M-15, TEM, SHV, rmtD	INCR	B	ST101
22	NDM-1,OXA-48 CTX-M-15, rmtC	INCR, INCL	C	ST395
24	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV, rmt D	INCR, INCL	B	ST101
28	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV	INCR, INCL	B	ST101
31	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV	INCR, INCL	B	ST101
37	OXA-48, CTX-M-15, RmtC,QnrB	INCR	D	ST395
B6	NDM-1 CTX-M-15, TEM. SHV, CIT, rmtB-C, QnrS	INCR, INCA/C	E	ST15

PFGE Analizi



G@images. 1 Klebsiella pn.
 G@images. b6 Klebsiella pn.
 G@images. 14 Klebsiella pn.
 G@images. 24 Klebsiella pn.
 G@images. 31 Klebsiella pn.
 G@images. 28 Klebsiella pn.
 G@images. 2 Klebsiella pn.
 G@images. 21 Klebsiella pn.
 G@images. 22 Klebsiella pn.
 G@images. 37 Klebsiella pn.

MLST analizi



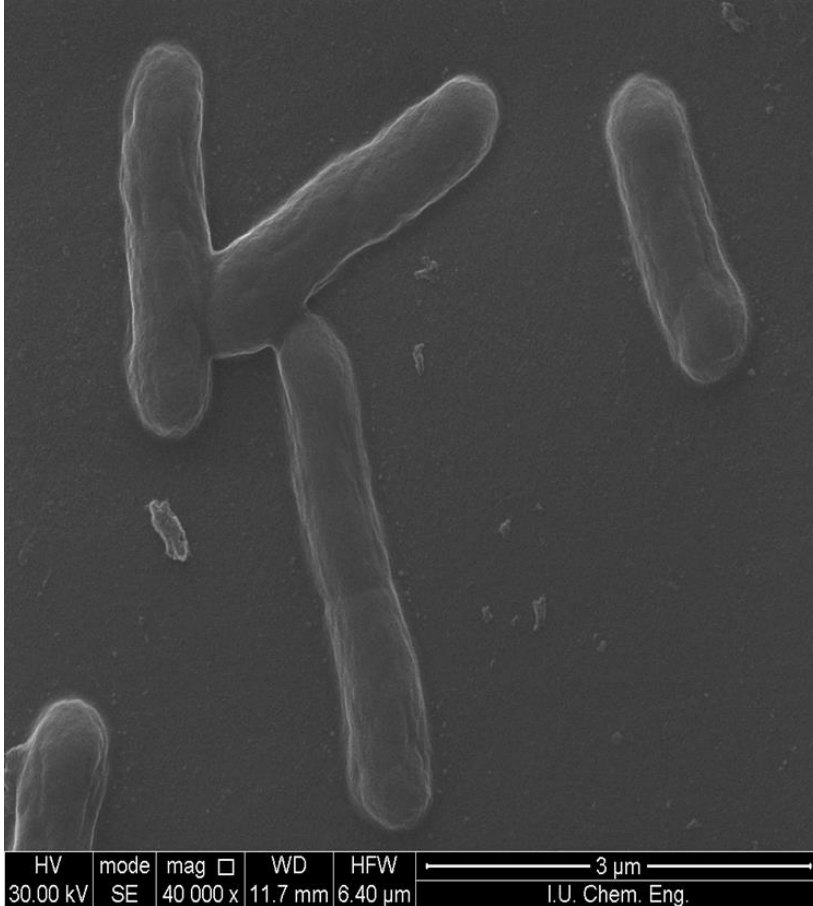
- (OXA-48) pozitif 6 izolat ➡ ST101
- OXA -48 pozitif bir izolat ➡ ST395
- NDM-1 pozitif 1 izolat ➡ ST14
- NDM-1 pozitif 1 izolat ➡ ST 15
- OXA-48 ve NDM-1 pozitif ➡ ST395

Direnç genleri, dama tahtası yöntemi, zamana bağlı öldürme yöntemi , MLST , PFGE, plazmit tiplendirmesi sonuçları.

