

KOBAYLARDA PENİSİLİNE DİRENÇLİ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* İLE OLUŞTURULAN PNÖMONİ MODELİNDE AMOKSİSİLİN VE LEVOFLOKSASİN ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARATIVE ACTIVITIES OF AMOXICILLIN AND LEVOFLOXACIN AGAINST PENICILLIN-RESISTANT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* INFECTED GUINEA PIGS IN A PNEUMONIA MODEL

Nevriye GÖNÜLLÜ¹ Ömer KÜÇÜKBASMACI¹ Özden BÜYÜKBABA BORAL²
Tolga ÖĞÜT² Mine ANĞ-KÜÇÜKER²

¹ İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü;

² İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; İstanbul

Anahtar Sözcükler: *Streptococcus pneumoniae*, amoksisilin, levofloksasin, pnömoni, deneysel infeksiyon

Key Words: *Streptococcus pneumoniae*, amoxicillin, levofloxacin, pneumonia, experimental infection

ÖZET

Penisiline yüksek dirençli *Streptococcus pneumoniae* ile kobaylarda oluşturulan pnömoni modelinde amoksisilinin ve levofloksasinin etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Sekizer kobaydan oluşan üç deney grubuna intratrakeal yoldan 1.4×10^8 bakteri verilmiştir. Amoksisilin grubuna günde 200 mg/kg amoksisilin, levofloksasin grubuna ise levofloksasin 7 mg/kg verilmiştir. Pozitif kontrol grubuna antibiyotik verilmemiştir. Kırksekizinci saatte kobaylar öldürülmüş, akciğerleri tartıldıktan sonra homojenize edilmiş ve kantitatif bakteri sayısı cfu/g olarak saptanmıştır. Deney sonunda her iki antibiyotiğin etkili olduğu ve istatistiksel olarak aralarında bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (amoksisilin-kontrol $p < 0.05$, levofloksasin-kontrol $p < 0.05$).

SUMMARY

The purpose of this study was to test the activities of amoxicillin and levofloxacin in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* infected guinea pigs. Guinea pigs were intratracheally inoculated with 1.4×10^8 bacteria and treated with amoxicillin 200 mg/kg/day and levofloxacin 7 mg/kg/day. A positive control group was infected but not received antibiotic. 48 h after bacterial challenge, guinea pigs were euthanised and the lungs were excised and weighed. The lungs were homogenized to determine the number of cfu per gram of tissue quantitatively. Both amoxicillin and levofloxacin reduced the number of cfu per gram comparing with the control group but the difference was not found significant statistically (amoxicillin-control $p < 0.05$, levofloxacin-control $p < 0.05$).

GİRİŞ

Bakteriyel pnömoninin en sık rastlanan etkeni *Streptococcus pneumoniae*, önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Özellikle son 20 yıldır bu etkenin penisiline ve diğer antibiyotiklere karşı direnci çok artmıştır ve bu nedenle araştırmacılar yeni tedavi arayışlarına başlamışlardır.

Deneysel modeller çeşitli antibiyotiklerin etkinliklerinin karşılaştırılmasında, hastalığın fizyopatolojisini daha iyi anlaya-

bilmek ve uygun terapötik dozları araştırmak için kullanılabılırler. Toplumda kazanılmış pnömoni etkenleri arasında *S. pneumoniae* en sık rastlanılması, antibiyotik direncinin giderek artması ile dikkat çekerken daha iyi tedavi şemaları bulabilmek için değişik hayvanlarda deneysel pnömoni modelleri kullanılmıştır (1-3).

Penisiline yüksek dirençli *S. pneumoniae*'ye karşı çeşitli antibiyotiklerin etkinliklerini araştıran hem deneysel hem

linik çalışma sayısı azdır. Bu nedenle, bu çalışma, penisiline yüksek dirençli [minimal inhibitör konsantrasyon (MİK 3 µg/ml)] *S. pneumoniae* suşu ile oluşturulan kobay pnömoni modelinde amoksisilin yüksek dozda (200 mg/kg/günde) ve yeni bir florokinolon olan levofloksasinin (7 mg/kg/günde) etkinliklerinin karşılaştırması amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İlaçlar: Amoksisilin toz halinde Deva Holding'den, levofloksasin ise Fako firmasından sağlanmıştır.

