

PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ESCHERICHIA COLI, ACINETOBACTER BAUMANNII VE STAPHYLOCOCCUS AUREUS KLİNİK İZOLATLARINDA DIŞA ATIM POMPA İNHİBİTÖRLERİNİN SİPROFLOKSASİN MİK DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EFFLUX PUMP INHIBITORS TO MIC VALUES OF CIPROFLOXACIN IN CLINICAL ISOLATES OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ESCHERICHIA COLI, ACINETOBACTER BAUMANNII AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Ebru ÇETİNKAYA¹, Ahmet Yılmaz ÇOBAN¹, Belma DURUPINAR¹

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun. (cobanay2003@yahoo.com.tr)

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen florokinolonlara dirençli 42 *Pseudomonas aeruginosa*, 97 *Escherichia coli*, 58 *Acinetobacter baumannii* ve 80 *Staphylococcus aureus* izolatının siprofloksasin (CIP) minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri üzerine, dışa atım (efflux) pompa inhibitörlerinin etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Pompa inhibitörü olarak *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *A.baumannii* izolatları için PAßN (fenilalanil-arjinil-beta-naftilamid), *S.aureus* izolatları için rezerpin kullanılmıştır. Klinik izolatların florokinolon direnci, VITEK2 Compact (BioMerieux, Fransa) otomatize sistemi ile belirlenmiş ve standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile doğrulanmıştır. İnhibitör ajanların etkilerinin araştırılması için, mikrodilüsyon yöntemi ile 25 µg/ml ve 100 µg/ml PAßN ve 20 µg/ml rezerpin varlığında CIP MİK değerleri tekrar belirlenmiştir. *P.aeruginosa* klinik izolatlarında, 25 mg/l PAßN varlığında dirençli izolatların %61.9'u, 100 mg/l PAßN varlığında ise dirençli izolatların %73.8'i duyarlı hale gelmiştir. *A.baumannii* klinik izolatlarında, 25 mg/l PAßN varlığında dirençli izolatların %8.6'sı, 100 mg/l PAßN varlığında ise dirençli izolatların %15.5'i duyarlı hale gelmiştir. 25 mg/l PAßN, *E.coli* klinik izolatlarından %42.2'sinin CIP MİK değerlerini ≥ 4 kat, %30.9'unun MİK değerlerini ise ≥ 2 kat azaltmış, buna karşın %26.9'unun MİK değerlerinde herhangi bir azalmaya neden olmamıştır. PAßN'nin 100 mg/l konsantrasyonunda, *E.coli* izolatlarından %83.6'sının MİK değerlerinde ≥ 4 kat, %13.4'ünde ise iki kat azalmaya neden olduğu, izolatların %3'ünün MİK değerlerinde herhangi bir azalmaya yol açmadığı belirlenmiştir. *S.aureus* klinik izolatları değerlendirildiğinde; 20 mg/l rezerpin varlığında izolatların %8.75'inin CIP MİK değerlerinde ≥ 4 kat ve %33.75'inin MİK değerlerinde iki kat azalma olduğu izlenmiştir. *S.aureus* izolatlarının %57.5'inin CIP MİK değerlerinde ise herhangi bir azalma olmamıştır. Sonuç olarak çalışmamızda, PAßN'nin *P.aerugino-*

