



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI

ANKARA ETLİK ŞEHİR HASTANESİ



# MDR *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz genleri ve litik bakteriyofaj izolasyonu

Uzm. Dr. Burcu Altunay

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Etik İzin: Bu çalışma için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'dan onay alınmıştır.

(Tarih: 08.04.2021 Protokol No: 2021/71)

Table 12. Distribution of species-specific programmes by mode of action and WHO bacterial priority pathogen list

Mode of action category	Total (%)	Bacterial priority pathogen														
		CRITICAL				HIGH				MEDIUM						
		<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Enterobacter spp.	<i>M. tuberculosis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.	<i>E. faecium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>S. aureus</i>	Group A streptococci	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	Group B streptococci
Small molecule - direct acting	30	5				17			2	4	1		1			
Small molecule - indirect acting	16				1			10	2	3						
Peptide - direct acting	4				3			1								
Large molecule - direct acting	4			1				3								
Large molecule - indirect acting	2									2						
Bacteriophage/bacteriophage products	13	1	2	3				1	4	2						
Biologic (antibody or other biotherapeutic)	5	1	1					2		1						
Nucleic acid-based products	1										1					
<b>Total</b>	<b>75 (100)</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>22</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

\* Activity against bacteria resistant to carbapenem antibiotics and bacteria resistant to third-generation cephalosporin antibiotics is not always disclosed and so species activity is represented.

# AMAÇ

- Hastanemizdeki MDR *K. pneumoniae* izolatlarının karbapenemaz profilini belirlemek.
- Bu dirençli suşlara karşı çevresel kaynaklardan litik fajlar izole etmek.
- Bu fajların tedavi potansiyellerini *in vitro* düzeyde değerlendirmektir.

Mart  
2018

Ağustos  
2020

Haziran  
2021

Ağustos  
2021



38 adet MDR  
*K.pneumoniae* izolatu



32 hasta, 20'si enfekte



Faj izolasyonu  
in-vitro litik etki



Faj genom analizi,  
Karbapenemaz profili

# YÖNTEM

Klinik Numune Kültürü	N=38	(%)
Kan	11	28,9
Trakeal aspirat	10	26,3
İdrar	8	21,1
Yara yeri	5	13,2
Balgam	3	7,9
Safra sıvısı	1	2,6

Tablo 1. MDR *K.pneumoniae*'lerin İzole Edildiği Klinik Materyallerin Dağılımı

# Faj Süspansiyonlarının Hazırlanışı

## Santrifüj ve Filtreleme



Filtrelenmemiş  
atık su örneği



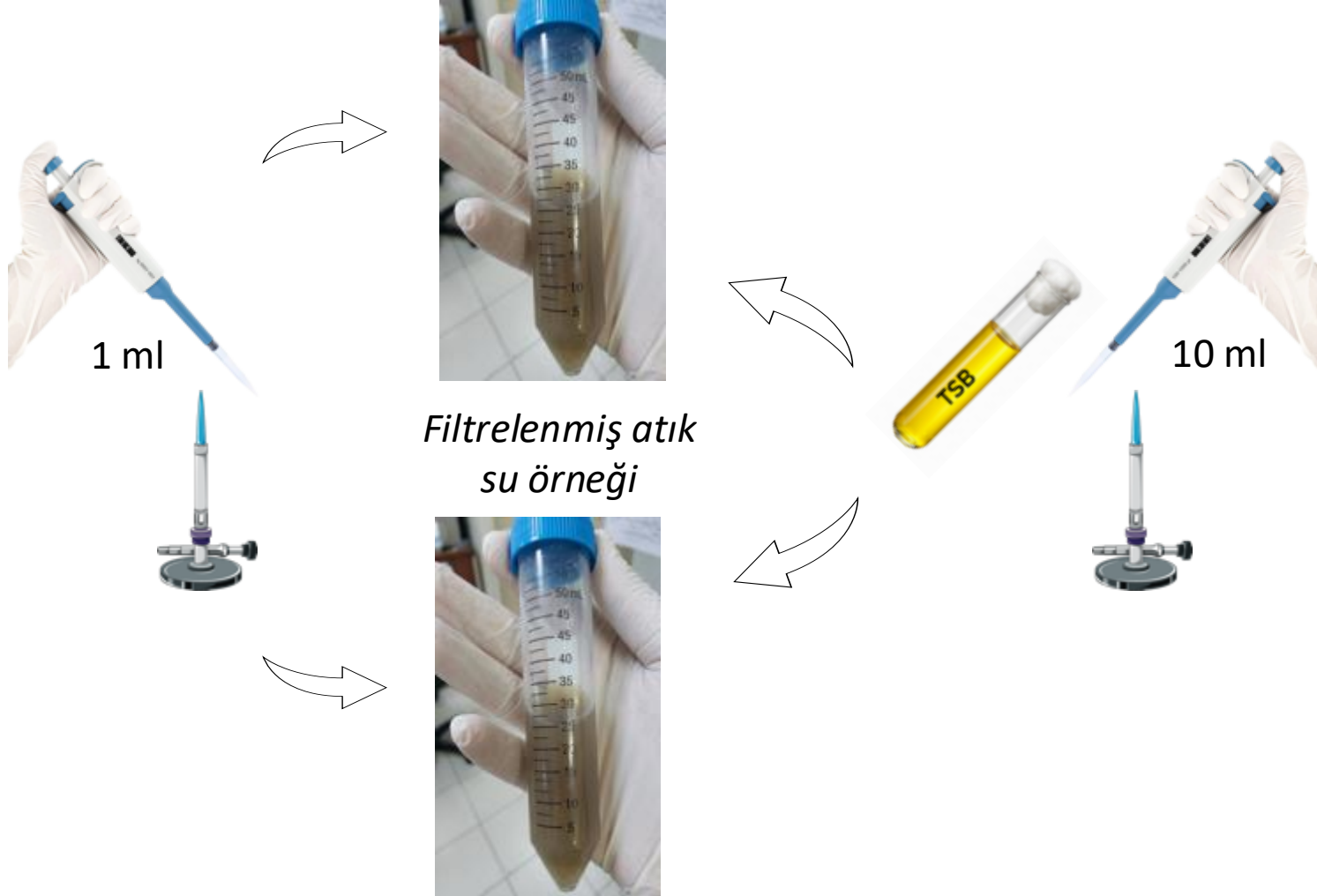
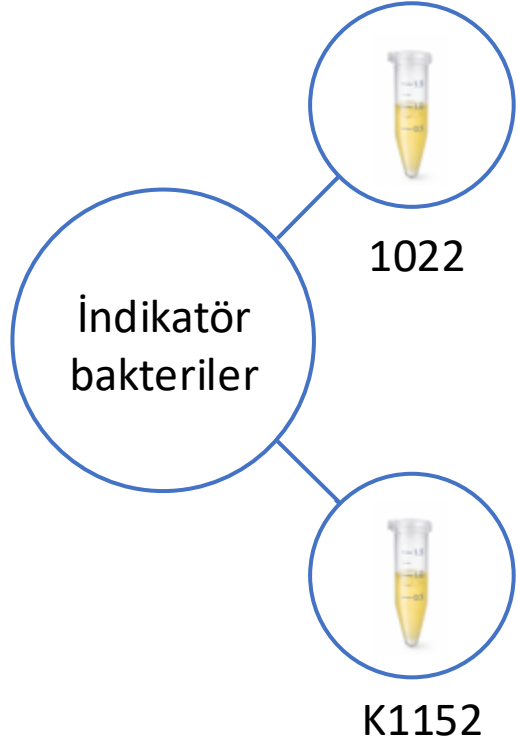
15 dk, 5000 rpm



