

KARBAPENEM DİRENÇLİ *A. BAUMANNII* SUŞLARINDA, KOLİSTİN HETEROJEN DİRENCİNİN VE BUNA ETKİ EDEN BAZI FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

DENİZ GAZEL*, MÜŞERREF TATMAN OTKUN**

* Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

** Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

RESEARCH ARTICLE / ARAŐTIRMA

DOI: 10.4274/mjima.2017.1

Mediterr J Infect Microb Antimicrob 2017;6:1

Eriřim: <http://dx.doi.org/10.4274/mjima.2017.1>



Investigation of Colistin Heteroresistance and Some Factors Affecting Heteroresistance in Carbapenem-Resistant *A. baumannii* Strains

Karbapenem Dirençli *A. baumannii* Suşlarında, Kolistin Heterojen Direncinin ve Buna Etki Eden Bazı Faktörlerin Araştırılması

Deniz GAZEL¹, Müşerref TATMAN OTKUN²

¹Gaziantep University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Gaziantep, Turkey

²Çanakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Çanakkale, Turkey

Abstract

- *A. baumannii* complex (ABC) hastane enfeksiyonlarında en önemli etkenlerden
- Çoklu ilaç dirençli ABC enfeksiyonlarında **karbapenemler**
- Karbapenem dirençli ABC (CR-ABC) enfeksiyonlu hastalarda **kolistin**
 - Kolistin için de heterodirenç/direnç bildirilmeye başlandı

- Rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile kolistin heterodirenci tespit edilemez
- ABC özelinde **heterojen direnç tanımı**
 - Bakterinin kolistin MİK değerinin $<2 \mu\text{g/ml}$ olmasına karşın, $>2 \mu\text{g/ml}$ colistin varlığında 48 saat enkübasyon sonunda altpopülasyonlarının saptanabilmesidir.

- Bu heterodirencin özellikle mikroorganizmanın kolistin'e maruziyeti ile indüklendiği düşünölmektedir
- CR-ABC enfeksiyonlarındaki tedavi başarısızlıklarının nedeni olarak kolistin heterodirenci suçlanmaktadır.

AMAÇ

1. Bu çalışmada CR-ABC suşlarında **kolistin heterojen direnç oranını** ve
2. Ek olarak standart ABC suşu ve bir yoğun bakım hastasında kan kültüründen izole edilen suşu kullanarak;
İkili antibiyotik kombinasyonlarının **heterodirenç/direnç oluşumu üzerine etkisini** araştırmayı amaçladık.

- Kolistin - **rifampisin**,
- Kolistin - **tigesiklin**,
- Kolistin - **gentamisin**
- Kolistin - **flukonazol**

- Bu çalışma ÇOMÜ BAP-2012-028 No'lu proje ile desteklenmiştir

YÖNTEM

- Çalışma ÇOMÜ-SUAM Tıbbi Mikrobiyoloji AD Laboratuvarı'nda, kan kültürlerinden izole edilen 31 adet CR-ABC suşu ile gerçekleştirildi.
- Tüm suşlar izole, genel ve dahiliye yoğun bakım ünitelerinden izole edildi.

YÖNTEM

- Kolistin için mikrodilüsyon test yöntemiyle,
- Karbapenemler için E-test kullanılarak MİK değerleri tespit edildi.
 - Kalite kontrol kökenleri olarak *A.baumannii* ATCC 19606, *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı

Heterodirenç analizi

- 0.5 McFarland standardına uygun bakteri süspansiyonu hazırlandı
- 100 µl süspansiyon **4 µg/ml kolistin içeren Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine** ve kontrol için %5 koyun kanlı agara pasajlandı.
- Plaklar 35°C de 48 saat tutuldu ve 48 saat sonrasında üreyen koloniler sayıldı
 - Dört µg/ml kolistin içeren besiyerinde üreyen koloniler heterojen dirençli *A.baumannii* olarak değerlendirildi
 - Buradan yapılan pasajlardaki bakterilerin MİK değerinin >2 µg/ml olduğu mikro buyyon dilüsyon testi ile doğrulandı.

Sub-inhibitör düzeyde kolistin ile muamele edilerek heterodirenç analizi

- 0.5 x MİK konsantrasyonunda kolistin ve KAMHB içeren test tüpleri, bir öze dolusu koloni ile inokule edildi
- Tüpler 37°C çalkalamalı su banyosunda **48 saat** enkübasyona kaldırıldı
- Enkübasyon esnasında her tüpten 100µl alınarak, **4 µg/ml kolistin içeren MHA** besiyerine pasajlandı
- Antibiyotikli agarda üreyen koloniler kolistine dirençli olarak değerlendirildi ve koloniler manuel olarak sayıldı.

