Acinetobacter baumannii'de kolistin direncine yol açan klinik ve moleküler etkenler

Elif Nurtop[1], Fulya Bayındır Bilman[2], Şirin Menekşe[3], Özlem Kurt Azap[4], Mehmet Gönen[5], Önder Ergönül[6], Füsun Can[1]

[1]Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul

[2]İzmir Menemen Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, İzmir

[3]Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

[4]Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara

[5]Koç Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Endüstri Mühendisliği Bölümü, İstanbul

[6]Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul

GİRİŞ VE AMAÇ

- Kolistin dirençli *Acinetobacter baumannii* kaynaklı hastane enfeksiyonlarının sıklığındaki artış endişe vericidir[1].

- Bu çalışmada, kolistin direncinde rolü olabilecek

  - moleküler mekanizmalar
  - klinik faktörlerin

  araştırılması amaçlanmıştır.

[1]Oikonomou O, Sarrou S, Papagiannitsis CC, Georgiadou S, Mantzarlis K, Zakynthinos E, et al. BMC Infect Dis. 2015;15:559.

A.baumannii ‘de kolistin direncinin moleküler mekanizmaları

- *pmrCAB* operonunda nokta mutasyonlar- membran negatif yükünün azalması
- *lpxA*, *lpxC* ve *lpxD* mutasyonlar -LPS'nin tamamen kaybedilmesi

YÖNTEM

- Bu prospektif çalışmada,

- 4 farklı hastanede
  - Menemen Devlet Hastanesi (İzmir)
  - Başkent Üniversitesi Hastanesi (Ankara)
  - Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi (İstanbul)
  - Amerikan Hastanesi (İstanbul)

- Nisan 2015-Haziran 2016 tarihleri arasında

- Kolistin dirençli *A. baumannii* enfeksiyonu tanısı almış 29 hastadan izole edilmiş suşlar çalışmaya dahil edilmiştir.

YÖNTEM

Hastaların demografik verileri ve klinik bulguları değerlendirilmiştir.

- Altta yatan hastalık
- Enfeksiyon tipi
- İzolasyon yeri
- Predispozan faktörler
- Son 1 ay içinde geçirilmiş operasyon öyküsü
- Yoğun bakım yatışı
- Empirik tedavide kullanılan antimikrobiyal ajan
- Etkene yönelik tedavide kullanılan antimikrobiyal ajan
- İzolasyon öncesi kolistin ile tedavi süresi
- Karbapenem direnci
- 30 gün mortalite oranı

YÖNTEM

Kolistin ve karbapenem direnci

Kolistin: merkezlerde E test gradient strip ile, Koç Üniversitesi'nde sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile

