

# Klinik Enterobacterales İzolatlarında Plazmit Aracılı *mcr* Kolistin Direnç Geninin Araştırılması

## Investigation of Plasmid Mediated *mcr* Colistin Resistance Gene in Clinical Enterobacterales Isolates

Esra ÖZKAYA<sup>1</sup>(ID), Celal Kurtuluş BURUK<sup>1</sup>(ID), İlnur TOSUN<sup>1</sup>(ID), Bayram TORAMAN<sup>2</sup>(ID), Neşe KAKLIKKAYA<sup>1</sup>(ID), Faruk AYDIN<sup>1</sup>(ID)

<sup>1</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

<sup>1</sup> Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

<sup>2</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

<sup>2</sup> Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Trabzon, Turkey.

\* Bu çalışma, 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (28 Ekim-01 Kasım 2019, İzmir, Türkiye)'nde sözlü sunum olarak sunulmuştur.

**Makale Atfı:** Özkaya E, Buruk CK, Tosun İ, Toraman B, Kakıkkaya N, Aydın F. Klinik Enterobacterales izolatlarında plazmit aracılı *mcr* kolistin direnç geninin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2020;54(2):191-202.

### ÖZ

Çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda karbapenemler, karbapeneme dirençli olanlarda ise kolistin (polimiksin E) son çare olarak kullanılmaktadır. Gram-negatif bakterilerin sitoplazmik membranının geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne neden olan kolistinin tüm dünyada kullanımının artışı direnç sorununu gündeme getirmiştir. Aktarılabılır kolistin direnci enzimi olan *mcr*, lipid A'ya fosfoetanola-min eklenip lipopolisakaritleri modifiye ederek polimiksin direncine yol açan bir fosfoetanola-min transfe-razdır. Bu çalışmada kolistine dirençli Enterobacterales izolatlarında en yaygın görülen plazmit aracılı bazı kolistin ve karbapenemaz direnç genlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada Karadeniz Teknik Üni-versitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ekim 2016-Eylül 2018 tarihleri arasında klinik birimlerde tedavi gören hastaların numunelerinde tespit edilen Enterobacterales izolatları kul-lanılmıştır. İzolatlar klasik yöntemlere ilaveten MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Enterobacterales izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları Phoenix (Becton Dickinson, ABD) oto-matize mikrobiyoloji sistemi ile çalışılmıştır ve "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" önerilerine göre değerlendirilmiştir. Kolistine dirençli bulunan izolatlarda ve duyarlı saptanan ancak kolistin duyarlılık test sonucu hasta raporuna eklenmesi gereken izolatlarda kolistin duyarlılık testleri EUCAST standartlarına uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle tekrarlanmıştır. Kolistine dirençli Ente-robacterales izolatlarında EUCAST önerileri doğrultusunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), AmpC beta-laktamaz ve karbapenemaz varlığı fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır. Ayrıca, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *mcr*-1-5, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> direnç genleri araştırılmış, ardından amplifiye edilen ürünlerin nükleotit dizi analizleri yapılmıştır. Çalışmamızda, farklı klinik birimlerde tedavi gören 7535 hastaya ait 14657 Enterobacterales izolatu retrospektif olarak irdelendiğinde en sık *Esche-richtia coli* %61.2 (n= 8968), *Klebsiella pneumoniae* %22.7 (n= 3334) ve *Enterobacter cloacae* %6.9 (n= 1005) olduğu görülmüştür. Karbapenem direnci toplamda 894 izolatta tespit edilmiş olup; Ekim 2016-Eylül 2017

**İletişim (Correspondence):** Dr. Öğr. Üyesi Esra Özkaya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 462 377 5155, **E-posta (E-mail):** esraozkaya@ktu.edu.tr

tarihleri arasında izole edilen 7135 izolatın %5.8 (n= 412)'i, Ekim 2017-Eylül 2018 tarihleri arasında izole edilen 7522 izolatın %6.4 (n= 482)'ü dirençli bulunmuştur. Tüm izolatlar içinde kolistine dirençli bulunan izolatlar Ekim 2016-Eylül 2017 tarihleri arasında 65 (%0.9) iken, Ekim 2017-Eylül 2018 tarihleri arasında 97 (%1.3)'dir. Aynı hastaya ait farklı örneklerdeki aynı etken üremelerinde sadece ilk izolatlar çalışmaya dahil edilerek kolistine dirençli 46 izolat seçilmiştir. Stok kültürden üretilmeyen 6 izolat çalışma materyalinden çıkarılmıştır. Çalışmaya dahil edilen kolistine dirençli 40 Enterobacterales izolatının 13 (%32.5)'ü 2017, 27 (%67.5)'si 2018 yılında izole edilmiştir. Bu izolatların 22'sinde GSBL, 6'sında AmpC beta-laktamaz, 15'inde karbapenem direnci fenotipik yöntemlerle tespit edilmiştir. Bu işlemlerin ardından PCR yöntemiyle 2 izolatta *mcr-1*, 2 izolatla *bla*<sub>OXA-48</sub>, 1 izolatla *bla*<sub>VIM</sub>, 1 izolatla *bla*<sub>KPC</sub> ve *bla*<sub>OXA-48</sub> birlikteliği, 5 izolatla *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>OXA-48</sub> birlikteliği tespit edilmiştir. *mcr-1* saptanan izolatlarda nükleotid dizi analizi ile doğrulama yapılmıştır. Tespit edilen *mcr-1* genleri hastanemizde tedavi gören 65 yaş üstü 2 kadın hastanın idrar kültürü örneklerinde üreyen *E.coli* izolatlarında bulunmuştur. Bu hastalardan 1'inde test edilen antibiyotikler arasında sadece ampisiline direnç gözlenmiş, diğerinde ise ampisilin, amoksisilin-klavulonik asit ve siprofloksasine direnç belirlenmiştir. Sonuç olarak, yayınıımız literatürde ulaşabildiğimiz kadarıyla ülkemizde klinik örneklerde *mcr-1* geni varlığını gösteren ve DNA dizi analizi ile doğrulanmış ilk çalışmadır. Çoklu ilaç direnci görülmeyen izolatlarda *mcr* geninin saptanmış olması tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolistin duyarlılık testi çalışmasının önemini bir kez daha gözler önüne sermektedir. Ayrıca çalışmamızda farklı direnç genlerini bir arada içeren izolatların saptanmış olması, karbapenem ve kolistin direncinin yayılımının beklenenden daha hızlı olabileceğini bir kez daha hatırlatmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Enterobacterales*; kolistin direnci; karbapenem direnci; *mcr-1* geni.

