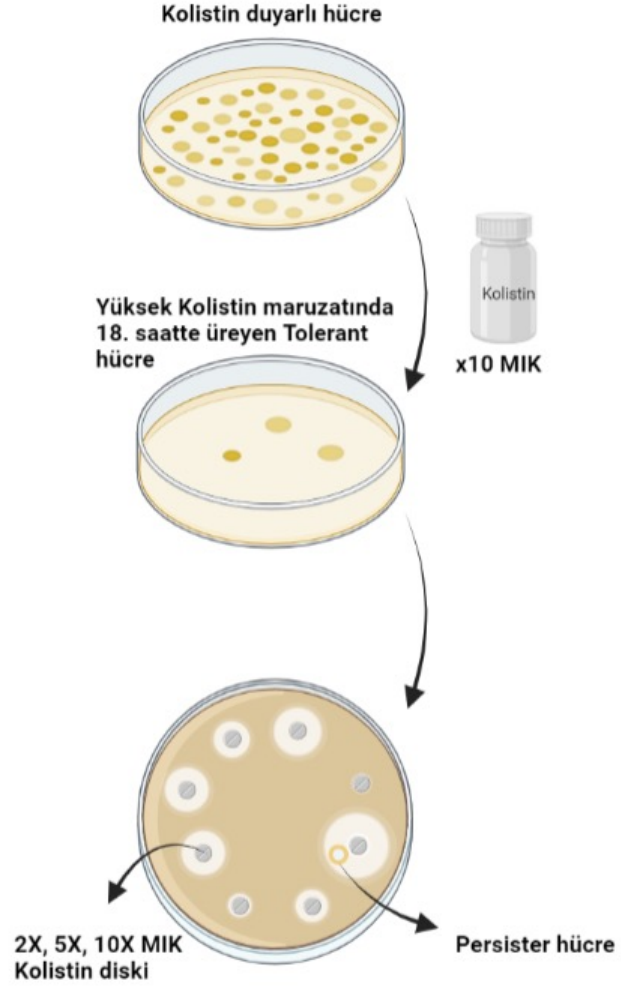




Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella Pneumoniae ve Acinetobacter baumannii
İzolalarında Karşılaştırmalı Fenotipik Tolerans ve Persister Hücre Oluşumu

Jale Boral, Cansel Vatansever, Gulin Ozcan, Siran Keske, Sirin Menekse, Onder Ergonul, Fusun Can

