

Kolistin dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında virülans faktörlerinin metagenomik ve transkriptomik analizi

Cansel Vatansever¹, Selin Kolsuz², Gülin Özcan^{1,3}, Jale Boral^{1,3}, Mehmet Gönen^{1,4}, Füsun Can^{1,5}

¹ Koç Üniversitesi – İş Bankası Enfeksiyon Hastalıkları Araştırma Merkezi (KUISCID), İstanbul, Türkiye

² Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

³ Koç Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

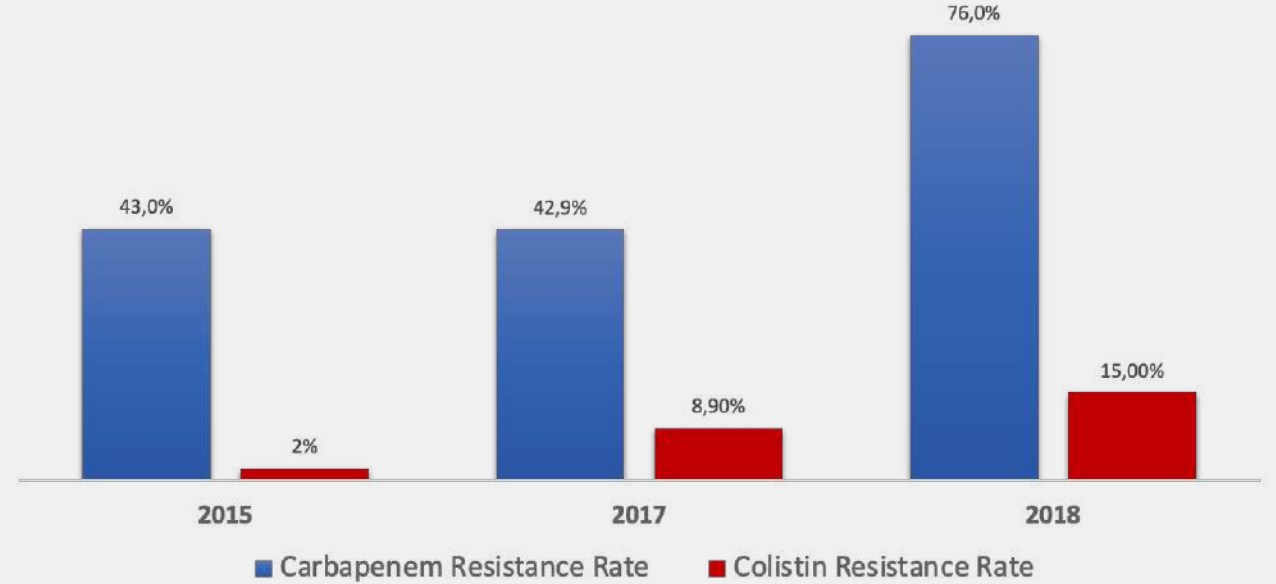
⁴ Koç Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Endüstri Mühendisliği ABD, İstanbul, Türkiye

