

İMİPENEMİN NORMAL VE SPLENEKTOMİLİ SIÇANLARDA SERUMUN BAKTERİSİDAL AKTİVİTESİNE ETKİSİ*

EFFECT OF İMİPENEM ON SERUM BACTERICIDAL ACTIVITY OF
NORMAL AND SPLENECTOMIZED RATS

Güner SÖYLETİR**, Ayşegül ESKİTÜRK**, Meral DEMİREL***
Necdet DUMAN**, Candan Bozok JOHANSSON**

Özet: Normal (Sham operasyonlu) ve splenektomili sıçanlarda *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı serum bakterisidal aktivite (SBA)'sini ve imipenemin bu aktiviteye katkısını araştırmak üzere yapılan bu çalışmada; operasyondan 12 hafta sonra intranasal olarak 3×10^8 cfu/ml ($7 \times LD_{50}$) bakteri inokülasyonu ile deneysel pnömoni oluşturulmuş, inokülasyondan hemen önce ve 12 gün sonra alınan serum örneklerinde IgM düzeyleri, SBA ve imipenemin bu aktiviteye katkısı araştırılmıştır. *P.aeruginosa* inokülasyon öncesi serumların hepsine dirençliyen, enfeksiyon sonrasında antibiyotik katkısı olsun ya da olmasın SBA'ya duyarlı hale dönüşmüştür. Splenektomili sıçanlardaysa sadece imipenemin katkısıyla SBA gözlenmiştir. Sonuç olarak; düşük antikor düzeyi olan splenektomili hastalarda oluşacak sepsislerde yüksek mortaliteyi azaltmak üzere imipenemin bu katkısından yararlanılabilir.

Anahtar kelimeler: İmipenem, Serum bakterisidal aktivitesi.

Summary: In order to investigate bactericidal activity of sera obtained from sham operated and splenectomized rats; experimental pneumonia was constituted by inoculating 3×10^8 cfu/ml ($7 \times LD_{50}$) suspension of *Pseudomonas aeruginosa* intranasally 12 weeks after inoculation. IgM levels, serum bactericidal activity (SBA) and contribution of imipenem to this activity was determined in sera collected before and 12 days after inoculation. Test strain which was found to be resistant initially converted to be susceptible to the sera of sham operated rats obtained after infection with or without aid of antimicrobial. However sera collected from splenectomized rats after infection showed SBA in the presence of imipenem only. In conclusion; to reduce high mortality rate of *Pseudomonas* sepsis in splenectomized patients one can benefit this effect of imipenem on SBA.

Key words: *Imipenem, Serum bactericidal activity.*

* VIIth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division (July 3rd-8th 1994, Prague, Czech Republic)'de sunulmuştur.

** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

*** Şişli Etfal Hastanesi, III. Cerrahi Kliniği, İstanbul.

G İ R İ Ş

İnsan immün sisteminin temel organlarından biri olan dalağın özellikle kapsüllü bakterilere karşı savunmada önem taşımakta olduğu ve dalağı alınmış kişilerde enfeksiyon riskinin arttığı 1960'lardan beri bilinmektedir (1). Splenektomili konakta *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağlı enfeksiyon riski % 9.8 olmakla beraber, mortalite % 78 oranında seyretmektedir (2). Gram negatif basillerin enfeksiyon yapabilmelerinde insan serumunun bakterisidal etkisine direnç göstermeleri önemli bir etkidir ve bakteriyemi yapan çoğu Gram negatif bakteride bu direnç gözlenmektedir (3). Bazı antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonlarda bakteriyi serumun bakterisid aktivitesine duyarlı hale getirdikleri, bazılarının ise bakteri duyarlılığını artırdığı bilinmektedir (4).

Bu çalışmada, hayvan modeli kullanılarak, dalağın *P.aeruginosa*'ya karşı serumun bakterisidal aktivitesini etkileyip etkilemediği ve bu etkinin varlığında bir beta laktam antibiyotik olan imipenemin katkısı incelenmiştir.

MATERYAL ve METOD

Test Hayvanları : Bu çalışma; 4 haftalık, ortalama ağırlıkları 100 gr olan, 20 erkek Wistar-Albino sıçan ile yapıldı. Hayvanlar ortalama ısı 22 ± 1 °C, nemi % 65-% 70 olan özel havalandırma sistemli odalarda ve ayrı kafeslerde tutuldu. Deneyler uluslararası hayvan araştırmaları etik standartları çerçevesinde uygulandı.

