

DİRENÇLİ GRAM-POZİTİF BAKTERİLERDE LİNEZOLİD/ERTAPENEM KOMBİNASYONUNUN İN VİTRO AKTİVİTESİ

IN VITRO ACTIVITY OF LINEZOLID/ERTAPENEM COMBINATION IN RESISTANT GRAM-POSITIVE BACTERIA

Bayrı ERAÇ¹, Hüseyin TAŞLI¹, Şafak ERMERTCAN¹, Feriha ÇİLLİ²,
Mine HOŞGÖR LİMONCU¹

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (mine.hosgor.limoncu@ege.edu.tr)

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

ÖZET

Metisiline dirençli stafilkok ve vankomisine dirençli enterokok enfeksiyon sıklığının artışı tedavide önemli sorunlara yol açmakta olup, alternatif tedavi seçenekleri üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmada; klinik örneklerden izole edilen 2 vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VREF), 2 metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve 2 metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) suşu üzerine linezolid/ertapenem kombinasyonunun in vitro aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla, linezolid/ertapenem kombinasyonunun 1/2 x MİK (minimum İnhibitör konsantrasyonu), 1 x MİK ve 4 x MİK konsantrasyonları kullanılmış ve suşlar üzerindeki in vitro aktiviteler zamana bağlı öldürme eğrisi (time-kill) metodu ile belirlenmiştir. MRSA suşlarında 1 x MİK ile 4 x MİK değerlerinde 6. ve 24. saatlerde additif etki saptanırken, VREF suşlarında da aynı MİK değerlerinde 6. saatte additif etki gözlenmiştir. İncelenen MRSE suşlarından birinde, 4 x MİK değerinde 6. saatte 2 antibiyotik arasında sinerji belirlenmiş, bu suшта 1 x MİK değerinde 6. ve 24. saatlerde antibiyotikler additif etki göstermiştir. Diğer MRSE suşunda herhangi bir sinerji saptanmazken, 1/2 x MİK değerinde 6. saatte ve 1 x MİK değerinde 24. saatte additif etki görülmüştür. Bu sonuçlar, linezolid/ertapenem kombinasyonunun dirençli gram-pozitif suşların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceği görüşünü desteklemekle birlikte, daha kapsamlı in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Metisiline dirençli stafilkoklar, vankomisine dirençli enterokoklar, linezolid, ertapenem, zamana bağlı öldürme eğrisi.

ABSTRACT

The increasing prevalence of vancomycin-resistant enterococcus and methicillin-resistant staphylococcus infections has become a major therapeutic challenge and alternative therapy options are under consideration. In the present study, we aimed to evaluate the in vitro antibacterial activity of linezolid combined with ertapenem against two vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF), two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and two methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*

(MRSE) strains isolated from clinical specimens. In vitro activity of linezolid/ertapenem combination at 1/2 x MIC (minimal Inhibitory Concentration), 1 x MIC and 4 x MIC concentrations for each of the isolates was determined by time-kill curve method. At 1 x MIC and 4 x MIC concentrations, additive effect was detected for MRSA (at 6 and 24 h) and VREF (at 6 h) strains. Synergism was observed between two antibiotics at 4 x MIC concentration against one of the MRSE strains at 6th hour. Additive effect was determined at 6th and 24th hours in this strain at 1 x MIC concentration. No synergism was present in the other MRSE strain but additive interaction was detected at 6 h (1/2 x MIC) and 24 h (1 x MIC). Although these results support the use of linezolid/ertapenem combination in infections caused by resistant gram-positive strains, further in vitro and in vivo studies are necessary.

Key words: Methicillin-resistant staphylococci, vancomycin-resistant enterococci, linezolid, ertapenem, time-kill curve.

GİRİŞ

Gram-pozitif bakteriler, özellikle *Staphylococcus aureus*, koagülaz-negatif stafilokoklar ve enterokoklar, hastane ortamında önemli enfeksiyonlara neden olan bakterilerdir. Bu bakterilerde gelişen antibiyotik direnci, tedaviyi güçleştirmekte, morbidite ve mortalitenin artmasına yol açmaktadır. Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), neden oldukları enfeksiyonların tedavisinde sorun yaşanan gram-pozitif bakterilerin başında gelmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, yoğun bakım ünitelerinde görülen stafilokok enfeksiyonlarının yaklaşık %60'undan MRSA suşları sorumludur ve bu oran giderek artmaktadır¹. Önemli MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde standart olarak vankomisin kullanılmakla birlikte, son yıllarda bu antibiyotiğe dirençli *S.aureus* suşları da bildirilmiştir^{2,3}. Toplum kökenli enfeksiyonlardan izole edilen MRSA oranları da yükselmekte olup, yumuşak doku enfeksiyonlarının yanı sıra nekrotizan pnömoni gibi önemli hastalıklara neden olabilmektedirler¹.