## ABSTRACT

Carbapenems are used in the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria and colistin (polymyxin E) is used as the last choice of antimicrobial agent in those resistant to carbapenems. The worldwide and increased use of colistin, which causes cell death by disrupting the permeability of the cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria, raised the problem of resistance. The transferable colistin resistance enzyme *mcr*, is a phosphoethanolamine transferase that adds phosphoethanolamine to lipid A and modifies lipopolysaccharides, leading to polymyxin resistance. The aim of this study was to investigate some of the most prevalent plasmid mediated colistin and carbapenemase resistance genes in colistin resistant Enterobacterales isolates. Enterobacterales isolates which were isolated in the samples of patients treated in the clinical units between October 2016 and September 2018 in the Karadeniz Technical University Faculty of Medicine Farabi Hospital Medical Microbiology Laboratory were included in the study. In addition to conventional methods, isolates were identified to the species level by MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Germany). The antibiotic susceptibilities of Enterobacterales isolates were studied by an automated microbiology system (Phoenix, Becton Dickinson, USA) and evaluated according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria. In isolates that are resistant to colistin, and the isolates that are found to be sensitive but should be included in the patient report of the colistin susceptibility test, colistin susceptibility tests were repeated with liquid microdilution method in accordance with EUCAST standards. The presence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL), AmpC beta-lactamase and carbapenemase were determined by phenotypic methods according to EUCAST recommendations in colistin resistant Enterobacterales isolates. Furthermore, resistance genes of *mcr-1-5*, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> were detected by polymerase chain reaction (PCR) method, followed by nucleotide sequence analysis of the amplified products. In our study, 14657 Enterobacterales isolates belonging to 7535 patients treated in different clinical units were examined retrospectively. *Escherichia coli* 61.2% (n= 8968), *Klebsiella pneumoniae* 22.7% (n= 3334) and *Enterobacter cloacae* 6.9% (n= 1005) were the most prevalent isolates. Carbapenem resistance was detected in 894 isolates, and 5.8% (n= 412) of 7135 isolates isolated between October 2016 and September 2017; 6.4% (n= 482) of 7522 isolates between October 2017 and September 2018 were found to be resistant. Considering all isolates, colistin resistant isolates were 65 (0.9%) between October 2016 and September 2017 and 97 (1.3%) between October 2017 and September 2018. By including only the first isolates in the study for the same agent growths in different samples of the same patient, 46 colistin resistant isolates were selected. Six isolates which could not be cultivated from stock cultures were excluded from the study material. Thirteen (32.5%) of the 40 colistin resistant Enterobacterales isolates were isolated in 2017 and 27 (67.5%) were isolated in 2018. ESBL was

detected in 22, AmpC beta-lactamase was detected in 6, carbapenem resistance was detected in 15 of them by phenotypic methods. As a result of PCR analysis, *mcr-1* gene detected in 2 isolates, *bla*<sub>OXA-48</sub> in 2 isolates, *bla*<sub>VIM</sub> in 1 isolate, *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> in 1 isolate, *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> in 5 isolates. These results were confirmed by sequencing of the PCR products. The *mcr-1* genes were found in *E.coli* isolates grown in urine culture samples of 2 women over 65 years of age treated in our hospital. Among the antibiotics tested, only ampicillin resistance was observed in 1 of the patients, whereas ampicillin, amoxicillin-clavulanate and ciprofloxacin resistance were detected in the other. In conclusion, as far as we can reach in the literature our publication is the first study showing the presence of *mcr-1* gene in clinical samples in our country and confirmed by DNA sequence analysis. The detection of *mcr* gene in isolates without multidrug resistance showed once again the importance of colistin susceptibility testing in the laboratories. In addition, the presence of isolates containing more than one resistance genes in our study, suggests that the spread of carbapenem and colistin resistance may be faster than expected.