⁵ Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, İstanbul, Türkiye



Pseudomonas aeruginosa Kolistin Direnç Oranı, Türkiye

Toplum Kaynaklı Enfeksiyonlarda Kolistin Direnç Oranı, Türkiye

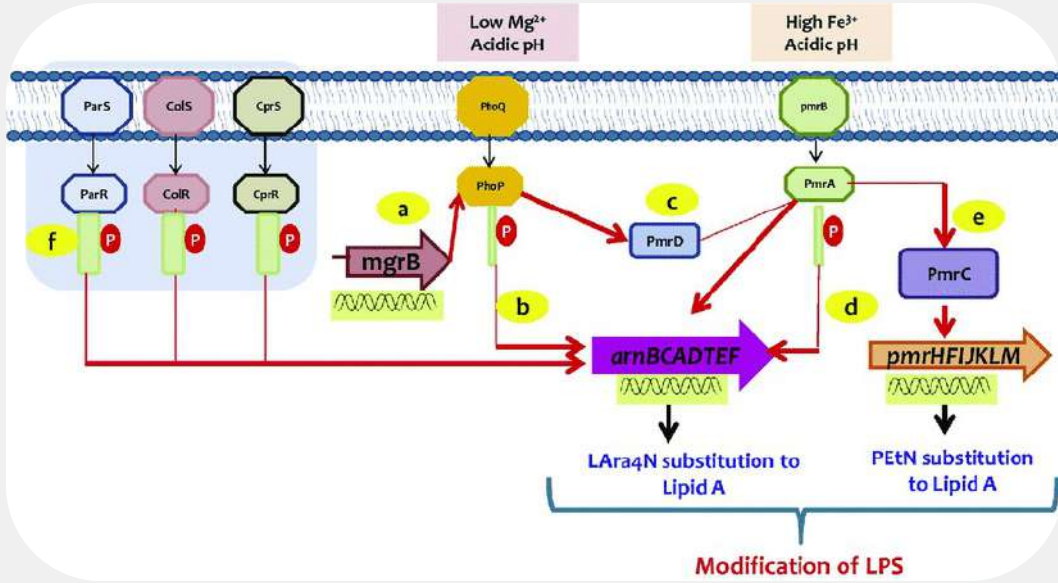


Türkiye’de 2015-2018 yılları arasında toplum kaynaklı enfeksiyonlarda görülen kolistin direnç oranı. Ergönül et al., *JHI*, 2016; Aydın et al., *JHI*, 2018; Aydın et al., *EJCMID*, 2020



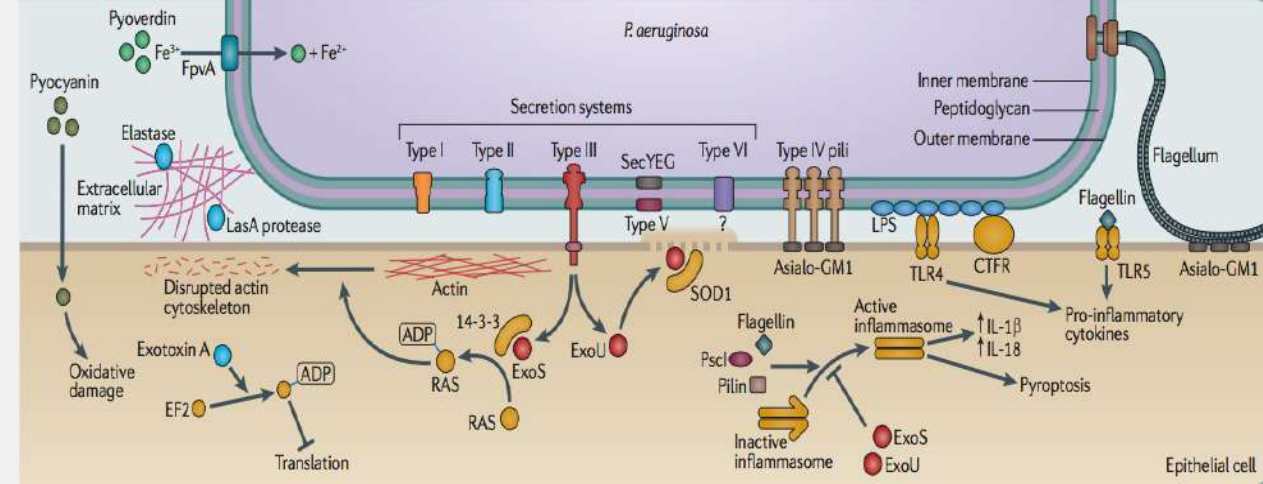
P. aeruginosa : Kolistin Direnç Mekanizması ve Virülans Faktörleri

Kolistin Direnç Mekanizmaları



- LPS modifikasyonu *pmrAB* and *phoPQ*
- Effluks pompalarının artışı
- Porin kaybı

Virülans Faktörler



- Flagella, pili ve lipopolisakarit gibi bakteriyel yüzey faktörleri
- Demir alım sistemleri
- Toksinlerin salgılanması
- Biyofilm oluşumu



