

ÇOĞUL DİRENÇLİ PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilara ÖĞÜNÇ¹, Mehmet Bakır SAYGAN¹, Gözde ÖNGÜT¹, Dilek ÇOLAK¹,
Filiz GÜNŞEREN², Meral GÜLTEKİN¹

ÖZET

Antibiyotiklere çoğul dirençli 49 *Pseudomonas aeruginosa* suşunda imipenem+amikasin; seftazidim+amikasin; piperasilin/tazobaktam+amikasin kombinasyonlarının E test yöntemi ile etkinliği araştırılmıştır. İmipenem+amikasin; seftazidim+amikasin ve piperasilin/tazobaktam+amikasin kombinasyonları suşların 21 (% 43); 25 (% 51); 40 (% 82)'inde sinerjik etki göstermiştir. Piperasilin/tazobaktam+amikasin kombinasyonu ile antagonist etki gözlenmez iken, suşların 2 (% 4)'sinde imipenem+amikasin; 11 (% 22)'inde seftazidim+amikasin kombinasyonunun antagonist etki gösterdiği saptanmıştır. İmipenem ve amikasin dirençli 31 suşun 12 (% 39)'sinde; seftazidim ve amikasin dirençli 34 suşun 16 (% 47)'sında; piperasilin/tazobaktam ve amikasin dirençli 16 suşun 14 (% 88)'ünde söz konusu antibiyotik kombinasyonları ile sinerjik etki elde edilmiştir.

SUMMARY

Investigation of the efficacy of the antibiotic combinations against multiple-antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa strains.

The efficacy of imipenem plus amikacin, ceftazidime plus amikacin and piperacillin/tazobactam plus amikacin combinations against 49 *Pseudomonas aeruginosa* strains with multiple antibiotic resistance were determined by E test. Imipenem+amikacin, ceftazidime+amikacin, piperacillin/tazobactam+amikacin combinations were found to be synergistic against 43%, 51% and 82% of the strains, respectively. No antagonism was observed for piperacillin/tazobactam+amikacin combination, while imipenem+amikacin combination was antagonistic for 2 strains (4%) and ceftazidime+amikacin for 11 strains (22%). Synergy was demonstrated for 12 (39%) of 31 strains with imipenem and amikacin resistance, 16 (47%) of 34 strains with ceftazidime and amikacin resistance and 14 (88%) of 16 strains with piperacillin/tazobactam and amikacin resistance for the combinations tested.

GİRİŞ

P.aeruginosa, hastane infeksiyonlarının önde gelen etkenlerinden biridir. Pek çok antibiyotik grubuna intrinsik olarak dirençli olduğundan ve anti-psödomonal ajanlara da giderek direnç kazandığından neden olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlük yaşanmakta-

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1- Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2- Klinik Bakterioloji ve Infeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya.

dır. Tek olarak verilen antibiyotiğe de kısa sürede direnç geliştirmeleri ve ciddi infeksiyonlara neden olmalarından dolayı, *Paeruginosa* infeksiyonlarında kombine antibiyotik tedavisi uygulanır (11).

Kombine olarak kullanılan antibiyotiklerin in-vitro etkileşimleri sinerji testleri ile araştırılır. Antibiyotikler, farmakodinamik etkileşimler sonucunda ya birbirlerini etkilemezler ya da antagonist veya sinerjik etki gösterirler. Söz konusu etkileri araştırmak amacı ile, "iki boyutlu sulandırım (dama tahtası sulandırım), zamana bağlı ölüm incelemesi" yöntemleri kullanılır (6,8). Bu yöntemler oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Son yıllarda, E test yöntemi ile, her bir antibiyotiğin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında gösterdikleri MİK değerlerinin matematiksel olarak hesaplanması yolu ile antibiyotik kombinasyonlarının etkisinin yorumlanabileceği bildirilmektedir (1-3,12).

Sunulan çalışmada, hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen çoğul dirençli 49 *Paeruginosa* suşunda, imipenem+amikasin; seftazidim+amikasin; piperasilin/tazobaktam+amikasin kombinasyonlarının in-vitro etkilerinin E test yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı bakteri stoklarından seçilen çoğul dirençli 49 *Paeruginosa* suşunun (Tablo 1) pasajı yapılarak, taze kültürlerinden 1 no.lu McFarland standardına göre bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Her bir suş için dört petriye, steril eküvyonlarla üç farklı açıda homojen bir şekilde ekim yapılmış, etüvde 15-20 dk kurutulduktan sonra her bir plağa antibiyotiklerin MİK değerlerini saptamak amacı ile birer E test şeriti (AB Biodisk, İsviçre) yerleştirilmiştir. Diğer plaklara, önce amikasin E test şeridi konmuş ve 60 dk 37°C'de inkübe edildikten sonra, amikasin şeritleri kaldırılarak, antibiyotik yoğunluk değerleri eş gelecek şekilde, ikinci, üçüncü, dördüncü plaklara imipenem, seftazidim ve piperasilin/tazobaktam E test şeritleri yerleştirilmiştir. 37°C'de 18-24 saat inkübasyonun sonunda, inhibisyon zonunun E test şerit kenarını kestiği noktadaki antimikrobiyal yoğunluk Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) olarak kaydedilmiştir. Örneğin, A ve B antibiyotiklerinin kombinasyonlarının etkisi şu şekilde değerlendirilmiştir:

