

ÇOĞUL DİRENÇLİ ACINETOBACTER KÖKENLERİNDE AMPİSİLİN/SULBAKTAM – SİPROFLOKSASİN, AMPİSİLİN/SULBAKTAM - AMİKASİN, İMİPENEM – SİPROFLOKSASİN, İMİPENEM - AMİKASİN KOMBİNASYONLARININ *IN VITRO* ETKİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF *IN VITRO* INTERACTIONS OF AMPICILLIN/SULBACTAM – CIPROFLOXACIN, AMPICILLIN/SULBACTAM – AMIKACIN, IMIPENEM – CIPROFLOXACIN, IMIPENEM – AMIKACIN COMBINATIONS AGAINST MULTIPLE RESISTANT *ACINETOBACTER* STRAINS

Aslı Gamze ŞENER

Meral TÜRK

İlhan AFŞAR

Metin TÜRKER

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

Anahtar Sözcükler: *Acinetobacter* türleri, infeksiyon, kombinasyon sağaltımı, sinerji

Keywords: *Acinetobacter* spp., infection, combination therapy, synergy

Geliş: 26 Şubat 2004

Kabul: 17 Kasım 2004

ÖZET

Çoğul dirençli *Acinetobacter* infeksiyonları özellikle yoğun bakım ünitelerinde sağaltım güçlüğüne neden olmaktadır. Bu çalışma, çoğul dirençli *Acinetobacter* kökenlerinde antibiyotik kombinasyonlarının *in vitro* etkinliklerinin araştırılması amacıyla düzenlenmiştir. Çoğul dirençli 12 *Acinetobacter* kökeninde sulbaktam-ampisilin + siprofloksasin (SAM+CIP), sulbaktam-ampisilin + amikasin (SAM+AK), imipenem + siprofloksasin (IMP+CIP) ve imipenem + amikasin (IMP+AK) kombinasyonlarının *in-vitro* sinerjistik etkinliği dama tahtası (checkerboard) yöntemi ile araştırılmıştır. En yüksek sinerji oranı SAM+AK (3/12) kombinasyonunda saptanmıştır. İndiferan etkileşim, SAM+CIP, SAM+AK, IMP+CIP ve IMP+AK kombinasyonlarında sırasıyla ; %91.6, %75, %75 ve %83.3 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, çoğul dirençli *Acinetobacter* infeksiyonlarında kombinasyon sağaltımı ve öncesinde antibiyotik etkileşimlerinin gösterilmesi açısından *in vitro* sinerji testlerinin yapılması önerilmiştir.

SUMMARY

Acinetobacter infections cause treatment failures especially in intensive care units because of multiple antibiotic resistance. The purpose of this study was to investigate the *in-vitro* effect of antibiotic combinations on 12 multiresistant *Acinetobacter* strains. The *in vitro* synergy of sulbactam-ampicillin + ciprofloxacin (SAM+CIP), sulbactam-ampicillin + amikacin (SAM+AK), imipenem + ciprofloxacin (IMP+CIP) and imipenem + amikacin (IMP+AK) combinations were studied by the checkerboard technique in multiresistant strains. The highest rates of synergy were detected with SAM+AK (3/12) combination. Indifference was found to be 91.6%, 75%, 75% and 83.3% in SAM+CIP, SAM+AK, IMP+CIP and IMP+AK combinations, respectively. In conclusion, combination therapy should be applied and *in vitro* synergy tests should be performed before starting treatment in multiresistant *Acinetobacter* infections.

GİRİŞ

Acinetobacter cinsi bakteriler antibiyotiklere karşı çoğul direnç geliştirmiş olmaları nedeniyle önemli hastane infeksiyonu etkenlerindendir. Çeşitli direnç mekanizmaları ile aminoglikozitler, sefalosporinler, kinolonlar ve imi-

peneme karşı direnç kazandıklarından sağaltımlarında güçlüklerle karşılaşmaktadır (1).

Araştırmalarda monoterapi ile başarı oranlarının düşük olması nedeniyle, özellikle dirençli kökenlerin ortaya çıkışının önlenmesi açısından kombine antibiyotik kullanımı

önerilmiştir (2). Özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda kombine antibiyotik kullanımının önemi günden güne artmaktadır. Bu nedenle, çalışma da yoğun bakım hastalarından soyutlanan *Acinetobacter* kökenlerinde çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının etkisi dama tahtası yöntemi ile araştırılmıştır.

GEREÇ YÖNTEM

Bakteri kökenleri: Çalışmaya, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yoğun bakım hasta örneklerinden soyutlanan çoğul dirençli 12 *Acinetobacter* kökeni alınmıştır.

