

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-02

UDC: 615.281:579.84:355.721

THE EPIDEMIOLOGY AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *A. BAUMANNII* ISOLATES FROM MILITARY HEALTH CARE FACILITIES

Kovalchuk V.¹, Kondratiuk V.¹, Patrick Mc Gann², Kovalenko I.¹, Erik Snedrud³

¹National Pirogov Memorial Medical University (Pirogov st., 56, Vinnytsya, Ukraine, 21018),

²Molecular Research Walter Reed Army Institute of Research (503 Robert Grant Ave. RM 2W106 Silver Spring MD 20910 U.S.A.),

³Repository and Surveillance Network (MRSN) Walter Reed Army Institute of Research (503 Robert Grant Ave. RM 2W106 Silver Spring MD 20910 U.S.A.)

Responsible for correspondence:
e-mail: valentinkovalchuk15@gmail.com

Article received March 19, 2018; Accepted for printing April 19, 2018

Annotation. *A.baumannii* is one of the main causes of health care associated infections. The epidemiological situation has worsened in the past years, with a higher number of countries reporting interregional spread or endemicity of carbapenem-resistant *A.baumannii*. For these reasons to investigate epidemiology and susceptibility to antibiotics of *A.baumannii* in modern war wounds is crucial for correct treatment choice. The patients enrolled in study had combat wounds of upper or lower extremities which were treated in the Military Medical Clinical Center of Central Region (MMCC CR) Ukraine in 2014-2016 years. The recovered *A.baumannii* after primary identification in Department of Microbiology of National Pirogov Memorial Medical University were forwarded to the Multi-drug resistant repository and surveillance network (MRSN) in Walter Reed Army Institute of Research where they underwent additional antibiotic susceptibility testing (AST) and analysis by whole genome sequencing (WGS). There were analyzed 10 isolates. Testing revealed that all isolates were resistant to ampicillin, cefazolin, ciprofloxacin, and levofloxacin and all were sensitive to tigecycline. Susceptibility to other antibiotics varied considerably, with just two isolates displaying resistance to the carbapenems (imipenem and meropenem). An analysis of the antibiotic resistance genes carried by the isolates was in broad agreement with the AST data. Carbapenem resistance in VNMU001 was correlated with the presence of *blaOXA-23*, while carbapenem resistance in VNMU133 was correlated with the *blaOXA-24* variant, *blaOXA-72*. Overall, 28 different antibiotic resistance genes were identified among the 10 isolates, with the majority encoding β -lactamases or aminoglycoside modifying enzymes (AMEs). The ten *A.baumannii* isolates represent four separate clades that include a single isolate from ST-1 and ST-2, members of the globally distributed CCI and CCII groups. Both of these clades are notorious for harboring multi-drug resistant strains, and this is reflected in this study where VNMU133 (CCI) and VNMU001 (CCII) displayed resistance to a wide variety of antibiotics and carried multiple antibiotic resistant genes. The remaining 8 isolates were assigned to ST-19, which is also a member of CCI, and all four isolates were closely related. Similarly, the four isolates from ST-400 clustered together, but only the two isolates from the same culture would be considered related. It is possible that ST-19 and ST-400 isolates are circulating within this population and additional surveillance is warranted. These data indicate that ST-19 and ST-400 isolates are still susceptible to many antibiotics but have the potential to acquire and develop more resistance mechanisms.

Keywords: battle wounds, microbial flora, antimicrobial resistance, Multi-locus sequence typing, *A.baumannii*.

Introduction

Acinetobacter baumannii is one of the main causes of health care associated infections. Regarding its ability of rapid dissemination in hospital environment and acquiring mechanisms of antimicrobial resistance, it represents global healthcare-associated problem. Resistant *A.baumannii* poses a significant threat to patients and healthcare systems [1, 6]. Colonization with resistant microorganisms is inevitable for battle injured, who has to pass through the various levels of the evacuation chain. These infections are thus likely the result of hospital-acquired infection in facilities along the evacuation route with *A.baumannii* being the most common pathogen [3, 4]. *Acinetobacter* appears to be primarily associated with nosocomial transmission in and out of the combat zone [2]. *A.baumannii* is the cause of serious infections in healthcare settings, and resistance limits treatment options and increases the risk for adverse outcomes for patients. The epidemiological situation has worsened in the past years, with a higher number of countries reporting interregional spread or endemicity of carbapenem-resistant *A.baumannii* [7]. *A.baumannii* is adapted to persistence in healthcare

settings and is difficult to eradicate once it has become endemic [5]. For these reasons to investigate epidemiology and susceptibility to antibiotics of *A.baumannii* in modern war wounds is crucial for correct treatment choice.

