

# Kolistin Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarına Vankomisin'in İn-Vitro etkisi<sup>§</sup>

Deniz GAZEL\*, Özlem ZANAPALIOĞLU GAZEL\*\*, Alper AKÇALI\*\*\*, Müşerref TATMAN OTKUN\*\*\*

\*Çanakkale Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

\*\*Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

\*\*\*Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

**Amaç:** *Acinetobacter baumannii* suşları normalde vankomisine dirençlidir. Çalışmamızda, vankomisin'in kolistine dirençli hale gelmiş *A. baumannii* suşlarına karşı in-vitro etkinliğini araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Standart ATCC (American Type Culture Collection) 19606 *A. baumannii* suşu, aynı hastaya ait bir kolistin duyarlı ve bir kolistin dirençli *A. baumannii* suşu çalışıldı. Önce, kolistin duyarlı kan izolatu ve ATCC suşunun MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerleri E-test (Oxoid, Birleşik Krallık) kullanılarak saptandı. Sonra, Li'nin yöntemi kullanılarak suşlar artan konsantrasyonlarda kolistine maruz bırakılarak kolistin dirençli klonlara dönüştürüldü. Vankomisin ve kolistin için yeni MİK değerleri saptandı. Kolistin dirençli BOS izolatu için de vankomisin ve kolistin MİK değerleri saptandı.

**Bulgular:** Başlangıçta MİK değerleri, ATCC suşu ve kolistin duyarlı kan izolatu için 0.4 µg/ml iken, kolistin maruziyeti ile dirençli forma dönüşüm sonrasında kolistin MİK değerleri sırası ile 48 ve 32 µg/ml düzeyine yükseldi. Başlangıçta her iki suş da vankomisine karşı tamamen dirençli iken (>256 µg/ml), dönüşüm sonrasında vankomisin MİK değerleri azaldı ve sırası ile 0.5 ve 3 µg/ml düzeyine indi. BOS izolatu için vankomisin ve kolistin MİK değerleri sırasıyla 128 ve 12 µg/ml olarak saptandı.

**Sonuçlar:** Dönüşüm sonrasında, kolistin için MİK değerleri yüksek düzeylere çıkarken, vankomisin için MİK değerleri düşmüştür. Bu nedenle vankomisin ve kolistin MİK değerleri arasında ters orantı olabileceği öngörülebilir. MİK değerleri 32 µg/ml üzerinde olan *A.baumannii* suşları için vankomisin inhibitör aktiviteye sahip olabilir. Bu çalışmada, kolistine direnç geliştiren suşların vankomisin MİK değerinin düştüğü gösterilmiştir. Vankomisin-kolistin kombinasyonunun, kolistin dirençli suşların seçimini engellediğini göstermek için in-vitro sinerjik etki çalışması yapılmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** *Acinetobacter baumannii*, kolistin, vankomisin

## SUMMARY

**In-Vitro Activity of Vancomycin Against Colistin Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains**

**Aim:** *Acinetobacter baumannii* strains are naturally resistant to vancomycin. We aimed to investigate the in-vitro activity of vancomycin against colistin resistant *A. baumannii* strains.

**Material and Methods:** *A. baumannii* ATCC19606 which is colistin susceptible and two *A. baumannii* isolates, one colistin susceptible and one colistin resistant, from the same patient were included in the study. Colistin MIC values of the colistin susceptible blood isolate and ATCC strain were determined by E-test (Oxoid, United Kingdom). Then, these strains were transformed to colistin resistant forms using Li's method by colistin exposure at increasing concentrations. New MIC values were determined for vancomycin and colistin. MICs were also determined for the colistin resistant strain isolated from the cerebrospinal fluid (CSF) sample of the same patient.

**Results:** While MIC values for both ATCC strain and colistin susceptible blood isolate were 0.4 µg/ml, after transformation to resistant forms, colistin MICs of the strains raised to 48 and 32 µg/ml, respectively. These two strains were initially resistant to vancomycin (>256 µg/ml), however, following transformation, MICs for vancomycin decreased to 0.5 and 3 µg/ml, respectively. For the CSF isolate, vancomycin and colistin MICs were determined as 128 and 12 µg/ml, respectively.