sa, *E.coli* ve *A.baumannii* klinik izolatlarının CIP MK değerlerinde azalmaya neden olduğu gözlenmiş, bu etkinin dışa atım pompa inhibisyonu yoluyla olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, rezepinin *S.aureus* suşlarında elde edilen CIP MK değerleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, siprofloksasin, direnç, dışa atım pompası, fenilalanil-arjinil-beta-naftilamid, rezepin.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of efflux pump inhibitors on the minimal inhibitory concentration (MIC) values of ciprofloxacin (CIP) in fluoroquinolone-resistant 42 *Pseudomonas aeruginosa* (n= 42), *Escherichia coli* (n= 97), *Acinetobacter baumannii* (n= 58) and *Staphylococcus aureus* (n= 80) strains isolated from clinical specimens. For this purpose phenylalaninyl-argininyl-beta-naphthylamide (PAßN) was used for *P.aeruginosa*, *E.coli*, *A.baumannii* and reserpine for *S.aureus* isolates as pump inhibitors. Fluoroquinolone resistance of the clinical isolates were determined by VITEK2 Compact (BioMérieux, France) automated system and confirmed with standard broth microdilution method. For the investigation of the effects of inhibitor agents, the MIC values were also determined in the presence of 25 µg/ml and 100 µg/ml PAßN and 20 µg/ml reserpine. In the presence of 25 mg/l PAßN, 61.9% of CIP resistant *P.aeruginosa* strains converted to susceptible ones, while this rate was 73.8% in the presence of 100 mg/l PAßN. In *A.baumannii* clinical isolates, 8.6% and 15.5% of CIP-resistant strains have become susceptible in the presence of 25 mg/l and 100 mg/l PAßN, respectively. Similarly the MIC values for CIP have decreased ≥ 4 folds in 42.2%, and ≥ 2 folds in 30.9% of *E.coli* isolates, in the presence of 25 mg/l PAßN, however, there was no change in MICs of 26.9% of *E.coli* strains. The MIC values have also been lowered for ≥ 4 folds in 83.6%, and two folds in 13.4% of *E.coli* strains by the use of 100 mg/l PAßN concentration, however, no decrease in MIC values was detected in 3% of the isolates. 20 mg/l of reserpine have caused a decrease of ≥ 4 folds in 8.75%, and two folds in 33.75% of *S.aureus* isolates, while there was no change in MIC values of 57.5% of *S.aureus* strains. Our results showed that PAßN causes significant reduction in MIC values for CIP in the clinical isolates of *P.aeruginosa*, *E.coli* and *A.baumannii* and this effect may be attributed to efflux pump inhibition. In contrast, it was concluded that reserpine does not have a considerable effect on the MIC values of *S.aureus* against ciprofloxacin.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, ciprofloxacin, resistance, efflux pump, phenylalaninyl-argininyl-beta-naphthylamide, reserpine.

GİRİŞ

Klinik önemi olan bakterilerde görülen çoklu ilaç direnci, bugün tıbbın karşı karşıya olduğu en önemli sorunlardan birisidir¹. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bakteriyel transport proteinlerinden bazılarının antimikrobiyal ilaçları aktif olarak hücre dışına atarak ilacın hedefine ulaşmasını engellediğini ve bunun da çoklu ilaç direncinde oldukça etkin rol oynayan bir mekanizma olduğunu göstermiştir^{1,2}.

Dışa atım (efflux) pompasına bağlı direnç klinikte yaygın olarak görülmektedir. Bu direnç önlemek için alternatif tedavi seçeneklerine gereksinim olmasının yanı sıra dışa atım pompasının etkilerini inhibe edebilen bileşiklerin geliştirilmesine de gereksinim kaçınılmaz görülmektedir³. Son yıllarda bu pompa sistemlerinin üstesinden gelebilecek ve böylelikle neden oldukları çoklu ilaç direncini ortadan kaldıracak bileşikler yoğun bir şekilde araştırılmaktadır¹. Bu bileşiklerden fenilalanil-arjinil-beta-naftilamid (PAßN), bir dipeptid amid bileşiğidir. Bu bileşiğin gram-negatif bakterilerde en sık çoklu ilaç direncine

yol açan RND tipi pompa sistemlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın MexAB-OprM, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN pompalarına ve *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Enterobacter aerogenes*'in AcrAB-TolC pompalarına karşı inhibitör aktivitesi olduğu kanıtlanmıştır⁴. Rezerpin, P-glikoproteini inhibe ettiği bilinen ve antihipertansif etkisi olan bir bitkisel alkaloiddir. Gram-pozitif bakterilerde, NorA ve Bmr çoklu ilaç pompa sistemlerini inhibe ettiği ortaya konan ilk bileşiktir. Bir dışa atım pompa inhibitörü olan rezerpin çoklu ilaç direnci gösteren gram-pozitif bakterilerde florokinolon aktivitesini artırmaktadır⁵.