Amaç

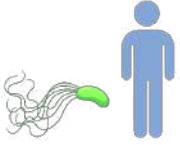
Kolistin dirençli *P.aeruginosa*'da yapısal ve fonksiyonel değişiklikler;

- Virülans faktörler
- Kolistin direnciyle ilişkili mekanizmalar

Adım 1: Çalışma hastalarının dahil edilmesi

Kolistin Duyarlı

K969

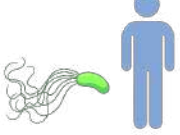


Kolistin Dirençli

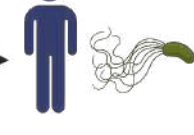
K970



K981



K982



Adım 2: Kolistin MİK değerlerinin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmesi



Adım 3: PFGE - Klonalite Analizi

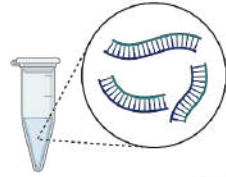


Adım 4: In vivo C.elegans enfeksiyon modeli

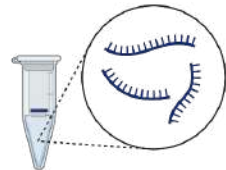


Adım 5: Moleküler Çalışmalar

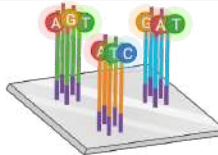
DNA İzolasyonu



RNA İzolasyonu



Kütüphane Oluşumu



HiSeqXten Dizileme

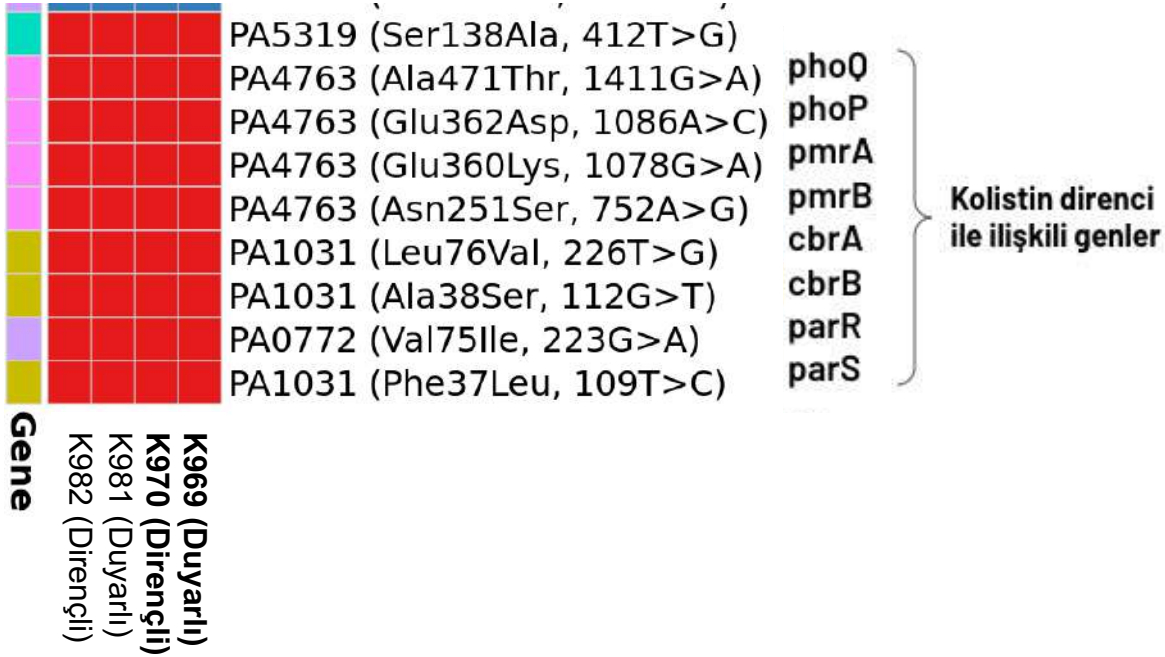


Metagenomik ve Transkriptomik Analizler



Kolistin Direncinden Sorumlu Genler: pmrAB, phoPQ, cbrAB, parRS Metagenomik ve Transkriptomik İncelenmesi