**Keywords:** *Enterobacterales*; resistance to colistin; resistance to carbapenems; *mcr-1* gene.

## GİRİŞ

Karbapenemler ve kolistin günümüzde özellikle immün sistemi baskılanmış hastalar-daki gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında hayat kurtarıcıdır. Nitekim, genişlemiş spekt-rumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfek-siyonlarda karbapenemler, karbapeneme de dirençli olanlarda ise kolistin (polimiksin E) son çare olarak kullanılmaktadır<sup>1,2</sup>. Gram-negatif bakterilerin sitoplazmik membranının geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne neden olan kolistin tüm dünyada kullanımının artışı direnç sorununu yanında getirmiştir<sup>1,3</sup>. Çin'de Lui ve arkadaşları, 2015 yılında Ente-robacterales izolatlarında plazmit aracılı *mcr-1* kolistin direnç geninin varlığını gösterene kadar, kolistin direncinin yalnızca kromozomal mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmek-teydi<sup>1,4</sup>. Mcr-1 enzimi, lipid A'ya fosfoetanolamin eklenip lipopolisakaritleri modifiye ederek polimiksin direncine yol açan bir fosfoetanolamin transferazdır<sup>3</sup>. *mcr-1*'in tespi-tinden kısa bir süre sonra diğer Mcr homologlarının (*mcr-2-9*) bildirimleri yapılmıştır ve direnç genlerinin izolatlar arasında transfer olabileceği gösterilmiştir<sup>5,6</sup>.

Çalışmamızda Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikro-biyoloji Laboratuvarında, Ekim 2016-Eylül 2018 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen kolistine dirençli *Enterobacterales* ailesi üyesi izolatlarda en yaygın görülen plazmit aracılı bazı kolistin ve karbapenemaz direnç genlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 31.12.2018 ve Karar no: 24237859-10).

### Bakteri İzolatları

Bu çalışmada, Ekim 2016-Eylül 2018 tarihleri arasında laboratuvarımızda klinik örnek-lerden izole edilen ve uygun şartlarda saklanan *Enterobacterales* izolatları kullanıldı.

### *Enterobacterales* İzolatlarının Tanımlanması

Laboratuvarımıza gönderilen klinik örnekler, %5 koyun kanlı agar (BD, Becton Dickin-son, ABD), EMB agar (Oxoid, İngiltere) ve çikolata agar (Becton Dickinson, ABD) besiyer-

lerine ekilerek 24-48 saat 35-37°C'de aerobik ortamda inkübe edildi ve üreyen koloniler değerlendirmeye alındı. Mikroskopik incelemede gram-negatif basil görünümünde olan koloniler, klasik yöntemlere ilaveten MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Almanya) ile üretici firma önerileri doğrultusunda tür düzeyinde tanımlandı.

### Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri ve Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Tayini

Enterobacterales olarak tanımlanan izolatların antibiyotik duyarlılıkları Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize mikrobiyoloji sistemi ile çalışıldı ve "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" kriterlerine göre değerlendirildi<sup>7</sup>. Uygunsuz direnç profillerindeki testler disk difüzyon, antibiyotik gradiyent ve/veya sıvı mikrodilüsyon testleri ile tekrarlandı.

Çalışma süresince tüm Enterobacterales izolatlarında otomatize sistem ile kolistin direnci tarandı. Bu yöntemle dirençli bulunan izolatlarda ve duyarlı saptanan ancak kolistin duyarlılık test sonucu hasta raporuna eklenmesi gereken izolatlarda kolistin duyarlılık testleri EUCAST standartlarına uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tekrarlandı<sup>7</sup>. Kalite kontrol için *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *E.coli* NCTC 13846 suşları kullanıldı<sup>7</sup>.

### GSBL ve AmpC Beta-Laktamaz Saptanması

EUCAST önerileri doğrultusunda GSBL çift disk sinerji; AmpC beta-laktamaz testi ise sefoksitin/sefoksitin-boronik asit diskleri kullanılarak kombine disk yöntemi ile çalışıldı. Bu testlerde kalite kontrol için *E.coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *K.pneumoniae* ATCC 13883 suşları kullanıldı<sup>8,9</sup>.

### Karbapenemazların Belirlenmesi

Enterobacterales izolatlarında karbapenemaz varlığı karbapenem inaktivasyon yöntemi (CIM) kullanılarak araştırıldı<sup>10</sup>. Bu incelemeler sırasında KPC pozitif olan *K.pneumoniae* ATCC BAA1705 ve KPC negatif olan *K.pneumoniae* BAA1706 kontrol suşları olarak kullanıldı.

Moleküler analizler uygulanıncaya kadar izolatlar %15 gliserol (Merck, Almanya) içeren triptik soy buyyon besiyerinde (Fluka, 22092, ABD) -80°C'de saklandı<sup>11</sup>.