Bakteri : Transplantasyon ünitesinde yatan bir hastanın balgamından izole edilen ve tanısı optokine duyarlılık deneyi ve safrada erime deneyi ile doğrulanan bir *S. pneumoniae* suşu kullanılmıştır.

Minimal inhibitör konsantrasyon : Penisilin ve sefotaksim için E test, levofloksasin için agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Deney hayvanları: 250-300 g arası Dunkin Hartley türü kobaylar kullanılmıştır.

Kobay pnömoni modeli: Üç grup halinde sekiz tane kobaya intratrakeal olarak 1.4×10^8 cfu/ml *S. pneumoniae* verilmiştir. Hayvanlar intraperitoneal tiyopental ile uyutulmuştur (55 mg/kg). Trakea ekspoz edilirdikten sonra, steril bir iğne ile 0.5 ml bakteri süspansiyonu intratrakeal olarak verilmiştir. Deri insizyonu cerrahi ipek ile kapatılmıştır. Bu işlemden sonra, bakterinin solunum yollarından ilerlemesini kolaylaştırmak için deney hayvanı yaklaşık 15 saniye vertikal pozisyonda tutulmuştur. Bakteri inokulumu uygulandıktan bir saat sonra, 200 mg/kg/gün üç kez amoksisilin intraperitoneal olarak, diğer gruba levofloksasin 7 mg/kg/gün iki kez peroral gavaj ile verilmiştir. Pozitif kontrol grubuna antibiyotik verilmemiştir. Kırksekizinci saatte, kobaylar tiyopental ile (160 mg/kg) öldürülüp göğüs kafesleri açılmış ve akciğerler steril koşullarda çıkarılmıştır. Akciğerler tartıldıktan sonra 3 ml tuzlu su içeren cam homojenizatörlerde homojenize edilmiş ve onluk seri sulandırılmaları yapılmıştır. Bu sulandırmalardan %5 tavşan kanlı Muller-Hinton agar besiyerine ekim yapılarak üreyen bakteri sayısı cfu/g olarak saptanmıştır.

İstatistik: İstatistik incelemede tek yönlü ANOVA (Post-Hoc-LSD) testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Kullanılan *S. pneumoniae* suşunun penisilin MİK'i 3 µg/ml, sefotaksim MİK'i 1.5 µg/ml, levofloksasin MİK'i ise 0.25 µg/ml olarak saptanmıştır. Deney sonuçları Tablo 1'de log cfu/g olarak gösterilmiştir.

Deney sonunda her iki antibiyotik de kontrol grubuna göre akciğerdeki mikro-organizma sayısını düşürmüştür ve aradaki

fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (amoksisilin-kontrol $p < 0.05$, levofloksasin-kontrol $p < 0.05$). Yapılan Post-Hoc karşılaştırmada amoksisilin ve levofloksasin gruplarındaki kobayların akciğerindeki bakteri sayısı istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 1. Her üç grubun ortalama bakteri sayısı (log cfu/g)

	X ± SD	Min.	Maks.	İki yönlü anlamlılık
Amoksisilin	1.49 ± 0.67	0.74	2.52	F=18.49
Levofloksasin	1.63 ± 0.86	0.72	2.74	p < 0.001
Kontrol	3.98 ± 1.15	2.11	5.43	

X: Aritmetik ortalama; SD: Standart deviasyon

TARTIŞMA

Son yıllarda *S. pneumoniae*'nin antibiyotiklere karşı direncinin artması, solunum yolu infeksiyonlarının tedavisini çok değiştirmiştir. Çoğul dirençli suşların giderek tüm dünyada yayılması ile birlikte, araştırmacılar yeni tedavi arayışlarına başlamışlardır. Bu amaçla levofloksasin, gemifloksasin, moksifloksasin gibi yeni florokinolonlar geliştirilmiştir.