**Conclusion:** Following colistin exposure at increasing concentrations, colistin MIC values increased while vancomycin MIC values decreased. This indicated a possible negative correlation between vancomycin and colistin MIC values. For strains exhibiting colistin MIC values above 32 µg/ml, vancomycin may have inhibitory activity. In this study, it was shown that vancomycin MICs decreased for the strains that had gained colistin resistance. In-vitro synergy testing must be performed to show that vancomycin-colistin combinations may prevent selection of colistin resistant strains.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, colistin, vancomycin

**Alındığı tarih:** 13.07.2015

**Kabul tarihi:** 08.09.2015

**Yazışma adresi:** Deniz Gazel, Çanakkale Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İsmetpaşa Mah. 17100 Çanakkale Tel: (0286) 2171098 e-posta: denizgazel@yahoo.com

<sup>§</sup> Bu araştırma 4<sup>th</sup> Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection (SEEC 2013, 15-17 Kasım 2013, İstanbul) Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur

## GİRİŞ

Kolistin, çoklu ilaç direncine sahip *Acinetobacter baumannii* (ÇİDAB) enfeksiyonlarında elde son kalan antibiyotiklerden biridir ve son yıllarda kolistine karşı da direnç bildirilmektedir<sup>(1)</sup>. Bu yüzden kolistine dirençli *A. baumannii* enfeksiyonları ile mücadele için yeni antibiyotikler ve antibiyotik kombinasyonları denenmektedir<sup>(2)</sup>. Son çalışmalar kolistin maruziyeti nedeniyle oluşan kolistin direncinin genetik mekanizmalarını açıklamaya çalışmaktadır. Bazı in-vitro çalışmalara göre, kolistin direnci lipopolisakkarid üreten genlerde mutasyonların (*lpxA*, *lpxC* ve *lpxD* veya *pmrA* ve *pmrB* genlerindeki mutasyonlar) aracılık ettiği lipopolisakkarid üretim eksikliği nedeni ile oluşmaktadır<sup>(2,3)</sup>. Yakın zamanda, kolistin monoterapisi tarafından indüklenmiş kolistin direnci ve *pmrB* mutasyonu birlikteliği klinik olarak gösterilmiştir<sup>(4)</sup>. Kolistine karşı bu direnç gelişimi aynı zamanda bakterinin normalde dirençli olduğu bazı antimikrobiyallere verdiği yanıt da ilginç değişikliklere (duyarlılık gelişmesi gibi) neden olabilir<sup>(5,6)</sup>.

*Acinetobacter baumannii* suşları normalde vankomisine karşı dirençlidir. Literatürde *A. baumannii* suşları üzerine kolistin-vankomisin sinerjisini gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır<sup>(7,8)</sup>. Kolistin-vankomisin kombinasyonu Sanford 2012 tedavi rehberinde *A. baumannii* tedavisi için alternatif kombinasyon olarak önerilmektedir<sup>(5)</sup>. Bu sinerjinin nedeni hakkında kesin ve tatmin edici bir açıklama olmamakla beraber, bu kombinasyonun gerçekten etkili olduğu tespit edilmiştir<sup>(8)</sup>.

Bu çalışmada, tek başına vankomisin antibiyotiğinin, kolistine dirençli hâle gelmiş *A. baumannii* suşlarına karşı in-vitro etkinliğini araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bir standart ATCC (American Type Culture

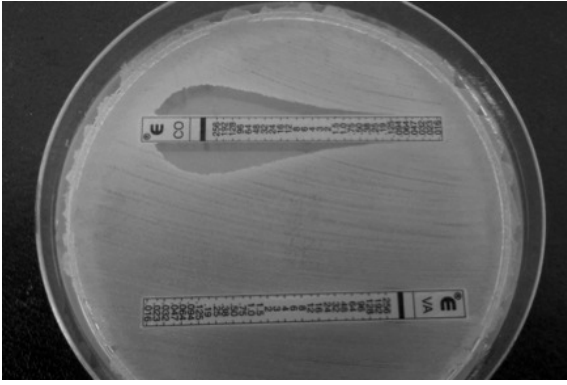
Collection) 19606 *A. baumannii* suşu, bir kolistin duyarlı ÇİDAB ve bir kolistin dirençli ÇİDAB çalışmaya alındı. Klinik izolatlar, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hastanesi yoğun bakım ünitesinde yatan aynı hastadan izole edilmişti. Kolistin duyarlı suş kan kültüründen, kolistin dirençli suş ise beyin omurilik sıvısı (BOS) kültüründen izole edilmişti. Kolistin dirençli BOS suşu, duyarlı suştan 35 gün sonra ve kolistin monoterapisi sonrasında izole edildi. İzolatlar çalışmaya kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

