

## KLİNİK ÖRNEKLERDEN SOYUTLANAN AEROP BAKTERİLERİN PEKSİGANANA *IN VITRO* DUYARLILIĞI

### *IN VITRO* PEXIGANAN SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES OF AEROBIC BACTERIA

Gülhan VARDAR-ÜNLÜ Mehmet ÜNLÜ Mustafa Zahir BAKICI Ayşe ŞAHİN

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas

**Anahtar Sözcükler:** Peksiganan, katyonik peptit, aerop bakteriler, *in vitro* antimikrobiyal duyarlılık, mikrodilüsyon yöntemi

**Key Words:** Pexiganan, cationic peptide, aerop bacteria, *in vitro* antimicrobial susceptibility, microdilution method

## ÖZET

Antimikrobiyal bir peptit olan peksiganan orjinal olarak Afrika kurbağasının derisinden elde edilmiş magainin II grubu peptitlerin sentetik analogudur. Bu çalışmada, peksiganan Gram-pozitif ve Gram-negatif 580 klinik kökünde NCCLS önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemiyle denendiğinde, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Peksigananın MİK<sub>90</sub> değerleri *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. için 32 µg/ml ve *Pseudomonas aeruginosa* için 64 µg/ml olarak saptandı. *Staphylococcus aureus*, koagülaz-negatif stafilkoklar, *Enterococcus faecium* için peksigananın MİK<sub>90</sub> değeri 16 µg/ml idi. *Enterococcus faecalis* ve *Proteus* spp. MIC<sub>50</sub> ve MIC<sub>90</sub> 256 µg/ml'den daha yüksek değerleriyle peksiganana az duyarlı bulundu. Bu sonuçlar, peksigananın etkili bir topikal antimikrobiyal madde olabileceğini göstermektedir.

## SUMMARY

Pexiganan, an antimicrobial peptide, is a synthetic analog of the magainin II peptides originally isolated from the skin of the African clawed frog. In this study, pexiganan was shown to have broad-spectrum antimicrobial activity when it was tested against 580 clinical isolates of Gram-positive and Gram-negative aerobic bacteria by broth microdilution method as recommended by NCCLS. The MIC<sub>90</sub> values of pexiganan were detected as 32 µg/ml for *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. and 64 µg/ml for *Pseudomonas aeruginosa*. The MIC<sub>90</sub> values of pexiganan for *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, and *Enterococcus faecium* were 16 µg/ml. *Enterococcus faecalis* and *Proteus* spp. were found to be less susceptible to pexiganan with both MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values greater than 256 µg/ml. These results demonstrate that pexiganan could serve as a potent topical antimicrobial substance.

## GİRİŞ

Geçen 50 yılda, infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan doğal, sentetik ve yarı sentetik antimikrobiyallere karşı mikro-organizmalarda direncin sıklıkla görülmesi tedavide ciddi sorun yaratmaktadır. Bu nedenle, günümüzde yeni antimikrobiyallerin tanımlanmasına gereksinim du-

yulmaktadır. Antimikrobiyal peptitler, bakteri, omurgalı, omurgasız ve bitkiler olmak üzere çeşitli canlılardan elde edilmiştir (1). İki grup peptit antimikrobiyalden daha önce uygulamaya giren gramisidin ve polimiksinler topikal olarak, glikopeptit antibiyotiklerden vankomisin ve teikoplamin ise enjektabl olarak tedavide kullanılmıştır (1, 2). Son

15 yıl süresince tedavi amacı ile hayvanlardan elde edilen 100 den fazla peptit tanımlanmıştır (3-5).

İlk olarak *Xenopus laevis* isimli Afrika kurbağasının derisinden magainin sınıfı katyonik peptit elde edilmiş ve geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitesi olduğu gösterilmiştir (3, 6). Peksiganan (MSI-78), magainin sınıfı peptitin sentetik analogu olup, 22 amino asit (Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>) uzunluğunda olduğu bildirilmiştir (7, 8).

Daha önce yapılan in vitro çalışmalarda klinik örneklerden soyutlanan Gram-pozitif ve Gram-negatif aerop ve anaerop bakterilerde etkili olduğu gösterilen (7, 9) peksiganan, topikal antimikrobiyal madde olarak kullanılmak üzere geliştirilmiştir (8, 10, 11).

Bu çalışmada, klinik örneklerden soyutlanan 580 Gram-pozitif ve Gram-negatif aerop bakteride peksigananın in vitro etkinliğinin standart mikrodilüsyon yöntemiyle saptanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 1999-2001 yılları arasında klinik örneklerden soyutlanan 132 *Escherichia coli*, 48 *Pseudomonas aeruginosa*, 43 *Klebsiella* spp., 17 *Enterobacter* spp. 13 *Proteus* spp. 126

koagülaz-negatif stafilokok, 89 *Staphylococcus aureus*, 87 *Enterococcus faecalis*, 25 *Enterococcus faecium* kökeni çalışmaya alındı. Bakterilerin tanımlanması; kolon morfolojisi, üreme ve Gram boyanma özelliği gibi klasik testlerin yanısıra, Sceptor (Becton Dickinson, USA) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı hastadan elde edilen ikinci bir köken çalışmaya alınmamıştır.