Çalışmada Ponte ve ark. (3)'nün tanımladığı deneysel pnömoni modeli kullanılmıştır. Bağışıklığı baskılanmamış olan kobaylarda, intratrakeal penisiline orta dirençli bir *S. pneumoniae* süspansiyonu inoküle edilmiştir. İki farklı doz şeklinde amoksisilin, sefotaksim ve meropenemin etkisi araştırılmıştır ve istatistiksel olarak bu üç antibiyotüğün etkinlikleri arasında bir fark bulunmamıştır.

Penisilin dirençli *S. pneumoniae* suşları ile deneysel pnömoni modelleri yakın bir zamana kadar immünsüpresyon yapıldıktan sonra oluşturulmaktaydı. Bunun nedeni de, penisiline dirençli *S. pneumoniae* suşlarının daha çok farelerde virulansı düşük olan serotiplere ait olmasıydı (örn: 14, 19, ve 23 F). Ayrıca farelerde virülen olduğu bilinen serotip 3'te penisiline dirençli suşlara rastlanmamıştır. Tateda ve ark. (1) CBA/J fareleri kullanarak intranasal inokülasyon yöntemiyle penisiline dirençli pnömokok ile pnömoni oluşturmuşlardır. Bu çalışmada, CBA/N, C3H/HeN, C3H/HeJ, C57BL/6 ve ICR fare türlerinde immünitesi baskılamaya gerek kalmaksızın penisiline dirençli ve virulansı düşük *S. pneumoniae* suşları ile pnömoni indüklenebilmektedir. Son yıllarda, deneysel pnömoni modeli immünitesi baskılanmamış kobaylarda ve tavşanlarda çalışılmaya başlanmıştır.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, penisiline dirençli pnömokoklara karşı en etkili olan antibiyotiklerin amoksisilin, sefotaksim, seftriakson ve imipenem olduğu gösterilmiştir (4, 5). Penisiline yüksek dirençli (MİK ≥ 2 µg/ml) suşlara karşı sefotaksim veya seftriakson, karbapenemler, glikopeptitler, florokinolonların *in vitro* deneylerde etkili bulunmuştur, ancak bu konuda yapılan klinik çalışmaların sayısı azdır. Bu suşların nadir bulunması, hem klinik hem deneysel

olarak deneyimlerin az olmasına yol açmıştır. Piroth ve ark. (6) yaptıkları çalışmada; günde 3 g amoksisilini, yüksek penisilin dirençli *S. pneumoniae* (MİK 4 µg/ml) suşu ile oluşturdukları deneysel pnömoni modelinde etkili bulmuşlardır. Nadir rastlanan ve daha yüksek MİK'i olan suşlara karşı, bu tedavinin başarısız olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (7-9).

Penisilinin yüksek dozda (150000-200000 U/kg/24 h) veya günde 3 g amoksisilinin uygulanmasından birkaç saat sonra serumda antibiyotik konsantrasyonları 2 µg/ml'nin üzerine ulaşmaktadır. Penisiline duyarlı ve düşük düzeyde penisilin direnci olan *S. pneumoniae* suşları ile olan infeksiyonlarda bu dozlar ile yeterli bir tedavi sağlanmaktadır. Yüksek düzeyde penisilin direnci olan suşlar (MİK'i ≥2 µg/ml) ile oluşan infeksiyonlarda vankomisin, florokinolonlar kullanılabilir veya *in vitro* antibiyotik duyarlılık paternlerine göre antibiyotik seçimi yapılır (10). Penisiline yüksek dirençli pnömokokların tedavisinde florokinolon grubundan olan levofloksasin ile henüz klinik çalışmaların sayısı az olmasına karşın risk faktörlerini taşıyan ve yatan hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, levofloksasinin günde iki kez 500 mg dozunda etkili olduğunu gösterilmiştir (11).