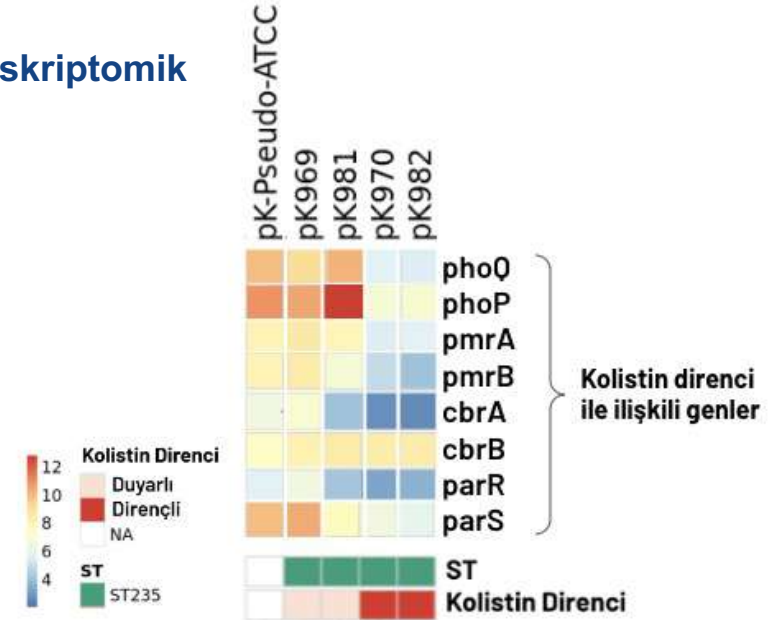
Metagenomik



Duyarlı-Dirençli

Aynı genomik değişiklik motifleri

Transkriptomik



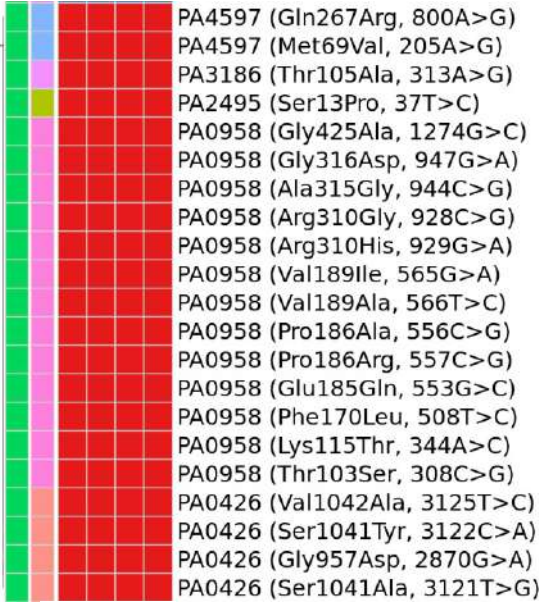
Dirençlilerde duyarlıya oranla artış;

phoP 17.2 kat ↑
phoQ 13.3 kat ↑



Kolistin Direnci ile İlişkili Genler: Effluks ve Porin Metagenomik ve Transkriptomik İncelenmesi