Enterococcus faecium suşları başta olmak üzere, özellikle hastane ortamında izole edilen VRE oranları artmaktadır. VRE suşlarının, çoğunlukla kullanımdaki diğer antibiyotiklere de dirençli olmaları, etken oldukları enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır⁴. Gram-pozitif kökenli enfeksiyonların kontrolünde yaşanan sorunlar, tıp dünyasını yeni antibakteriyel ajan seçenekleri üzerinde durmaya zorlamaktadır.

Bakteriyel ribozomun 50S ve 30S alt ünitelerinin birleşimini engelleyerek protein sentezini inhibe eden linezolid, klinikte ilk kullanıma giren oksazolidinon türevi olup, dirençli gram-pozitif bakterilere karşı etkinliği nedeniyle ön plana çıkmıştır⁵. Linezolid, MRSA ve VRE gibi dirençli türlerin neden olduğu endokardit, menenjit, komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile nozokomiyal pnömoni gibi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır⁶. 2000 yılında kullanıma girmesine karşın, linezolide dirençli *S.aureus*, *S.epidermidis* ve enterokok suşları bildirilmiştir^{7,8}. Yapılan çalışmalarda linezolid direncinin 23S rDNA geninde oluşan G2576T mutasyonu ile ilişkili olduğu, genellikle uzun tedavi süreci, invaziv cihaz varlığı ve yüksek kullanım sıklığı gibi faktörlere bağlı olarak geliştiği belirtilmiştir^{6,9}.

Ertapenem, serum yarı ömrü ve etki süresi uzun, dolayısıyla günde tek doz kullanıma uygun bir karbapenemdir. Enterobacteriaceae üyeleri, *Streptococcus pneumoniae* ve birçok

anaerob bakteri de dahil olmak üzere gram-pozitif ve gram-negatif bakterileri kapsayan bir etki spektrumu vardır¹⁰. Ancak *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., MRSA ve enterokoklara karşı etkinliği sınırlıdır. Gram-pozitif bakterilerde görülen ertapenem dirençci genellikle penisilin bağlayan protein (PBP) yapısındaki değişimlere bağlı olarak ortaya çıkarken, gram-negatif bakterilerde metallo-beta-laktamaz üretimi, porin proteinlerindeki değişim ve aktif pompa (eflüks) sistemleri gibi mekanizmalarla gelişmektedir¹⁰.

S.aureus suşları üzerinde linezolidin farklı antibiyotikler ile kombinasyonunun etkinliğini inceleyen birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Linezolid ile ertapenemin *S.aureus* dışındaki dirençli gram-pozitif bakterilere karşı etkisi hakkında ise yeterli bilgi bulunmamaktadır¹¹⁻¹⁴. Çalışmamızda linezolid-ertapenem kombinasyonunun, vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VREF), MRSA ve metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) suşları üzerindeki in vitro aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 2 MRSA, 2 MRSE ve 2 VREF suşu dahil edildi. Linezolid (Pfizer, İstanbul-Türkiye) ve ertapenem (Merck, İstanbul-Türkiye) antibiyotikleri üretici firmalardan sağlandı. Suşların linezolid ve ertapenem minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi¹⁵. *S.aureus* ATCC 29213 ve *E.faecalis* ATCC 29212 standart suşları, kalite kontrol amacıyla kullanıldı.

Zamana Bağlı Öldürme Eğrisi (Time-Kill Curve)

Zamana bağlı öldürme eğrileri, Pillai ve arkadaşları tarafından kullanılan yöntem esas alınarak belirlendi¹⁶. Her suş için linezolid ve ertapenem, tek başlarına ve kombine edilerek 1/2 x MİK, MİK ve 4 x MİK konsantrasyonlarında çalışıldı. Öncelikle, taze bakteri kültürlerinden %0.9'luk tuzlu suda 0.5 McFarland standardında süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyonlar, önceden belirlenmiş konsantrasyonlarda antibiyotik içeren Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB; Merck) ile karıştırılarak, başlangıç inokülumunun 5×10^6 ile 1×10^7 cfu/ml değerleri arasında olması sağlandı. Her çalışma etabında antibiyotik içermeyen kontroller de hazırlanıp, aynı prosedür uygulandı. 37°C'de inkübe edilen karışımlardan, 0., 6. ve 24. saatlerde alınan örnekler %0.9'luk tuzlu su ile uygun oranlarda dilüe edilerek, Mueller-Hinton agar (MHA; Merck) plaklarına ekildi. 37°C'de 24-48 saat inkübe edilen plaklardaki koloniler sayıldı. Çalışma prosedürü tüm suşlar için iki kez tekrarlandı.