Etken maddesi sağlanan peksigananın (Magainin Pharmaceuticals Inc., USA) distile suda çözülerek 0.125-256 µg/ml arasındaki konsantrasyonu denenmiştir. NCCLS önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır (12). Kontrol kökeni olarak *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 580 Gram-pozitif ve Gram-negatif aerop bakteri kökeni incelemeye alınmıştır. Kökenlerin peksiganan minimum inhibitor konsantrasyonu (MİK) değerlerinin dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Peksiganan için MİK aralığı ve minimum inhibitor konsantrasyonu 50 ve 90 değerleri (MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub>) Tablo 2'de gösterilmiştir. Gram-pozitif bakteriler değerlendirildiğinde; koagülaz-negatif stafilokok, *S. aureus* ve *E. faecium* kökenlerinde MİK<sub>90</sub> değeri 16 µg/ml, *E. faecalis* kökenlerinde 256 µg/ml olarak saptanmıştır. Gram-negatif bakterilerde ise, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella*

**Tablo 1.** Klinik örneklerden soyutlanan 580 bakteride peksigananın MİK değerlerinin dağılımı

Mikro-organizma	No	Kökenlerin MİK dağılımları (µg/ml)												
		0.125	0.250	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
<i>Escherichia coli</i>	132				2	16	28	43	24	12	6	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48						7	16	15	3	3	3		1
<i>Klebsiella</i> spp.	43				1	2	7	10	11	8	2	1		1
<i>Enterobacter</i> spp.	17					1	1	7	5	2		1		
<i>Proteus</i> spp.	13													13
Koagülaz-negatif stafilokok	126		1	6	44	31	16	15	4	4	3	1		1
<i>Staphylococcus aureus</i>	89			2	4	5	22	27	21	3	4			1
<i>Enterococcus faecalis</i>	87					1	2	3	4	11	16	34	12	4
<i>Enterococcus faecium</i>	25				2	6	3	10	2	1	1			
Toplam	580	0	1	8	53	62	86	131	86	44	35	41	12	21

**Tablo 2.** Klinik örneklerden soyutlanan bakterilerde peksigananın MİK aralıkları, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri

Mikro-organizma	No	MİK (µg/ml)		
		% 50	% 90	Aralık
<i>Escherichia coli</i>	132	8	32	2-128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48	16	64	4->256
<i>Klebsiella</i> spp.	43	16	32	1->256
<i>Enterobacter</i> spp.	17	8	32	2-128
<i>Proteus</i> spp.	13	≥256	≥256	>256->256
Koagülaz-negatif stafilokok	126	2	16	0.25->256
<i>Staphylococcus aureus</i>	89	8	16	0.5->256
<i>Enterococcus faecalis</i>	87	128	256	2->256
<i>Enterococcus faecium</i>	25	8	16	1-64

spp. kökenlerinde MİK<sub>90</sub> değeri 32 µg/ml ve *P. aeruginosa* kökenlerinde MİK<sub>90</sub> değeri 64 µg/ml olarak saptanmıştır. *Proteus* spp. kökenlerinde MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değeri >256 µg/ml olarak bulunmuştur.

Kontrol kökenleri her çalışmada kullanılmıştır. Ge ve ark. (10) tarafından yapılan çalışmadaki kontrol kökenlerinde peksiganan için MİK değerleri esas alınarak değerlendirme yapılmıştır. Bu değerler, *S. aureus* ATCC 29213 için 8-16 µg/ml, *E. faecalis* ATCC 29212 için 32-64 µg/ml, *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için 4-8 µg/ml olarak saptanmıştır.

## TARTIŞMA

İnfeksiyon etkeni olan Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin klinik kullanımda bulunan antimikrobilyallere direnç oluşturduğu ve tedavide ciddi sorunlarla karşılaşıldığı bilinmektedir. Bu nedenle, yeni antimikrobilyallerin bulunması için girişimler sürmektedir. Katyonik peptitler, doğadaki canlıların mikro-organizmalara karşı savunmasında önemli antimikrobilyallar olarak değerlendirilmektedir (1, 2, 13).

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 580 Gram-pozitif ve Gram-negatif kökende magainin grubu katyonik peptitlerin sentetik analogu olan peksigananın etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar çeşitli çalışmalarda bildirilen sonuçlar ile uyum göstermektedir (6, 7, 9, 10).

İlk olarak Zasloff (3) kurbağa derisinden elde ettiği doğal peptitlerin bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesini saptamıştır. Zasloff ve ark. (6) 1988'de yayınladıkları çalışmada, dizilimi aynı doğal ve sentetik peptitlerin antimikrobiyal aktiviteleri yönünden farklılık göstermediğini gözlemişlerdir.