Antibakteriyel ilaçlar: Siprofloksasin (CIP) (Bayer), amikasin (AK) (Fako-Abfar), ampicilin-sulbaktam (SAM) (Fako-Abfar), imipenem (IMP) (Merck-Sharp-Dohme) antibiyotiklerinin toz şekilleri kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) önerilerine göre Mueller-Hinton buyonu kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır (3). Bu yöntemle elde edilen minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri sinerji testlerinde gerekli antibiyotik konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Kalite kontrol kökeni olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

Sinerji testleri: Her bir köken ve denenecek her antibiyotik için; 96 çukurlu ve U tabanlı bir adet steril mikroyet kullanılarak dama tahtası (checkerboard) yöntemi

uygulanmıştır (4). Çoğul dirençli kökenlerde SAM-CIP, SAM-AK, IMP-CIP ve IMP-AK kombinasyonlarının etkisi incelenmiştir. Sinerji testlerinde her köken ve antibiyotik için buyon mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerinin 2-3 kat üstünden, 4-8 kat altına kadar hazırlanan dilüsyonlar kullanılmıştır. İnokulum hazırlanması için 24 saatlik kültürden katyon ekli Mueller-Hinton buyona 3-5 koloni konarak 37° C'de 2-3 saat inkübe edilmiş ve 0.5 McFarland bulanıklığına getirilmiştir.

Her antibiyotik için ayrı ayrı tüplerde çift kat seri dilüsyonlar NCCLS önerilerine uyularak katyon ekli Mueller-Hinton buyonu ile yapılmıştır (3). A1 çukuru üreme kontrolü, H12 çukuru ise besiyeri kontrolü olarak kullanıldığından antibiyotik eklenmemiştir. Kombinasyonlardaki iki antibiyotikten ilki için ilk yatay sıra (A sırası), ikincisi için ise ilk dikey sıra (1 nolu sütun) kullanılarak antibiyotiklerin MİK değeri saptanmıştır. İlk antibiyotiğin iki katı dilüsyonu mikrodilüsyon plağının 2 nolu sütundan başlayarak (ör; IMP) 12. sütuna kadar dağıtılmıştır. İkinci antibiyotiğin çift katlı dilüsyonları (ör; AK) ise her bir dilüsyon bir satırın tümüne konulmak üzere mikrodilüsyon plağının B ve H sıralarına aktarılmıştır. Daha sonra tüm kuyucuklara bakteri süspansiyonundan 10 µl konulmuştur (Tablo 1). Plaklar 37° C'de 18 saat tutulduktan sonra üremeler görsel olarak değerlendirilmiş ve her kombinasyona ait fraksiyonel inhibitör konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Tablo 1. İmipenem- amikasin mikrodilüsyon panelinin şematik görünümü

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ÜK	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
B	AK 1	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1
C	AK 2	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2
D	AK 4	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4
E	AK 8	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8
F	AK 16	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16
G	AK 32	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32
H	AK 64	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	SK 64

ÜK: Üreme kontrolü, SK: Sterilite kontrolü, AK: Amikasin, IMP: İmipenem, Sayılar µg/ml olarak antibiyotik konsantrasyonu

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) ve FİK indeksinin hesaplanması:

SAM, CIP, IMP, AK için MİK değerleri okunduktan sonra iki antibiyotiğin birlikte bulunduğu çukurlar üreme yönünden değerlendirilmiştir. Her kombinasyon için her bir çukurdaki FİK ve FİK indeksi (ΣFİK) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

FİKA = MİKA (Kombinasyon/MİKA (Tek başına)

FİKB = MİKB (Kombinasyon/MİKB (Tek başına)

ΣFİK = FİKA + FİKB

Sonuçlar ΣFİK ≤ 0.5 ise sinerjistik etki, 0.5 < FİK ≤ 4 ise etkisiz, ΣFİK > 4 ise antagonistik etki olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 12 çoğul dirençli *Acinetobacter* kökeni için dört kombinasyon denenmiş ve 886 çukurun FİK değeri hesaplanmıştır. En yüksek sinerji oranı SAM+AK (3/12) kombinasyonunda saptanmıştır. İndiferan etkileşim, SAM+CIP, SAM+AK, IMP+CIP ve IMP+AK kombinasyonlarında sırasıyla; %91.6, %75, %75 ve %83.3 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 2'de görülmektedir.