Bu çalışmanın amacı; hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen, çok ilaca direnç fenotipleri florokinolon dirençleri temel alınarak seçilen *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarının siprofloksasin minimum inhibitör konsantrasyonu (MIK) değerleri üzerine PAßN'nin ve *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarının siprofloksasin MIK değerleri üzerine de rezerpinin etkilerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen florokinolona dirençli 42 *P.aeruginosa*, 97 *E.coli*, 58 *A.baumannii*, 80 *S.aureus* klinik izolatı olmak üzere toplam 277 klinik izolat çalışmaya dahil edildi. Bakterilerin tanımlanması geleneksel yöntemlerle yapıldı. Tür düzeyinde geleneksel tanımlamanın doğrulanması ise VITEK2 Compact (Biomérieux, Fransa) otomotize sisteminde ID GN ve ID GP kartları kullanılarak yapıldı.

Duyarlılık Testleri

Klinik örneklerin tamamının florokinolon direnci VITEK2 Compact otomotize sistemi ile belirlendi ve CLSI⁶ önerileri doğrultusunda standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile doğrulandı. Katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyerinden (Becton Dickinson and Company, Fransa) U tabanlı 96 kuyucuklu mikropatlara 100'er µl dağıtıldı. İlk kuyucuklara üreme kontrolü için ve en son kuyucuklara da sterilite kontrolü için antibiyotik eklenmedi. İkinci sıradaki kuyucuklardan itibaren siprofloksasinin iki kat seri dilüsyonları yapıldı. Siprofloksasin (CIP) son konsantrasyonları 256-0.5 µg/ml idi.

Çalışmada, pompa inhibitörlerinin etkilerinin araştırılması için, 25 mg ile 100 mg PAßN (Sigma) ve 20 mg rezerpin (Fluka) içeren katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) hazırlandı. PAßN distile suda, rezerpin ise DMSO'da çözülerek katyon ayarlı MHB'ye yavaş yavaş ilave edildi. Hazırlanan bu pompa inhibitörlü MHB ile, tekrar CIP duyarlılığını test etmek için plaklar hazırlandı.

Koyun kanlı agara ekilip 18-24 saat inkübasyondan sonra saf olarak elde edilen kolonilerden serum fizyolojik ile 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonu 1:100 oranında sulandırıldı. Hazırlanan plaklardaki sterilite kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 100 µl dağıtıldı. 35°C'de 16-20 saat inkübasyondan sonra, izolatların CIP MIK değerleri ile 25 mg/l ve 100 mg/l PAßN ve 20 mg/l rezerpin varlığındaki MIK değerleri belirlendi. Çalışmada, CIP MIK değerleri ile dışa atım pompa

inhibitörü eklenince elde edilen MK değerleri arasında ≥ 4 kat azalma saptandığında, elde edilen sonuç anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışılan *P.aeruginosa* klinik izolatlarında 25 mg/l PAßN varlığında suşların %92.8'inin CIP MK değerlerinde ≥ 4 kat, %7.2'sinde ise 2 kat azalma saptanmıştır. 100 mg/l PAßN varlığında klinik izolatların %97.6'sında ≥ 4 kat, %2.4'ünde ise 2 kat azalma belirlenmiştir. CIP'a dirençli iken, 25 mg/l ve 100 mg/l PAßN varlığında duyarlı hale gelen *P.aeruginosa* klinik izolatları Tablo I'de özetlenmiştir. 25 mg/l PAßN varlığında dirençli izolatların %61.9'u; 100 mg/l PAßN varlığında ise dirençli izolatların %73.8'i duyarlı hale gelmiştir.