Öncelikle, kolistin duyarlı kan izolatu ve ATCC suşunun MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerleri E-test (Oxoid, Birleşik Krallık) kullanılarak saptandı. Daha sonra, Li ve ark.<sup>(10)</sup> tarafından bildirilen yöntem kullanılarak her iki suş 5 gün boyunca artan konsantrasyonlarda kolistine maruz bırakılarak kolistin dirençli klonlara dönüştürüldü. Bu işlemde 0.5xMİK (1. ve 2. gün), 2xMİK (3. gün), 8xMİK (4. gün) ve son olarak 64xMİK (5. gün) düzeyinde kolistin içeren katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon tüplerinde ardışık günlerde pasajlanarak 37°C'de enkübe edildi.

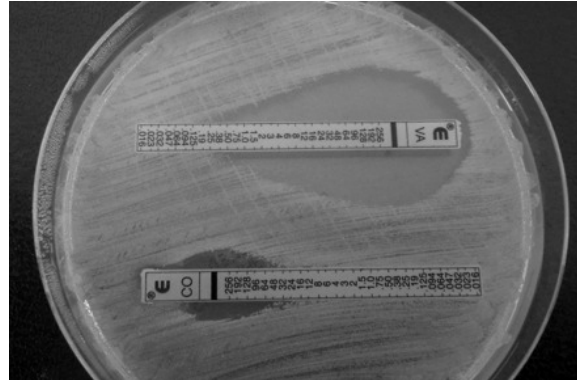
Bu işlem sonrasında, kolistine maruz kalmış bu iki suş için vankomisin ve kolistin için yeni MİK değerleri E-test kullanılarak saptandı. Doğal kolistin direnci gelişmiş olan, BOS'dan izole edilen kolistin dirençli *A. baumannii* suşu için de vankomisin ve kolistin MİK değerleri ayrıca saptandı.

## BULGULAR

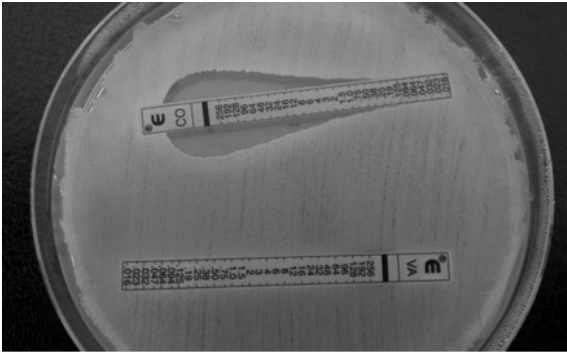
Başlangıçta MİK değerleri, hem ATCC suşu hem de kolistin duyarlı kan izolatu için 0.4 µg/ml iken (Şekil 1, 2), kolistin maruziyeti ile dirençli forma dönüşüm sonrasında kolistin MİK değerleri sırası ile 48 ve 32 µcg/ml düzeyine çıktı (Şekil 3, 4). Başlangıçta (Şekil 1 ve Şekil 2) her iki suş da vankomisine karşı tamamen dirençli iken (>256 µg/ml), kolistin dirençli klonlara



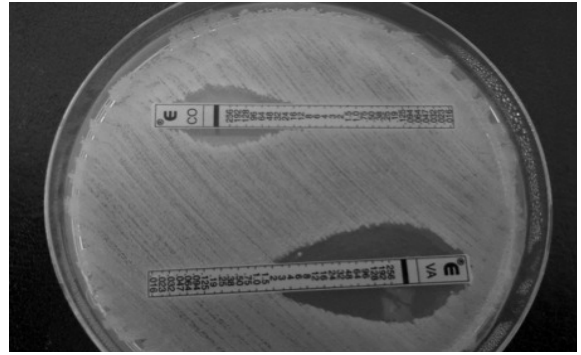
Şekil 1. Kolistin maruziyeti öncesi ATCC 19606 *Acinetobacter baumannii* suşu.