Tek başına A antibiyotiğinin MİK değeri: a

Tek başına B antibiyotiğinin MİK değeri: b

Her iki antibiyotiğin birlikte kullanıldıklarında MİK değeri: c

$$\text{FIC (Fractional Inhibitory Concentration) A} = \frac{c}{a}$$

$$\text{FIC B} = \frac{c}{b}$$

$$\text{FIC indeks} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

FIC indeks değerine göre antibiyotik kombinasyonlarının etkisi yorumlanmıştır (Tablo 2).

Araştırmada, kontrol suşu olarak *Paeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

Tablo 1. Sinerji testi uygulanan 49 *P.aeruginosa* suşunun antibiyotiklere direnç özellikleri.

MIK özellikleri (µg/ml)	Amikasin	İmipenem	Seftazidim	Piperasilin/tazobaktam
MIK aralığı	4-256	0.5-32	0.8-256	1-256
MIK ₅₀ / MIK ₉₀	48/256	24/32	256/256	24/256
Dirençli suş sayısı (%)	36 (74)	33 (68)	37 (76)	17 (35)

Tablo 2. FIC indeksi değerleri.

FIC İndeks	Sinerjik etki		Fark yok > 1 - < 2	Antagonist etki ≥ 2
	Supra-aditif etki ≤ 0.5	Aditif etki > 0.5-1		

BULGULAR

Araştırmada kullanılan çoğul dirençli 49 *P.aeruginosa* suşu için kombinasyon etkinlik sonuçları ise tablo 3'de belirtilmiştir. Kombinasyon etkinliklerinin araştırıldığı antibiyotiklerin her ikisine de dirençli olan suşların kombinasyon test sonuçları imipenem+amikasin için tablo 4, seftazidim+amikasin için tablo 5, piperasilin/tazobaktam+amikasin için tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 3. Çoğul dirençli *P.aeruginosa* suşlarında (n: 49) antibiyotik kombinasyon test sonuçları.

Etki	Amikasin+imipenem		Amikasin+seftazidim		Amikasin+piperasilin/ tazobaktam		
	n	%	n	%	n	%	
Sinerjik	Supra-aditif	6	12	9	18	29	60
	Aditif	15	31	16	33	11	22
Farksız	26	53	13	27	9	18	
Antagonist	2	4	11	22	-	-	

Tablo 4. Amikasin ve imipeneme dirençli suşların (n: 31) antibiyotik kombinasyon test sonuçları.

Etki	n		%	
	Supra-aditif	4	13	13
Aditif	8	26	26	84
Farksız	17	55	55	177
Antagonist	2	6	6	19

Tablo 5. Amikasin ve seftazidime dirençli suşların (n: 34) antibiyotik kombinasyon test sonuçları.

Etki	n	%
Sinerjik	Supra-aditif	5
	Aditif	11
Farksız	8	24
Antagonist	10	29

Tablo 6. Amikasin ve piperasilin/tazobaktama dirençli suşların (n: 16) antibiyotik kombinasyon test sonuçları.

Etki	n	%
Sinerjik	Supra-aditif	12
	Aditif	2
Farksız	2	12
Antagonist	-	-

TARTIŞMA

Paeruginosa, yurdumuzun diğer merkezlerinde olduğu gibi, hastanemizde de nozokomiyal enfeksiyonların en sık soyutlanan etkenlerindedir (10). Antibiyotiklere giderek artan direnç oranları nedeniyle de "sorun" mikroorganizmalardır (11). Öyle ki, Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarından verilen *Paeruginosa* antibiyotik duyarlılık, daha doğrusu direnç raporunda klinisyen tedavide kullanabileceği antibiyotiği seçmekte zorlanmaktadır. Acaba, bu aşamada antibiyotik kombinasyon testleri tedavi rejiminin belirlenmesinde bir yarar sağlayabilir mi? Sunulan çalışma, bu soru ile planlanmış araştırmalar zincirinin başlangıcıdır. Bu amaçla kültür stoklarımızdan, hastane enfeksiyonu etkeni, çoğul dirençli *Paeruginosa* suşları seçilmiştir.

Paeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde beta-laktam+aminoglikozid; kinolon+aminoglikozid; beta-laktam+kinolon gibi antibiyotik kombinasyonları uygulanır. Çalışmamızda, imipenem+amikasin; seftazidim+amikasin ve piperasilin/tazobaktam+amikasin kombinasyonlarının in-vitro etkinliği araştırılmıştır.

Kombinasyon etkinlik sonuçları üretici firma (AB Biodisk, İsviçre) tarafından "sinerji, aditif etki, fark yok ve antagonizm" şeklinde yorumlanmaktadır. Ancak, sinerji, sumasyon (aditif etkileşme) veya potansiyalizasyon şeklinde olur. İki ilaç birlikte verildiklerinde oluşturdukları kombine etki, eğer tek başlarına verildiklerinde yaptıkları bireysel etkinin cebirsel toplamına eşit ise iki ilaç arasındaki etkileşme aditif (sumasyon) etkileşme olarak yorumlanır. Eğer kombine etki bireysel etkilerin beklenen sumasyonundan fazla ise potansiyalizasyondan söz edilir ki, bu etkileşmeye supra-aditif etkileşme adı verilir (8). Bu nedenle bulgularımız "supra-aditif, aditif etki, fark yok ve antagonizm" şeklinde ifade edilerek, "supra-aditif ve aditif etkiler" sinerji başlığı altında toplanmıştır (Tablo 2).

Çoğul dirençli 49 *Paeruginosa* suşunun 2 (% 4)'sinde imipenem+amikasin kombinasyonu, 11 (% 22)'inde seftazidim+amikasin kombinasyonu antagonist etki göstermiştir. Piperasilin/tazobaktam+amikasin kombinasyonu ile antagonizm saptanmamıştır (Tablo 3).

Paeruginosa suşlarında aminoglikozid+beta-laktam antibiyotik kombinasyonlarının in-vitro sinerjik etkisi olduğu şeklindeki bilgilerimiz ile bu verilerimiz çelişiyor gibi gözüküyorsa da, antagonizm saptanan söz konusu suşlar hem amikasin ve imipeneme (Tablo 4) (n: 2), hem de amikasin ve seftazidime (Tablo 5) (n: 10) ayrı ayrı dirençlidirler. Dolayısı ile, her iki antibiyotiğe de dirençli olan suşlarda antagonist etki saptanmıştır. Seftazidim+amikasin kombinasyonu ile antagonist etki saptanan sadece bir suş her iki antibiyotiğe de ayrı ayrı dirençli değildir. Aslında, ilginç olan antibiyotiklere dirençli olan suşlarda sinerjik etki elde edilmesidir. Amikasin ve imipeneme dirençli 31 suşun 12 (% 39)'sinde, amikasin ve seftazidime dirençli 34 suşun 16 (% 47)'sında söz konusu kombinasyonlar ile sinerjik sonuç sağlanmıştır (Tablo 4, Tablo 5). Sinerji oranı, amikasin ve piperasilin/tazobaktama dirençli suşlarda % 88'dir (Tablo 6). Tüm suşlar için "sinerji" değerlendirmesi yapıldığında imipenem+amikasin kombinasyonunun % 43, seftazidim+amikasin kombinasyonunun % 51, piperasilin/tazobaktam+amikasin kombinasyonunun % 82 oranlarında sinerjik etki gösterdiği saptanmıştır (Tablo 3). Kocazeybek ve ark. (9) 50 *Paeruginosa* suşu ile çalışmışlar; beta-laktam+aminoglikozit kombinasyonu ile, kinolon+aminoglikozid kombinasyonuna göre daha yüksek sinerji oranlarını elde etmişler ve her iki antibiyotiğe de duyarlı olan suşlarda sinerjik etkinin her iki antibiyotiğe de dirençli olanlardan daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Karakoç ve Gerçeker (7) seftazidim+amikasin kombinasyonu ile, meropenem+amikasin kombinasyonuna göre sinerji oranının daha yüksek (% 70,8, % 40) olduğunu belirtmişlerdir. Şüphesiz sinerji oranlarının çalışılan suşların o antibiyotiklere ayrı ayrı direnç oranları temelinde tartışılması gerekmektedir. Nitekim, söz konusu çalışmada (7) suşların % 96'sı amikasin, % 74'ü seftazidime duyarlıdır. Bizim araştırmamızda ise suşların % 74'ü amikasin, % 76'sı seftazidime dirençlidir (Tablo 1). Bu nedenle, kombinasyon test sonuçları, çalışılan bakteri popülasyonunun direnç özelliğine göre ayrı ayrı değerlendirilmeli, yorumlanmalıdır.