Karbapenem: sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile

Karbapenemaz varlığı: PCR

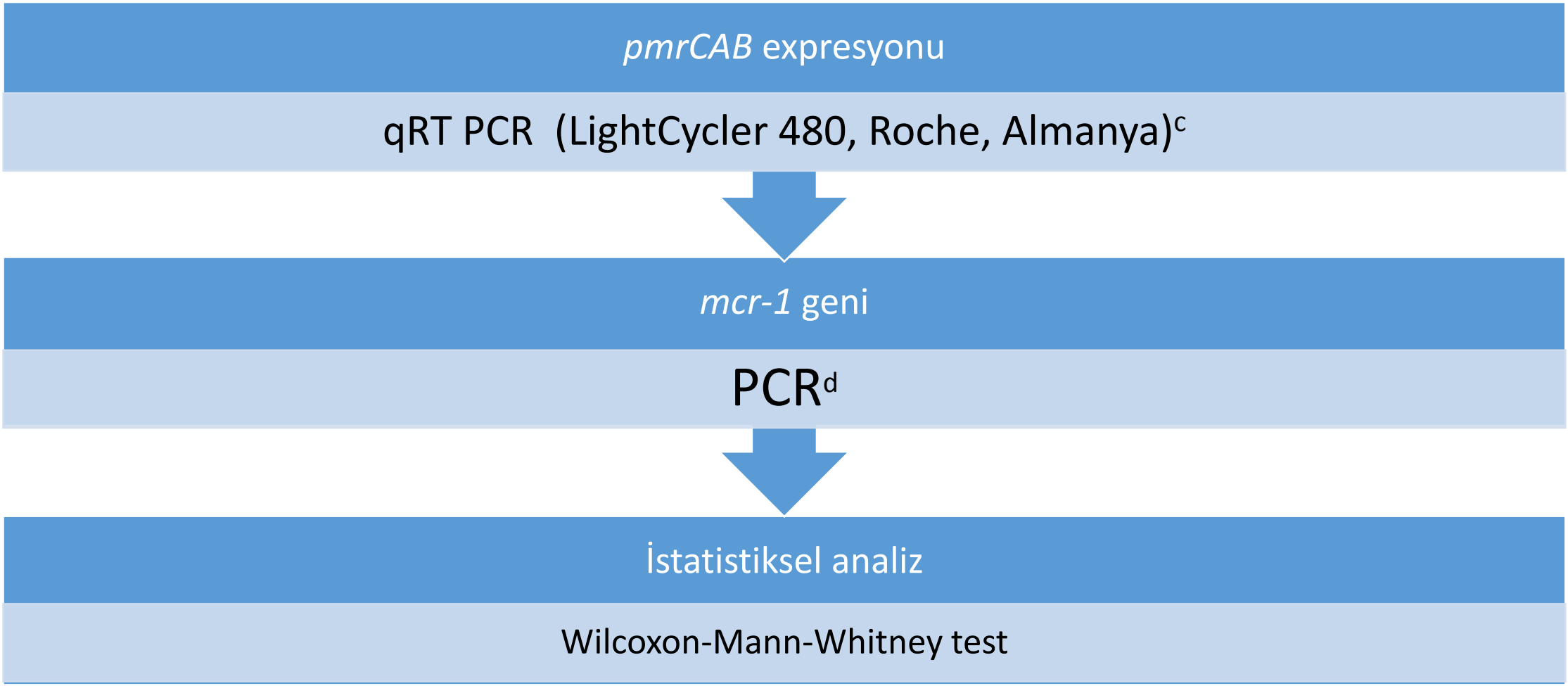
Genotiplendirme

Extragenic palindromic PCR (rep-PCR) (BioMerieux, Fransa)

Mutasyon analizi

Mutasyon yönünden *pmrCAB*, *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* genleri Sanger sequencing (Applied ABI3500, Applied Biosystems)[b] yöntemi ile

[a]Woodford N, et al. Int J Antimicrob Agents. 2006;27(4):351-3.
[b]Adams MD, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(9):3628-34.

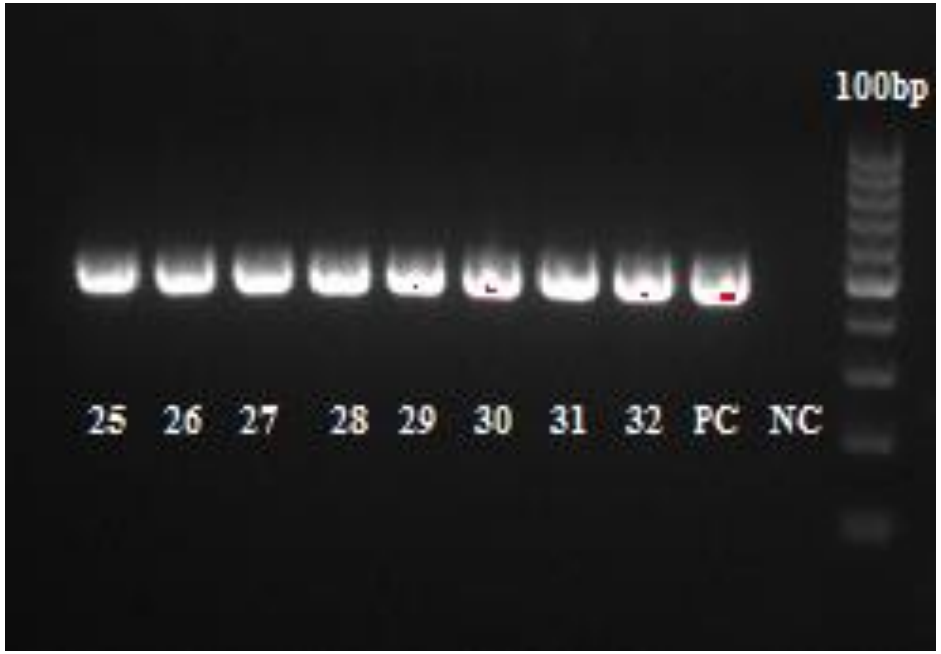


[c]Beceiro A, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(7):3370-9.