Cerrahi Yöntem : Eter anestezisi altında ve aseptik koşullarda 20 hayvana laparotomi uygulandı. Hayvanlar Sham operasyonu yapılanlar (n: 10) ve splenektomi yapılanlar (n: 10) olarak ikiye ayrıldı. Abdominal insizyonlar 6/0 prolen sütürler ile iki tabaka olarak kapatıldı ve hayvanlar tekrar kafeslerine konuldu.

Bakteri Verilmesi : Deneyde sepsisli bir hastanın trakeal sekresyonundan izole edilen *P.aeruginosa* suşu kullanıldı. Triptik soy sıvı besiyerine pasajı yapılan suş 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde bir gece inkübe edildi ve 3×10^8 cfu/ml yoğunluğa ayarlandı. Operasyondan 12 hafta sonra tüm hayvanlardan kuyruk kanı alınarak serumları ayrıldı (İnokülasyon öncesi serumları). Ardından, taze hazırlanan bakteri süspansiyonundan tüm hayvanlara intranasal olarak 0.3'er ml, günde iki kez verildi (İntraperitoneal yolla bulunan LD₅₀'nin 7 katı). Bakteriyel inokülasyon hafif eter anestezisi altında uygulandı. İnokülasyondan hemen önce ve pnömoni gelişmesine rağmen ölmeyen sıçanlarda (splenektomi grubu, n: 6\Sham operasyon grubu, n: 6) inokülasyondan 12 gün sonra kuyruk kanları alınarak serumları ayrıldı (İnokülasyon sonrası serumları).

Antibiyotik Hassasiyet Çalışması : İmipenem baz toz halinde Merck Sharp and Dohme firmasından sağlandı. İmipenem MİK (Minimal İnhibe edici Konsantrasyon) ve MBK'u (Minimal Bakterisidal Konsantrasyon) Müeller Hinton sıvı ve agar besiyerleri kullanılarak standart yöntemlerle belirlendi (5).

Serumun Bakterisidal Aktivitesinin Araştırılması : *P.aeruginosa*, Müeller Hinton sıvı besiyerinde 37 °C'de bir gece inkübe edildikten sonra, önce McFarland 0.5 standardına

uyacak yoğunlukta bir süspansiyon hazırlandı ve bu süspansiyon 1/100 oranında sulandırılarak deneyde kullanılacak yoğunluk elde edildi (1.5×10^6 cfu/ml). Sıçanlardan inokülasyon öncesi ve inokülasyondan 12 gün sonra alınan serumlar 1:1 oranında PBS ile dilüe edildi ve bunlardan 0.8'er ml alınarak üzerlerine 0.1 ml *P.aeruginosa* süspansiyonu ve 0.1 ml imipenem çözeltisi eklendi. İmipenem son konsantrasyonu 1/2 MİK olacak şekilde hazırlandı. Kontrol tüplerine 0.1 ml imipenem yerine Müeller Hinton sıvı besiyeri (MHB) konuldu. Bu karışımlar aşağıdaki şekilde gruplandırılarak çalışıldı:

- 1a. Normal (Sham operasyonlu) sıçan serumları + bakteri süspansiyonu + MHB (Kontrol).
- 1b. Normal (Sham operasyonlu) sıçan serumları + bakteri süspansiyonu + imipenem çözeltisi.
- 2a. Splenektomi yapılmış sıçan serumları + bakteri süspansiyonu + MHB (Kontrol).
- 2b. Splenektomi yapılmış sıçan serumları + bakteri süspansiyonu + imipenem çözeltisi.

Karışımlar 37 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra tüpler buz içine konularak reaksiyon durduruldu. Her gruptaki tüplerden 1/10 oranında birer dizi dilüsyonlar hazırlanarak, bunların herbirinden 0.1'er ml jelöz besiyerine ekildi. 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonrası koloni sayımı yapıldı. Diğer yandan her grup hayvanın inokülasyon öncesi ve enfeksiyon sonrası serumlarındaki IgM düzeyleri radyal immunodifüzyon yöntemi kullanılarak bakıldı (SEROTEC; Rat IgM test kit). İstatistiksel değerlendirme Student's t test kullanılarak yapıldı.

S O N U Ç L A R

İmipenemin MİK'u 1 µg/ml ve MBK'u 4 µg/ml olarak bulundu. Deney sonucunda bulunan ortalama bakteri sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1
Ortalama Bakteri Sayıları (log 10 cfu/ml)

	Sham Operasyonlular			Splenektomililer	
	iÖ**	is***		iÖ	is
1a	6.0	5.48	2a	6.23	6.15
1b	5.70	5.31	2b	5.98	5.48

* Başlangıç inokülasyonu: 6.63 log₁₀ cfu/ml.