### İzolatların Yeniden Canlandırılması ve DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen seçilmiş izolatlar stoklardan çıkarılarak %5 koyun kanlı agarda pasajlandı. Karbapenem ve kolistin duyarlılık testleri tekrarlandı. DNA izolasyonu için bir öze dolusu izolat, 500 µl steril saf su içinde süspansiyon edildi. 2500 x g'de bir dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Aynı işlem iki kez daha tekrar edildikten sonra çökelti 500 µl steril Tris-EDTA (TE), pH= 8 tamponu içinde yeniden süspansiyon edildi. Çözelti kaynayan saf su içinde 10 dakika bekletildikten sonra 10.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Steril saf su ile 10 kat sulandırılan süpernatant alikotlanarak kullanılıncaya kadar dondurucuda stoklandı.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Fenotipik yöntemlerle kolistin direnci saptanan izolatlarda *mcr*-1-5, karbapenem direnci saptanan izolatlarda ise *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> gen varlığı araştırıldı. Bu

işlem için toplam 25 µl'lik hacmin içinde; 5 µl tampon (Promega Madison, WI, ABD), 1 U DNA polimeraz (Promega, Madison, WI, ABD), 0.2 mM dNTP karışımı (Ampliçon, Danimarka), 0.2 µM primer (Oligomer, Ankara), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 2 µl kalıp DNA olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. Kullanılan primerler Tablo I'de sunulmuştur. Amplifikasyon koşulları; 94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu sonrası, her döngü için 94°C'de 30 sn denatürasyon, 58°C'de 90 sn primer birleşmesi, 72°C'de 60 sn polimerizasyon aşamalarını içeren 25 döngü ve sonrasında 72°C'de 10 dakika son uzama süresi olarak düzenlendi. Cihazda (Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700, ABD) gerçekleştirilen amplifikasyon işleminin sonucu, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1.5'lik agaroz jele yüklenen ürünlerin 110 Volt'da elektroforezi sonrası UV transilüminatörde gözlemlendi.

### Nükleotit Dizi Analizi

Agaroz jel elektroforezi sonucunda büyüklükleri uyumlu olan bant gözlenen PCR ürünleri temizlendikten sonra aynı PCR primerleri ile dizileme döngüsü (cycle sequencing) gerçekleştirildi (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Waltham, MA, ABD). Dizileme işlemi ABI PRISM® 3100 Genetic analizörde (Applied Biosystems, ABD) ger-

**Tablo I.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminde Kullanılan Primerler

Primer adı	Dizisi (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
CLR F	F- CGG TCA GTC CGT TTG TTC	309	1
CLR R	R- CTT GGT CGG TCT GTA GGG		
MCR2 IF	F- TGT TGC TTG TGC CGA TTG GA	567	5
MCR2 IR	R- AGA TGG TAT TGT TGG TTG CTG		
mcr3_900bp_fw	F- AAA TAA AAA TTG TTC CGC TTA TG	929	12
mcr3_900bp_rev	R- AAT GGA GAT CCC CGT TTT T		
mcr4_1100bp_fw	F- TCA CTT TCA TCA CTG CGT TG	1116	12
mcr4_1100bp_rev	R- TTG GTC CAT GAC TAC CAA TG		
MCR5_fw	F- ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644	13
MCR5_rev	R- TCATTGTGGTTGCCTTTTCTG		
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	F- GATACCACGTTCCGTCTGG R- GCAGGTTCCGTTTTGTCTC	246	14
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	F- TTGGTGGCATCGATTATCCG R- GAGCACTTCTTTGTGATGGC	744	15
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	TCG ATC CCA ACG GTG ATA TT TGG ATC AAG CAG GAG ATC AA	287	15
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G ATG AAA GTG CGT GGA GAC	261	16
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	587	16

bp: Baz çifti.

çekleştirdi. Elde edilen dizilerin benzerliği "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)" kullanılarak araştırıldı.

## BULGULAR

Çalışmamızda, farklı klinik birimlerde tedavi gören 7535 hastaya ait 14657 Enterobacterales izolatı retrospektif olarak irdelenmiş ve en sık *E.coli* %61.2 (n= 8968), *K.pneumoniae* %22.7 (n= 3334) ve *Enterobacter cloacae* %6.9 (n= 1005) olduğu görülmüştür. Karbapenem direnci toplamda 894 izolatta tespit edilmiş ve Ekim 2016-Eylül 2017 tarihleri arasında izole edilen 7135 izolatın %5.8 (n= 412)'i; Ekim 2017-Eylül 2018 tarihleri arasında izole edilen 7522 izolatın %6.4 (n= 482)'ü dirençli bulunmuştur. Tüm izolatlar içinde kolistine dirençli bulunan izolatlar Ekim 2016-Eylül 2017 tarihleri arasında 65 (%0.9) iken, Ekim 2017-Eylül 2018 tarihleri arasında 97 (%1.3) olarak tespit edilmiştir. Hastaların tekrarlayan üremelerinde sadece ilk örnekleri çalışmaya dahil edilerek kolistine dirençli 46 izolat seçilmiştir. Stok kültürden üretilemeyen 6 izolat çalışma materyalinden çıkarılmıştır. Çalışmaya dahil edilen kolistine dirençli 40 Enterobacterales izolatının 13 (%32.5)'ü 2017, 27 (%67.5)'si 2018 yılında izole edilmiştir.