Metagenomik

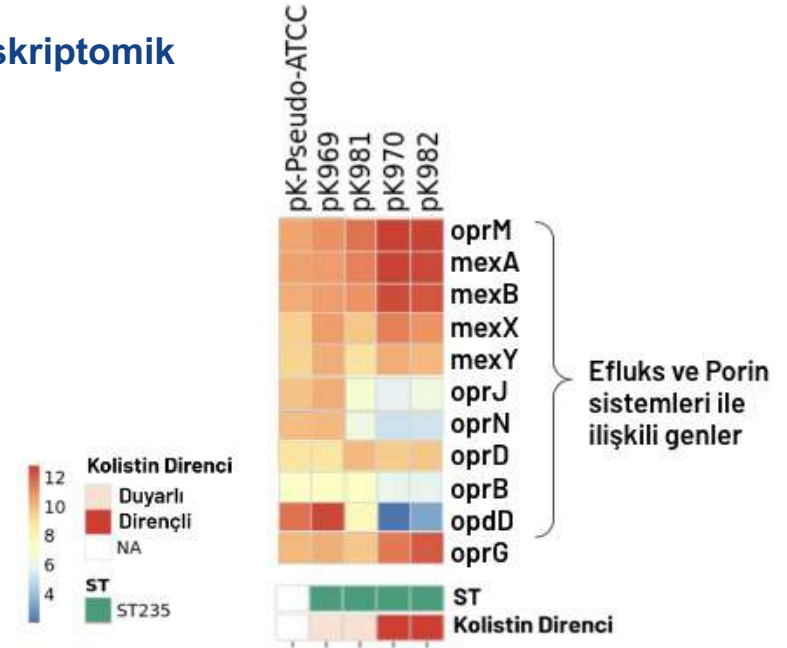


K969 (Duyarlı)
K970 (Dirençli)
K981 (Duyarlı)
K982 (Dirençli)

Duyarlı-Dirençli

Aynı genomik değişiklik motifleri

Transkriptomik



Dirençlilerde duyarlıya oranla;

Effluks

mexAB 2.5 kat
mexXY 2.5 kat

Porin

oprJ 2.5 kat
oprN 3.7 kat
oprD 5.8 kat



Demir Alım Sistemleri

PA2394 (Val32Ala, 95T>C)
PA2392 (Ala405Ser, 1213G>T)
PA2392 (Ala402Ser, 1204G>T)
PA2392 (Phe400Val, 1198T>G)
PA2392 (Phe400Leu, 1200T>A)
PA2392 (Thr397Ser, 1190C>G)
PA2392 (Arg387Ser, 1161G>C)
PA2392 (Leu370Met, 1108C>A)
PA2392 (Ala356Glu, 1067C>A)
PA2392 (Ala340Gly, 1019C>G)
PA2392 (Ala338Asp, 1013C>A)
PA2392 (His333Arg, 998A>G)
PA2392 (Ser329Thr, 986G>C)
PA2392 (Phe314Cys, 941T>G)
PA2392 (Ile305Leu, 913A>C)
PA2392 (Glu288Gln, 862G>C)
PA2392 (Arg257His, 770G>A)
PA2392 (Pro256Arg, 767C>G)
PA2392 (Arg92Leu, 275G>T)
PA2392 (Lys90Arg, 269A>G)
PA2392 (Val67Leu, 199G>C)
PA2392 (Leu61Ile, 181C>A)
PA2392 (Ile52Met, 156A>G)
PA2392 (Gly51Ala, 152G>C)
PA2392 (As0Glu, 150T>G)
PA2390 (His240Gln, 720C>A)
PA2390 (Ile123Thr, 368T>C)
PA2389 (Asn355Ser, 104A>G)
PA2386 (Ser398Cys, 1192A>T)
PA2386 (Ala394Thr, 1180G>A)
PA2386 (Ala394Val, 1181C>T)
PA2386 (Ala391Ser, 1171G>T)
PA2386 (Val390Ala, 1169T>C)
PA2386 (Lys389Gln, 1165A>C)
PA2386 (Glu386Gln, 1156G>C)
PA2386 (Cys315Ser, 943T>A)
PA2386 (Ile308Val, 922A>G)
PA2386 (Val299Ile, 895G>A)
PA2386 (Thr290Ile, 869C>T)
PA2386 (Leu277Val, 829C>G)
PA2386 (His270Asp, 808C>G)
PA2386 (His270Arg, 809A>G)

K969 (Duyarlı)
K970 (Dirençli)
K981 (Duyarlı)
K982 (Dirençli)