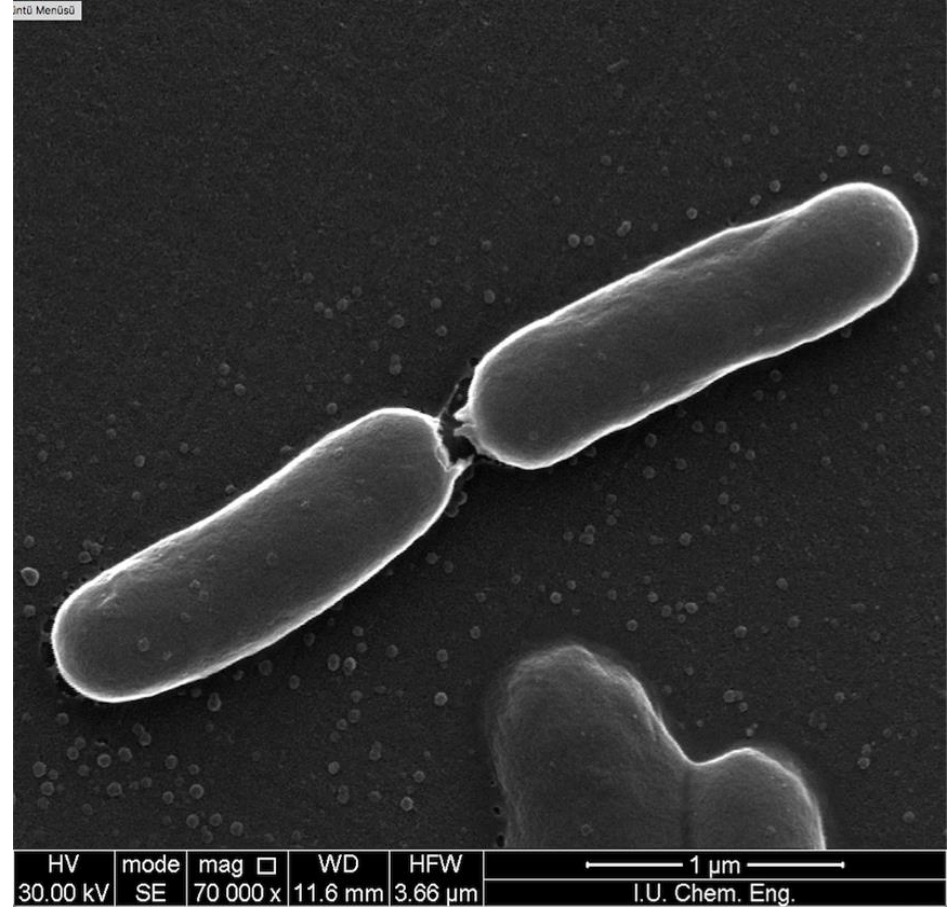


SUŞ NO	GEN	DAMA TAHTASI SONUÇLARI			ZAMANA BAĞLI ÖLÜM SONUÇLARI			MİK (MG/L) ERT/MEM/COL	PLAZMİT PFGE, MLST SONUÇLARI
		Ert+mem	Mem+kol	Ert+mem+kol	Ert+mem	Mem+kol	Ert+mem+kol		
KP1	NDM-1 CTX-M-15 TEM, SHV, rmtB, rmA	0.5 0.62 SYN-ADT	0.5 0.75 SYN-ADT	0.28 0.56 SYN-ADT	IND	SYN	SYN	>128/64/16	INCR, INCH1b M, INCF1b, INCFII A ST14
KP2	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV rmtD	1 - 1.5 IND-IND	0.18 0.56 SYN-ADT	0.14 1.06 SYN-IND	IND	SYN	SYN	>128/32/16	INCR, INCL B ST101
KP14	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV rmtD	0.31 0.56 SYN-ADT	0.25 1.03 SYN-IND	0.14 1.06 SYN-IND	IND	SYN	SYN	32/32/4	INCR, INCL B ST101
KP21	OXA-48 CTX-M-15, TEM, SHV rmtD	0.5 0.75 SYN-ADT	0.5 0.56 ADT-SYN	0.5 0.62 SYN-ADT	IND	SYN	SYN	128/32/16	INCR B ST101
KP22	NDM-1, OXA-48 CTX-M-15, rmtC	0.5 0.62 SYN-ADT	0.05 0.5 SYN-SYN	0.15 0.53 SYN-ADT	IND	SYN	SYN	128/32/4	INCR, INCL C ST 395
KP24	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV rmtD	0.62 0.75 ADT-ADT	0.75 1 ADT-IND	0.13 0.5 SYN-SYN	IND	SYN	SYN	>128/32/16	INCR, INCL B ST101
KP28	OXA-48, CTX-M-15 TEM, SHV rmtD	0.62 0.75 ADT-ADT	0.5 0.62 SYN-ADT	0.75 1 ADT-IND	IND	SYN	SYN	>128/16/16	INCR, INCL B ST101
KP31	OXA-48 CTX-M-15 TEM, SHV rmtD	0.50 1.12 SYN-IND	0.25 0.5 SYN-ADT	0.18 0.50 SYN-SYN	IND	SYN	SYN	>128/64/16	INCR, INCL B ST101
KP37	OXA-48 CTX-M-15, RmtC, QnrB	0.56 1 ADT-IND	0.37 0.62 SYN-ADT	0.125 0.56 SYN-ADT	IND	SYN	SYN	128/32/16	INCR D, ST395
KPB6	NDM-1 CTX-M-15, TEM. SHV, CIT, rmtB- C, QnrS	0.5 0.75 ADT-IND	0.56 0.75 ADT-ADT	0.26 0.5 SYN-SYN	IND	SYN	SYN	256/32/8	INCR, INCA/C E ST15