Çalışma süresince tüm Enterobacterales izolatlarında otomatize sistem kolistin direnci taranmıştır. Bu yöntemle dirençli bulunan izolatlar ve duyarlı saptanan ancak kolistin duyarlılık test sonucu hasta raporuna eklenmesi gereken izolatların kolistin duyarlılık testi EUCAST standartlarına uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tekrarlanmıştır. Her iki çalışma arasında uyumsuzluk tespit edilmiştir. Tüm izolatlar içinde kolistine dirençli bulunan 40 izolat çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen kolistine dirençli Enterobacterales izolatlarının kolistin MİK oranları Tablo II'de sunulmuştur.

Kolistine dirençli izolatların 26 (%65.0)'ünün hastane kaynaklı, 14 (%35.0)'ünün toplum kaynaklı, bu izolatların da en sık (%42.5) yoğun bakım ünitelerinden gelen örneklerden olduğu saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen kolistine dirençli Enterobacterales izolatlarının 22'sinde GSBL, altısında AmpC beta-laktamaz, 15'inde karbapenem direnci varlığı fenotipik yöntemlerle tespit edilmiştir. Bu işlemlerin ardından uygulanan PCR analizinde 2 izolatta *mcr-1*, 2 izolatta *bla<sub>OXA-48</sub>*, 1 izolatta *bla<sub>VIM</sub>*, 1 izolatta *bla<sub>KPC</sub>* ve *bla<sub>OXA-48</sub>* birlikteliği, 5 izolatta *bla<sub>NDM</sub>* ve *bla<sub>OXA-48</sub>* birlikteliği tespit edilmiştir. PCR analizi yapılan izolatların karbapenem ve kolistin MİK değerleri, fenotipik ve genotipik test sonuçları Tablo III'te gösterilmiştir.

**Tablo II.** Kolistine Dirençli Enterobacterales İzolatlarının Kolistin MİK Oranları

Bakteri izolatları	MİK aralığı (µg/ml)	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n= 19)	8 -> 64	64	> 64
<i>Escherichia coli</i> (n= 14)	4-32	16	32
<i>Klebsiella aerogenes</i> (n= 4)	16-> 64	32	> 64
<i>Enterobacter cloacae</i> (n= 3)	64-> 64	> 64	> 64

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

**Tablo III.** Kolistine Dirençli Enterobacterales İzolatlarının Karbapenem ve Kolistin MİK Değerleri, Fenotipik ve Genotipik Test Sonuçları

İzolat no	Bakteri türü	ERT (µg/ml)	iMP (µg/ml)	MEM (µg/ml)	CO (µg/ml)	GSBL	AMP-C	CIM	Direnç genleri
TK-1	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	4	4	64	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub>
TK-2	<i>E.cloacae</i>	1	2	≤ 0.125	64	Negatif	Pozitif	Negatif	-
TK-3	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	32	Negatif	Negatif	Negatif	-
TK-4	<i>K.pneumoniae</i>	≤ 0.25	1	≤ 0.125	32	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-5	<i>K.aerogenes</i>	0.5	≤ 0.25	≤ 0.125	> 64	Negatif	Pozitif	Negatif	-
TK-6	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	32	Negatif	Negatif	Negatif	-
TK-7	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	32	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-8	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	8	8	> 64	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub>
TK-9	<i>E.cloacae</i>	≤ 0.25	1	≤ 0.125	> 64	Negatif	Negatif	Pozitif	-
TK-10	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	8	> 8	> 64	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
TK-11	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	8	> 8	64	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub>
TK-12	<i>K.aerogenes</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	16	Negatif	Negatif	Pozitif	-
TK-13	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	0.5	≤ 0.125		Negatif	Negatif	Negatif	<i>mcr-1</i>
TK-14	<i>K.pneumoniae</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	16	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-15	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	> 8	> 8	8	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
TK-16	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	32	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-17	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	32	Negatif	Negatif	Negatif	-
TK-18	<i>K.pneumoniae</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	64	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-19	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	16	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-20	<i>K.pneumoniae</i>	0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	64	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-21	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	> 8	> 8	32	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>KPC</sub>
TK-22	<i>E.coli</i>	> 1	≤ 0.25	1	> 64	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-23	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	≤ 0.25	1	> 64	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-24	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	4	Negatif	Negatif	Negatif	-
TK-25	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	≤ 0.25	1	> 64	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-26	<i>K.pneumoniae</i>	≤ 0.25	0.5	≤ 0.125	> 64	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-27	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	32	Negatif	Negatif	Negatif	-
TK-28	<i>K.pneumoniae</i>	≤ 0.25	0.5	≤ 0.125	> 64	Negatif	Negatif	Negatif	-
TK-29	<i>K.pneumoniae</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	8	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-30	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	0.5	1	> 64	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-31	<i>K.pneumoniae</i>	≤ 0.25	1	≤ 0.125	16	Negatif	Negatif	Negatif	-
TK-32	<i>K.aerogenes</i>	> 1	4	8	32	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub>
TK-33	<i>E.cloacae</i>	> 1	8	2	> 64	Negatif	Pozitif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>

**Tablo III.** Kolistine Dirençli Enterobacterales İzolatlarının Karbapenem ve Kolistin MİK Değerleri, Fenotipik ve Genotipik Test Sonuçları (Devamı)