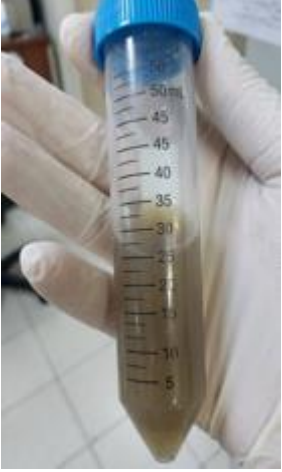
Filtrelenmiş  
atık su örneği

# Faj Süspansiyonlarının Hazırlanışı

## Zenginleştirme



# Faj Süspansiyonlarının Hazırlanışı



Zenginleştirilen  
süspansiyonlar



37°C 'de  
18-24 saat



Ertesi gün tekrar  
santrifüj ve filtreleme

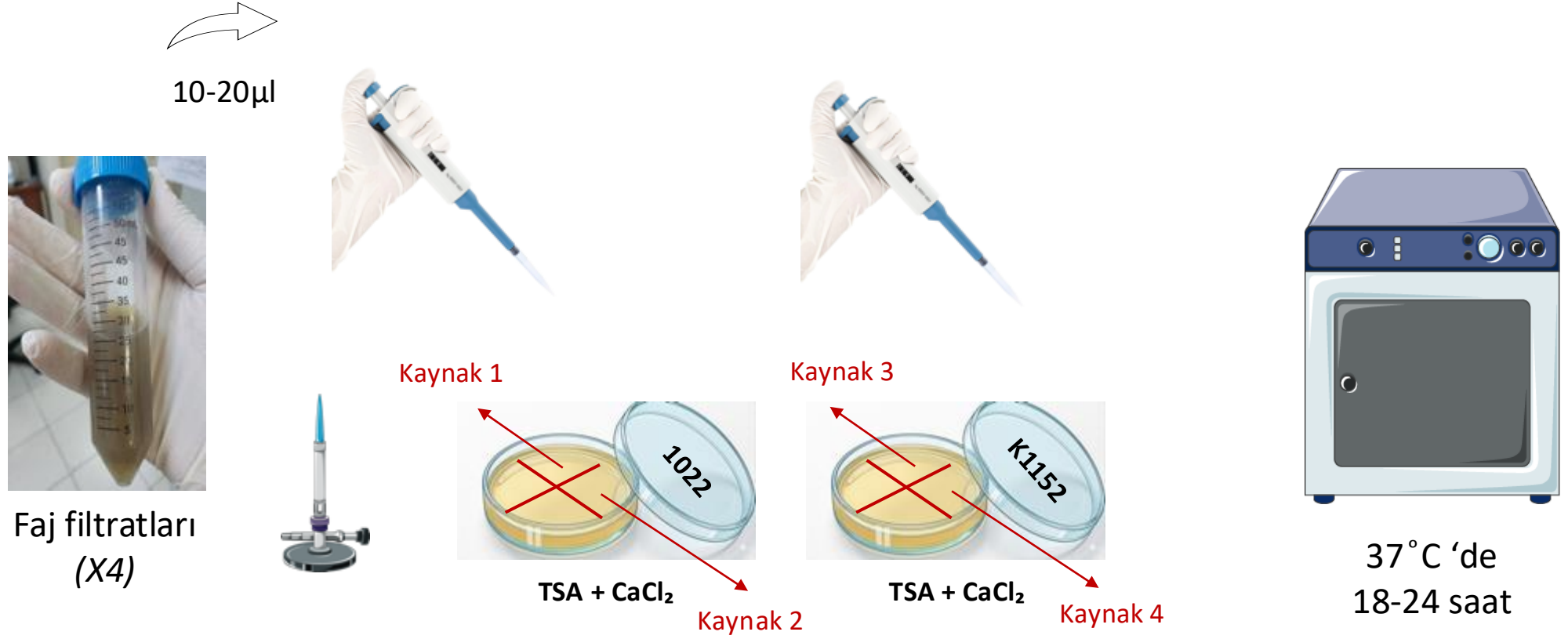


# Faj Varlığının Saptanması

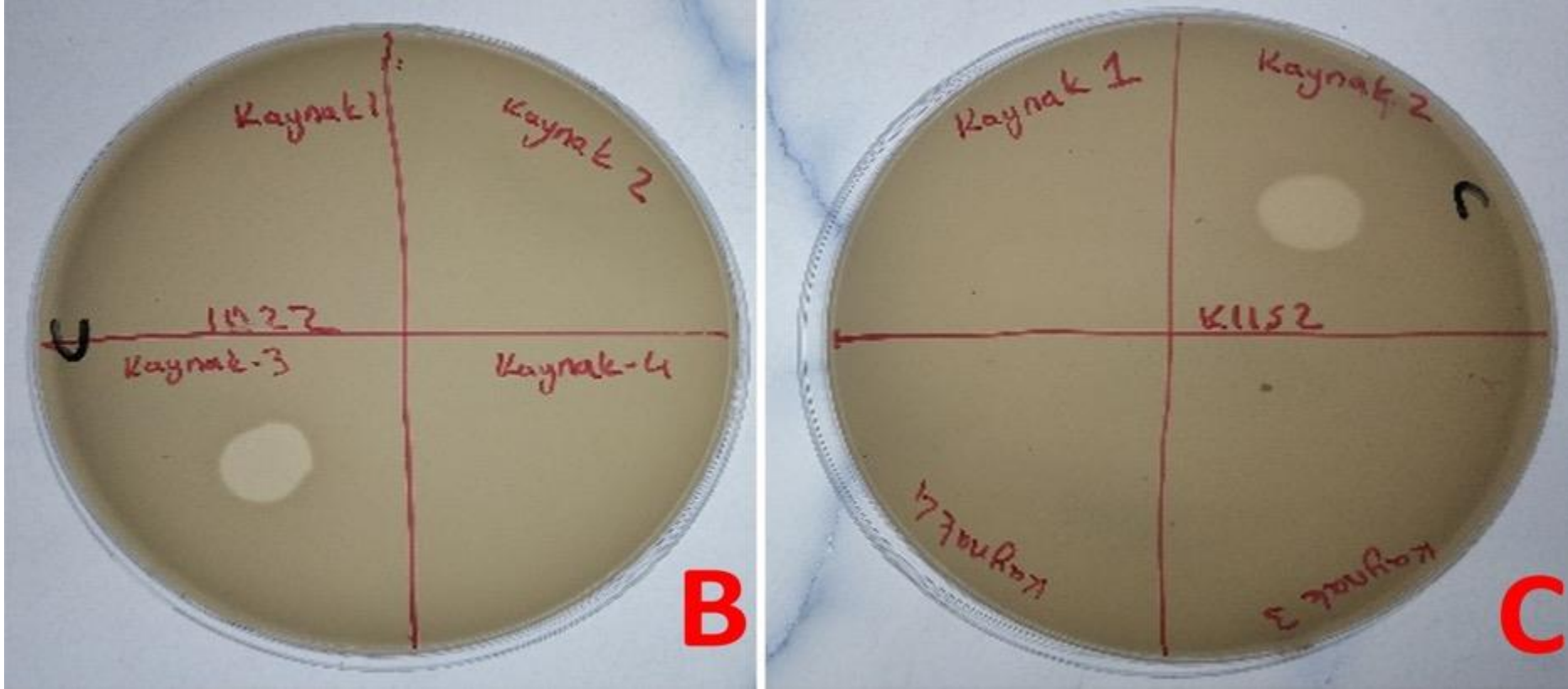
## İkili Agar Kaplama Metodu



# Faj Varlığının