Materials and Methods

The patients enrolled in study had combat wounds of upper or lower extremities which were treated in the Military Medical Clinical Center of Central Region (MMCC CR) Ukraine. The wounds were swab-cultured. The recovered *A.baumannii* after primary identification in Department of Microbiology of National Pirogov Memorial Medical University were forwarded to the Multi-drug resistant repository and surveillance network (MRSN) in Walter Reed Army Institute of Research where they underwent additional antibiotic susceptibility testing (AST) and analysis by whole genome sequencing (WGS).

Results. Updating

In total 10 isolates were submitted as *A.baumannii*. Testing revealed that all isolates were resistant to ampicillin,

Table 1. Antibiotic susceptibilities of *A. baumannii* isolates.

MIC Interpretation of ¹	Strain									
	VNMU 001	VNMU 008	VNMU 028	VNMU 081	VNMU 085	VNMU 130-1	VNMU 130-2	VNMU 132	VNMU 133	VNMU 134
AMK	R	S	R	I	S	R	S	R	R	S
AMC	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R
SAM	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S
AMP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ATM	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R
CFZ	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
FEP	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
CAZ	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
CRO	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
CIP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GEN	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
IPM	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
LVX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MEM	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
TET	S	S	S	R	S	S	S	S	I	S
TGC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TOB	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R
SXT	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R

Abbreviations used: AMK - Amikacin; AMC - amoxicillin-clavulanic acid; SAM - ampicillin-sulbactam; AMP - ampicillin; ATM - aztreonam; CFZ - ceftazidime; FEP - cefepime; CAZ - ceftazidime; CRO - ceftriaxone; CIP - ciprofloxacin; GEN - gentamicin; IPM - imipenem; LVX - levofloxacin; MEM - meropenem; TET - tetracycline; TGC - Tigecycline; TOB - tobramycin; SXT - trimethoprim-sulfamethoxazole.

¹Adjudicated susceptibility result based on the three commercial platforms used at the MRSN. R - resistant; I - intermediate; S - sensitive based on current CLSI guidelines.

cefazolin, ciprofloxacin, and levofloxacin and all were sensitive to tigecycline (table 1).

Susceptibility to other antibiotics varied considerably, with just two isolates (VNMU001 and VNMU133) displaying resistance to the carbapenems (imipenem and meropenem). An analysis of the antibiotic resistance genes carried by the isolates was in broad agreement with the AST data (Table 2). Carbapenem resistance in VNMU001 was correlated with the presence of blaOXA-23, while carbapenem resistance in VNMU133 was correlated with the blaOXA-24 variant, blaOXA-72.

Notably, VNMU133 also carried the potent 16S methylase gene armA, which confers resistance to all aminoglycosides, and this is reflected in the AST profile for this strain which indicates resistance to all three aminoglycosides tested (amikacin, gentamicin, and tobramycin). Overall, 28 different antibiotic resistance genes were identified among the 10 isolates, with the majority encoding β -lactamases or aminoglycoside modifying enzymes (AMEs). In silico Multi-locus sequence typing (MLST) was performed on all 10 isolates and assigned the strains to four different Sequence Types (STs). Four isolates were assigned to ST-19 and four to ST-400. The remaining two isolates were assigned

to ST-1 and ST-2.

MLST is suitable for analysis of isolates on a global scale, but the resolution provided is low. To better understand the relationship between the isolates, we performed a pair-wise comparison of the isolates using a single nucleotide polymorphism (SNP) based approach. This identifies any mutations between different isolates and offers exceptional resolution that is suitable for outbreak investigations.

Initially, we constructed an overall dendrogram based on mutational differences between the isolates (Fig. 1).

As illustrated in Figure AB1, the 10 isolates form four distinct clusters that correspond to the 4 different MLST's identified. Two isolates, VNMU001 and VNMU133 formed their own branches and were unrelated to the other isolates. Notably, VNMU133 belonged to ST-1, the founding member of Global Complex I, a globally distributed complex of *A.baumannii* [2]. Similarly, VNMU001 belongs to ST-2 (Global Complex II) and is found world-wide.