İzolat no	Bakteri türü	ERT (µg/ml)	İMP (µg/ml)	MEM (µg/ml)	CO (µg/ml)	GSBL	AMP-C	CIM	Direnç genleri
TK-34	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	16	Negatif	Negatif	Negatif	<i>mcr-1</i>
TK-35	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	16	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-36	<i>K.pneumoniae</i>	> 1	0.5	2	> 64	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-37	<i>E.coli</i>	> 1	1	1	16	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub>
TK-38	<i>E.coli</i>	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.125	32	Pozitif	Negatif	Negatif	-
TK-39	<i>K.aerogenes</i>	> 1	8	4	8	Negatif	Pozitif	Negatif	-
TK-40	<i>K.pneumoniae</i>	≤ 0.25	0.5	≤ 0.125	8	Pozitif	Negatif	Negatif	-

ERT: Ertapenem, İMP: İmipenem, MEM: Meropenem, CO: Kolistin, GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, CIM: Karbapenem inaktivasyon yöntemi.

*mcr-1* pozitif PCR ürünü dizi analizinde 309 bp uzunluğunda veri elde edilmiştir. Dizi Blast veri tabanında araştırıldığında *mcr-1* dizileri ile %100 benzerlik görülmüştür.

Tespit edilen *mcr-1* genleri hastanemizde tedavi gören 65 yaş üstü 2 kadın hastanın idrar kültürü örneklerinde üreyen *E.coli* izolatlarında bulunmuştur. Bu hastalardan 1'inde test edilen antibiyotikler arasında sadece ampiciline karşı direnç gözlenmiş, diğerinde ise sadece ampicilin, amoksisilin-klavulonik asit ve siprofloksasine karşı direnç belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

Enterobacterales ailesi üyeleri hem sağlık hizmeti ile ilişkili hem de toplum kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenleri arasındadır<sup>17</sup>. Hastanelerde her klinikte görülse de, enfeksiyonlarına en sık yoğun bakım ünitelerinde karşılaşılmakta ve sonuçları da daha ağır seyredabilmektedir<sup>18</sup>. Çalışmamıza dahil ettiğimiz kolistine dirençli Enterobacterales izolatları da en sık olarak yoğun bakım ünitelerinden (%42.5) saptanmıştır.

Mobil kolistin direnç genlerinin ortaya çıkması, kolistin direncinin oluşması ve yayılması ile ilgili verilerin yeniden gözden geçirilmesine neden olmuştur<sup>6</sup>. Çin'de *mcr-1*'in keşfinden sonra dünyanın çeşitli bölgelerinden *mcr* genleri ile ilgili bildirimler yayımlanmıştır<sup>5</sup>. Bu bildirimlerde Enterobacterales ailesinde sıklıkla *mcr-1* ve *mcr-3* tespit edilmiştir, *mcr-2*, *mcr-4* ve *mcr-5* varlığı oldukça nadirdir<sup>6</sup>. Ülkemizde *mcr-1* geni ilk kez Kürekçi ve arkadaşları<sup>19</sup> tarafından tavuk etlerinden üretilmiş *E.coli* izolatlarında gösterilmiştir. Sarı ve arkadaşları<sup>20</sup> 2017 yılında yayımladıkları çalışmada toplam 22 merkeze ait 329 Enterobacterales izolatında *mcr-1* ve *mcr-2* gen varlığını PCR yöntemi ile araştırmış ancak çalışmaya alınan izolatların hiçbirinde aranan gen bölgelerine rastlanmamıştır. Arabacı ve arkadaşları<sup>21</sup> 2018 yılında sundukları bildiride üç *K.pneumoniae* izolatında PCR yöntemi ile *mcr-1* genini tespit ettiklerini bildirmişler ancak ileri doğrulama testlerini gerçekleştirmemişlerdir. Kandemir ve arkadaşları<sup>22</sup> *Acinetobacter baumannii* izolatında PCR yöntemi ile elde ettikleri amplifikasyon ürünlerini DNA dizi analizi ile incelediklerinde, hedeflenen



bölge ile yaklaşık aynı bp uzunluğunda ancak %60-80 oranlarında benzerlik tespit ettiklerini bildirmişler ve pozitif çıkan örneklerin DNA dizi analizi ile doğrulanmasının uygun olacağını önermişlerdir.

Bu çalışma, literatürde ulaşabildiğimiz kadarıyla ülkemizde klinik örneklerde *mcr-1* geni varlığını gösteren ve DNA dizi analizi ile doğrulanmış ilk araştırmadır. Pozitif sonuçlardan birisi enfeksiyon hastalıkları polikliniğinde ayaktan takip edilen, diğeri ise iç hastalıkları nefroloji servisinde yatarak tedavi gören 65 yaş üstü iki kadın hastanın idrar kültürü örneklerinde etken olarak üreyen *E.coli* izolatlarında tespit edilmiştir. Ülkemizde tavuklardan izole edilen kolistine dirençli *E.coli* izolatlarının antibiyotik profilinde piperasiline, tetrasikline, levofloksasine, siprofloksasine, sefepime, aztreonam, seftazidime ve trimetoprim-sülfametoksazole karşı direnç varlığı gösterilmiştir<sup>19</sup>. İzolatlarımızdan birinde test edilen antibiyotikler arasında kolistine, ampisiline, amoksisilin-klavulonik asite ve siprofloksasine karşı direnç gözlenmiş, diğeri ise kolistin ve ampisilin dışında direnç belirlenmemiştir. Bu durum çoklu ilaç direnci görülmeyen izolatlarda da kolistin direncinin görülebileceğini hatırlatarak, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolistin duyarlılık testi çalışmasının önemini bir kez daha gözler önüne sermiştir.