Antibiyotiklerin birlikte kullanımlarının in-vitro E test yöntemi ile değerlendirilmesine ilişkin henüz çok az sayıda çalışma söz konusudur ve bu yöntemin standart olarak kullanılabilir hale gelmesinden önce bu tür çalışmalara gereksinim vardır (3-5,9,12). Çok değil, on yıl önce yayımlarımızın tartışma kısmında "antibiyotik duyarlılık testlerinin mutlak yapılması ve tedavinin elde edilen sonuçlara göre planlanması gerekliliğini" vurguluyorduk. Söz konusu testler artık her merkezde yapılıyor, ancak günümüzde özellikle *Paeruginosa* gibi "sorun" mikroorganizmalarda gelinen nokta, çoğul antibiyotik direnci karşısında klinisyenin tedavi rejimini nasıl belirleyeceğidir. Çalışma sonuçlarımızın ışığı altında, "çoğul dirençli *Paeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde piperasilin/tazobaktam+amikasin kombinasyonu söz konusu antibiyotiklere ayrı ayrı direnç olsa bile, in-vivo kullanımda da sinerjik etki gösterip başarılı sonuç alınabilecek mi" sorusu akla gelmektedir. Tartışmaya açılacak bir diğer konu ise, antibiyotiklere direnç saptandığında in-vitro kombinasyon testlerinin değerinin ne olacağıdır. Belki de, önümüzdeki yıllarda Mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyotiklere direnç kazanmış mikroorganizmalar için kombinasyon testlerini çalışmamız gerekli olacaktır.

Araştırmamızda kullandığımız suşlar, geriye dönük olarak stoklarımızdan seçtiğimiz çoğul dirençli *Paeruginosa* suşlarıdır. Retrospektif olarak bu suşların soyutlandığı hastaların dosyalarından tedavi rejimlerinin sonuçları sağlıklı olarak değerlendirilememiştir. Bu nedenle, çalışmamızın bundan sonraki aşamasında, ileriye dönük olarak in-vitro kombinasyon testi sonuçlarının eş zamanlı olarak hastaların klinik verileri ile değerlendirmesi planlanmıştır. Diğer merkezlerde de yapılacak çalışmalar sonucunda, çoğul dirençli mikroorganizmaların antibiyotik direnç oranları yanı sıra kombinasyon test sonuçlarının da tartışılması ile, tedavi rejimlerinin belirlenmesinde faydalı sonuçlar elde edilmesi umulabilir.

TEŞEKKÜR: Araştırmada kullanılan E test şeritlerini temin eden Hemakim Tıbbi Ürünler Tic. Ltd. Şti.'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1- Bolmström A: Determinations of minimum bactericidal concentrations, kill curves, and postantibiotic effects with the E test technology, *Diagn Microbiol Infect Dis* 19: 3 (1994).
- 2- Bolmström A, Arvidson S, Ericsson M, Karlsson A: New in vitro models for studying antibiotic combinations using predefined antibiotic gradients, *16th International Congress of Chemotherapy*, Jerusalem (1989).
- 3- Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA: Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E test, time-kill, and checkerboard methods, *Diagn Microbiol Infect Dis* 38: 43 (2000).
- 4- Cercenado E, Garcia-Garrote E, Bouza E: Activity of different antimicrobial combinations against methicillin and teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci. Utility of the E-test for the determination of the effects of antimicrobial combinations, *39th ICAAC*, Abstr No. 880, San Francisco (1999).
- 5- Cercenado E, Garcia-Garrote E, Bouza E: Effect of linezolid with vancomycin against highly vancomycin-resistant enterococci: Utility of the E-test for the determination of the effects of antimicrobial combinations, *39th ICAAC*, Abstr No. 881, San Francisco (1999).
- 6- Durmaz G, Kaya D, Kiraz N: *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı imipenem-amikasin kombinasyonunun etkinliği, *Mikrobiyol Bül* 30: 13 (1996).
- 7- Karakoç B, Gerçeker AA: Seftazidim ve meropenemin tek başına ve amikasin ile kombinasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına in vitro etkilerinin araştırılması, *ANKEM Derg* 14: 157 (2000).
- 8- Kayaalp SA: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, İlaçların arasındaki etkileşimler 8. baskı, Cilt 1, s. 109, Hacettepe TAŞ Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara (1998).
- 9- Kocazeybek B, Ayyıldız A, Ordu A, Küçükateş E, Çakan H, Gülsoy Ö: Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen çoğul dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının etkisinin E test yöntemiyle araştırılması, *ANKEM Derg* 14: 152 (2000).
- 10- Mamıkoğlu L, Günseren F, Özçelik FT, Saba R, Sarıgül F, Atakan P, Gültekin M: Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde hastane infeksiyonları: 1994-1995, *Hastane İnfeksiyon Derg* 2: 42 (1998).
- 11- Pollack M: *Pseudomonas aeruginosa*, "GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5.baskı" kitabında s. 2310, Churchill Livingstone, Philadelphia (2000).
- 12- White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA: Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test, *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1914 (1996).