Four isolates were assigned to ST-19 (See Table 3), which is also a member of Global Complex I, and is closely related to ST-1. A SNP-based analysis of the four isolates was conducted to determine the relationship between them (Figure 2).

Table 2. Antibiotic resistant genes carried by *A. baumannii* isolates.

Gene ¹	Phenotype ²	VNMU Strain ³										
		001	008	028	081	085	130-1	130-2	132	133	134	
<i>aac(3)-Ia</i>	Aminoglycosides: Gentamicin	+									+	
<i>aac(6)-Ib</i>	Aminoglycosides: Amikacin and tobramycin			+								
<i>ant(3'')-1a</i>	Aminoglycosides: Streptomycin	+									+	
<i>ant(2'')-1a</i>	Aminoglycosides: Gentamicin, kanamycin, and tobramycin		+	+	+	+					+	
<i>aph(3')-Ic</i>	Aminoglycosides: Kanamycin											+
<i>aph(3')-Va</i>	Aminoglycosides: Kanamycin			+	+					+	+	
<i>aph(3')-Vb</i>	Aminoglycosides: Kanamycin	+										
<i>aph(6)-Id</i>	Aminoglycosides: Streptomycin			+								
<i>amA</i>	Aminoglycosides: All clinically relevant										+	
<i>blaADC-25</i>	β -lactams: Penicillins, early cephalosporins	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>blaGES-11</i>	β -lactams: Carbapenems			+								
<i>blaOXA-100</i>	β -lactams: Cloxacillin, carbapenems			+				+	+	+		
<i>blaOXA-23</i>	β -lactams: Carbapenems										+	
<i>blaOXA-66</i>	β -lactams: Cloxacillin, carbapenems	+										
<i>laOXA-69</i>	β -lactams: Cloxacillin, carbapenems		+		+	+					+	+
<i>blaOXA-72</i>	β -lactams: Carbapenems	+										
<i>blaPER-1</i>	β -lactams: Extended spectrum cephalosporins, monobactams	+										
<i>blaTEM-1D</i>	β -lactams: Penicillins, early cephalosporins										+	
<i>mph(E)</i>	Macrolides										+	
<i>msr(E)</i>	Macrolides										+	
<i>catA1</i>	Phenicol				+							+
<i>cmiA1</i>	Phenicol			+								
<i>sul1</i>	Sulphonamides	+		+							+	
<i>sul2</i>	Sulphonamides		+		+	+						+
<i>tet(B)</i>	Tetracyclines				+							
<i>dfrA12</i>	Trimethoprim										+	
<i>dfrA7</i>	Trimethoprim			+								

Note. ¹Best hit gene based on sequence coverage. ²Predicted resistance phenotype based on current knowledge. ³“+” indicates the gene is present in this strain.

As illustrated, the four isolates are related, but not identical, and are only distantly related to ST-19 isolates cultured during the Iraq war. VNMU008 and VNMU085 are the most related, and they differ by 14 mutations (SNPs) and an additional 4 kB of sequence in VNMU085. This is reflected in the antibiotic resistance gene content, where both isolates carry the same antibiotic resistance genes (Tab. 2). A difference of 14 SNPs indicates that these isolates diverged approximately 1 year previously. Notably, VNMU008 was collected on September 2014 while VNMU085 was collected 6 months later in March 2015. This could indicate that both strains have emerged from a common source, possibly an environmental area that is

contaminated by this strain.

Four isolates were also assigned to ST-400, which was first described in 2015 from isolates cultured in Brazil in 2000 and is unrelated to the major clonal complexes. A SNP-based analysis of the four strains was also performed (Fig. 3).