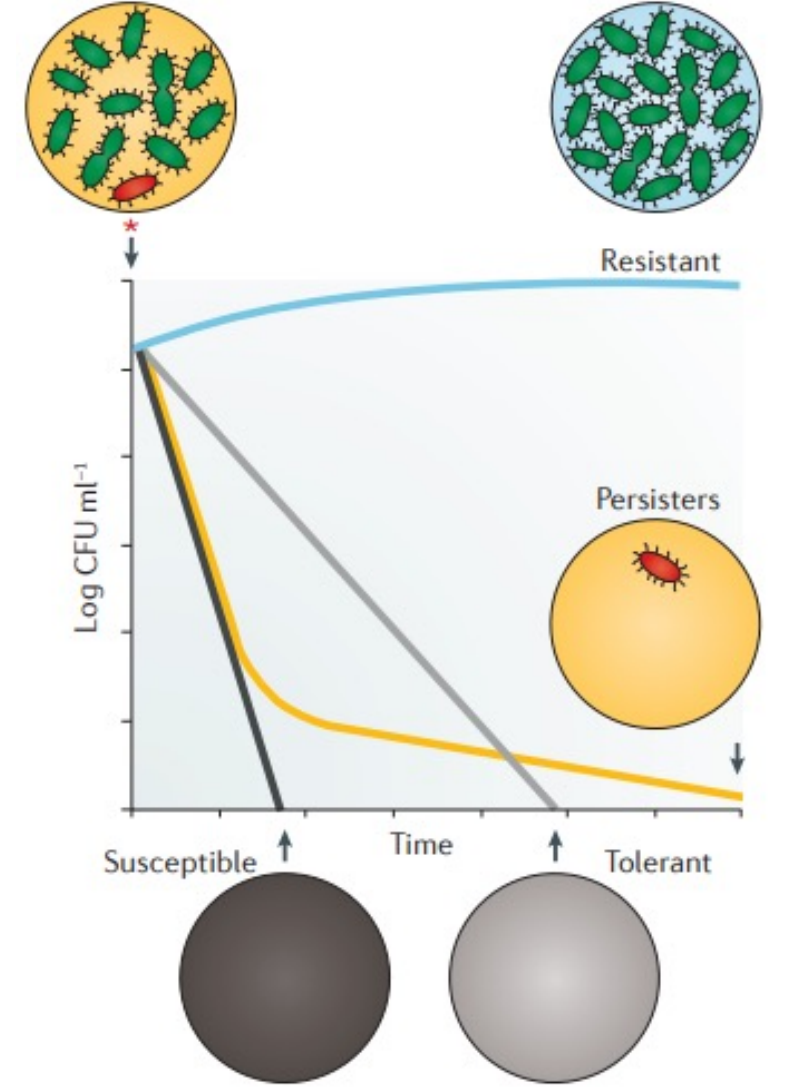
Amaç



Karbapenem dirençli gram negatif patojenlerde Kolistin "son çare" antimikrobiyal tedavi olarak kabul edilmektedir.

Toleran ve persister hücre gelişimi bakterinin antibiyotik etkinliği süresince lag fazını uzatıp direnç geliştirmeden hayatta kalmasına sebep olur.

Bu çalışmanın amacı ***P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii***'nin kolistin maruziyeti altında geliştirdikleri toleran ve persister hücrelerin incelenmesidir.

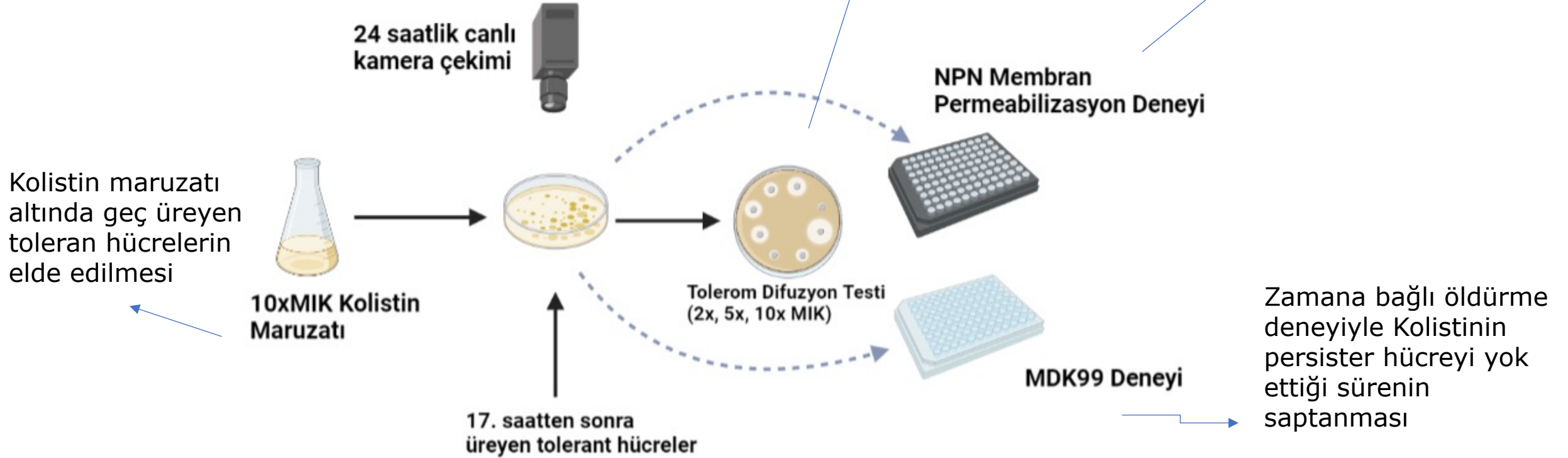


Sekil 1. Duyarlı hücreden, toleran ve persister hücre üretimi



Gereç ve Yöntem

Örnek seçimi: Çalışmaya, Kolistine duyarlı ve dirençli 2 *P. aeruginosa*, 5 *K. pneumoniae* ve 2 *A. baumannii* izolati dahil edilmistir.



Sekil 2. Fenotipik tolerans ve persister hücre oluşumu saptanmasında uygulanan deney şeması

- Tolerant hücrelere TD testi uygulandığında *A.baumannii* izolatlarında persister hücre **oluşmadığı** izlenmiştir.