Linezolid/Ertapenem Kombinasyonunun Etkinliği

Her iki antibiyotiğin varlığında oluşan koloni sayısı, incelenen suşa karşı en etkin antibiyotik karşısında üreyen koloni sayısına oranla en az 100 katlık bir azalma gösteriyorsa "sinerji", bundan daha düşük bir azalma söz konusu ise "aditif", 100 kat veya daha fazla bir artış söz konusu ise "antagonizma" olarak değerlendirildi.

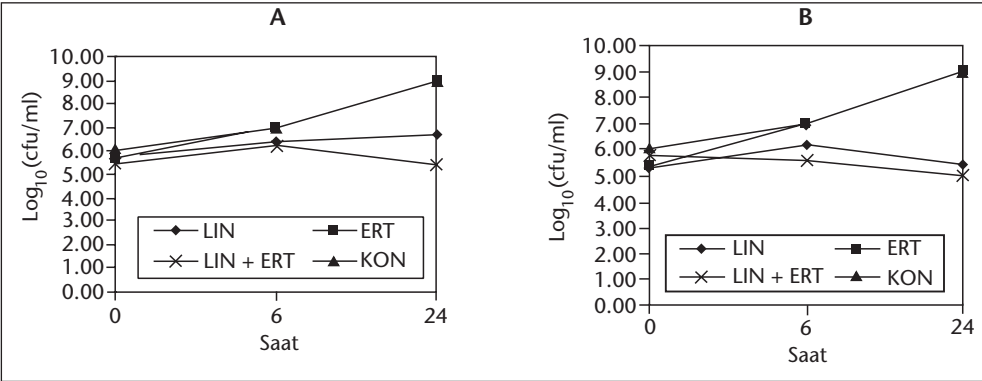
BULGULAR

Çalışmaya alınan ikişer MRSA, MRSE ve VREF suşlarının linezolide duyarlı, ertapeneme ise dirençli oldukları saptanmıştır. Araştırmamızda kullanılan suşların, CLSI önerileri doğrultusunda belirlenen linezolid ve ertapenem MİK değerleri Tablo 1'de görülmektedir.

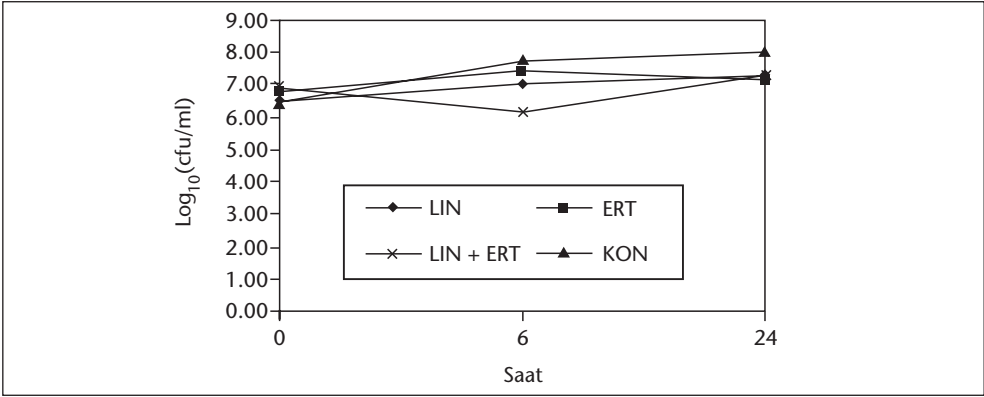
Linezolid ve ertapenemin etkinlikleri, tek başlarına ve kombine edilerek farklı konsantrasyonlarda araştırıldığında; MRSA-1 no'lu suшта, 1 x MİK değerinde 6. saatte iki antibiyotik arasında aditif etki saptanırken, MRSA-3 no'lu suшта 1 x MİK değerinde 24. saatte ve 4 x MİK değerinde 6. saatte aditif etki görülmüştür (Şekil 1). VREF-22 no'lu suшта 4 x MİK ve VREF-23 no'lu suшта 1 x MİK değerlerinde 6. saatte, linezolid ve ertapenem arasında aditif etkileşim belirlenmiştir (Şekil 2). MRSE-45 suşunda 1 x MİK değerinde 6. ve 24. saatlerde, linezolid ile ertapenem arasında aditif etki gözlenirken, 4 x MİK düzeyinde 6. saatte iki antibiyotiğin sinerjizm gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3). MRSE-49 suşunda ise, 1/2 x MİK değerinde 6. saatte ve 1 x MİK değerinde 24. saatte iki antibiyotik arasında aditif etki saptanmıştır.