As illustrated in Figure AB3, VNMU132 and VNMU028 form very distinct strains and are unrelated. However, VNMU130-1 and VNMU130-2, collected from the same sample, differ by 20 mutations (i.e. 20 SNPs), and both isolates also carry the same antibiotic resistance gene content. It is likely that these isolates represent an ancestral strain that has evolved over time, either within the host or on an

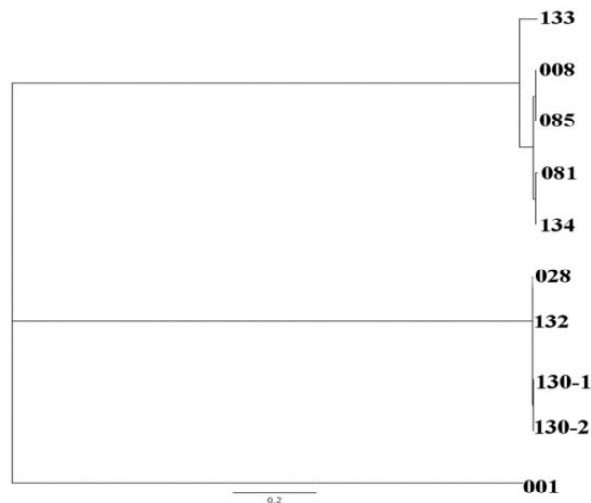


Fig. 1. Dendrogram generated from the whole genome sequence of the all 10 Ukrainian *A. baumannii*. The scale bar approximately represents the number of mutations per 1,000 bases. Branch lengths are indicative of strain relatedness.

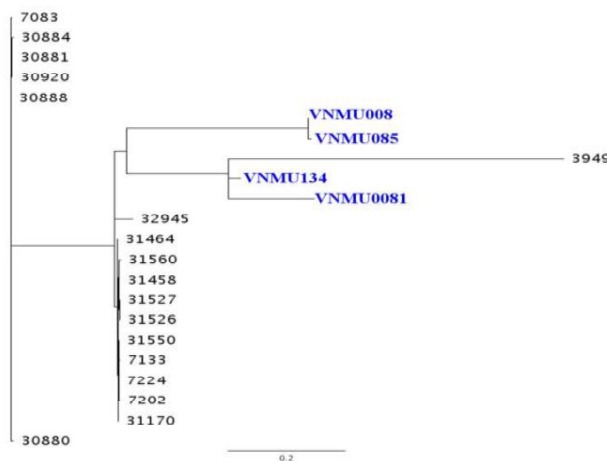


Fig.2. Dendrogram generated from the whole genome sequence of the all 4 ST-19 *A. baumannii* (Blue Test) compared to ST-19 isolates collected during the Iraq war (Black text). The scale bar approximately represents the number of mutations per 1,000 bases. Branch lengths are indicative of strain relatedness.

environmental surface that have since diverged in the past 1-2 years.

References

1. Diancourt, L., Passet, V., Nemeč, A., Dijkshoorn, L. & Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multi-resistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*, 5 (4), 10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034.
2. Forest, R. S., Sheppard, F. R., Keiser, P., Craft, D.W., Gage, F., Robson, M. ... Elster, E. (2010). The majority of US combat casualty soft-tissue wounds are not infected or colonized upon arrival or during treatment at a continental US military medical facility. *Am. J. Surg.*, 200 (4), 489-495. doi: 10.1016/j.amjsurg.2010.03.001.
3. Kaspar, R. L., Griffith, M. E., Mann, P. B. & Lehman, D. J. (2009). Association of bacterial colonization at the time of presentation to a combat support hospital in a combat zone with subsequent 30-

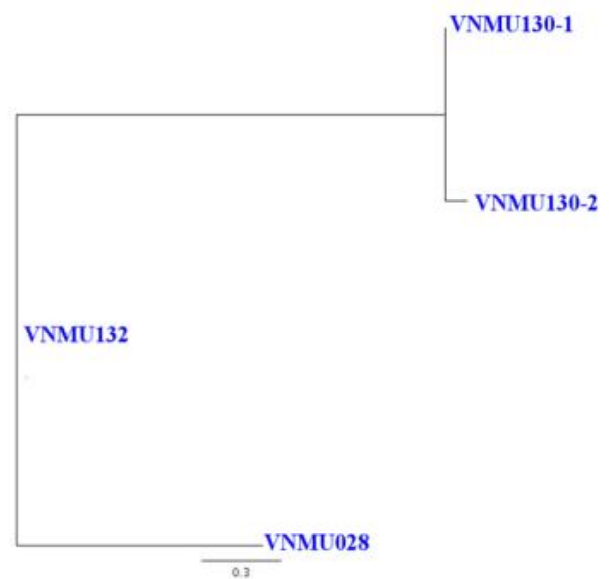


Fig. 3. Dendrogram generated from the whole genome sequence of the all 4 ST-400 *A. baumannii*. The scale bar approximately represents the number of mutations per 1,000 bases. Branch lengths are indicative of strain relatedness.