A.baumannii

K1007 Tolerom (Durağan Faz)
5µg/ml



18 saat inkübasyon

40% glikoz →

K1007 Tolerom (Durağan Faz)
5µg/ml



36 saat inkübasyon

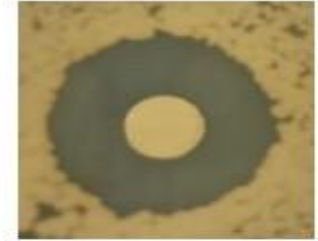
K1007 Tolerom (Logaritmik Faz)
10µg/ml



18 saat inkübasyon

40% glikoz →

K1007 Tolerom (Logaritmik Faz)
10µg/ml



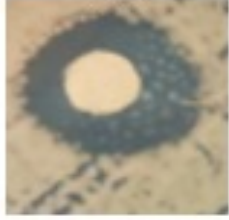
36 saat inkübasyon

Sekil 3. Persister hücre oluşumu gözlemlenmeyen *A.baumannii* izolatları



K.pneumoniae

K1342 Tolerom (Logaritmik Faz)
5 µg/ml



18 saat inkübasyon

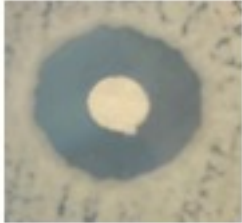
%40 glikoz

K1342 Tolerom (Logaritmik Faz)
5 µg/ml



36 saat inkübasyon

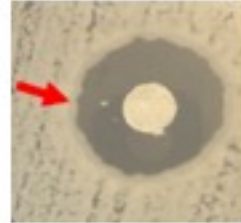
K1342 Tolerom (Durağan Faz)
10 µg/ml



18 saat inkübasyon

%40 glikoz

K1342 Tolerom (Durağan Faz)
10 µg/ml



36 saat inkübasyon

- TD testte üreme gösteren *K.pneumoniae* ve *P.aeruginosa* tolerant hücrelerinde hem durağan hem logaritmik fazda 5XMİK, 10XMİK kolistin içeren diskler etrafında koloni oluşumu gözlemlenmiştir.

P.aeruginosa

K969 Tolerom (Durağan Faz)
10 µg/ml



18 saat inkübasyon

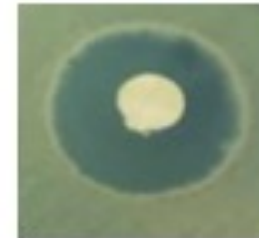
%40 glikoz

K969 Tolerom (Durağan Faz)
10 µg/ml



36 saat inkübasyon

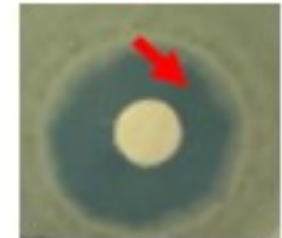
K969 Tolerom (Durağan Faz)
20 µg/ml



18 saat inkübasyon

%40 glikoz

K969 Tolerom (Durağan Faz)
20 µg/ml



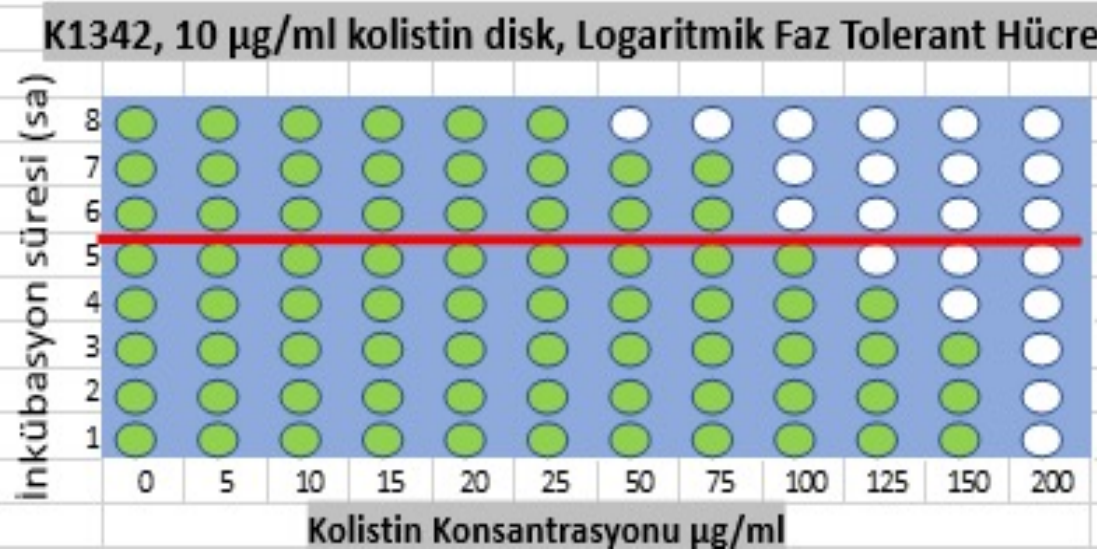
36 saat inkübasyon

Şekil 4. Farklı Kolistin konsantrasyonlarına maruzat sonrası %40 glikozla inkube edilen *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae* izolatlarının disk etrafında persister hücre üretmesi