Time-kill yöntemi

- Standart ATCC suşu ve seçilen bir klinik izolat üzerinde çalışıldı
- 0.5ml'lik KAMHB besiyerinde **0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64,128xMİK kolistin** içeren süspansiyonlar hazırlandı.
- Bu tüplerin her birine 0.5 ml logaritmik faza getirilmiş bakteri süspansiyonu eklendi
- Süspansiyonlar hazırlandıktan **0, 1, 2, 3, 4, 6 ve 24 saat** sonra, koloni sayımına uygun olacak şekilde 50'şer µl alınarak nutrient agar plaklarına ekim yapıldı ve koloniler 35°C'de 48 saat enkübasyon sonrası sayıldı.

İkili Antibiyotik Kombinasyonlarının Heterojen Direnç Oranına Olan Etkilerinin Araştırılması

- Kolistinin tek başına etkisi ile
- Kolistinin
 - **rifampisin, gentamisin, tigesiklin ve flukanazol** ile ikili kombinasyonlarının

heterojen direnç gelişimine olan etkileri, standart bakteri ve seçilen *A.baumannii* izolatında seri pasajlarla incelendi

- Bu kombinasyonların, suşların MİK değerlerinin 0.5, 2, 8 ve 64 katı düzeyinde **heterodirenç-direnç gelişimini önleyici etkileri;** günden güne **kombinasyon antibiyotiklerin dozu arttırılarak** seri pasajlarda incelendi

Seri pasajlar

- **1.gün:** Bir öze dolusu *A.baumannii* kolonisi **0.5xMİK** kolistin içeren 10 ml KAMHB'a pasajlandı. 37°C çalkalamalı su banyosunda 48 saat enkübe edildi (100 rpm).
- **3.gün:** Birinci gün çekilen pasaj tüpünden 0.1 ml kültür **2xMİK** kolistin içeren 10 ml KAMHB'ye transfer edilerek ve tekrar bir önceki gibi enkübasyona alındı.
- **4.gün:** Üçüncü gün çekilen pasaj tüpünden 0.1 ml kültür **8xMİK** kolistin içeren 10 ml KAMHB'ye transfer edilerek ve tekrar bir önceki gibi enkübasyona alındı.
- **5.gün:** Dördüncü gün çekilen pasaj tüpünden 0.1 ml kültür **64xMİK** kolistin içeren 10 ml KAMHB'ye transfer edilerek ve tekrar bir önceki gibi enkübasyona alındı.

- **6.gün:** Kültürlerden alınan 5 ml örnek 3000 g, 10 dk, +4°C'de santrifüj edildi, 10 ml tuzlu su ile 2 kez **yıkandı** ve sonra 10 ml **antibiyotiksiz KAMHB'ye** ekildi.
- Daha sonraki **on gün** boyunca 6. günde yapılan işlemler tekrarlandı.
- Her pasaj esnasında 50 µl alınarak **4 µg/ml kolistinli MHA** içeren petriye ekilip üreyen koloniler sayıldı ve **heterojen direnç oluşumu** araştırıldı.

BULGULAR

Antibiyogram sonuçları:

- Tüm suşlarda karbapenemlerin MİK değerleri >32 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.
- Tüm klinik izolatların ve standart ATCC suşlarınınin kolistin MİK değerleri 0.5 $\mu\text{g/ml}$ bulunmuştur.