Flagella Pili Adhezyon Genleri

PA4651 (Ser242Ala, 724T>G)
PA4651 (Arg228Gln, 683G>A)
PA4651 (Thr61Ile, 182C>T)
PA4651 (Thr61Ala, 181A>G)
PA4651 (As28Gly, 383A>G)
PA4651 (As28Asn, 382G>A)
PA4651 (Leu21Phe, 61C>T)
PA4651 (Ser11Gly, 31A>G)
PA4528 (Thr62Asn, 185C>A)
PA4528 (Thr18Ala, 52A>G)
PA4306 (Glu62Asp, 186A>C)
PA4306 (Glu62Ala, 185A>C)
PA4306 (Glu62Lys, 184G>A)
PA4295 (Asn157Ser, 470A>G)
PA4295 (Gly147Ser, 439G>A)
PA0682 (Met317Val, 949A>G)
PA0682 (Ala148Asp, 443C>A)
PA0682 (Ala139Thr, 415G>A)
PA0682 (As30Gly, 389A>G)
PA0678 (Ala118Val, 353C>T)
PA0678 (Ser7Gly, 19A>G)
PA0677 (Ala196Ser, 586G>T)
PA0677 (Val136Ile, 406G>A)
PA0677 (As67Glu, 501T>G)
PA0677 (Ser85Ile, 254G>T)

K969 (Duyarlı)
K970 (Dirençli)
K981 (Duyarlı)
K982 (Dirençli)

Biyofilm Genleri

PA3706 (Ile291Val, 871A>G)
PA3706 (Val286Ala, 857T>C)
PA3706 (Glu168Asp, 504G>T)
PA3063 (Ala1089Thr, 3265G>A)
PA3063 (Val1076Leu, 3226G>C)
PA3063 (Arg1008Gln, 3023G>A)
PA3063 (Leu1007Val, 3019C>G)
PA3063 (Ser978Ala, 2932T>G)
PA3063 (Val970Leu, 2908G>C)
PA3063 (His923Arg, 2768A>G)
PA3063 (Glu916Ala, 2747A>C)
PA3063 (Arg798Gln, 2393G>A)
PA3063 (Asn790Asp, 2368A>G)
PA3063 (Thr739Ala, 2215A>G)
PA3063 (Gly585Ser, 1753G>A)
PA3063 (Lys541Gln, 1621A>C)
PA3063 (Arg526Ser, 1576C>A)
PA3063 (Phe343Leu, 1027T>C)
PA3063 (Phe343Leu, 1029T>G)
PA3063 (Gly337Ser, 1009G>A)
PA3063 (Val303Ile, 907G>A)
PA3061 (Arg360Cys, 1078C>T)
PA3061 (Arg312Leu, 935G>T)
PA3061 (Ile303Val, 907A>G)
PA3061 (Arg84Gln, 251G>A)
PA3061 (Ala83Val, 248C>T)
PA3060 (Arg272His, 815G>A)
PA3059 (Thr306Ala, 916A>G)
PA3059 (Met185Ile, 555G>A)
PA2241 (Arg323Gln, 968G>A)
PA2241 (His207Arg, 620A>G)
PA2241 (Val125Ile, 373G>A)
PA2239 (Thr222Ala, 664A>G)
PA2238 (Ala365Ser, 1093G>T)