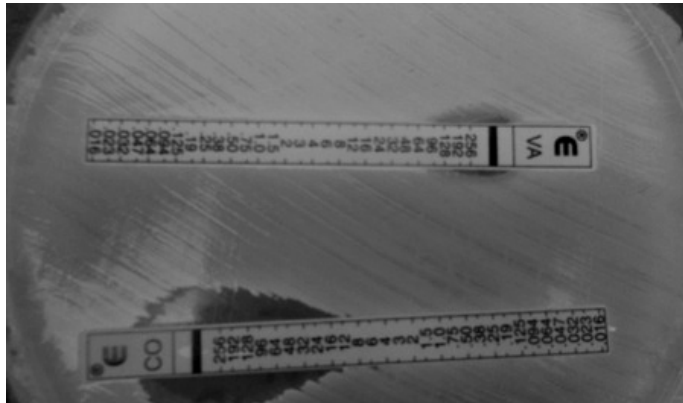
Şekil 3. Kolistin maruziyeti sonrası ATCC 19606 *Acinetobacter baumannii* suşu.



Şekil 2. Kolistin maruziyeti öncesi çoklu ilaç direncine sahip *Acinetobacter baumannii* kan izolatu.



Şekil 4. Kolistin maruziyeti sonrası çoklu ilaç direncine sahip *Acinetobacter baumannii* kan izolatu.



Şekil 5. Beyin omurilik sıvısı kültüründen elde edilen kolistin dirençli *Acinetobacter baumannii* klinik izolatu.

dönüşüm sonrasında bu suşlar için vankomisin MİK değerleri anlamlı derece azaldı ve sırası ile 0.5 ve 3 µg/ml düzeyine indi (Şekil 3, 4).

Kolistin dirençli BOS suşu için de MİK değerleri E-test ile saptandı. Kolistin için MİK değeri 12 µg/ml bulunmuş iken, vankomisin için MİK değeri 128 µg/ml olarak saptandı (Şekil 5).

## TARTIŞMA

Vankomisin ve teikoplaninin etkisi Gram pozitif bakterilerde hücre duvar yapısını oluşturan peptidlerin terminal D-ala-D-ala dizisine bağlanmak suretiyle transglükolizasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu inhibe etmektedir<sup>(10,11)</sup>. Bakterisidal olmaları onların ilk kullanıma

girmelerinden bugüne metisiline dirençli stafilkokların neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde başarıyla kullanımlarına neden olmuştur. Gram negatif bakterilerin hedef yapılarına lipid tabakalarından geçememeleri nedeniyle etkili olamazlar<sup>(12)</sup>.

Normalde *A. baumannii* suşları vankomisin antibiyotiğine karşı tamamen dirençlidir, ancak biz çalışmamızda kolistine yüksek dirençli suşlarda vankomisine karşı duyarlılık geliştiğini gözlemledik. Yüksek dirençli forma dönüşüm sonrasında, kolistin MİK değerleri yükselir iken (48 ve 32 µg/ml), vankomisin için MİK değerleri oldukça düşük düzeylere geriledi (3 ve 0.5 µg/ml). Vankomisinin klinik olarak hedeflenen en düşük dozu 15-20 µg/ml olduğundan, bu düşmüş MİK düzeylerinin klinik kullanımda etkili olabileceğini düşündürmektedir<sup>(5,12)</sup>.

Kolistin direncinin vankomisin duyarlılığına yol açabileceği düşüncemizi desteklemek için kolistin dirençli BOS izolatını da kontrol olarak çalışmış idik. Bu suşta kolistin direnci diğerlerine göre çok yüksek olmadığından (12 µg/ml), vankomisin MİK değeri de çok düşük çıkmamış (128 µg/ml) olabilir. Bu MİK değeri vankomisinin terapötik olarak uygulanabileceği dozdan yüksek olduğu için, vankomisinin bu suşa klinikte etkisi olmayacaktır, ancak bu olay bize kolistin direnci ile vankomisin duyarlılığı arasında doğrusal ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Bunun doğrulanması için daha fazla bakteri sayısı ile yapılacak çalışmalara gereksinim vardır.