Tablo 1. MRSA, VREF ve MRSE Suşlarının Linezolid ve Ertapenem MİK Değerleri

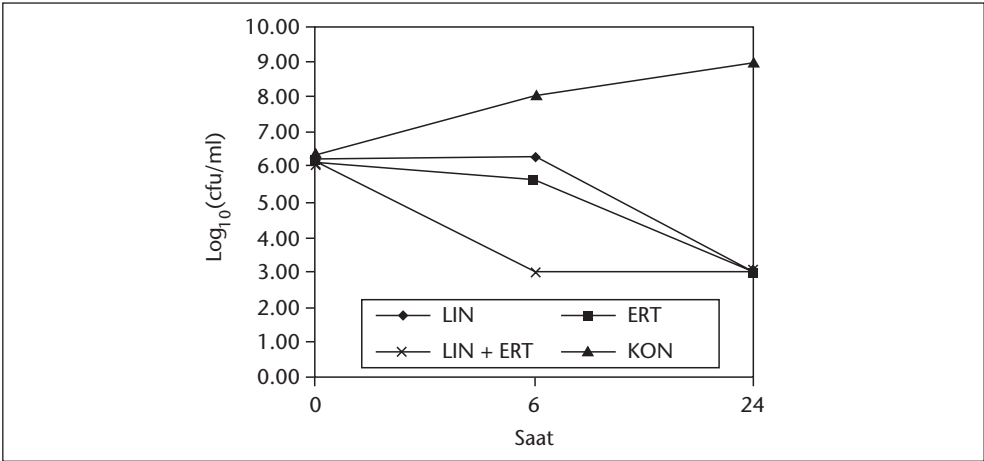
Suş	MİK (mg/L)	
	Linezolid	Ertapenem
MRSA-1	1	32
MRSA-3	2	16
VREF-22	1	32
VREF-23	1	32
MRSE-45	1	32
MRSE-49	1	64



Şekil 1. MRSA-3 suşunda; A: 1 x MİK değerinde 24. saatte, B: 4 x MİK değerinde 6. saatte linezolid ve ertapenem arasında aditif etkileşim (LIN: Linezolid, ERT: Ertapenem, LIN + ERT: Linezolid/Ertapenem kombinasyonu, KON: Kontrol).



Şekil 2. VREF-23 suşunda 1 x MİK değerlerinde 6. saatte, linezolid ve ertapenem arasında aditif etkileşim (LIN: Linezolid, ERT: Ertapenem, LIN + ERT: Linezolid/Ertapenem Kombinasyonu, KON: Kontrol).



Şekil 3. MRSE-45 suşunda 4 x MİK düzeyinde 6. saatte linezolid ile ertapenem arasında sinerjizm (LIN: Linezolid, ERT: Ertapenem, LIN + ERT: Linezolid/Ertapenem Kombinasyonu, KON: Kontrol).

TARTIŞMA

Gram-pozitif bakterilerin etken olduğu nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde önemli yeri olan vankomisin gibi klasik glikopeptidlere karşı gelişen direnç, yeni antibiyotiklere olan gereksinimi artırmıştır¹⁷. Özellikle dirençli gram-pozitif bakterilere karşı iyi bir etkinlik gösteren linezolid, tedavide önemli bir alternatif durumundadır. Ancak, göreceli olarak kısa bir süre önce klinik kullanıma girmesine rağmen linezolidde dirençli suşların ortaya çıkması ve ciddi enfeksiyonlarda mutlak bakterisidal etkiye ihtiyaç duyulması nedeniyle, diğer antibiyotikler ile kombinasyonlarının etkinliği araştırılmaktadır¹⁸. Linezolid ile gentamisin, vankomisin, siprofloksasin, rifampin, fusidik asit ve fosfomisin kombinasyonlarının sinerjik etkinliği olmadığı saptanırken, gentamisin, vankomisin, siprofloksasin ve fosfomisin linezolid ile kombinasyonunun antagonistik etki gösterdiği be-

lirlenmiştir^{12,17}. Ertapenem, gram-pozitif ve gram-negatif birçok mikroorganizmayı kapsayan spektrumu ve özellikle günde tek doz kullanıma imkan tanınması nedeniyle tercih edilen yeni bir karbapenemdir. Anaerop türlere karşı ertapenemin, piperasilin-tazobaktama eşdeğer veya daha iyi bir etkinliği bulunmaktadır¹⁰. Metisiline dirençli stafilkoklara ve enterokoklara karşı etkisi sınırlı olmakla birlikte *S.pneumoniae* enfeksiyonlarında başarı ile kullanılabilir¹⁹.