** Bakteriyel inokülasyon öncesi.

*** İnokülasyondan 12 gün sonra.

Serumun bakterisidal aktivitesine hassasiyet başlangıç değerinden log (% 90) cfu düşme olarak değerlendirildi. Bu tanımlamaya göre *P.aeruginosa* başlangıçta alınan tüm serum örneklerine dirençliyen, inokülasyondan 12 gün sonra alınan normal sıçan serumlarına imipenem olsun veya olmasın hassas hale geldi. Oysa splenektomi grubunda ancak inokülasyondan 12 gün sonra alınan serumlar sadece imipenemin katkısı varsa bakterisidal etki gösterebildi. Serumlar IgM düzeyleri açısından incelendiğinde Sham operasyonlu sıçanlarda ortalama IgM değeri 1245 ± 174.5 mg/ml, splenektomili sıçanlarda 915 ± 216.3 mg/ml olarak bulundu ($p < 0.001$).

T A R T I Ş M A

Splenektomi yüksek mortaliteyle seyreden bakteriyel enfeksiyonlar açısından önemli bir risk faktörüdür. Bu enfeksiyonlar başta *S.pneumoniae* olmak üzere çoğunlukla kapsüllü bakteriler tarafından oluşturulmaktadır (6). Gram negatiflere bağlı enfeksiyon riski düşük olmakla beraber mortalite çok yüksek oranlarda seyretmektedir. Gram negatif bakteri enfeksiyonlarına karşı savunmada insan serumunun bakterisidal etkisinin önemli 1960'lardan beri bilinmektedir (7). Serumun hassas bakterileri öldürebilmesi esas olarak kompleman sisteminin bir özelliği olup klasik ya da alternatif yolla aktive edilebilmektedir (8). Serumun bakterisidal etkisine direnç gösterme bakteri virulansında önemli olup doku penetrasyonu yapabilen ve kana geçebilen bakterilerde bu direnç kommensal veya invaziv olmayan bakterilere göre çok daha fazla görülmektedir. Pennie ve ark. (9) *Campylobacter jejuni*'ye bağlı akut enflamatuvar ishali olan hastalardan akut ve konvelasan dönemde serum alarak yaptıkları çalışmada konvelasan dönemde alınan serumun bakterisidal aktiviteye sahip olduğunu ve *C.jejuni*'nin immun serumla öldürülmesinin kompleman bağımlı ve hastalığa neden olan suşa özgül bir özellik olduğunu göstermişlerdir. Muster ve ark. (10) tiplendirilemeyen *Haemophilus influenzae* enfeksiyonlarında konak savunma mekanizmalarını araştırmış ve normal insan serumunun bu mikroorganizmaya karşı bakterisidal ve opsonize edici etkisinin var olduğunu göstermişlerdir. Ancak serumun bakterisidal aktivitesinin varlığına rağmen, *H.influenzae* tip b'nin sepsise neden olduğu da bilinmektedir (11). Johnson ve ark. (12) *Vibrio vulnificus*'un bakteremi yapan suşlarının normal insan serumunun bakterisidal etkisine tamamen dirençliyen, yumuşak doku enfeksiyonu yapan ve çevreden izole edilen suşların bu etkiye hassas olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar yayınlanmamış bir çalışmalarında bakteremiyle seyreden *V.vulnificus* enfeksiyonundan iyileşen bir hastanın konvelasan dönem serumunda aynı suşa karşı yüksek düzeyde bakterisidal ve opsonize edici etki saptadıklarını bildirmişlerdir (12).

Çalışmamızda deney suşu olarak *P.aeruginosa* kullanmamızın nedeni, bu mikroorganizmanın hastanede solunum yolu manüplasyonu uygulanan hastalar için önemli bir tehdit unsuru olması ve çok sayıda antibiyotiğe direnç durumu nedeniyle tedavisinin güç yapılmasıdır. *P.aeruginosa*'nın lipopolisakarit tabakasının dış kısmındaki O yan zinciri komplemanın "membrane attack complex-MAC" oluşumunu engellemekte ve bakterinin seruma dirençli olmasını sağlamaktadır (13). Thomassen ve ark. (14) kistik fibrosisli hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının yarısında serum direnci olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda intranazal verilen *P.aeruginosa* suşu bakteri inokülasyonundan hemen önce alınan serumların hepsine direnç gösterirken inokülasyondan 12 gün sonra normal sıçanlardan alınan immun serumlara hassas hale gelmiştir. Oysa splenektomili sıçanların immun serumlarında bu etki ancak imipenemin katkısıyla gerçekleşebilmiştir.