Saptanması: Spot Test Yöntemi

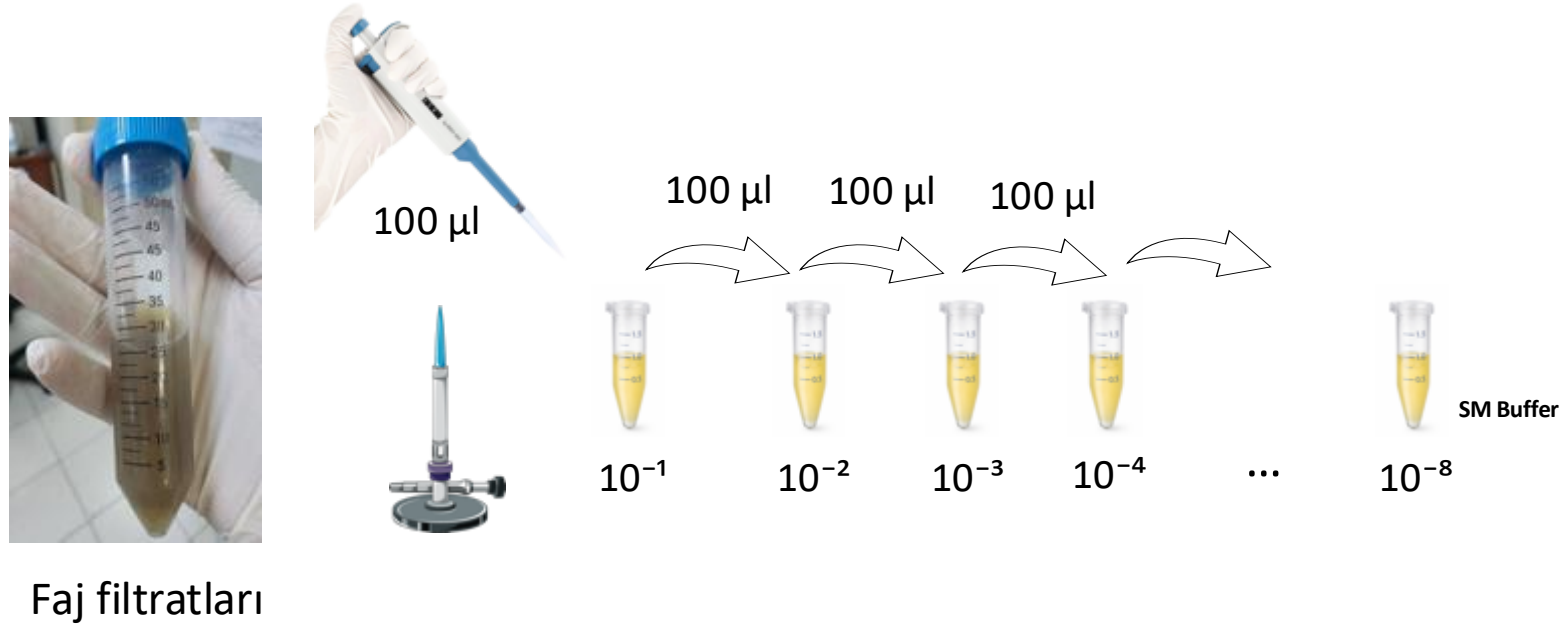


## Faj Varlığının Saptanması: Spot Test Yöntemi



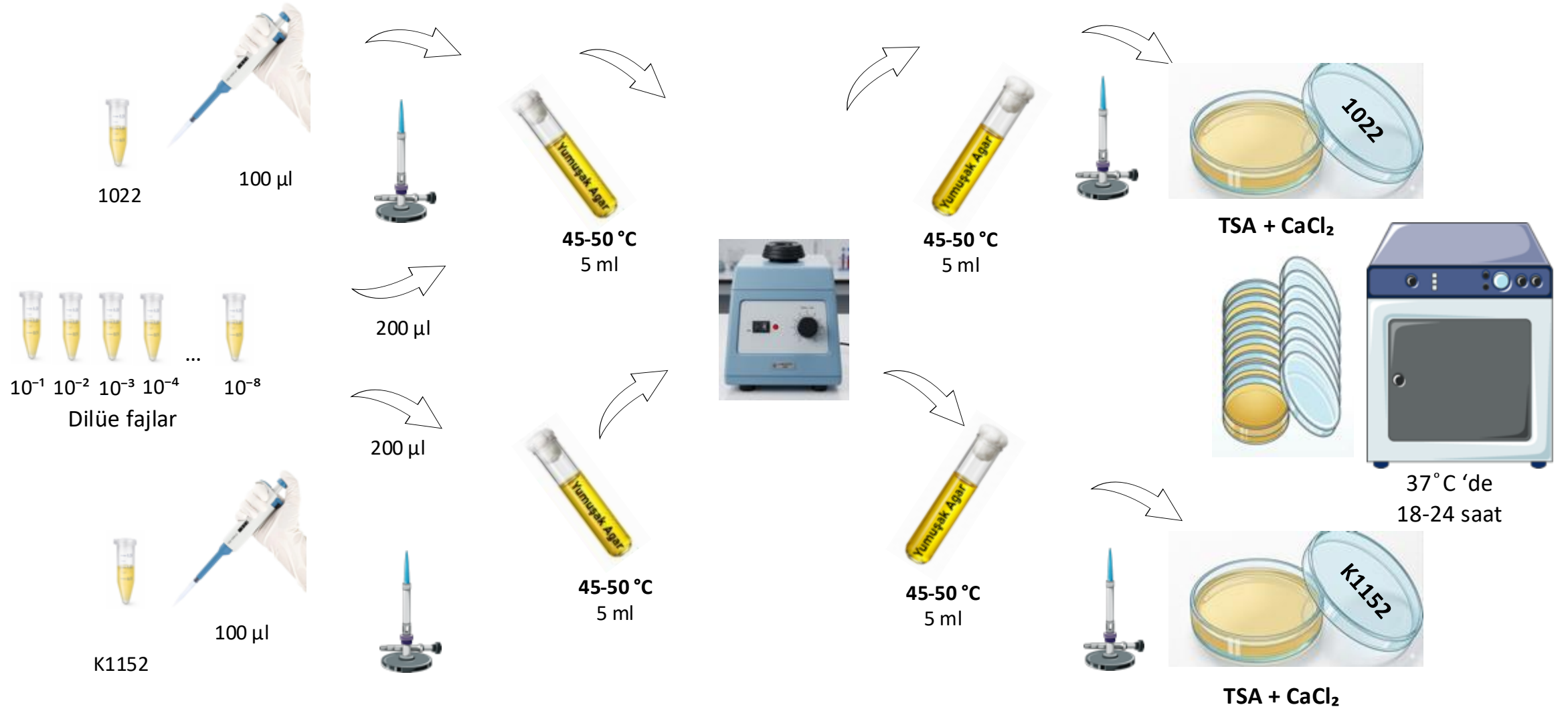
Resim 1. Atık su örneklerinde bakteriyofaj tespiti

# Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofajların Saflaştırılması

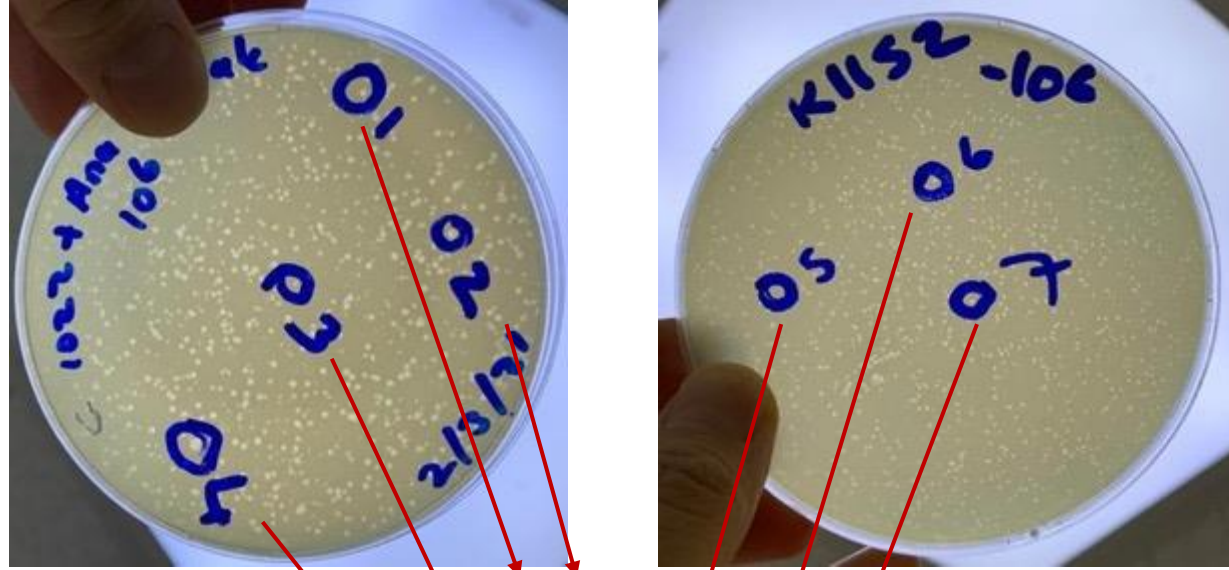


Şekil 1. Seri Dilüsyonla Bakteriyofaj Titrelelerinin Seyreltilmesi

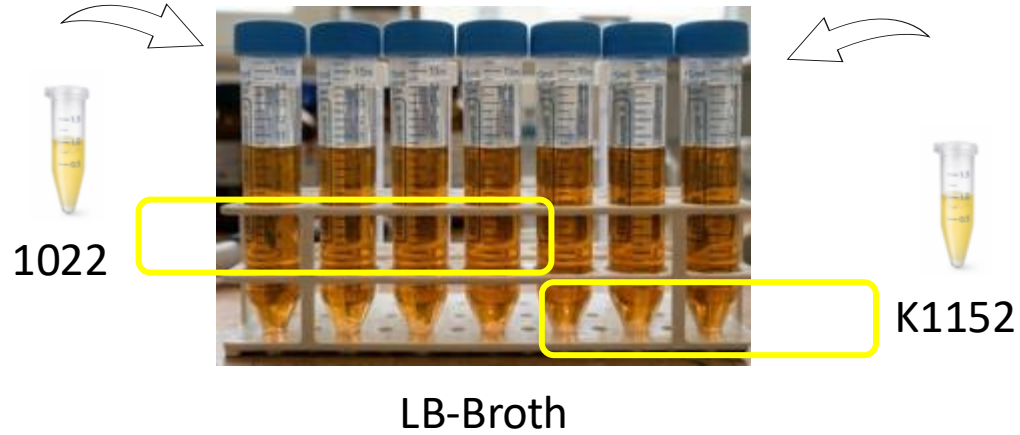
# İkili Agar Kaplama Metodu



# Tek Plak İzolasyonu ile Bakteriyofajların Saflaştırılması



Resim 2. (A) *K. pneumoniae* 1022'ye (B) *K. pneumoniae* K1152'ye etkili fajın ikili agar kaplama yöntemi ile elde edilen karışık morfolojideki faj plakları