[d]Liu YY, et al. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-8.

Hastaların demografik ve klinik özellikleri

	n=29
Ortalama yaş (min-max)	73 (32-88)
Kadın cinsiyet	16 (%55)
Son 1 ay içinde operasyon öyküsü	11 (%38)
Pnömoni	17 (%59)
Bakteriyemi	5 (%17)
Kolistin kullanımı	27 (%93)
Ortalama kolistin kullanım süresi (min-max)	7 (1-28)
Fatalite	13 (%45)

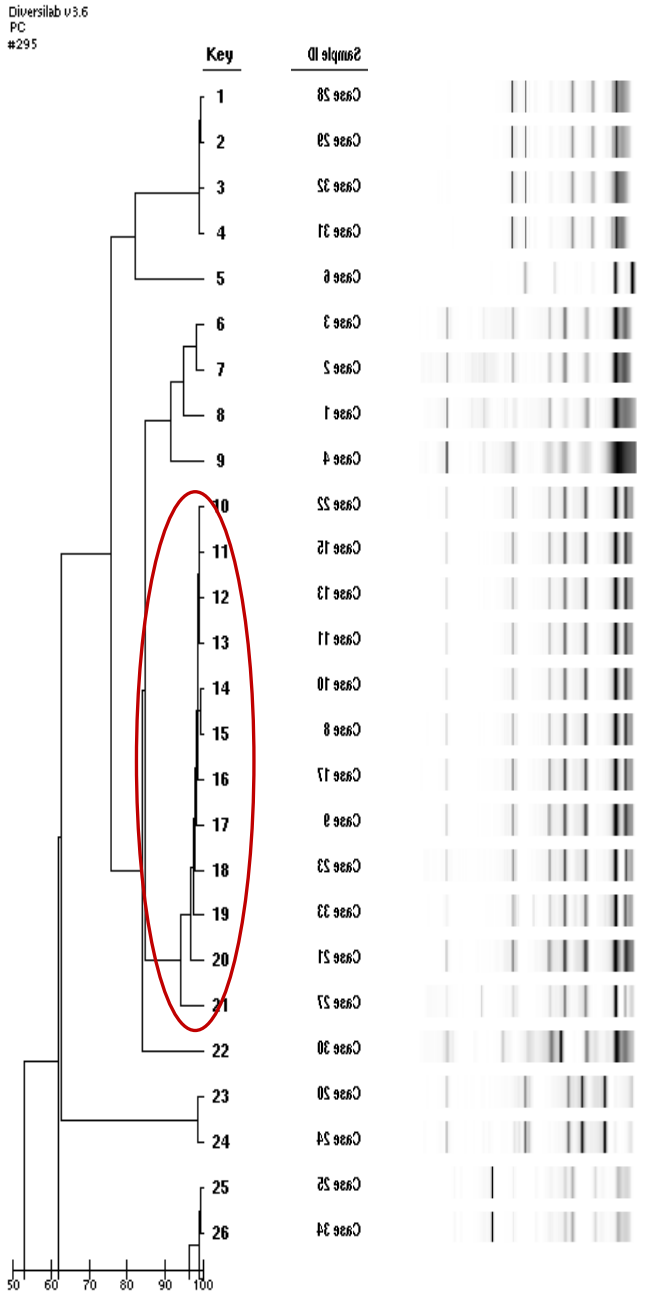


Karbapenemaz PCR jel görüntüsü

✓Tüm izolatlarda *bla*$_{OXA-23}$ karbapenemaz pozitif

✓ Kolistin MİK$_{50}$ 32 µg/ml (range: 2-256 µg/ml)