Fusch ve ark. (7), 1998'de yapılan çalışmada, 29 aerop bakterinin MİK değerlerinin dağılımını değerlendirmişlerdir. MİK değeri 64 µg/ml veya daha az olduğunda, bakteriler peksiganana duyarlı olarak kabul edilmişlerdir. Sözkonusu çalışmada, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, *S. aureus*, koagülaz negatif stafilocokların MİK<sub>90</sub> değeri 8- 64 µg/ml olarak saptanmış ve bu bakterilerin duyarlılık oranları % 96 ile % 100 arasında değiştiği görülmüştür. Aynı çalışmada *E. faecalis* kökenlerinde MİK<sub>90</sub> değeri > 256 µg/ml olarak saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Hancock REW. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997; 349: 418-22.
2. Akyar I, Rota S. Geniş spektrumlu doğal antibiyotikler: Katyonik peptidler. *Flora* 1999; 4: 26-33.
3. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5449-53.
4. Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defence system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 277-304.

Ge ve ark. (9) tarafından 1999 yılında yayımlanan benzer bir çalışmada; *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilocoklar, *E. faecium* kökenlerinin MİK<sub>90</sub> değerleri 4- 64 µg/ml olarak bulunmuştur. *Enterococcus faecalis* kökenlerinde MİK<sub>90</sub> değeri > 256 µg/ml olarak saptanmıştır. Ge ve ark. (10) aynı yıl içerisinde yayımlanan çalışmalarında, diabetik ayak ülserlerinden soyutlanan bakterilerde peksiganan duyarlılığı saptamışlardır. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, *S. aureus*, koagülaz-negatif stafilocoklar, *E. faecium* kökenleri için MİK<sub>90</sub> değeri 4-32 µg/ml olarak bildirilmiştir. *Enterococcus faecalis* ve *Proteus* spp. kökenlerinde ise, MIC<sub>90</sub> değeri sırasıyla 256 µg/ml ve > 256 µg/ml olarak saptanmıştır. *Enterococcus faecalis* ve *Proteus* spp. kökenleri diğer çalışmalarda da doğal ve sentetik peptitlere dirençli bulunmuştur (3, 6).

Katyonik peptitlerin in vitro aktiviteleri beklenildiği kadar yüksek olmamasına karşın, -laktamlar, kinolonlar, makrolitler ve linkosamidler gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere çoklu direnç gösteren bakterilerde peksiganana karşı çapraz direnç gözlenmediği bildirilmiştir (10).

Diğer katyonik peptitler gibi, magaininler bakteriyel membranların dış yüzeyindeki anyonik fosfolipitlere bağlanarak membran geçirgenliğini bozarlar. Bakteri hücresinin lizisine ve ölümüne neden olurlar (1, 9, 11). Ge ve ark. (9) *S. aureus* ve *S. epidermidis* kökenleri kullanarak yaptıkları çalışmada, MİK değerinin yarı konsantrasyonunda peksiganan bulunan ortamda çoklu pasajlardan sonra dirençli mutantların soyutlanmadığını bildirmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin, MİK değerine eşit peksiganan bulunan ortamda 20 dakika kadar kısa sürede bakterilerin hızla öldüğü bildirilmiştir. Sonuçlar, peksigananın bakterisidal olarak hızla etkili olduğunu göstermiştir. *Staphylococcus aureus* ve *P. aeruginosa* kökenlerinin kimyasal bir mutajen veya UV ışığına maruz kaldıklarında peksiganan-dirençli mutantlar saptanmadığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak; peksiganan hayvan kaynaklı katyonik peptitlerin magainin analogu olup, in vitro olarak geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Ayrıca katyonik peptitlerin birbirleri ile veya ticari olarak kullanılan antibiyotiklerle sinerji çalışmaları tedavide umut verici olarak görülmektedir (14-16).

5. **Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA, et al.** Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with *in vivo* activity. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41: 1738-42.
6. **Zasloff M, Martin B, Chen HC.** Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**; 85: 910-3.
7. **Fuchs PC, Barry AL, Brown SD.** *In vitro* antimicrobial activity of MSI-78, a magainin analog. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 1213-6.
8. **Feibush B, Snyder BC.** Oxidation of the N-terminal gly-residue of peptides: stress study of pexiganan acetate in a drug formulation. *Pharm Res* **2000**; 17: 197-204.
9. **Ge Y, Mac Donald D, Holroyd KJ, Thomsberry C, Wexler H, Zasloff MA.** *In vitro* antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43: 782-8.
10. **Ge Y, Mac Donald D, Henry MM, et al.** *In vitro* susceptibility to pexiganan of bacteria isolated from infected diabetic foot ulcers. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1999**; 35: 45-53.
11. **Jacob L, Zasloff M.** Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. *Ciba Found Symp* **1994**; 186: 197-216.
12. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Eight Informational Supplement. NCCLS Document M7-A4, MIC Testing. Villanova, Pa: NCCLS, **1998**.
13. **Hancock REW, Chapple DS.** Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 41: 1738-42.
14. **Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Fortuna M, Scalisa G.** *In vitro* activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **1999**; 44: 641-5.
15. **Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, et al.** Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Peptides* **2000**; 21: 1155-60.
16. **Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, et al.** Comparative activities of polycationic peptides and clinically used antimicrobial agents against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **2000**; 46: 807-10.