Faj + İndikatör bakteri



37°C 'de  
18-24 saat



Faj + İndikatör bakteri

Santrifüj ve Filtreleme



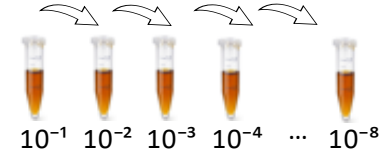
1. Plak Saflaştırma

Seri Dilüsyon



Faj filtratları

100 µl



İkili Agar Kaplama

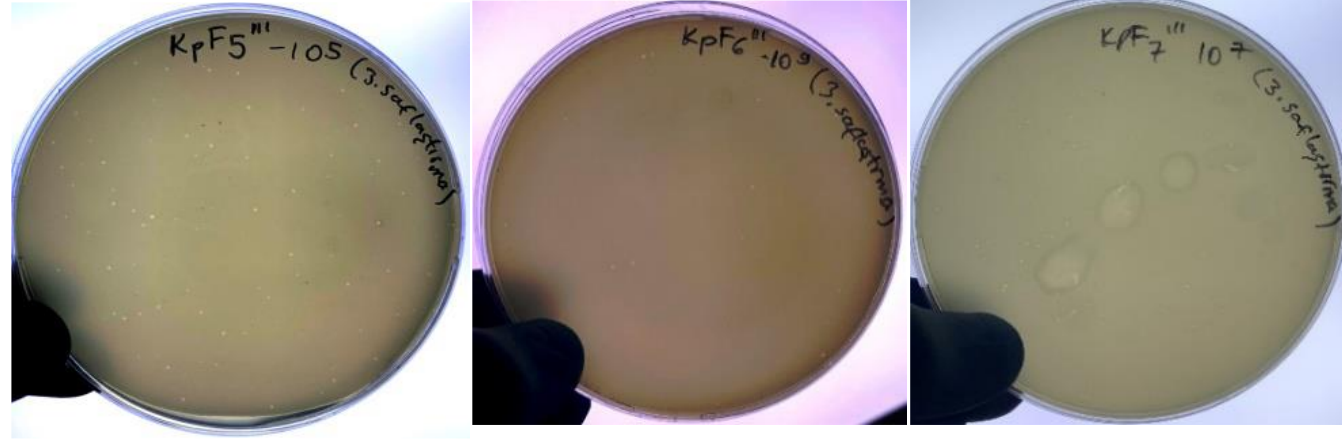
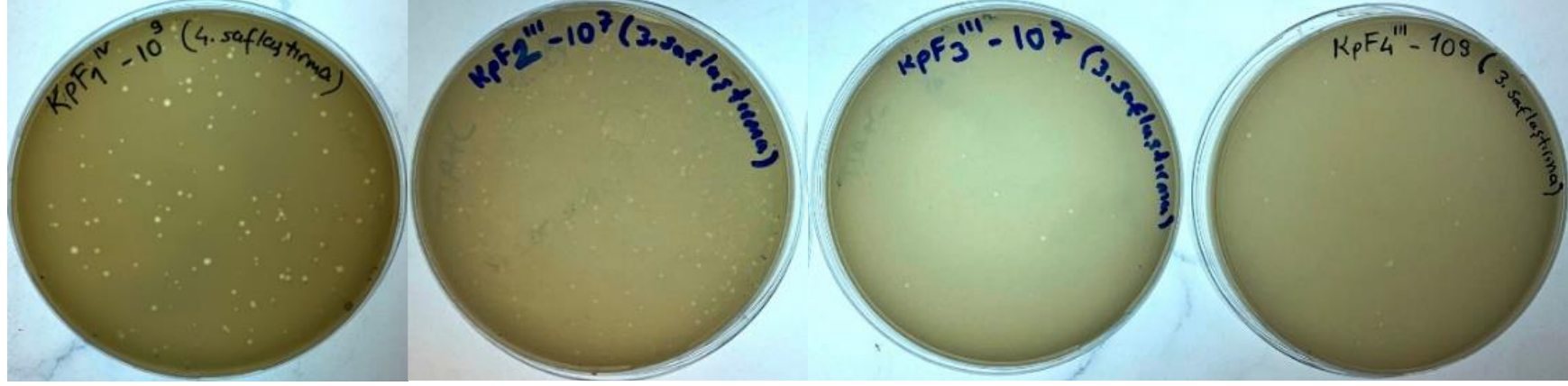