Çalışmaya dahil edilen *E.coli* klinik izolatlarında, 25 mg/l PAßN varlığında izolatların %42.2'sinin MK değerlerinde ≥ 4 kat azalma, %30.9'unun MK değerlerinde ≥ 2 kat azalma saptanırken, %26.9'unda ise herhangi bir azalma saptanmamıştır. PAßN'nin konsantrasyonu 100 mg/l'ye çıkarıldığında klinik izolatların %83.6'sının MK değerlerinde ≥ 4 kat azalma, %13.4'ünün MK değerlerinde 2 kat azalma saptanırken %3'ünde herhangi bir azalma görülmemiştir. PAßN'nin iki konsantrasyonu arasındaki fark (≥ 4 kat anlamlı azalma saptanan izolatların oranları arasında) istatistiksel olarak ki-kare testi ile değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çalışılan *A.baumannii* klinik izolatlarında, 25 mg/l PAßN'nin suşların %15.5'inin MK değerlerinde ≥ 4 kat azalma, %38'inin MK değerlerinde 2 kat azalmaya yol açtığı; %46.5'inde ise herhangi bir azalmaya neden olmadığı saptanmıştır. PAßN'nin konsantrasyonu 100 mg/l'ye çıkarıldığında, izolatların %39.6'sının MK değerlerinde ≥ 4 kat azalma, %39.6'sının MK değerlerinde 2 kat azalma olduğu; %20.8'inde ise herhangi bir azalma olmadığı belirlenmiştir. PAßN'nin iki konsantrasyonu arasındaki fark (≥ 4 kat anlamlı azalma saptanan izolatların oranları arasında) istatistiksel olarak ki-kare testi ile değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Dirençli iken, 25 mg/l ve 100 mg/l PAßN varlığında duyarlı hale gelen *A.baumannii* klinik izolatları Tablo II'de özetlenmiştir. 25 mg/l PAßN varlığında dirençli izolatların %8.6'sı duyarlı hale gelirken, 100 mg/l PAßN varlığında dirençli izolatların %15.5'i duyarlı hale gelmiştir.

Çalışmaya dahil edilen *S.aureus* klinik izolatlarında, 20 mg/l rezerpinin, izolatların %8.75'inin MK değerlerinde ≥ 4 kat azalmaya, %33.75'inin MK değerlerinde 2 kat azalmaya yol açtığı; %57.5'inde ise herhangi bir azalmaya neden olmadığı saptanmıştır.

TARTIŞMA

Günümüzde, antimikrobiyal tedavide ciddi sorunlara yol açan antibiyotik direncinin gelişmesinde, bakterilerin sahip oldukları atım pompaları büyük önem taşımaktadır. Bakteriyel direncin üstesinden gelme ve antibiyotiklerin aktivitesini artırmada temel yaklaşım, bu antibiyotiklerle birlikte direnci inhibe eden ajanların kullanılmasıdır. Bu yaklaşımda antibiyotik, direnci nötralize eden bir inhibitör maddeyle birlikte verilir. Bunun en iyi örneği beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerinin başarılı kullanımıdır. Hedefi modifiye eden enzimler ve dışa atım sistemleri için de benzer yaklaşım kullanılabilir⁷⁻¹⁰. Çeşitli dışa atım pompa inhibitörlerinin tanımlanmasına ve in vitro aktivitelerinin gösterilmesine

Tablo 1. PAßN Varlığında Siprofloksasine Duyarlı Hale Gelen *P.aeruginosa* İzolatlarının Karşılaştırmalı MİK Değerleri (µg/ml)

İzolat no	MİK değeri	Siprofloksasin	
		25 mg/l PAßN varlığında MİK değeri	100 mg/l PAßN varlığında MİK değeri
10	4	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
25	4	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
27	4	1- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
38	4	1- duyarlı	1- duyarlı
48	4	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
3	8	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
30	8	1- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
33	8	2- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
39	8	2- duyarlı	1- duyarlı
55	8	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
14	16	4- dirençli	1- duyarlı
18	16	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
22	16	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
23	16	2- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
29	16	2- duyarlı	1- duyarlı
31	16	2- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
28	16	2- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
37	16	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
1	32	2- duyarlı	1- duyarlı
4	32	1- duyarlı	1- duyarlı
32	32	2- duyarlı	1- duyarlı
2	64	1- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
9	64	1- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
12	64	2- duyarlı	1- duyarlı
16	64	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
24	64	4- dirençli	≤ 0.5- duyarlı
35	64	4- dirençli	≤ 0.5- duyarlı
58	64	4- dirençli	≤ 0.5- duyarlı
20	128	2- duyarlı	1- duyarlı
8	128	1- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
5	≥ 256	16- dirençli	≤ 0.5- duyarlı

Tablo II. PAßN Varlığında Siprofloksasine Duyarlı Hale Gelen *A.baumannii* İzolatlarının Karşılaştırmalı MİK Değerleri (µg/ml)