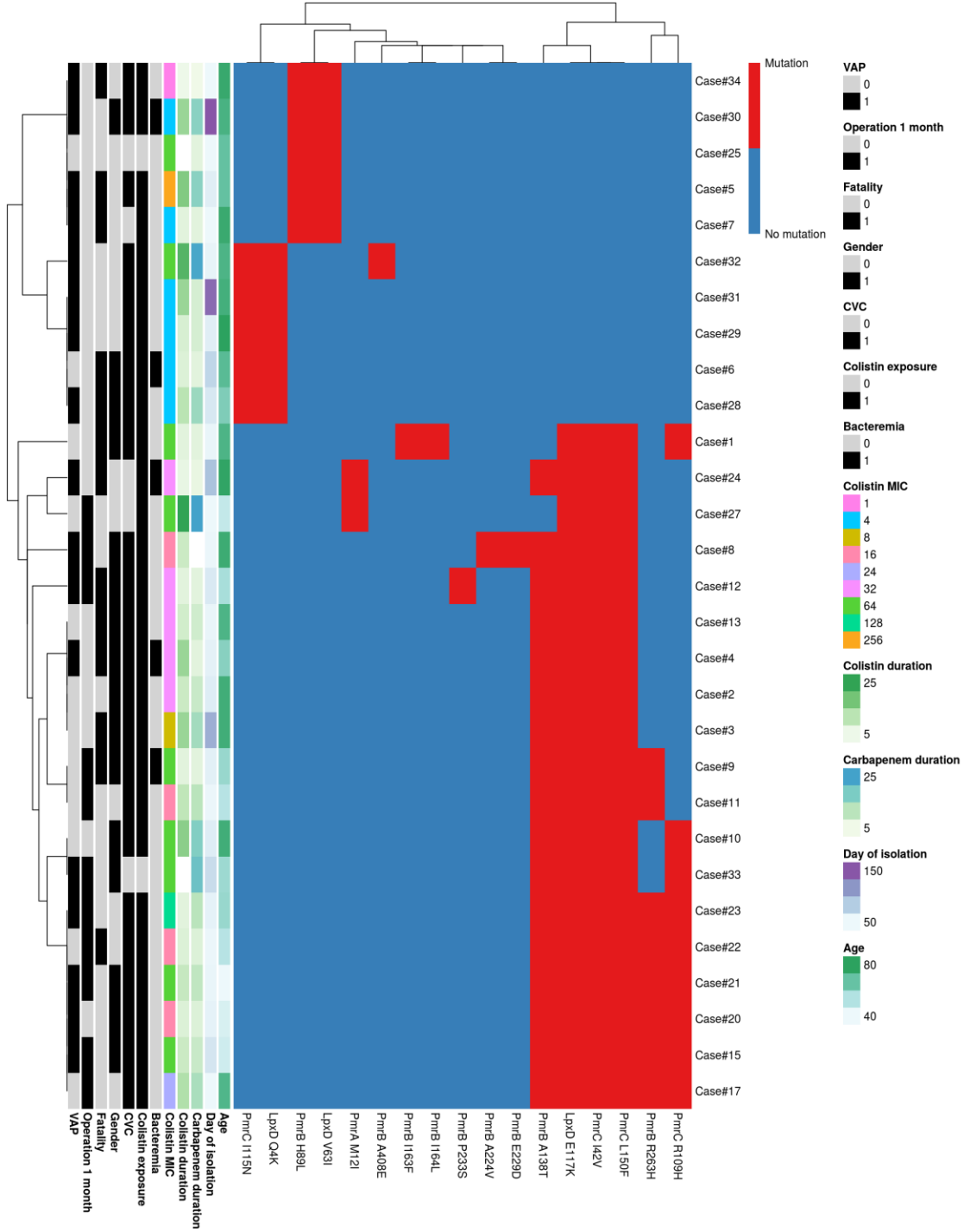
✓ İzolatların hepsi *mcr-1* geni negatif