Bulgular: Zamana Bağlı Öldürme Deneyi

Statik ve Logaritmik fazda üreyen *Klebsiella pneumoniae* persister hücrelerindeki zamana bağlı öldürme deneyi sonuçları farklı Kolistin konsantrasyonlarında 5 ve 6 saat olarak saptanmıştır.



Sekil 5. *Klebsiella pneumoniae* izolati olan K1342'nin MDK99 sonuc tabloları.

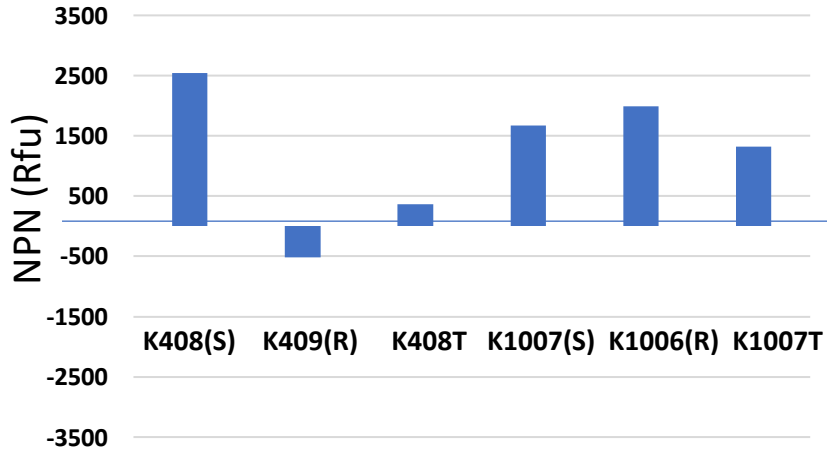
	TD Test Suş	MDK99 (saat)	MDK99.99 (saat)
<i>P.aeruginosa</i>	K969 10 ug/ml Statik Faz	x	x
	K969 20 ug/ml Statik Faz	x	x
	K969 30 ug/ml Statik Faz	x	x
<i>K.pneumoniae</i>	K1314 10 ug/ml Statik Faz	6	5
	K1342 5 ug/ml Statik Faz	6	6
	K1342 10 ug/ml Statik Faz	6	5
	K1342 5 ug/ml Logaritmik Faz	5	5
	K1342 10 ug/ml Logaritmik Faz	5	5
<i>A.baumannii</i>	K1007 Tolerant Hücre	x	x
	K408 Tolerant Hücre	x	x

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen bütün izolatların MDK99 ve MDK99,99 deney sonuçları



Bulgular: Membran Permeabilizasyon Deneyi

A.baumannii



Duyarlı hücreye kıyasla toleran hücrenin membrane permeabilizasyonunda 80% azalma.

P.aeruginosa



Duyarlı ve dirençli izolatlar kıyaslandığında 25% azalma, duyarlı ve tolerant izolatlar karşılaştırıldığında 75% artış gözlemlenmiştir.

K.pneumoniae



Duyarlı ve dirençli hücrelerde membranın bozulmamış olduğu, tolerom formunda ise membrane permeabilitesinin %100 arttığı görülmüştür.

- *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* tolerant hücrelerinin persister hücreye dönüşmemesi ve membran geçirgenliğinin azalması bu bakterinin kolistine adaptasyonunun zayıf olduğunu göstermektedir.
- *K.pneumoniae* persister hücrelerinin varlığı ve membran geçirgenliğinin artması bu hücrelerin kolistine adaptasyon yeteneğinin daha güçlü olduğunu göstermiştir.
- Antibiyotiğe adaptasyon sağlayabilen bakterilerin uzayan ve tekrarlayan enfeksiyonlara sebep olması, antibiyotiklerin yetersiz kaldığı bu dönemde anti-tolerant ve anti-persister tedaviler için hedef bölgelerin belirlenmesinin önemini vurgulamaktadır.

Teşekkürler

 kuisid@ku.edu.tr

 <https://twitter.com/kuisid>

 <https://www.instagram.com/KUISCID>

 <https://www.instagram.com/KUISCID>