İzolat no	MİK değeri	Siprofloksasin	
		25 mg/l PAßN varlığında MİK değeri	100 mg/l PAßN varlığında MİK değeri
2	4	2- duyarlı	1- duyarlı
46	4	2- duyarlı	1- duyarlı
62	8	4- dirençli	2- duyarlı
60	8	4- dirençli	1- duyarlı
34	16	≤ 0.5- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
45	16	8- dirençli	2- duyarlı
69	16	8- dirençli	≤ 0.5- duyarlı
20	32	1- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı
26	32	1- duyarlı	≤ 0.5- duyarlı

rağmen, bunların çoğu ökaryotik hücrelerde güçlü farmakolojik etki gösterdiğinden günümüzde hiçbiri klinik kullanımda değildir¹¹. Çeşitli çalışmalarda, PAßN ile *P.aeruginosa*'da dışa atım pompasına bağlı direncin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir¹²⁻¹⁴. Lomovskaya ve arkadaşları¹², PAßN'nin *P.aeruginosa*'da florokinolonlara karşı hem intrensek direnci (levofloksasin için 8 kat) hem de dışa atım pompasının aşırı ekspresyonuna bağlı olarak gelişen kazanılmış direnci azalttığını göstermişlerdir. Çoban ve arkadaşları¹³, siprofloksasin (CIP), ofloksasin ve levofloksasin (LEV) ile PAßN kombinasyonlarının *P.aeruginosa* klinik izolatlarında dışa atım pompasına bağlı florokinolon direncini azalttığını saptamışlardır. Mesaros ve arkadaşları¹⁴ da, *P.aeruginosa*'da 50 mg/l PAßN varlığında norfloksasin (NOR), eritromisin, karbenisilin, imipenem ve gentamisin MİK değerlerinde anlamlı düzeyde azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, 42 *P.aeruginosa* klinik izolatında, 25 mg/l ve 100 mg/l PAßN varlığında ve yokluğunda olmak üzere CIP MİK değerleri araştırılmış; 25 mg/l PAßN varlığında klinik izolatların %92.8'inin MİK değerlerinde ≥ 4 kat, %7.2'sinde ise iki kat azalma olduğu saptanmıştır. 100 mg/l PAßN kullanıldığında, klinik izolatların %97.6'sında ≥ 4 kat, %2.4'ünde ise iki kat azalma olduğu belirlenmiştir. Sonuçlarımız, çalışılan *P.aeruginosa* klinik izolatlarında florokinolon direncinin gelişmesinde başlıca mekanizmanın dışa atım pompasının aşırı ekspresyonu olduğunu düşündürmüştür.

Çoban ve arkadaşlarının¹⁵, PAßN, verapamil, lansoprazol ve omeprazolün, CIP'a dirençli 14 *E.coli* klinik izolatının MİK değerlerine olan etkilerini araştırdığı çalışmalarında, PAßN varlığında CIP MİK değerlerinde altı izolatta iki kat, iki izolatta dört kat azalma saptanmış; altı izolatta ise MİK değerlerinde bir değişim olmadığı ifade edilmiştir. Kern ve arkadaşları¹⁶ ise, *E.coli* izolatlarında 25 mg/l PAßN'nin florokinolon MİK değerleri üzerinde sınırlı etkiye sahip olduğunu belirtmişler, buna karşın PAßN konsantrasyonunun 100

mg/l'ye çıkarılması halinde, LEV MİK değerlerinde anlamlı düzeyde azalma olduğunu (suşların %87'sinde ≥ 4 kat azalma) bulmuşlardır. Bohnert ve arkadaşları¹⁷, dışa atım pompa ekspresyonu yüksek olan *E.coli* suşlarında 25 µg/ml ve 100 µg/ml PAßN varlığında LEV MİK değerlerinde azalma tespit etmişlerdir. Saenz ve arkadaşlarının¹⁸ çalışmasında da, 20 mg/l PAßN'nin *E.coli*'de florokinolon MİK değerleri üzerinde sınırlı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, 25 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlardaki PAßN varlığında ve yokluğunda 97 *E.coli* klinik izolatında CIP MİK değerleri araştırılmıştır. CIP MİK değerleri, 25 mg/l PAßN varlığında suşların %42.2'sinde ≥ 4 kat, %30.9'unda ≥ 2 kat azalma göstermiş, %26.9'unda ise herhangi bir azalmaya neden olmamıştır. Konsantrasyon 100 mg/l'ye çıkarıldığında, CIP MİK değerlerinde suşların %83.6'sında ≥ 4 kat azalma, %13.4'ünde iki kat azalma saptanmış, %3'ünde ise bir değişiklik görülmemiştir. Sonuçlarımız, daha önce yapılan çalışmaların¹⁵⁻¹⁸ sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. MİK değerlerinde azalma saptanmayan izolatlarda, florokinolon direncine yol açan başlıca mekanizmaların, olası mutasyonlar, farklı atım pompalarının varlığı ya da plazmid aracılı direnç varlığı olabileceği düşünülmüştür.