Kökenlerin FİK değerleri ve etkileşim sonuçları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 2. Antibiyotik kombinasyonlarının etkisi [Sayı (%)]

Kombinasyon	Antagonizma	Etkisiz kategori	Sinerji
SAM-CIP	0	11 (%91.6)	1 (%8.3)
SAM-AK	0	9 (%75)	3 (%25)
IMP-CIP	1 (%8.3)	9 (%75)	2 (%16.6)
IMP-AK	0	10 (%83.3)	2 (%16.6)

SAM: Ampisilin/sulbaktam, CIP: Siprofloksasin, AK: Amikasin, IMP: İmipenem

Tablo 3. Antibiyotik kombinasyonlarının FİK değerleri ve etkileşimleri

Köken	SAM-CIP FİK	Sonuç	SAM-AK FİK	Sonuç	IMP-CIP FİK	Sonuç	IMP-AK FİK	Sonuç
1	0.8	E	0.7	E	2	E	0.8	E
2	0.3	S	0.3	S	3	E	0.7	E
3	3.5	E	2	E	4	< A	3	E
4	2	E	3	E	0.7	E	0.3	S
5	0.6	E	0.8	E	0.8	E	0.3	S
6	2	E	0.7	E	3	E	2	E
7	3	E	1.5	E	2	E	1.5	E
8	1.5	E	0.3	S	0.3	S	1.5	E
9	1	E	3	E	3	E	1	E
10	2	E	2	E	1.5	E	3	E
11	1.5	E	0.3	S	0.3	S	0.7	E
12	2	E	0.7	E	0.7	E	0.8	E

SAM: Ampisilin/sulbaktam, CIP: Siprofloksasin, AK: Amikasin, IMP: İmipenem
E: Etkisiz S: Sinerji

TARTIŞMA

Acinetobacter türlerinin çeşitli sınıf antibiyotiklere hızla direnç geliştirdikleri bilinmektedir (5). Buna paralel olarak, son yıllarda çoğul dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu hastane infeksiyonlarından da sıklıkla söz edilmektedir (6-8). Son yıllarda seftazidim, sefotaksim gibi geniş spektrumlu sefalosporinler ile imipenem, torbamsin, amikasin ve florokinolonların *Acinetobacter* türleri için MİK değerlerinde artış olmuştur (9). Sağaltımı güç infeksiyonlara yol açan *Acinetobacter* kökenlerinde, sağaltım başarısının artırılması ve direnç gelişimini önlemek amacıyla kombine antibiyotik kullanımı önerilmektedir (10). Gram-negatif bakteri infeksiyonlarında en sık kullanılan kombinasyon geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik ile aminoglikozit kombinasyonlarıdır (11). *Acinetobacter* türlerine karşı *in vitro* olarak sinerjik etki göstermeleri nedeniyle sıklıkla IMP-AK kombinasyonu kullanılmaktadır (12).

Shokrylanbaran ve Tatman-Otkun (13) imipeneme dirençli *A. baumannii* kökeninde IMP-AK kombinasyonunda sinerji saptamazken imipeneme duyarlı üç kökenden ikisinde sinerji olduğunu bildirmişlerdir. Altıparlak ve ark. (14)'nın çalışmasında ise IMP-AK kombinasyonundaki sinerji oranı %33.3 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada çoğul dirençli *Acinetobacter* kökenlerinde IMP-AK kombinasyonunda sinerji oranı %16.6 (2/12) olarak bulunmuştur. Etkisiz kategoride ise 10 köken (%83.3) yer almaktadır.

En az iki aminoglikozit ve iki geniş spektrumlu penisiline dirençli olan 14 *A. baumannii* kökeninin yer aldığı bir çalışmada kökenlerin üçünde IMP-AK kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği bildirilmektedir (10). Aynı çalışmada SAM-AK kombinasyonu üç (3/14) SAM-TOB kombinasyonu dört (4/14) kökende sinerjik etki göstermiştir. Çalışmada SAM-AK kombinasyonu çoğul dirençli *Acinetobacter* suşları üzerinde %25 (3/12) oranında sinerjik etki göstermiştir. IMP-CIP ve IMP-AK kombinasyonları için bu oran %16.6 (2/12), SAM-CIP için ise %8.3 (1/12) olarak saptanmıştır. Antagonistik etkileşim yalnız bir kökende ve İmipenem-siprofloksasin kombinasyonunda (%8.3) görülmüştür. Çalışmada denenilen tüm kombinasyonlarda "etkisiz" kategorisine giren sonuçların oranı yüksek bulunmuştur. Ancak *in vivo* sonuçlar mikro-organizma ile ilgili etmenlere ek olarak, konağın savunma mekanizmaları ile de değiştiğinden sağaltım protokolünün belirlenmesi için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır. Hsueh ve ark. (15)'nin araştırmasında IMP-AK kombinasyonu ve IMP-SAM kombinasyonu ile çoğul dirençli *A. baumannii* suşlarında sinerjik etkileşim saptanmasına karşın klinik kullanımda istenen plazma dü-

