

Düşük Düzeyde Klorhekzidin ile Karşılaştırılmış *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Karakterizasyonu

Characterization of *Klebsiella pneumoniae* strains Exposed to Subinhibitory Concentrations of Chlorhexidine

Gamze Gizem DUMAN^{1,2}, Tuğba ÇUHADAR¹, Ahmet Sungur YAMAK³, Katren ALBAKKOUR¹, Kayhan ÇAĞLAR¹, Ayşe KALKANCI¹

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Gazi University Faculty Of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.

² Kahramanmaraş Sütçü İmam University Faculty of Medicine, Department of Eye Diseases, Kahramanmaraş, Turkey.

³ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, 6. sınıf öğrencisi, Ankara.

³ Gazi University Faculty of Medicine, 6th year student, Ankara, Turkey.

Makale Atfı: Duman GG, Çuhadar T, Yamak AS, Albakkour K, Çağlar K, Kalkancı A. Düşük Düzeyde Klorhekzidin ile Karşılaştırılmış *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Karakterizasyonu. Mikrobiyol Bul 2019;53(1):114-117

ABSTRACT

Chlorhexidine, a topical antiseptic, acts as a cationic biguanide altering the osmotic transport of the bacterial cell wall that has been used throughout the world to prevent healthcare-associated infections for decades. The routine application of chlorhexidine can result in decreased susceptibility of bacteria over time. The aim of this study was to develop *Klebsiella pneumoniae* strains after exposure to chlorhexidine and characterize these adapted strains in terms of their virulence ability both by in vivo and in vitro methods. Two clinical strains of *K.pneumoniae* were included in the study. One strain was completely susceptible and the other was resistant to certain antibiotics. Susceptible strain was subjected in the exposure assay as parent/wild strain. Exposure was performed by increasing chlorhexidine concentrations in agar plates. Chlorhexidine concentrations were gradually decreased reaching a final concentration of 0.12 mg/L after five weeks. Chlorhexidine-adapted viable colonies were selected and isolated. Minimal inhibitor concentrations of chlorhexidine, sodium hypochloride, benzalkonium chloride and triclosan for *K.pneumoniae* strains were determined using broth microdilution method. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis were performed for efflux pumps named cepA, kdeA and acr_{KP} expressions. Fluorimetric efflux assay by using Rhodamine 6G was performed. *Galleria mellonella* killing assay and in vitro virulence determinants such as esculin hydrolysis, biofilm production, lecithinase, DNase activity, hemolytic activity, lipase production, mucoviscosity, casein hydrolysis and complement-mediated serum killing were evaluated. *K.pneumoniae* strains exposed to chlorhexidine did not show any antibiotic resistance. MICs for chlorhexidine, sodium hypochloride, and benzalkonium chloride were increased in the adapted strain. Efflux pumps of cepA and kdeA were over-expressed in the chlorhexidine adapted strain. Rhodamine 6G assay showed an increased efflux in the adapted strain. *G.mellonella* killing assay showed median virulence score. All strains, were esculin positive, while biofilm production, lecithinase, DNase, hemolytic activity, lipase production, mucoviscosity, casein hydrolysis

were all negative. The susceptible parent/wild strain was susceptible to the complement-mediated serum killing, while the chlorhexidine adapted strain showed intermediate susceptibility. Chlorhexidine adapted strains of *K.pneumoniae* showed increased efflux pump expression, enhanced *G.mellonella* killing and raised resistance to serum killing. No difference was determined for other determinants. Minimal correlation was found between chlorhexidine resistance and virulence in *K.pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; chlorhexidine; resistance; virulence; exposed adaptation; *Galleria mellonella*.

Sayın Editör,

Kasyonik biguanid bir ajan olan klorhekzidinin (KHZ) düzenli olarak kullanımı zamanla bakterilerin duyarlılığında azalmaya neden olabilmektedir¹. Kazanılmış KHZ direncinin klinik anlamı olabileceği düşünülmektedir. KHZ'ye dirençli izolatlar literatürde yer almaktadır²⁻⁴. Fakat bunun sık görülen bir durum olmaması nedeniyle, KHZ altında üreyebilen, mutant izolatlar oluşturulması tercih edilmektedir. Çalışmalarda bu mutant izolatlar kullanılmaktadır⁵. Bu ön çalışmada, KHZ ile karşılaştırılmış *Klebsiella pneumoniae* izolatlarından KHZ altında üreyebilen mutant koloniler elde edilmesi ve bu mutant kolonilerin virülans özelliklerinin vitro ve in vivo yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada *K.pneumoniae* türünden biri duyarlı, biri dirençli iki klinik izolat kullanılmıştır. Bunlar; duyarlı izolat ve vahşi izolat "wild type" olarak ayrılmıştır. *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* izolatları KHZ'ye duyarlı kontroller olarak çalışmada kullanılmıştır. *K.pneumoniae* izolatları 16 mg/L'den başlayarak azalan konsantrasyonda KHZ içeren Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerinde sürekli pasajlanmıştır. KHZ konsantrasyonları kademeli bir biçimde azaltılarak 5 haftanın sonunda 0.12 mg/L konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Bu konsantrasyonda KHZ besiyerinde üreyen koloniler seçilmiş ve izole edilmiştir. KHZ altında üreyen koloniler, uyumun kalıcılığının değerlendirilmesi için 10 kez ilaçsız MHA'da pasajlanarak üretilmiştir. Bu izolatlar üzerinde virülans çalışmaları yapılmıştır⁵. Moleküler olarak mutasyon analizi yapamadığımız için "mutant" yerine "uyumlu izolat" terimi kullanılmıştır. *K.pneumoniae* izolatlarının KHZ, sodyum hipoklorit (SHK), benzalkonyum klorit (BNZ) ve triklosan (TRK) için MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır. Atım pompa varlığı için ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gerçekleştirilmiştir. *cepA* amplifikasyonu için primer zincir 5'-CAA CTC CTT CGC CTA TCC CG-3' ve 5'-TCA GGT CAG ACC AAA CGG CG-3', *kdeA* atım pompası için 5'-GTT GTT CCC GTT ATG TCT GGT GC-3' ve 5'-CCA GCA GCC ACT GTA AAA ACA TGC-3' ve *acr_{Kp}* ise, 5'-GCT GTC GAC GGT TAA TGA CTT TAC AGA GG-3' ve 5'-ACA TCC GAG AAT TCC AGC GT-3' primer dizileri kullanılmıştır⁶⁻⁸. *Galleria mellonella* larvasında virülans deneyi yapılmıştır. Günlük larva sayıları kullanılarak "Kaplan-Meier" grafiği oluşturulmuştur. İzolatlarda virülans özelliği olarak, biyofilm, eskülin hidrolizi, lesitinaz üretimi, DNAaz aktivitesi, hemolitik aktivite, lipaz aktivitesi, mukoviskozite, kazein hidrolizi, serum öldürme deneyi, atım pompalarının Rhodamine 6G (R6G) ile florimetrik analizi yapılmıştır.