Conclusions and prospects for further developments

1. The ten *A. baumannii* isolates represent four separate clades that include a single isolate from ST-1 and ST-2, members of the globally distributed CCI and CCII groups. Both of these clades are notorious for harboring multi-drug resistant strains, and this is reflected in this study where VNMU133 (CCI) and VNMU001 (CCII) displayed resistance to a wide variety of antibiotics and carried multiple antibiotic resistant genes.

2. The remaining 8 isolates were assigned to ST-19, which is also a member of CCI, and all four isolates were closely related. Similarly, the four isolates from ST-400 clustered together, but only the two isolates from the same culture would be considered related (VNMU130-1 and VNMU 130-2). It is possible that ST-19 and ST-400 isolates are circulating within this population and additional surveillance is warranted. These data indicate that ST-19 and ST-400 isolates are still susceptible to many antibiotics but have the potential to acquire and develop more resistance mechanisms.

day colonization or infection. *Mil. Med.*, 174 (9), 899-902. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19780364>.

4. Murray, C. K., Hinkle, M. K. & Yun, H. C. (2008). History of infections associated with combat-related injuries. *J. Trauma*, 64 (3), 221-231. doi: 10.1097/TA.0b013e318163c40b.
5. Nutman, A., Lerner, A., Schwartz, D. & Carmeli, Y. (2016). Evaluation of carriage and environmental contamination by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 22 (11), 949.e5-e7. doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.020.
6. Peleg, A. Y., Seifert, H. & Paterson, D. L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21 (3), 538-582. doi: 10.1128/CMR.00058-07.
7. Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M. & Tsakris, A. (2013).

Ковальчук В.П., Кондратиук В.М., Патрік Мак Ганн, Коваленко І.М., Ерік Шнеруд
ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ШТАМІВ А. BAUMANNII, ЩО ВИДІЛЕНІ У
ВІЙСЬКОВИХ У ЛІКУВАЛЬНИХ ЗАКЛАДАХ

Анотація. *A. baumannii* вважається найбільшою загрозою у виникненні інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги. Резистентність *A. baumannii* обмежує лікувальні можливості та збільшує ризики ускладнень. Епідеміологічна ситуація значно погіршилась в останні роки, зросла кількість країн в яких повідомляється про міжрегіональне розповсюдження стійких до карбапенемів штамів. З цих причин, дослідження розповсюдження та чутливості до антибактеріальних препаратів *A. baumannii*, що виділяється в сучасних військових конфліктах є принциповим для проведення вірного лікування. В дослідження включені пацієнти з пораненнями верхніх та нижніх кінцівок, які лікувались в Військово-медичному клінічному центрі Центрального регіону України в 2014-2016 рр. Виділені штами *A. baumannii*, після первинної ідентифікації на кафедрі мікробіології Вінницького національного медичного університету були направлені до репозиторію полірезистентних мікроорганізмів Військового інституту досліджень ім. Волтера Ріда, США, де проводилось додаткове визначення чутливості до антибіотиків та повний аналіз генної послідовності. Проаналізовано 10 штамів акинетобактерій. Дослідження показало, що всі ізоляти були стійкими до ампіциліну, цефазоліну, ципрофлоксацину та левофлоксацину, і всі вони були чутливими до тигецикліну. Чутливість до інших антибіотиків значно варіювала і тільки два ізоляти були резистентними до карбапенемів (іміпенему та меропенему). Стійкість до карбапенему у VNMU001 корелювала з присутністю гену *blaOXA-23*, тоді як резистентність до карбапенему VNMU133 корелювала з варіантом гену *blaOXA-24 blaOXA-72*. Загалом, у 10 ізолятів було виявлено 28 різних генів антибіотикорезистентності, більшість яких кодуєть ?-лактамази або ферменти, що модифікують аміноглікозиди (AMEs). Десять ізолятів *A. baumannii* являють собою чотири окремі клональні групи, що містять єдиний ізолят з ST-1 та ST-2, з числа представників глобально розподілених груп CCI та CCII. Обидві ці клональні групи відомі як джерело мультирезистентних штамів, і це відображено у цьому дослідженні, де VNMU133 (CCI) та VNMU001 (CCII) продемонстрували стійкість до широкого кола антибіотиків і містять багато антибіотикорезистентних генів. Решта 8 ізолятів були віднесені до ST-19, який також є представником CCI, і всі чотири ізоляти виявляли тісний зв'язок. Аналогічно, чотири ізоляти з групи ST-400 об'єднані в один кластер, але тільки два ізоляти з тієї ж культури допустимо вважати спорідненими. Цілком можливо, що ізоляти груп ST-19 та ST-400 поширюються в межах обстеженої популяції поранених та вимагають додаткового спостереження. Ці дані вказують на те, що ізоляти ST-19 та ST-400 зберігають чутливість до багатьох антибіотиків, але мають потенціал для рецепції та розвитку механізмів резистентності.