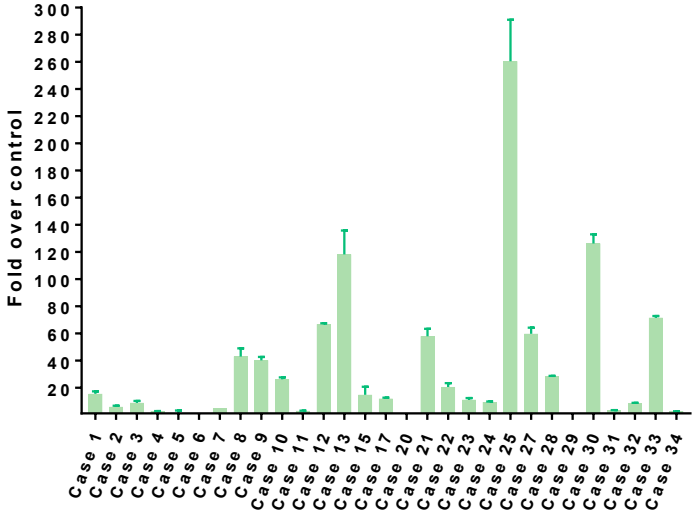
- ✓Farklı hastanelerden izole edilmiş suşların 12’si genotipleme ile >%95 benzerlik gösterdi.

PmrC, PmrA, PmrB ve LpxD proteinlerinde saptanan amino asit varyasyonları

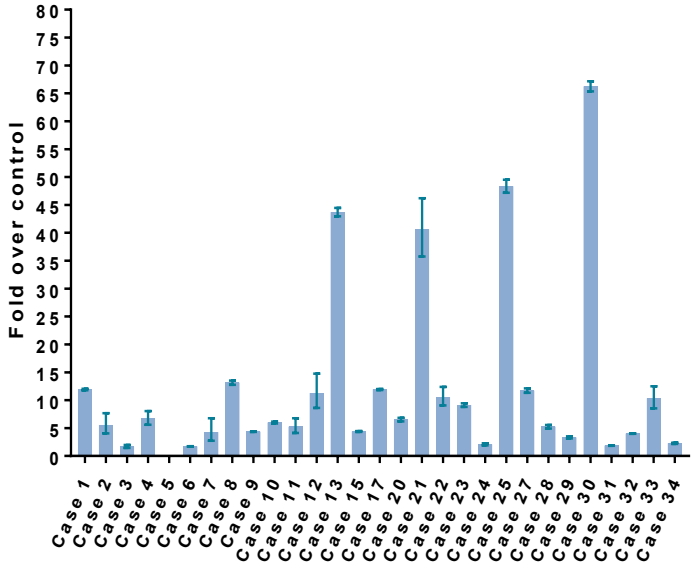
Protein	Mutasyon	Konsensus K14&K178 (%)
PmrC	**I42V**	**19(65.5)**
	R109H	9(31)
	I115N	5(17.2)
	L150F	**19(65.5)**
PmrA	M12I	2(6.8)
PmrB	H89L	5(17)
	A138T	**17(58.6)**
	I163F	1(3.4)
	I164L	1(3.4)
	A224V	1(3.4)
	E229D	1(3.4)
	P233S	1(3.4)
	R263H	8(27.6)
	A408E	1(3.4)
LpxD	Q4K	5(17.2)
	V63I	5(17.2)
	E117K	**19 (65.5)**



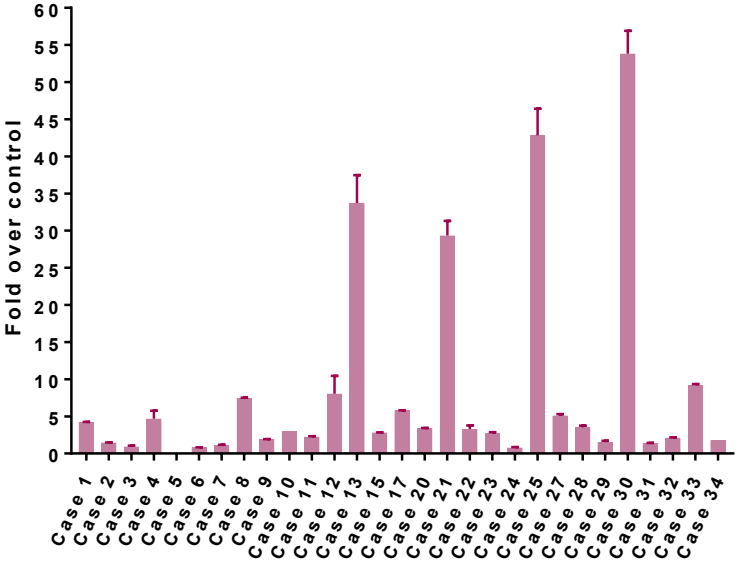
PmrC, PmrA ve PmrB expresyonundaki artışlar