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüler-1

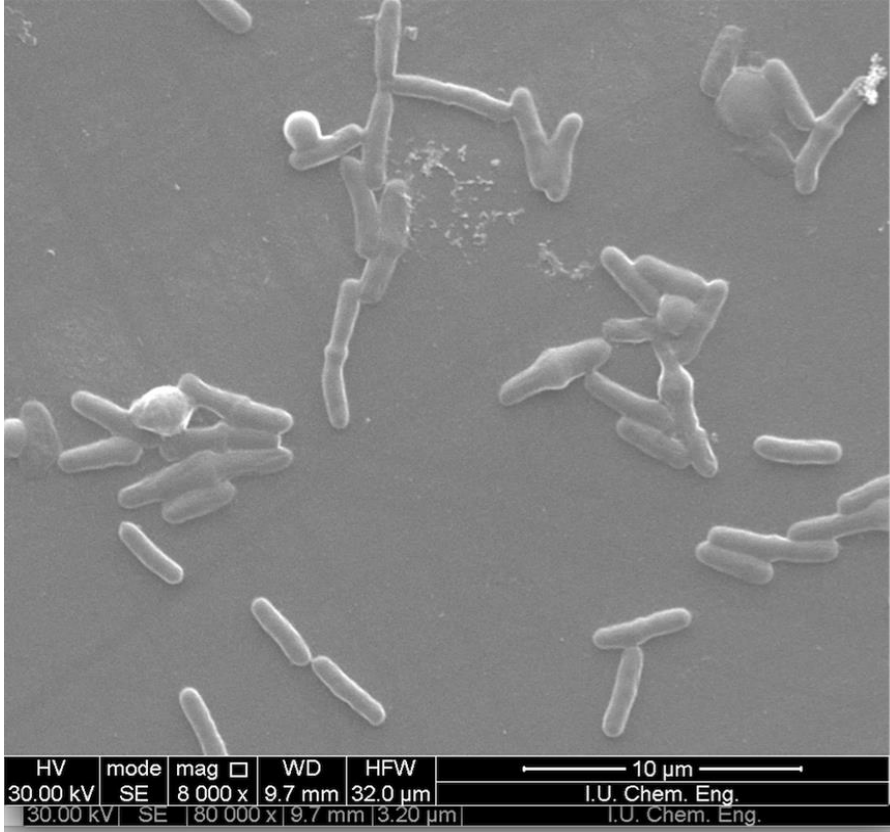


KONTROL *K. PNEUMONIAE* B6
(ANTBİYOTİKSİZ) SUŞUNUN EM
GÖRÜNTÜSÜ

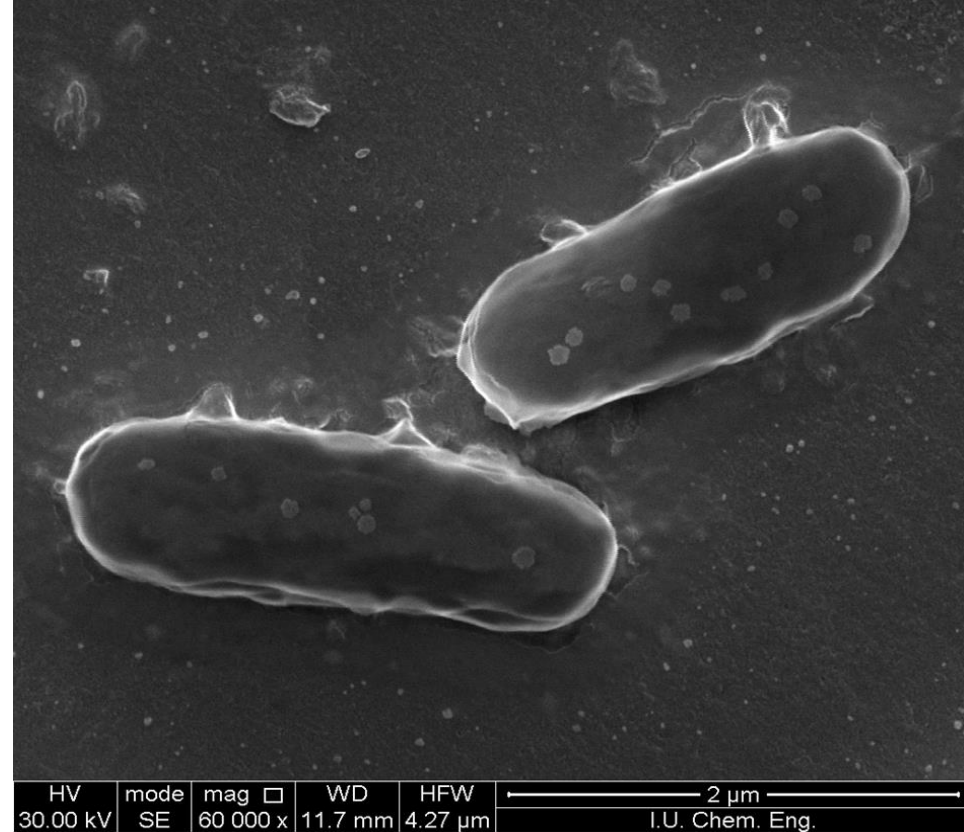