Kolistin dirençli *A. baumannii* suşlarında lipid sentezi eksikliği meydana geldiğinden, vankomisinin olası etki mekanizması şu şekilde olabilir: Normalde lipid tabakasından geçemeyen vankomisin, bakteri kolistine dirençli hâle gelirken aynı anda lipid tabakasını da kaybedeceğinden, artık hücre duvarından içeri kolayca geçmeye başlar ve etkili olabilir.

Kolistin monoterapisi nedeniyle gelişebilecek kolistin direncini engellemek için vankomisin bir kombinasyon alternatifi olabilir. O'Hara ve ark.<sup>(7)</sup> 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, daha önce kolistin tedavisi almış hastalardan izole edilmiş kolistin dirençli *A. baumannii* suşlarını çalışmışlardır. Çalışmaları sonucunda, vankomisin-kolistin içeren kombinasyonların in-vitro olarak sinerjik olduğunu saptamışlar ve in-vivo larva deneylerinde ise kolistin-vankomisin-doripenem içeren kombinasyon rejiminin monoterapiye göre sağ kalımı arttırdığını raporlamışlardır. Gordon ve ark.<sup>(8)</sup> daha önce yaptıkları bir çalışmada, kullandıkları tüm AB izolatları üzerinde kolistin-vankomisin kombinasyonunun sinerjik etkili olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, kolistin maruziyeti ile izolatların vankomisin MİK değerlerinin düştüğünü de saptamışlardır.

Çalışmamız sonucunda, kolistine in-vitro maruziyet sonrasında, kolistin için MİK değerleri yüksek düzeylere çıkarken, vankomisin için MİK değerleri düşmüştür. Bu değerler vankomisinin klinik olarak önerilen taban dozunun altında olduğundan, bu suşların vankomisine duyarlı olabileceği değerlendirilebilir.

Çalışmamız sonuçları vankomisin ve kolistin MİK değerleri arasında ters orantı olabileceğini düşündürmektedir. MİK değerleri 32 µg/ml üzerinde olan *A. baumannii* suşları için tek başına vankomisin inhibitör aktiviteye sahip olabilir. Bunun yanı sıra daha düşük kolistin MİK değerlerine sahip *A. baumannii* enfeksiyonlarında, kolistin ve vankomisin ajanlarının kombine kullanımının, tedavi sırasında kolistin dirençli suşların seçimini engelleme potansiyelinin, daha fazla bakteri ve ek testler ile doğrulanması gerektiğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports,

- mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:1607-15.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks084>
2. **Moffatt JH, Harper M, Harrison P, et al.** Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4971-7.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00834-10>
  3. **Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, et al.** Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3628-34.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00284-09>
  4. **Kim Y, Bae IK, Jeong SH, Yong D, Lee K.** In vivo selection of pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* during antibiotic treatment. *Yonsei Med J* 2015; 56:928-34.  
<http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2015.56.4.928>
  5. **Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Chambers HF, Saag MS.** The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy. 43rd ed. Sperryville: Antimicrobial Therapy Inc, 2012.
  6. **Li J, Nation RL, Owen RJ, Wong S, Spelman D, Franklin C.** Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clin Infect Dis* 2007; 45:594-8.  
<http://dx.doi.org/10.1086/520658>
  7. **O'Hara JA, Ambe LA, Casella LG, et al.** Activities of vancomycin-containing regimens against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:2103-8.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02501-12>
  8. **Gordon NC, Png K, Wareham DW.** Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:5316-22.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00922-10>
  9. **Li J, Rayner CR, Nation RL, et al.** Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2946-50.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00103-06>
  10. **Van Bambeke F.** Glycopeptides in clinical development: pharmacological profile and clinical perspectives. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:471-8.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2004.04.006>
  11. **Öncül O.** Vankomisin ve teikoplaninin hikayesi. *ANKEM Derg* 2010; 24(Ek 2):E101-9.
  12. **Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafer JC, et al.** Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clin Infect Dis* 2009; 49:325-7.  
<http://dx.doi.org/10.1086/600877>