TSA + CaCl<sub>2</sub>

Plak Saflaştırma



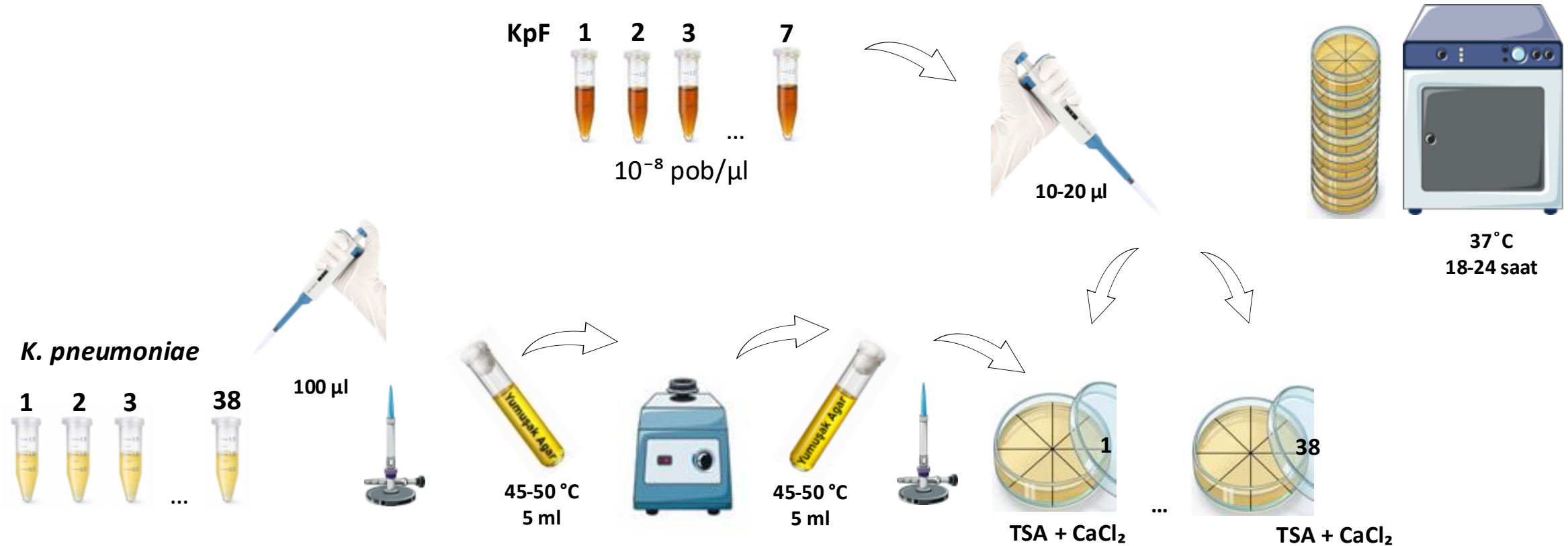
X3

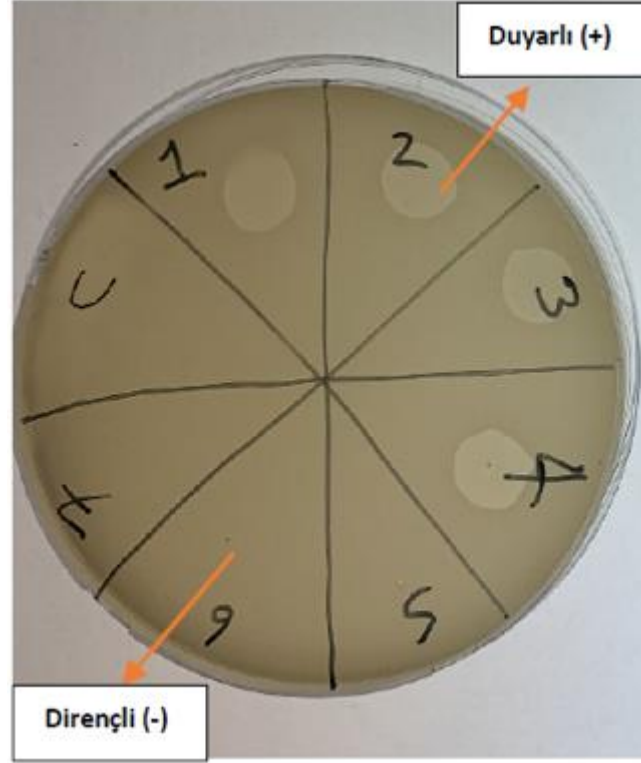


Resim 3. Tek Plak İzolasyon Yöntemi ile Saflaştırılmış Bakteriyofajların Petri Görüntüleri

*Elde edilen fajlar sırasıyla **KpF1**'den **KpF7**'ye kadar isimlendirilmiştir*

# Saflaştırılan Fajların *K. pneumoniae* İzolatları Üzerine Etkinliklerinin Belirlenmesi





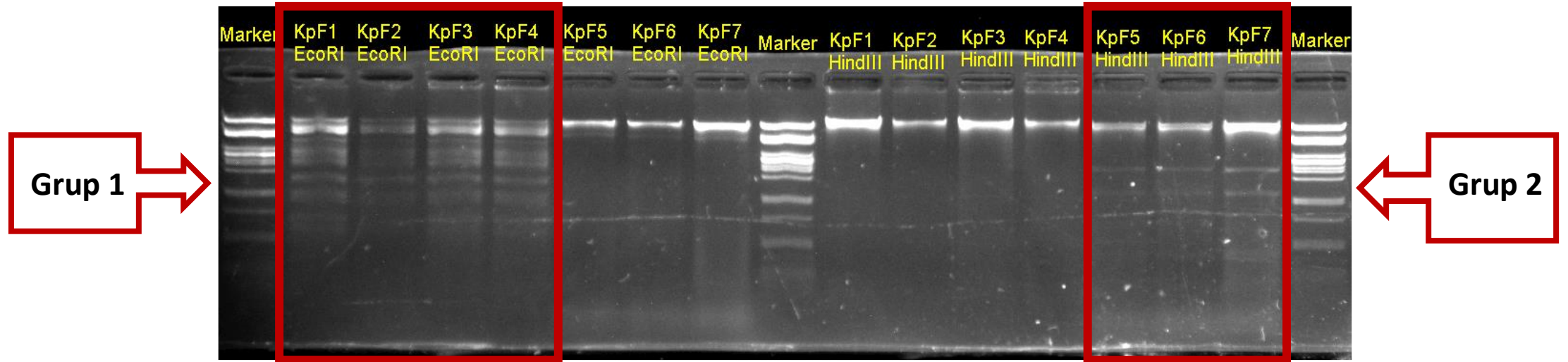
Resim 4. Plak morfolojilerine göre saflaştırılan fajların spot test yöntemi ile klinik *K. pneumoniae* izolatına denenmesi  
Bakterinin; “+” **duyarlı** (Lizis pozitif) olduğu fajlar  
Bakterinin; “-” **dirençli** (Lizis negatif) olduğu fajlar  
C; kontrol olarak SM buffer damlatıldı.

# BULGULAR

Saptanan gen	N=52	%
NDM	20	38,5
OXA	19	36,5
VIM	12	23,1
KPC	1	1,9
IMP	0	0,0
Gen Kombinasyonları	N=26	%
OXA + NDM	10	38,5
OXA + VIM	7	26,9
NDM + VIM	6	23,1
OXA + NDM + VIM	3	11,5

Tablo 2. *K. pneumoniae* izolatlarında bulunan karbapenemaz genlerinin dağılımı

# İzole edilen Faj DNA'larının Restriksiyon Profillerinin Belirlenmesi



Resim 5 . *K. pneumoniae* bakteriyofajlarının EcoRI ve HindIII kesimi sonucu jel elektroforezinde oluşan fragmentler.