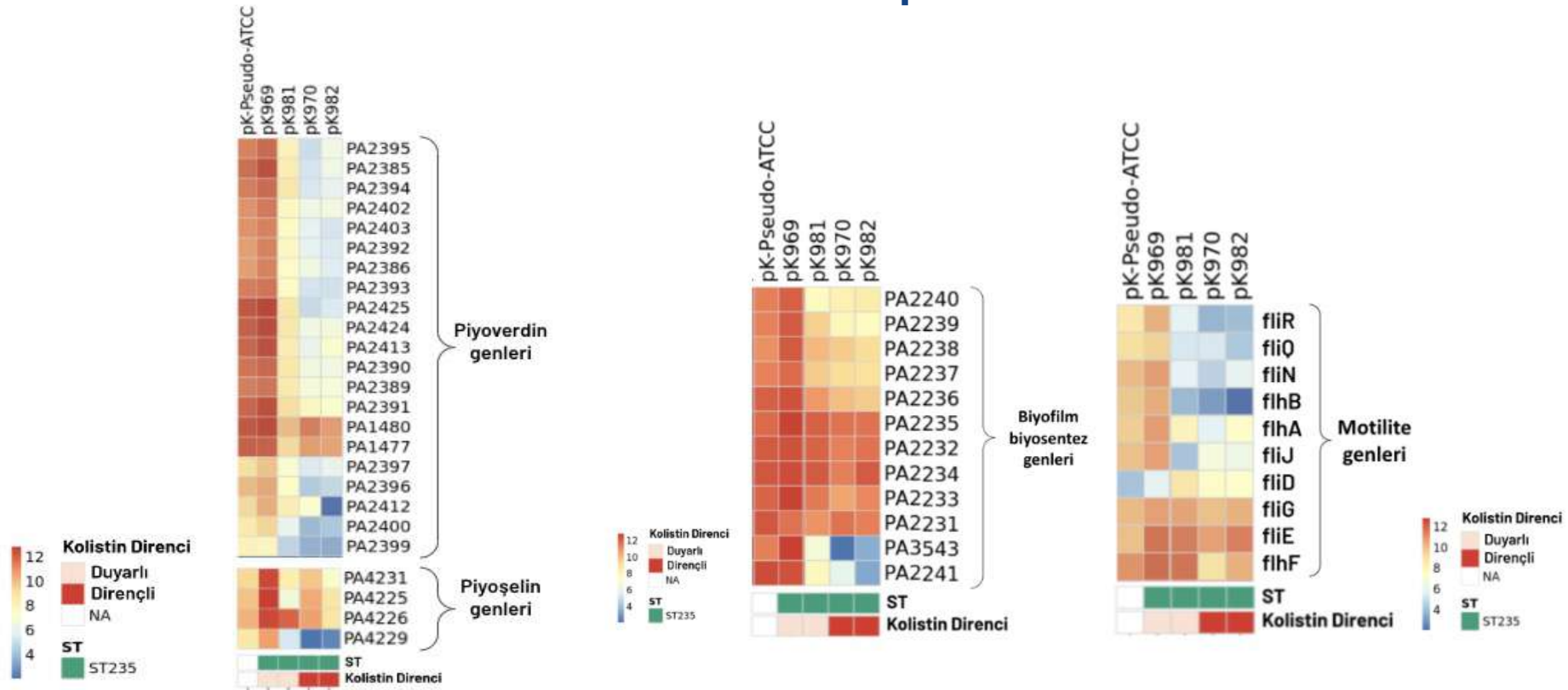
K969 (Duyarlı)
K970 (Dirençli)
K981 (Duyarlı)
K982 (Dirençli)

Duyarlı-Dirençli

Aynı genomik değişiklik motifleri



Virülans Faktörlerin Transkriptomik İncelenmesi



Dirençlilerde duyarlıya oranla azalış;