Kolistine dirençli *E.coli* izolatlarında plazmit üzerinden *mcr-1* geniyle birlikte GSBL ve kinolon direnç genlerinin de aktarılabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur<sup>2,3,19</sup>. Çalışmamızdaki izolatlar fenotipik testler ile GSBL negatif olarak tespit edilmiştir ancak izolatlarımızda konjugatif plazmit varlığı araştırılmaması çalışmamızın kısıtlı yanını oluşturmaktadır.

Karbapenem dirençli bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde tigesiklin, polimiksin, aminoglikozitler ve fosfomisin gibi antimikrobiyaller kullanılmaktadır; ancak bu moleküllerin farmakokinetik özellikleri, toksisiteleri ve gelişen direnç problemleri nedeniyle uygulanmasında kısıtlılıklar yaşanmaktadır. Bu nedenle Enterobacterales ailesi üyelerinde gözlenen artan karbapenem direnci tüm dünyada ciddi kaygılar uyandırmaktadır ve gelişen direncin nedenlerini belirlemek giderek önem kazanmaktadır<sup>1,23</sup>. Bu nedenle çalışmaya aldığımız kolistine dirençli bu özel grupta karbapenem direnci incelemeye değer bulunmuş ve yapılan incelemeler sonucunda izolatlarımızın 15 (%37.5)'inde fenotipik olarak karbapenem direnci belirlenmiştir. Direnç nedenlerini incelediğimizde karbapenem inaktivasyon testinin pozitif bulunduğu dokuz izolatta direnç genlerinin (*bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>) varlığı tespit edilmiştir. Bu testin negatif bulunduğu altı izolatta direnç genlerine rastlanmış ancak iki izolatta AmpC, dört izolatta GSBL üretimi görülmüş ve karbapenem direncinin bu enzimlerin aşırı üretimine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Ülkemizde yaygın olarak tespit edilen *bla*<sub>OXA-48</sub> geni bizim çalışmamızda da en sık rastlanan gen olmuştur<sup>24</sup>. Dünyada daha önce Monako, Tunus ve İsviçre'de gösterilmiş ve ülkemizde ilk kez 2015 yılında Kılıç ve arkadaşları<sup>25</sup> tarafından *K.pneumoniae* izolatında bildirilmiş olan OXA-48 ve NDM birlikteliği daha sonra *E.coli*, *Citrobacter freundii*, *Providencia rettgeri* gibi farklı izolatlarda da gözlenmiştir<sup>26</sup>. Bizim çalışmamızda da beş izolatta *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>NDM</sub> gen varlığı beraber saptanmıştır. *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>NDM</sub> birlikte

pozitif olan *E.coli* izolatında sadece ertapenem direncinin gösterilmiş olması, var olan direnç genlerinin aktif olmayabileceğini düşündürmüştür. Ancak konjugasyon çalışmaları ile doğrulanmamış olması çalışmamızın kısıtlı yanıdır.

NDM gibi diğer bir metallo-beta-laktamaz olan VIM ülkemizde 2014 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada %2.8 oranında tespit edilmiştir ve pozitif saptanan dört izolatın biri merkezimizden gönderilmiştir<sup>27</sup>. Çalışmamızda da *bla*<sub>VIM</sub> geninin karbapenemaz ve AmpC beta-laktamaz üreten bir *E.cloacae* izolatında saptanmış olması, bölgemiz için var olan tehdidin hala devam ettiğini göstermektedir.

Ülkemizde ilk kez 2014 yılında Romanyalı bir hastanın endotrakeal aspirat kültüründe izole edilen *K.pneumoniae* izolatında *bla*<sub>KPC</sub> enzimi geni varlığı tespit edilmiş, ardından ülkemizin çeşitli bölgelerinden bildirimler yapılmıştır<sup>28</sup>. Literatürde ulaşabildiğimiz kadarıyla daha önce Tayvan ve İngiltere’de saptanan *bla*<sub>KPC</sub> ve *bla*<sub>OXA-48</sub> birlikteliğine ülkemizde çalışmamız dışında rastlanmamıştır<sup>29,30</sup>.

Sonuç olarak, çalışmamız literatürde ulaşabildiğimiz kadarıyla ülkemizde klinik örneklerde *mcr-1* geni varlığını gösteren ve DNA dizi analizi ile doğrulanmış ilk çalışmadır. Çoklu ilaç direnci görülmeyen izolatlarda *mcr* geninin saptanmış olması tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolistin duyarlılık testi çalışılmasının önemini bir kez daha gözler önüne sermektedir. Ayrıca, çalışmamızda farklı direnç genlerini bir arada içeren izolatların saptanmış olması, karbapenem ve kolistin direncinin yayılımının beklenenden daha hızlı olabileceğini bir kez daha hatırlatmıştır. Kolistinin özellikle karbapeneme dirençli gram-negatif bakterilerin enfeksiyonlarının tedavisinde son seçenek olarak kullanılması, direnç yayılım mekanizmasının anlaşılmasının ve dirençli izolatlarla ilgili sürveyans çalışmalarının yürütülmesini oldukça önemli hale getirmiştir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, 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.
2. Rhouma M, Beaudry F, Theriault W, Letellier A. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Front Microbiol* 2016; 7: 1789.
3. Poirel L, Kieffer N, Brink A, Coetze J, Jayol A, Nordmann P. Genetic features of *mcr-1*-producing colistin resistant *Escherichia coli* isolates in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(7): 4394-7.
4. Kawanishi M, Abo H, Ozawa M, Uchiyama M, Shirakawa T, Suzuki S, 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* 2017; 61(1): e02057-16.
5. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 2016; 21(27): pii=30280.

6. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 2018; 7(1): 122.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, 2018.
8. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2.0, 2017.
9. Liu XQ, Liu YR. Detection and genotype analysis of AmpC  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from tertiary hospitals. *Exp Ther Med* 2016; 12(1): 480-4.
10. Simona M, Gatermann S, Pfeifer Y, Reischla U, Gessner A, Jantsch J. Evaluation of the automated BD Phoenix CPO Detect panel in combination with the  $\beta$ -CARBA assay for detection and classification of carbapenemase producing Enterobacterales. *J Microbiol Methods* 2019; 156: 29-33.
11. Robson RL, Essengue S, Reed NA, Horvat RT. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* induced by frozen storage in glycerol. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58(2): 185-90.
12. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill* 2018; 23(6): 17-00672.
13. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* B. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72(12): 3317-24.
14. Hindiye M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F, et al. Rapid detection of *bla*<sub>KPC</sub> carbapenemase genes by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9): 2879-83.
15. Hofko M, Mischnik A, Kaase M, Zimmermann S, Dalpke AH. Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on the BD Max system. *J Clin Microbiol* 2014; 52(5): 1701-4.
16. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Malamou-Lada E, Orfanidou M, et al. Detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J Microbiol Methods* 2010; 83(2): 185-7.
17. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* 2006; 34(6 Suppl 1): S20-8.
18. Lai CC, Chen YS, Lee NY, Tang HJ, Lee SS, Lin CF, et al. Susceptibility rates of clinically important bacteria collected from intensive care units against colistin, carbapenems, and other comparative agents: results from Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART). *Infection and Drug Resistance* 2019; 12: 627-40.
19. Kurekci C, Aydın M, Nalbantoglu OU, Gundogdu A. First report of *Escherichia coli* carrying the mobile colistin resistance gene *mcr-1* in Turkey. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; 15: 169-170.
20. Sarı AN, Süzük S, Karatuna O, Öğünç D, Karakoç AE, Çizmeci Z, et al. Results of a multicenter study investigating plasmid mediated colistin resistance genes (*mcr-1* and *mcr-2*) in clinical Enterobacteriaceae isolates from Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51(3): 299-303.
21. Arabacı Ç, Dal T, Başyigit T, Genişel N, Durmaz R. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnç mekanizmalarının değerlendirilmesi ve *MCR-1* geninin araştırılması. 38. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Antalya. Kongre Kitabı, s: 171-2, SS-084.
22. Kandemir T, Nağiyev T, Köksal F. Kolistin direncinin tespitinde yanlış tanı: yalnız MCR-1 pozitifliği. 38. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-8 Kasım 2018, Antalya. Kongre Kitabı, s: 190, SS-114.
23. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LE, Polato A, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K.pneumoniae*: a systematic review. *Am J Infect Control* 2016; 44(11): 1374-80.
24. Tekintaş Y, Çilli F, Erač B, Yaşar M, Aydemir SŞ, Hoşgör Limoncu M. Comparison of phenotypic methods and polymerase chain reaction for the detection of carbapenemase production in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51(3): 269-76.

25. Kilic A, Baysallar M. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med* 2015; 35(3): 382-3.
26. Otlu B, Yakupoğulları Y, Gürsoy NC, Duman Y, Bayındır Y, Tekerekoğlu MS, et al. *Providencia rettgeri*'de OXA-48 ve NDM-1 karbapenemaz genlerinin birlikte üretimi: ilk bildirim. *Mikrobiyol Bul* 2018; 52(3): 300-7.
27. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Ögünç D, Özhak Baysan B, et al. Türkiye'de 2014 yılı içinde izole edilen karbapeneme dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(1): 21-33.
28. Özyazıcı G, Özkaya E, Kaya H, Kocatürk Sel S, Altınbaşak H, Başarı F, et al. Investigation of *bla*<sub>KPC</sub> gene by PCR in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in a tertiary care hospital in Turkey. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob* 2019; 8: 3.
29. Chen CM, Guo MK, Ke SC, Lin YP, Li CR, Vy Nguyen HT, et al. Emergence and nosocomial spread of ST11 carbapenem-resistant co-producing OXA-48 and KPC-2 in a regional hospital in Taiwan. *J Med Microbiol* 2018; 67(7): 957-64.
30. Meunier D, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the AusDiagnostics MT CRE EU assay for the detection of carbapenemase genes and transferable colistin resistance determinants *mcr-1/-2* in MDR gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(12): 3355-8.