zeylerine ulaşmanın güçlüğü vurgulanmaktadır. Aynı çalışmada bakteriyemili hastalardan bazılarının yüksek doz (3 g/gün) IMP-AK kombinasyonu ile başarılı bir biçimde sağaltılırken, solunum sistemi veya yara infeksiyonlarında bu sağaltım protokolü ile mikro-organizma eradikasyonu ve klinik iyileşme sağlanamadığı bildirilmiştir.

Acinetobacter infeksiyonlarının sağaltımında IMP veya CAZ ile florokinolon kombinasyonu da önerilmektedir (12). Çalışmada IMP-CIP için sinerji oranı ise %16.6 (2/12) olarak bulunmuştur. Çalışılan kökenler arasında bir kökünde (%8.3) antagonizma saptanmış olup, bu da IMP-CIP kombinasyonundadır. *Acinetobacter* infeksiyonlarının sağaltımında beta-laktam + kinolon kombinasyonları-

nın, beta-lakta + aminoglikozit kombinasyonlarına göre daha az etkili olduğunu bildiren araştırmalar olmakla birlikte bu çalışmanın sonuçlarına göre bu kombinasyonların etkinliği birbirine yakın bulunmuştur (14). Sonuç olarak sinerji oranının daha yüksek olması ve antagolistik etkileşim saptanmaması nedeniyle SAM-AK kombinasyonunun çoğul dirençli *Acinetobacter* infeksiyonlarının sağaltımında önerilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan dama tahtası yönteminin tam olarak *in vivo* ortamı yansıtmadığı bilinmekle birlikte, kombinasyonların etkinliğinin *in vitro* olarak test edilmesinde ve antibiyotik kombinasyonu seçiminde yardımcı olacağı düşünülmektedir (16).

KAYNAKLAR

1. Shaes DM, Rice LB. Antimicrobiol resistance in hospital flora and nosocomial infections. In: Mayhall CG, ed. *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996: 980-99.
2. Mouton JW. Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. *Infection* 1999; 27 (Suppl 2): 24-8.
3. Gür D, ed. National Committee for Clinical Standards: Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları. Onikinci bilgi eki M100-S12. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002; 22: 94.
4. Moody J. Synergism testing; broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: ASM Press, 1992: 5.18.1-5.18.28.
5. Brauerneind A, Kljuar S Jungwirth R. Overview of antibiotic resistance problems in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* 1997; 46: 726-8.
6. Hsueh PR, Liu YC, Yand D, et al. Multicenter surveillance of antimicrobial resistance of major bacterial pathogens in intensive care units in 2000 in Taiwan. *Drug Resist* 2001; 7: 373-82.
7. Afzal MS, Livermore D. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 576-7.
8. Go ES, Urban C, Burns J, et al. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet* 1994; 344: 1329-32.
9. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148-65.
10. Marques MB, Brookings ES, Moser SA, et al. Comparative *in-vitro* antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 881-5.
11. Gould M, Milne K. *In-vitro* pharmacodynamic studies of piperacillin/tazobactam with gentamicin and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 53-61.
12. Bouze E, Munoz P. Monotherapy versus combination therapy for bacterial infections. *Med Clin North Am* 2000; 84: 1357-89.
13. Shokrylanbaran N, Tatman-Otkun M. Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde antibiyotik sinerjizmi. *İnfek Derg* 2002; 16: 463-70.
14. Altöparlak Ü, Özkurt Z Erol S. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının *in-vitro* etkileşiminin araştırılması. *ANKEM Derg* 2003; 17: 46-50.
15. Hsueh PR, Ten LJ, Chen CY, et al. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 2-14.
16. Gülay Z. Antibiyotik duyarlılık testlerinin hasta izleminde kullanımı: Antibiyotik kombinasyonlarının *in-vitro* etkinliğini ölçen testler. Gür D, Söyletir G, Bal Ç, Dündar V, Sümerkan B, Köksal İ, Çiftçi V, ed. *Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı* kitabında. İstanbul: Turgut Yayıncılık, 1997: 85.

İLETİŞİM

Uz. Dr. Aslı Gamze ŞENER
İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı
35370 Yeşilyurt, İZMİR
e-posta: asgam@myynet.com