Piyoverdin 3.5 kat

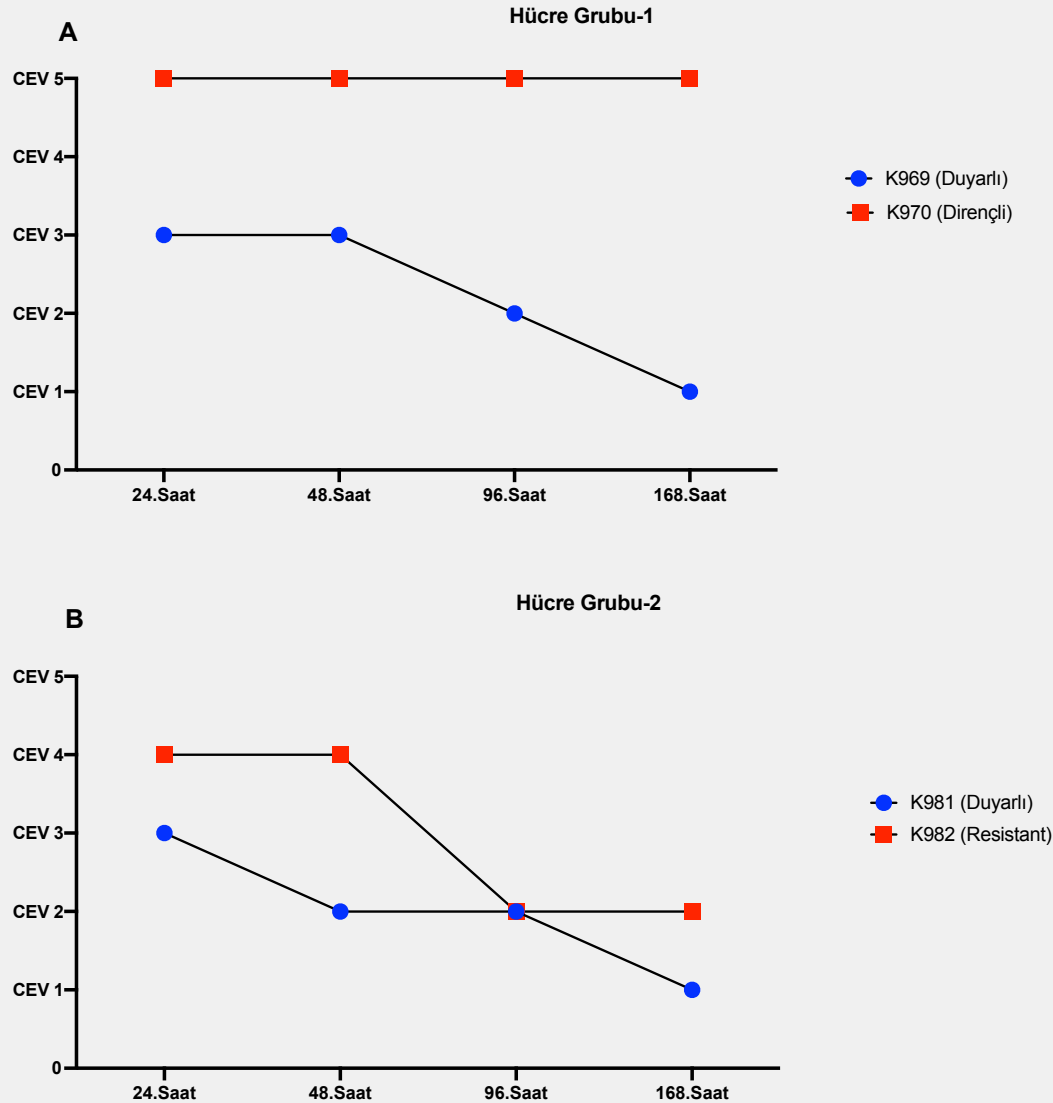
Piyoşelin 1.2 kat

Biyofilm Sentezi 1.5 kat

Motilite 1.4 kat



Bulgular – in vivo *C.elegans* enfeksiyon modeli



Virülans Skolarları;

Duyarlı

K969 (CEV1)

K981 (CEV1)

Dirençli

K970 (CEV5)

K982 (CEV2)



- *P.aeruginosa*'nın kolistin direncine uyum sürecinde, bakteri üzerindeki dirence bağlı stresi azaltmak için; demir alım mekanizmaları, motilite, biyofilm ve sekresyon sistemlerini zayıflattığı izlenmiştir
- Bu sistemleri hedef alan antivirülan terapiler, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni hedeflerinin geliştirilmesine öncü olabilir.

Teşekkürler...

Bu çalışma;

TÜBİTAK 1001, Proje no. 119S446

Koç Üniversitesi-İş Bankası Enfeksiyon Hastalıkları Merkezi (KUISCID) tarafından desteklenmiştir.

✉ kuisid@ku.edu.tr

🐦 <https://twitter.com/kuisid>

📷 <https://www.instagram.com/KUISCID>

in <https://www.linkedin.com/KUISCID>