Ключові слова: бойові рани, мікробна флора, антимікробна резистентність, типізація множинного локусу, *A. baumannii*.

Ковальчук В.П., Кондратиук В.Н., Патрік Мак Ганн, Коваленко І.Н., Ерік Шнеруд
ЕПІДЕМІОЛОГІЯ І АНТИБАКТЕРІАЛЬНА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ А. BAUMANNII, ВЫДЕЛЕННЫХ
У ВОЕННЫХ В ЛЕЧЕБНЫХ УЧРЕЖДЕНИЯХ

Аннотация. *A. baumannii* считается самой большой угрозой в возникновении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Резистентность *A. baumannii* ограничивает лечебные возможности и увеличивает риски осложнений. Эпидемиологическая ситуация значительно ухудшилась в последние годы, возросло количество стран, в которых сообщается о межрегиональном распространении устойчивых к карбапенемам штаммов. Поэтому, исследование распространения и чувствительности к антибактериальным препаратам *A. baumannii*, которые выделяются в современных военных конфликтах, являются принципиальным для проведения верного лечения. В исследование включены пациенты с ранениями верхних и нижних конечностей, которые лечились в Военно-медицинском клиническом центре Центрального региона Украины в 2014-2016 гг. Выделенные штаммы *A. baumannii*, после первичной идентификации на кафедре микробиологии Винницкого национального медицинского университета были направлены в репозиторий полирезистентных микроорганизмов Военного института исследований им. Уолтера Риды, США, где проводилось дополнительное определение чувствительности к антибиотикам и полный анализ генной последовательности. Проанализированы 10 штаммов акинетобактерий. Исследование показало, что все изоляты были устойчивыми к ампициллину, цефазолину, ципрофлоксацину и левофлоксацину и все они были чувствительными к тигециклину. Чувствительность к другим антибиотикам значительно варьировала и только два изолята были резистентными к карбапенемам (имипенему и меропенему). Устойчивость к карбапенему в VNMU001 коррелировала с присутствием гена *blaOXA-23*, тогда как резистентность к карбапенему VNMU133 коррелировала с вариантом гена *blaOXA-24 blaOXA-72*. В целом, у 10 изолятов было выявлено 28 различных генов резистентности, большинство которых кодируют ?-лактамазы или ферменты, модифицирующие аминогликозиды (AMEs). Десять изолятов *A. baumannii* представляют собой четыре отдельные клональные группы, содержащие единственный изолят с ST-1 и ST-2, из числа представителей глобально распределенных групп CCI и CCII. Обе эти клональные группы известны как источник мультирезистентных штаммов, и это отражено в этом исследовании, где VNMU133 (CCI) и VNMU001 (CCII) продемонстрировали устойчивость к широкому кругу антибиотиков и содержат много антибиотикорезистентных генов. Остальные 8 изолятов были отнесены к ST-19, который также является представителем CCI, и все четыре изолята проявляли тесную связь. Аналогично, четыре изолята из группы ST-400 объединены в один кластер, но только два изолята из той же культуры допустимо считать родственными. Вполне возможно, что изоляты групп ST-19 и ST-400 распространяются в пределах обследованной популяции раненых и требуют дополнительного наблюдения. Эти данные указывают на то, что изоляты ST-19 и ST-400 сохраняют чувствительность ко многим антибиотикам, но имеют потенциал для рецепции и развития механизмов резистентности.

Ключевые слова: боевые раны, микробная флора, устойчивость к противомикробным препаратам, типизация последовательности множественных локусов, *A. baumannii*.