PmrC

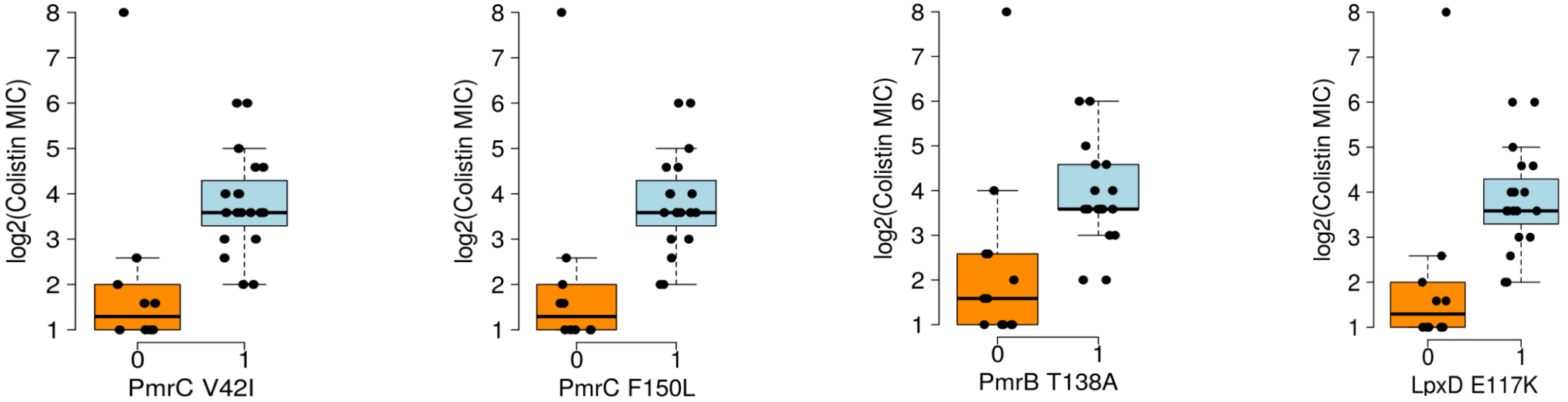


PmrA



PmrB

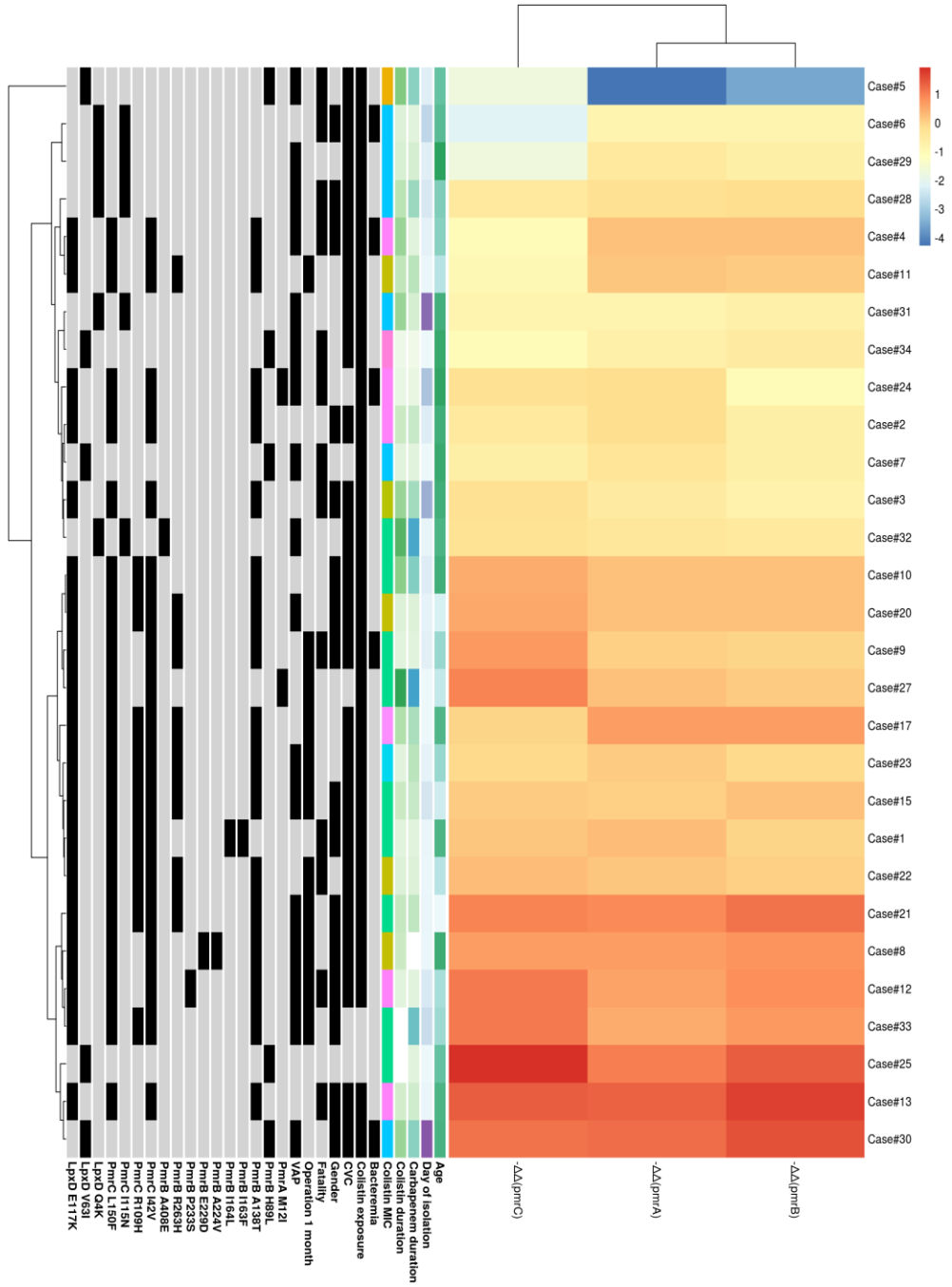
Mutasyon ile MİK değerleri arasındaki ilişki



Kolistin MİK değerleri, mutasyon olan izolatlarda, olmayan izolatlardan oldukça yüksek bulunmuştur.