A.baumannii ve *S.maltophilia* klinik izolatlarında, PAßN'nin, nalidiksik asit ve CIP MİK değerlerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; izolatların yaklaşık yarısında PAßN'nin nalidiksik asit MİK değerlerinde ≥ 4 kat azalmaya yol açtığı, ancak CIP MİK değerlerinde anlamlı bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir³. Bir başka çalışmada da, florokinolonlara dirençli *A.baumannii* klinik izolatlarında PAßN ile diğer bir dışa atım pompa inhibitörü olan NMP [1-(1-naftilmetil)-piperazin] test edilmiş; düşük konsantrasyonlarda (25 mg/l) her iki maddenin etkileri sınırlı olarak saptanırken, yüksek konsantrasyonlarda (100 mg/l), NMP'nin PAßN'den daha aktif olduğu rapor edilmiştir¹⁹. Bu araştırmacılar, 100 mg/l NMP ile suşların %48'sinde, aynı konsantrasyondaki PAßN ile ise suşların %14'ünde CIP MİK değerlerinde ≥ 4 kat azalma saptamışlardır¹⁹. Bizim çalışmamızda, 58 *A.baumannii* klinik izolatı 25 mg/l PAßN konsantrasyonunda test edildiğinde, suşların %15.5'inde CIP MİK değerleri ≥ 4 kat, %38'inde ise iki kat azalmış, izolatların %46.5'inde herhangi bir azalma saptanmamıştır. PAßN konsantrasyonu 100 mg/l'ye çıkarıldığında, suşların %39.6'sında ≥ 4 kat azalma, %39.6'sında iki kat azalma gözlenirken, %20.8'inde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre, MİK değerlerinde azalma olmayan suşlardaki florokinolon direncinin, dışa atım pompa sistemi dışındaki direnç mekanizmalarına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Rezerpin, gram-pozitif bakterilerdeki NorA ve Bmr çoklu ilaç pompa proteinlerinin fonksiyonunu inhibe etmektedir. Gibbons ve arkadaşları²⁰, genotipik olarak NorA pompa proteini taşıyan ve fenotipik olarak çoklu ilaç direnci gösteren *S.aureus* suşlarında 20 mg/l rezerpin ile CIP, NOR, LEV ve moksifloksasini kombine kullanmışlar, MİK değerlerinde NOR ve CIP için ≥ 4 kat azalma, LEV ve moksifloksasin için ise iki kat azalma saptamışlardır. CIP ile 20 mg/l rezerpinin kombine kullanıldığı bir çalışmada, 102 izolatın 48'inde CIP MİK değerlerinde dört kat azalma tespit edilmiş, 54'ünde ise rezerpinin CIP MİK değeri üzerine hiçbir etkisi görülmemiştir²¹. Bunun nedeninin, NorA ve/veya henüz tanımlanmamış diğer dışa atım taşıyıcılarında mutasyonlara bağlı görülen değişiklikler olabileceği ileri sürülmüştür. Vidailac ve arkadaşları²² NorA pompa proteini taşıyan *S.au-*