Klorheksidine uyumlu kolonilerin MİK değerleri KHZ, SHK ve BNZ için 2 dilüsyon artmış olarak bulunmuştur. TRK için MİK değerleri değişmemiştir. 0.12 mg/L KHZ içeren agar plak-

larda koloniler gösterilmiştir. Uyum frekansı 10^{-3} koloni olarak hesaplanmıştır. KHZ uyumlu koloniler duyarlı/vahşi izolatın üretilmiştir. Antibiyotiklere duyarlılık KHZ uyumundan sonra değişmemiştir. KHZ uyumlu koloniler *cepA*, *kdeA* açısından pozitif, *acr_{kp}* açısından negatif bulunmuştur. R6G geri alımı duyarlı/vahşi izolatta 0.072, dirençli izolatta 0.116, KHZ uyumlu izolatta 0.138 olarak ölçülmüştür. Duyarlı/vahşi izolat ile KHZ uyumlu izolat arasında larva mortalitesi açısından farklılık gözlenmiştir ($p < 0.001$). Duyarlı/vahşi izolat, antibiyotik dirençli izolat ve KHZ'ye uyumlu izolat, bütün *Klebsiella* cinsinde olduğu üzere, eskülin hidrolizi pozitif, biyofilm üretimi, lesitinaz, DNAaz aktivitesi, hemolitik aktivite, lipaz üretimi, mukoviskozite ve kazein hidrolizi parametrelerinin tamamı negatif bulunmuştur. Duyarlı/vahşi *K.pneumoniae* izolatı serum öldürme etkisine duyarlıyken, dirençli izolat serum öldürme etkisine dirençli, KHZ uyumlu izolat ise orta duyarlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, klinikte kullanılan KHZ konsantrasyonları genellikle *K.pneumoniae*'i inhibe etmek için gereken miktarın çok üzerinde olduğu için, biyosit direncinin klinik geçerliliğini tartışmak zordur⁹. Bu yüzden, çalışmamız KHZ altında üremeye uyum sağlamış izolatların virülans özellikleri ve atım pompası ifadeleri üzerinde hipotezlenmiştir. KHZ altında üreyerek uyum sağlayan *K.pneumoniae* kolonilerinde atım pompa artışı gösterilmiştir, *G.mellonella* larvalarında mortalite oranı artmış ve serum öldürme etkisine karşı direnç gelişmiştir. Gerek fenotipik gerekse genotipik değişimler aracılığıyla bakteri popülasyonunda duyarlılığın azalması, dezenfektan direncini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Hastane kökenli mikroorganizmaların dirençli ve baskın hale gelmelerini önlemek için "antiseptik ve dezenfektan yönetimi" konusunda gündem oluşturulması gerekmektedir¹⁰.

KAYNAKLAR

1. Khan S, Beattie TK, Knapp CW. The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria. *Ecotoxicology* 2017;26(2):283-92.
2. Bhatia M, Loomba PS, Mishra B, Dogra V, Thakur A. Reduced susceptibility of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to biocides: an emerging threat. *Indian J Med Microbiol* 2016;34(3):355-8.
3. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;61(1).
4. Wand ME, Baker KS, Benthall G, McGregor H, McCowen JW, Deheer-Graham A, et al. Characterization of pre-antibiotic era *Klebsiella pneumoniae* isolates with respect to antibiotic/disinfectant susceptibility and virulence in *Galleria mellonella*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(7):3966-72.
5. Bock LJ, Wand ME, Sutton JM. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and adapted strains. *J Hosp Infect* 2016;93(1):42-8.
6. Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SGB. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *J Hosp Infect* 2012;81(2):87-91.
7. Ping Y, Ogawa W, Kuroda T, Tsuchiya T. Gene cloning and characterization of *KdeA*, a multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol Pharm Bull* 2007;30(10):1962-64.

8. Li DW, Onishi M, Kishino T, Matsuo T, Ogawa W, Kuroda T, et al. Properties and expression of a multidrug efflux pump AcrAB-KocC from *Klebsiella pneumoniae*. Biol Pharm Bull 2008;31(4):577-82.
9. Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. The Complex relationship between virulence and antibiotic resistance. Genes (Basel) 2017;8(1).
10. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine-is it time to establish an 'antiseptic stewardship's initiative? J Hosp Infect 2016;94(3):213-27.