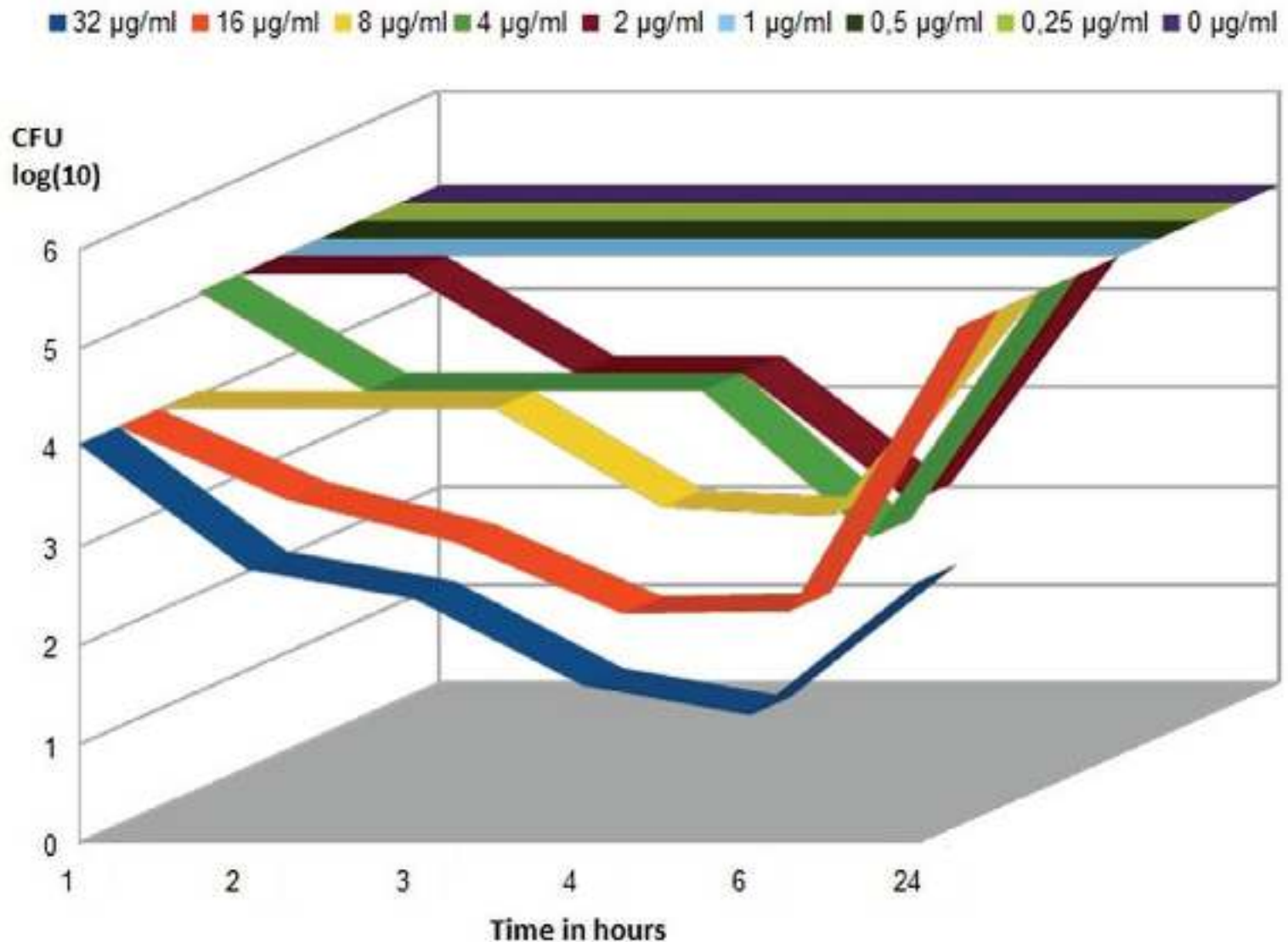


Figure 1. Time-kill curve for *Acinetobacter baumannii* clinical isolate.

Each colored band represents different antibiotic concentration. Number of colonies (log₁₀) that were able to grow on agar plates are on the vertical axis

Antibiyotik seri pasaj testi

Table 2b. Serial passaging results at different antibiotic combinations and concentrations for *Acinetobacter baumannii* clinical isolate (CFU/mL)

	Colistin alone	Col+Gen	Col+Rif	Col+Tig	Col+Flu
0.5x MIC	>100000	>100000	0	0	>100000
2x MIC	>100000	>100000	0	0	>100000
8x MIC	>100000	10000	0	0	>100000
64x MIC	>100000	0	0	0	>100000
1 st day *	>100000	0	0	0	>100000
2 nd day*	>100000	0	0	0	>100000
3 rd day*	>100000	0	0	0	>100000
4 th day*	>100000	0	0	0	>100000
5 th day*	>100000	0	0	0	>100000
6 th day*	>100000	0	0	0	>100000
7 th day*	>100000	0	0	0	>100000
8 th day*	>100000	0	0	0	>100000
9 th day*	>100000	0	0	0	>100000
10 th day*	>100000	0	0	0	>100000

*Passages in colistin free broth, Col+Gen: Colistin-gentamicin, Col+Rif: Colistin-rifampicin, Col+Tig: Colistin-tigecycline, Col+Flu: Colistin-fluconazole, MIC: Minimum inhibitory concentration, CFU: Colony-forming unit

SONUÇLAR

- 31 klinik izolatın hiçbirisi başlangıçta **heterojen dirençli bulunmadı**
- Sub-inhibitör düzeyde kolistin ile muamele sonucunda **tüm suşlar kolistin dirençli hale geldi**

SONUÇLAR

- Time-kill deneyinde
 - Düşük kolistin konsantrasyonlarında neredeyse hiç inhibisyon olmadı
 - Yüksek kolistin konsantrasyonlarında 6. saatten sonra çok hızlı bir yeniden üreme gözlemlendi
- Kolistin-rifampisin, kolistin-tigesiklin kombinasyonları çok düşük dozlarda bile bakterileri inhibe etti ve direnç gelişimini önledi

- Bu veriler ışığında, kolistin
 - Mutlaka verilebildiği **en yüksek dozlarda ve uygun aralıklarla kullanılmalı**
 - Mutlaka başka bir antibiyotik ile **kombine edilmeli**

TEŐEKKÜRLER



ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