Toplumda kazanılmış pnömonilerin etkenlerinin başında *S. pneumoniae* gelmektedir. *Haemophilus influenzae*, *Myc-*

plasma pneumoniae, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, yaşlılarda *Staphylococcus aureus* ve enterobakteriler, anaeroplardır diğer etkenler arasındadır. Pnömoni olgularının %50'sinde antibiyoterapinin erken başlanması ve tanı testlerinin yetersiz yapılmasından dolayı, etken saptanamamaktadır. Pnömonoklarda beta-laktam direnci penisilin bağlayan proteinlerdeki değişikliklere bağlıdır. MİK'i >0.06 µg/l olan suşların, penisiline azalmış duyarlılıkta oldukları kabul edilir. MİK'i >1 µg/l ise yüksek dirençli suşlar olarak değerlendirilir. Türkiye'de pnömokoklarda penisilin direnci, Fransa, Macaristan gibi ülkelerden farklı olarak, daha düşük düzeylerde seyretmektedir. Türkiye'de penisilin direnci %30 oranında olup yüksek dirençli suşların %10'un altında kaldığını bildirilmiştir (12) Kinolonlardan, ofloksasin ve siprofloksasin pnömokok infeksiyonlarının tedavisinde etkili olmadığından önerilmemektedir. Levofloksasin ve moksifloksasin gibi yeni kinolonlar artan Gram-pozitif etkinliklerinden dolayı bu infeksiyonların tedavisinde etkili bulunmuştur.

Çalışmada penisiline yüksek dirençli olan bir *S. pneumoniae* ile kobaylarda deneysel pnömoni oluşturulmuştur. Amoksisilinin ve levofloksasinin etkinliklerinin karşılaştırılması sonucunda, her iki antibiyotik etkili bulunmuş ve istatistiksel olarak aralarında bir fark bulunmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Tateda K, Takashima K, Miyazaki H, Matsumoto T, Hatori T, Yamaguchi K. Noncompromised penicillin-resistant pneumococcal pneumonia CBA/J mouse model and comparative efficacies of antibiotics in this model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1520-5.
2. Gavalda J, Capdevila JA, Almirante B, et al. Treatment of experimental pneumonia due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in immunocompetent rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 795-801.
3. Ponte C, Parra A, Nieto E, Soriano F. Development of experimental pneumonia by infection with penicillin-insensitive *Streptococcus pneumoniae* in guinea pigs and their treatment with amoxicillin, cefotaxime, and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2698-702.
4. Pallares R, Viladrich PF, Linares J, Cabellos C, Gudiol F. Impact of antibiotic resistance on chemotherapy for pneumococcal infections. *Microb Drug Resist* 1998; 4: 339-44.
5. Levy D, Gehanno P, Olivier C, Maruejols C, Boucot I, Leblanc F. Epidémiologie de la flore nasopharyngée au cours des otites moyennes aiguës de l'enfant en 1997. *Méd Mal Infect* 1998; 28: 8-22.
6. Piroth L, Martin L, Coulon A, et al. Development of a new experimental model of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia and amoxicillin treatment by reproducing human pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2484-92.
7. Metlay JP, Hofma J, Cetron MS, et al. Impact of penicillin susceptibility on medical outcomes for adult patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 520-8.
8. Feikin DR, Schuchat A, Feikin DR, Schuchat A, Kolczak M, Barret NL. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995-1997. *Am J Public Health* 2000; 90: 223-9.
9. Conference de consensus: Quelle doit être l'antibiothérapie de première intention des pneumonies aiguës communautaires? Quelle doit être sa réévaluation en cas d'échec, compte tenu de l'évolution des agents responsables, des résistances du pneumocoque et cela justifie-t-il des associations? *Méd Mal Infect* 2000; 30: 573-582.
10. Barlett JG, Breiman RF, Mandell LA, File TM. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 811-38.
11. Norrby SR, Petermann W, Willcox PA, Vetter N, Salewski E. A comparative study of levofloxacin and ceftriaxone in the treatment of hospitalized patients with pneumonia. *Scand J Infect Dis* 1998; 30: 397-406.
12. Gür D, Özalp M, Sümerkan B, et al. Prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes*: results of a multicentre study in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 207-11.