No	Bakteri İzolatları	Meropenem Duyarlılığı	Karbapenemaz Direnç Genleri	GRUP 1				GRUP 2		
				KpF1	KpF2	KpF3	KpF4	KpF5	KpF6	KpF7
1	2473	R	NDM, VIM	+	+	+	+	+	+	+
2	1022*	R	NDM, VIM	+	+	+	+	+	+	+
3	K3199	R	NDM, VIM	+	+	+	+	+	+	+
4	2284	R	NDM, OXA	+	+	+	+	+	+	+
5	2060	R	NDM	+	+	+	+	+	+	+
6	1024	R	NDM	+	+	+	+	+	+	+
7	2289**	R	∅	+	+	-	-	+	+	+

- 7 fajın **33/38 (%86,84) *K. pneumonia*** izolatına karşı **litik etkili** olduğu tespit edildi.

- Fajların litik etki spektrumları;

- KpF1 için 30/38 (%78,94)

No	Bakteri İzolatları	Meropenem Duyarlılığı	Karbapenemaz Direnç Genleri	GRUP 1				GRUP 2		
				KpF1	KpF2	KpF3	KpF4	KpF5	KpF6	KpF7
7	2289**	R	∅	+	+	-	-	+	+	+
9	K2276**	R	VIM	+	+	+	+	+	-	-
17	2459**	R	NDM	-	-	-	+	-	-	-
22	K1315**	R	NDM, OXA, VIM	-	+	-	+	+	-	-
29	1575**	R	NDM	+	+	+	+	-	+	-

28	3540	R	OXA	+	+	+	+	+	+	+
29	1575**	R	NDM	+	+	+	+	-	+	-
30	1535	R	NDM, OXA	+	+	+	+	-	-	-
31	K3454	R	OXA	+	+	+	+	-	-	-
32	K1319	R	VIM	-	-	-	-	-	-	-
33	1035	R	NDM	-	-	-	-	-	-	-
34	K3273	R	∅	+	+	+	+	-	-	-
35	3021	R	NDM	+	+	+	+	-	-	-
36	2933	R	∅	+	+	+	+	-	-	-
37	1235	R	OXA	+	+	+	+	+	+	+
38	1027	R	∅	+	+	+	+	+	+	+
39	K1152*			-	-	-	-	+	+	+

“+”: duyarlı, “-”: dirençli *K. pneumonia* izolatları

\* İndikatör Bakteriler

\*\* Restriksiyon profilleri aynı olan fajlara karşı farklı hassasiyet gösteren *K. pneumonia* izolatları





# Fajların Konak Aralıklarının Belirlenmesi

Bakteri	Referans No	KpF2	KpF5
<i>E.coli</i> (EIEC) Enteroinvaziv	ATCC 43893	N	N
<i>E.coli</i> (ETEC) ETEC toksin	ATCC 35401	N	N
<i>E.coli</i> (EHEC)	ATCC 35150	N	N
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	N	N
<i>Shigella boydii</i>	RSK 1040 ABD	N	N
<i>Shigella dysenteriae</i>	RSK 4070 NCTC	N	N
<i>Shigella flexneri</i>	RSK 6024 ATCC	N	N
<b>*<i>Shigella sonnei</i></b>	RSK 96021	P	N
<i>Salmonella abony</i>	NCTC 6017	N	N
<b>*<i>Salmonella enterica</i></b>	RSK 760	P	N
<i>Salmonella typhi</i>	RSK 6	N	N
<i>Salmonella typhimurium</i>	RSK 95091	N	N
<i>E.faecalis</i>	ATCC 29212	N	N
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	N	N
<i>Enterococcus faecium</i>	RSK 623	N	N

<i>Enterococcus faecium</i>	V585-VanB	N	N
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	N	N
<i>S. aureus</i>	ATCC 43300	N	N
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	N	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM-22644	N	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27583	N	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA01	N	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 6750	N	N
<i>P. aeruginosa</i> 1126	Klinik	N	N
<i>P. aeruginosa</i> 1834	Klinik	N	N
<i>P. aeruginosa</i> 1897	Klinik	N	N
<i>P. aeruginosa</i> 399	Klinik	N	N
<i>Acinetobacter</i> 1836	Klinik	N	N
<i>Acinetobacter</i> 3281	Klinik	N	N
<i>P. vulgaris</i> 1143	Klinik	N	N
<i>P. mirabilis</i> 3789	Klinik	N	N

“P”: Fajın bakteri üzerinde litik etkisi var.

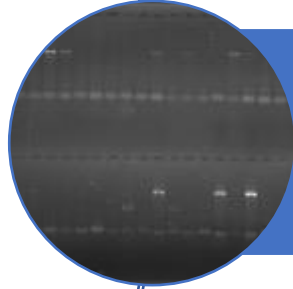
“N”: Fajın bakteri üzerinde litik etkisi yok.

\**Klebsiella pneumoniae* dışında KpF2 fajına karşı hassas olan bakteriler.

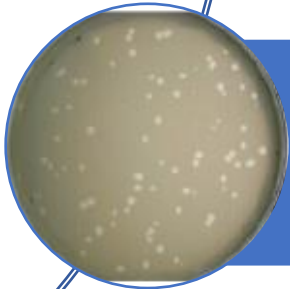
# TARTIŐMA VE SONUÇ



38 MDR *K. pneumoniae*



NDM geni = 20/52 (%38,46)



31 litik / 38; (%81,57) etki ile KpF2 faji

19 litik / 38; (%50) etki ile KpF5 faji



---

**TEŞEKKÜRLER**