reus'da NOR ve rezerpin kombinasyonunun etkisine bakmışlar, bu yolla NOR ile rezerpinin sinerjik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Aeschlimann ve arkadaşları²³ LEV, CIP ve NOR ile dışa atım pompa inhibitörlerini kombine kullanmışlar, rezerpin ile kombinasyon sonucu LEV MİK değerinde minimal etki, CIP ve NOR MİK değerlerinde dört kat azalma saptamışlardır. Bizim çalışmamızda, CIP'a dirençli 80 *S.aureus* klinik izolatında rezerpin 20 mg/l konsantrasyonunda kullanılmış; suşların %8.75'inin MİK değerinde dört kat, %33.75'inde ise iki kat azalma saptanmış, ancak %57.5'inde hiçbir etki izlenmemiştir. Çalışmaya alınan *S.aureus* suşlarında rezerpinin önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir ki, bunun da iki nedeni olabileceği düşünülmüştür Birincisi, çalışılan suşlardaki florokinolon direncinin hedef enzimdeki mutasyonlara bağlı olması; diğeri ise kromozomal mutasyonlar sonucu rezerpinin bağlanacağı NorA pompa proteini bölgesindeki değişiklikler sonucu rezerpinin pompaya bağlanmasının gerçekleşmemesidir.

Sonuç olarak çalışmamızda, gram-negatif bakteriler için kullandığımız PAßN'nin *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *A.baumannii* klinik izolatlarının CIP MİK değerlerinde azalmaya yol açtığı gözlenmiş, bu etkinin dışa atım pompa inhibisyonu yolu ile olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, *S.aureus* izolatları için kullanılan rezerpinin, CIP MİK değerlerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bakteriyel direncin üstesinden gelebilmek ve var olan antibiyotiklerin aktivitesini artırmak için bakteriyel direnç mekanizmalarının tanımlanması ve inhibitörlerinin MİK değerleri üzerine olası etkilerinin belirlenmesi, klinik açıdan direncin önlenmesinde değerli olacaktır. Daha ileri çalışmalar ile dışa atım pompalarının her biri için özgül inhibitörleri belirlemek, bizlere beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarında olduğu gibi klinik kullanım için önemli bir yenilik sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Hasdemir U. The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. Mikrobiyol Bul 2007; 41: 309-27.
2. Hasdemir U. Bakterilerin çoklu antimikrobiyal direncinde aktif pompa sistemleri. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. 2006, İstanbul. Kongre Kitabı, s: 125-35.
3. Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 697-8.
4. Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie 2005; 87: 1137-47.
5. Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2595-9.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, M7-A6. 2003, 6th ed. CLSI, Wayne, Pa.
7. Wright GD. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. Chem Biol 2000; 7: 127-32.
8. Miller LA, Ratman K, Payne DJ. Beta-lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. Curr Opin Pharmacol 2001; 1: 451-8.
9. Hajduk PJ, Dinges J, Schkeryantz JM, et al. Novel inhibitors of Erm methyltransferases from NMR and parallel synthesis. J Med Chem 1999; 42: 3852-9.
10. Gao Y. Glycopeptide antibiotics and development of inhibitors to overcome vancomycin resistance, Nat Prod Rep 2002; 19: 100-7.

11. Kristiansen JE, Hendricks O, Devlin T, et al. Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1271-9.
12. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 105-16.
13. Coban AY, Ekinci B, Durupınar B. A multidrug efflux pump inhibitor reduces fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Chemotherapy* 2004; 50: 22-6.
14. Mesáros N, Glupczynski Y, Avrain L, et al. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 378-86.
15. Çoban AY, Birinci A, Ekinci B, et al. Investigation of the effects of efflux pump inhibitors on ciprofloxacin MIC values of high level fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38: 21-5.
16. Kern WV, Steinke P, Schumacher A, et al. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 339-43.
17. Bohnert AJ, Kern WV. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 849-52.
18. Saenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, et al. Effect of the pump inhibitor phe-arg-beta-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 544-5.
19. Pannek S, Higgins P, Steinke P, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 970-4.
20. Gibbons S, Oluwatuyi M, Kaatz GW. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 13-7.
21. Schmitz FJ, Fluit AC, Lückefahr M, et al. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 807-10.
22. Vidaillac C, Guillon J, Arpin C, et al. Synthesis of omeprazole analogues and evaluation of these as potential inhibitors of the multidrug efflux pump NorA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 831-8.
23. Aeschlimann JR, Dresser LD, Kaatz GW, et al. Effects of NorA inhibitors on in vitro antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 335-40.