KOLİSTİNİN BAKTERİ HÜCRE ZARINDA
OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİĞİN EM GÖRÜNTÜSÜ

SEM Görüntüler-2

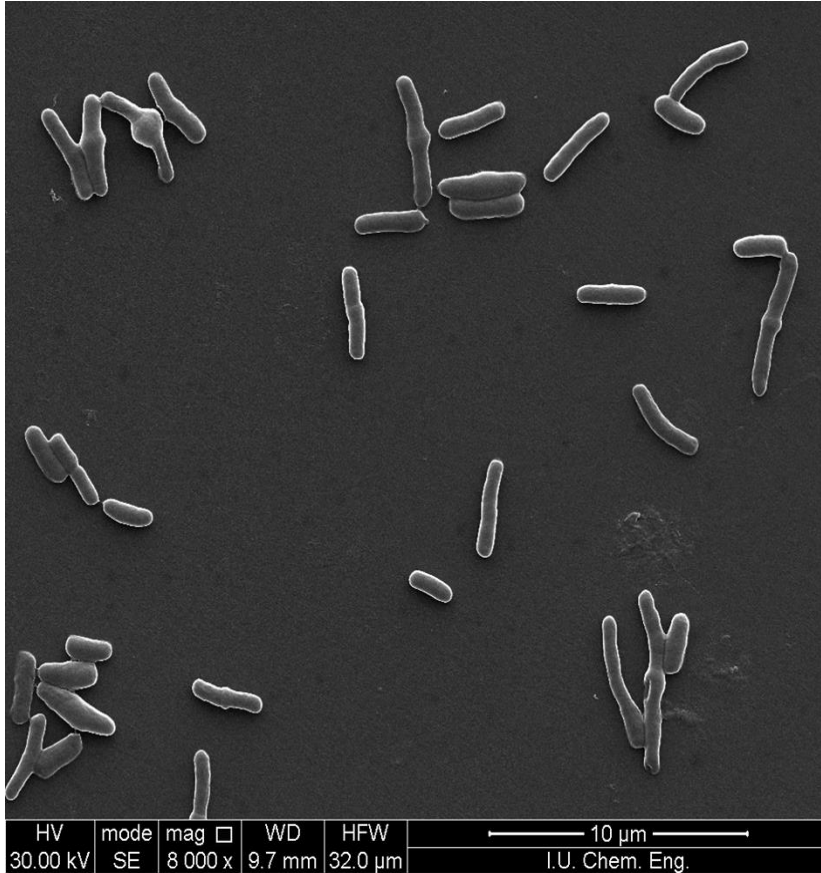


ERTAPENEMİN BAKTERİ HÜCRE DUVARINDA OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİĞİN EM MİKROSKOBİ GÖRÜNTÜSÜ

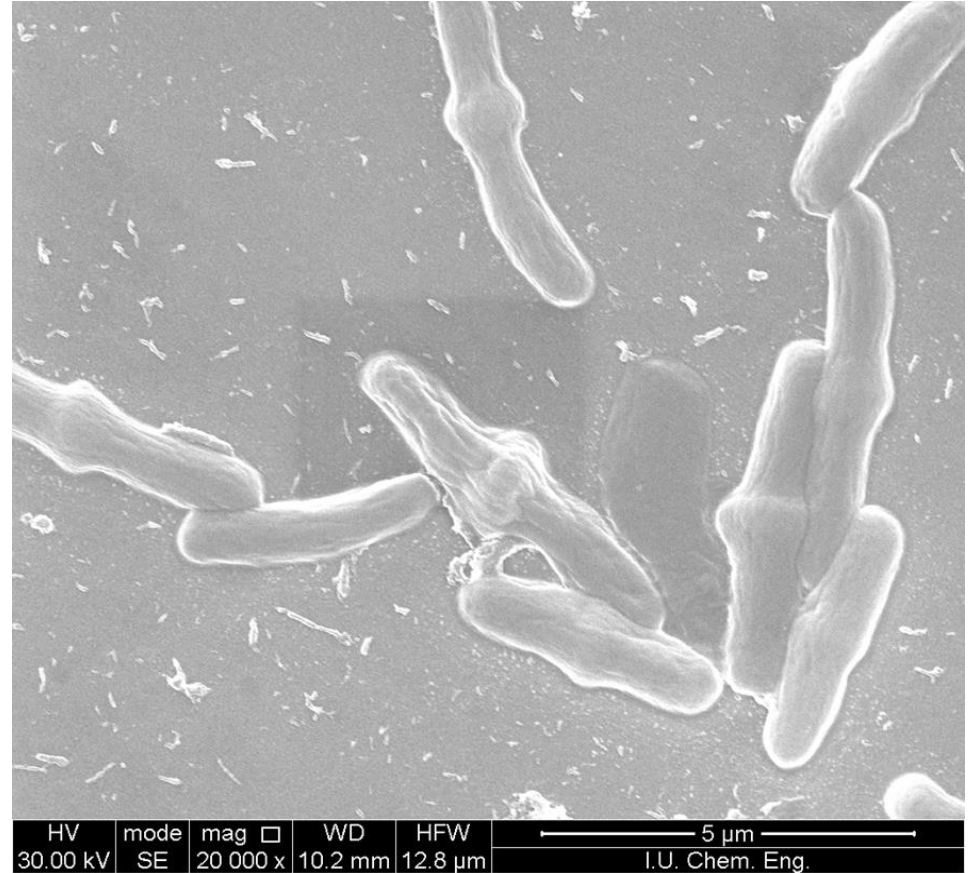


MEROPENEMİN BAKTERİ HÜCRE DUVARINDA OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİĞİN EM GÖRÜNTÜSÜ.