Dalak, kanda antijen belirmesinden hemen sonra IgM yapısını sağlayan temel organ olduğu gibi, splenik fagositler karaciğer makrofajlarıyla birlikte klasik yolla aktive olan kompleman komponentlerinin bir çoğunun temel sentez yerleridir (15). Splenektomili

İMİPENEMİN SERUM BAKTERİSİDAL AKTİVİTESİNE ETKİSİ

sıçanlarda düşük IgM düzeyleri saptadık; bu grupta immün serumlarda dahi bakterisidal aktivitenin olmaması düşük IgM düzeylerine ilaveten muhtemelen düşük kompleman düzeyleriyle açıklanabilir, Kaygusuz ve ark. (16) ölü *P.aeruginosa* suşunu intraperitoneal olarak verip immunize ettikleri normal sıçan serumlarında antibiyotik (amikasin) katkısı olsun ya da olmasın bakterisidal aktivite saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda inokülasyon sonrası saptanan bakterisidal aktivite doğal enfeksiyon sonucu yeterli düzeyde antikor gelişimine bağlı olabilir. Öte yandan imipenem verildikten sonra aktivitedeki artış bakterinin düzeyindeki yapısal birimlerin bozulmasına bağlı olarak serum komplemanının etkisine daha duyarlı hale gelmesi; splenektomililerde sadece imipenem varlığında bakterinin seruma duyarlı hale dönüşmesi ise düşük düzeyde de olsa komplemanın bu yüzey değişikliği sonucu etkili olmasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak; sepsis olgularından sorumlu *P.aeruginosa* suşlarından çoğunun seruma dirençli olduğu gözönüne alınırsa, splenektomili hastalardaki yüksek mortaliteyi önlemek amacıyla imipenem kullanılması tedavide iyi bir seçenek olabilir.

KAYNAKLAR

1. King H, Schumacker HB: Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg*, 1952, 136: 239-242.
2. Holdsworth RJ, Irving AD, Cuschieri A: Postsplenectomy sepsis and its mortality rate: actual versus perceived risks. *Br J Surg*, 1991, 78: 1031-1038.
3. Taylor P, Kroll HP: Killing of an encapsulated strain of *Escherichia coli* by human serum. *Infect Immun*, 1983, 39: 122-131.
4. Fietta A, Mangiarotti P, Grassi G: Effects of antibiotics on the bactericidal activity of human serum. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982, 9: 141-148.
5. Thornsberry C: Antimicrobial agents and susceptibility tests, p. 159-1201. In Balows E, Hausler W, Hearnmann K, Isensberg H, Shadomy J (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 1991, 5th ed., American Society of Microbiology, Washington DC.
6. Bohnsack JF, Brown EJ: The role of spleen in resistance to infection. *Ann Rev Med*, 1986, 37: 49-59.
7. Roantree RJ, Rantz LA: A study of the relationship of the normal bactericidal activity of the human serum to bacterial infection. *J Clin Invest*, 1960, 39: 72-81.
8. Roberts AP, Philips R: The relative importance of the classical and alternative complement pathways in serum bactericidal activity against *Escherichia coli*. *J Med Microbiol*, 1983, 16: 69-74.
9. Pennie RA, Pearson RD, Guerrant RL: Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to killing by human serum. *Clinical Research*, 1983, 31: 849 A.
10. Musher D, Hague-Park M, Wallace R, Cowley B: Opsonizing and bactericidal effects of normal human serum on nontypable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 1983, 39: 297-304.
11. Shaw S, Smith AL, Anderson P, Smith D: The paradox of *Haemophilus influenzae* type b bacteremia in the presence of serum bactericidal activity. *J Clin Invest*, 1976, 58: 1019-1029.
12. Johnson D, Calia F, Goe A: Resistance to *Vibrio vulnificus* to serum bactericidal and opsonizing factors. *J Infect Dis*, 1984, 150: 413-418.
13. Siefferman C, Regelman W, Gray B: *Pseudomonas aeruginosa* variants isolated from patients with cystic fibrosis are killed by a bactericidal protein from human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*, 1991, 59: 2152-2157.

14. Thomassen MJ, Demko CA: Serum bactericidal effect on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Infect Immun* 1981, 33: 512-518.
15. Timens W, Leemans R: Splenic autotransplantation and the immun system. *Ann Surgery*, 1991, 215: 256-260.
16. Kaygusuz A, Karahan S, Çağlıkülekcı M, Çetinkale O, Altuğ T, Dağoğlu T: Amikasin'in *Pseudomonas aeruginosa* ile immunize edilmiş sıçanlarda immun serumun bakterisid aktivitesi üzerine etkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 1990, 20 (3-4): 172-175.