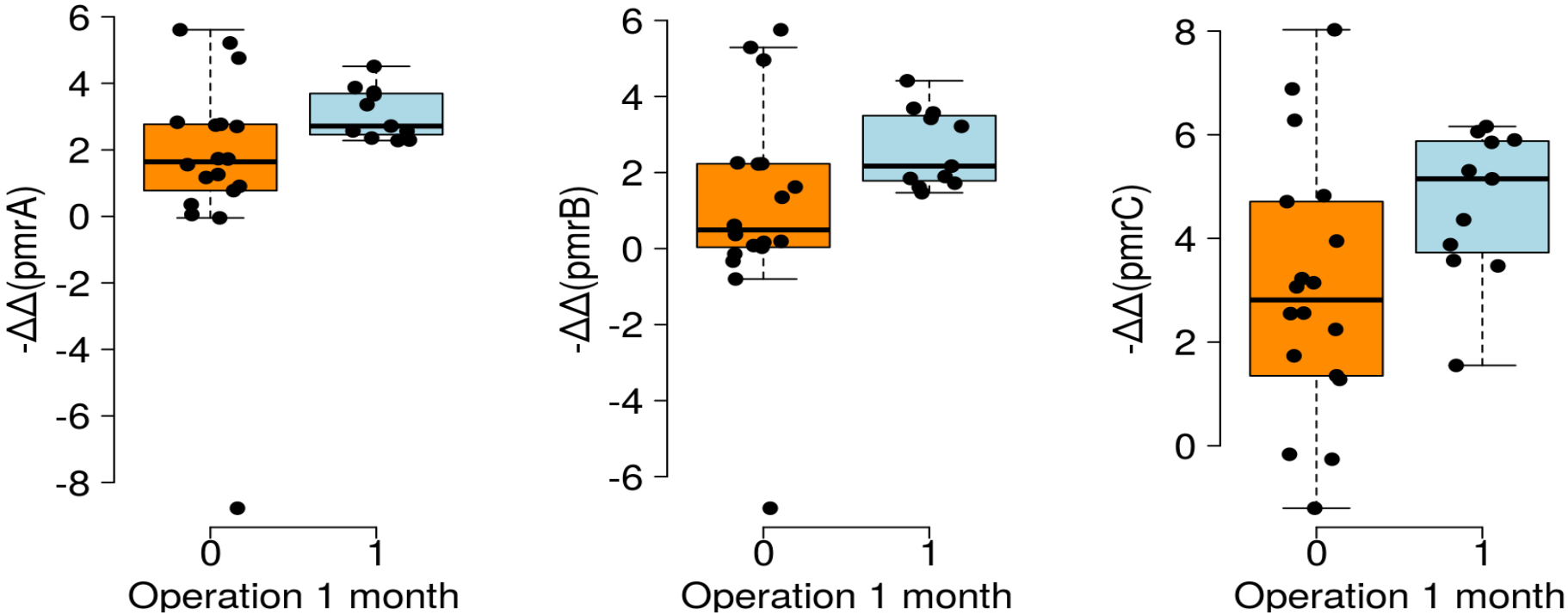
En sık görülen mutasyonlar ve Ekspresyonlar

	pmrA	pmrB	pmrC
PmrA M12I	0.89655	0.39901	0.59606
PmrB H89L	0.71596	0.93320	0.88886
PmrB A138T	0.04260	0.08016	0.11706
PmrB A224V	0.34483	0.41379	0.62069
PmrB E229D	0.34483	0.41379	0.62069
PmrB R263H	0.42857	0.32417	0.51779
PmrB P233S	0.48276	0.34483	0.34483
PmrB I163F	0.62069	0.96552	0.89655
PmrB I164L	0.62069	0.96552	0.89655
PmrB A408E	0.48276	0.68966	0.75862
PmrC I42V	0.01054	0.06235	0.03110
PmrC R109H	0.08540	0.10472	0.12719
PmrC I115N	0.00332	0.02267	0.00857
PmrC L150F	0.01054	0.06235	0.03110
LpxD Q4K	0.00332	0.02267	0.00857
LpxD V63I	0.71596	0.93320	0.88886
LpxD E117K	0.01054	0.06235	0.03110



PmrB'de A138T , PmrC'de I42V ve L150F in PmrC, ve LpxD'de E117K , ve bu mutasyonlar yüksek kolistin MİK düzeyleri ile ilişkili (sırasıyla; p: 0.0022, 0.00086, 0.00086, 0.00086).

Son 1 ay içinde operasyon geçirme ve gen ekspresyon karşılaştırması



TARTIŞMA ve SONUÇ

- ✓En sık karşılaştığımız amino asit değişikleri A138T (PmrB'de), I42V ve L150F (PmrC'de) ve E117K (LpxD'de), ve bu mutasyonlar yüksek kolistin MİK değerleri ile ilişkili (p: 0.0022, 0.00086, 0.00086, 0.00086 sırasıyla)
- ✓ *pmrC* mutasyonu *pmrC* geninin ekspresyonunda artışa neden olmakta
- ✓ Kolistin kullanım süresi pmrB aşırı expresyonu ile güçlü ilişkili (p: 0.046).
- ✓Son 1 ay içinde operasyon geçirme pmrB aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabilir (p: 0.00037).