SEM Görüntüler-3

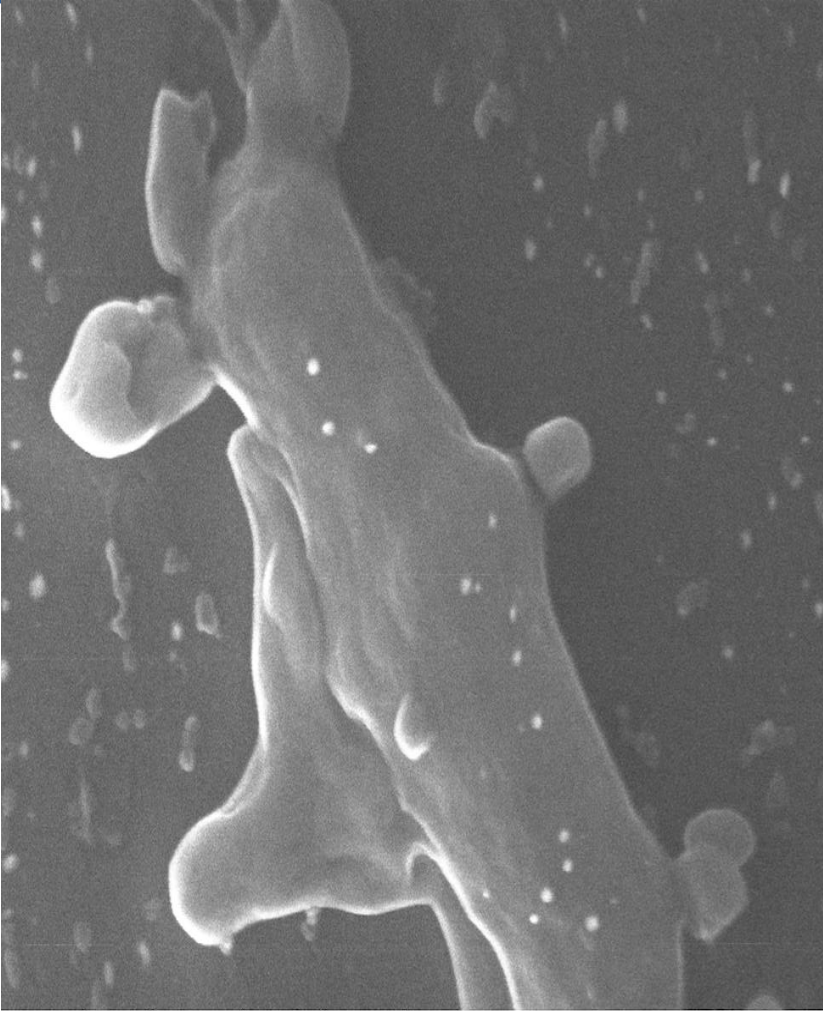


MEROPENEM VE KOLİSTİN
KOMBİNASYONUNUN HÜCRE
DUVARINDA OLUŞTURDUĞU
DEĞİŞİKLİĞİN EM GÖRÜNTÜSÜ

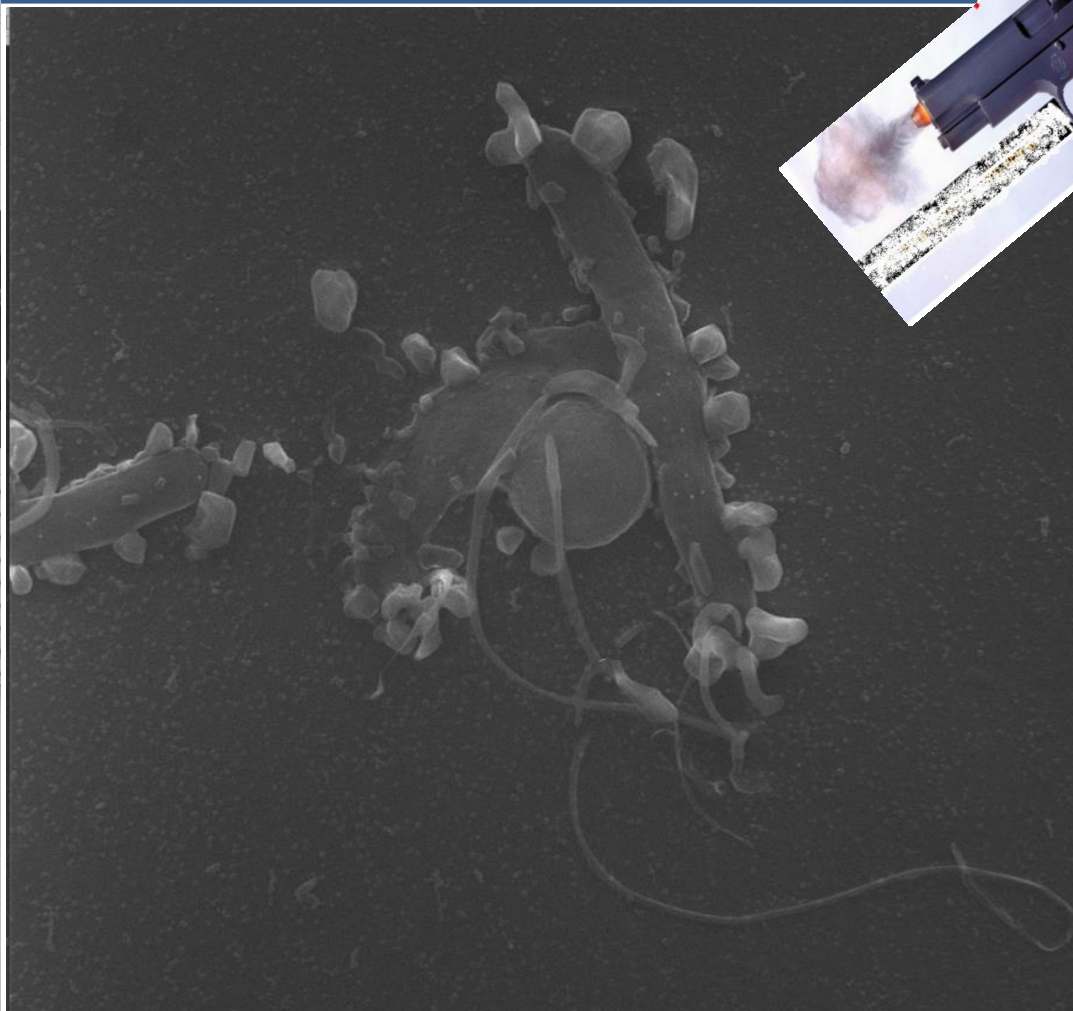


ERTAPENEM/MEROPENEM
KOMBİNASYONUNUN HÜCRE DUVARI
ÜZERİNDE OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİĞİN EM
GÖRÜNTÜSÜ

SEM-4



HV	mode	mag	WD	HF	WD	HF
30.00 kV	SE	80 000 x	9.9 mm	3.20 µm	1 µm	
0.00 kV	SE	16 000 x	11.7 mm	16.0 µm		



HV	mode	mag	WD	HF	WD	HF
30.00 kV	SE	20 000 x	11.7 mm	12.8 µm	5 µm	
0.00 kV	SE	10 000 x	11.7 mm	25.6 µm		

ERTAPENEM/MEROPENEM/KOLİSTİN KOMBİNASYONUNUN HÜCRE DUVARINDA OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİĞİN EM GÖRÜNTÜSÜ

Sonuç-1



- Bu çalışma verilerine göre, ikili karbapenem kombinasyonuna kolistinin eklenmesi suşlar üzerindeki sinerjistik etkiyi bariz bir şekilde arttırmıştır.
- Kolistin ve karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının tedavisinde üçlü kombinasyonun önemli bir alternatif olacağı *in vitro* testlerle ortaya konmuştur.
- Tedavinin yanı sıra epidemiyolojik açıdan da bakterilerin direnç mekanizmalarının bilinmesi ve tiplendirilmesi önemlidir.

Sonuç-2



- Çalışmamızda ülkemizde endemik hale geçen ve karbapenem direncinden sorumlu olan OXA-48 beta laktamaz dışında, üç suşta NDM-1 tipi beta laktamazın da bulunduğu saptanmıştır.
- Bir suş hem NDM-1 hem de OXA-48 genini birlikte taşımaktadır.
- Ülkemizde MLST analizi ile ilgili çok az yayın bulunmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla NDM-1 pozitif suşlarda ST14 ve ST15,ST395 tipi ilk defa bildirilmektedir.
- ST tiplerinin bilinmesi hem genetik evrim hem de suşların yayılımıyla ilgili epidemiyolojik ilişkileri kurmak açısından çok önemlidir

A microscopic view of numerous blue, rod-shaped bacteria, likely Bacillus subtilis, against a dark, starry background. The bacteria are arranged in various orientations, some individually and some in small clusters. The background features bright blue and yellow light sources, creating a sense of depth and movement.

TEŞEKKÜRLER