Linezolid ile ertapenem kombinasyonunun, MRSA, MRSE ve VREF suşları üzerine etkisini değerlendirdiğimiz çalışmamızda, genel olarak iki antibiyotik birbirleriyle aditif etki göstermiştir. Bunun tek istisnası, incelenen MRSE suşlarından birinde, 4 x MİK değerinde 6. saatte iki antibiyotik arasında sinerji belirlenmesidir. Bu suşta 1 x MİK değerinde 6. ve 24. saatlerde antibiyotikler aditif etki göstermiştir. Diğer MRSE suşunda sinerji saptanmazken, 1/2 x MİK değerinde 6. saatte ve 1 x MİK değerinde 24. saatte aditif etki bulunmuştur. MRSA suşlarında 1 x MİK-4 x MİK değerlerinde 6. ve 24. saatlerde aditif etki saptanırken, VREF suşlarında da aynı MİK değerlerinde 6. saatte aditif etki belirlenmiştir.

Linezolid ile ertapenem kombinasyonunun MRSA suşlarına etkinliğinin zamana bağlı öldürme eğrisi (time-kill) ile değerlendirildiği bir çalışmada, 4 x MİK düzeyindeki linezolid ile 1/128 x MİK düzeyindeki ertapenem arasında sinerji saptanmıştır¹⁴. Aynı çalışmada bu kombinasyon tavşan endokardit modeli üzerinde denenmiş ve tedavinin 4. gününde sinerjik etki belirlenmiştir¹⁴. Linezolid ve ertapenemin eşit katlardaki MİK değerlerini kullanarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, MRSA suşlarında sinerjik etki saptanmazken, MRSE suşlarından birinde 4 x MİK değerlerinde sinerji belirlenmesi, linezolid/ertapenem kombinasyonunun MRSE suşları üzerinde de sinerjik etki gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Gram-pozitif bakterilerin etken olduğu nozokomiyal enfeksiyonların ampirik tedavisinde genellikle antibiyotik kombinasyonları tercih edilmektedir. Sinerjik veya kısmi sinerjik etki oluşturan antibiyotik kombinasyonları, ciddi enfeksiyonların tedavisini mümkün kılmakta ve toksik etkilerini sınırlamaktadır. Hayvan modelleri ile desteklenen çalışmalarda, MRSA gibi dirençli mikroorganizmaların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde linezolidin vankomisin, rifampin ve gentamisin ile kombinasyonlarının etkinliği araştırılmıştır^{14,20}. Bunlardan sadece linezolid + gentamisin MRSA suşları üzerine bakterisidal etki göstermiştir. Ancak bu kombinasyonun kullanımı, gentamisine duyarlı mikroorganizmalar ile sınırlıdır¹⁴. Linezolidin sub-inhibitör konsantrasyonlardaki imipenem ile kombinasyonunun MRSA suşları üzerine sinerjik etkisi olduğu, Jacqueline ve arkadaşları¹³ tarafından belirlenmiştir. Ertapenemin dehidropeptidaz enzimine dayanıklı olması ve serum yarılanma süresinin uzunluğu nedeniyle günde tek doz uygulanabilmesi, imipeneme göre avantaj olarak değerlendirilmektedir¹⁰. Linezolidin oral yoldan kullanılabilmesi, ertapenemin söz konusu avantajlarıyla birlikte düşünüldüğünde, kullanımı daha kolay ve dolayısıyla hasta uyumu daha fazla olan bir kombinasyon olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda, linezolid/ertapenem kombinasyonunun bir MRSE suşuna karşı sinerjik, MRSA ve VREF suşlarına da aditif etkinliğinin belirlenmesi, bu kombinasyonun dirençli gram-pozitif suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceği düşün-

cesini destekler niteliktedir. Ancak klinik kullanım öncesinde, dirençli gram-pozitif suşların kullanıldığı kapsamlı in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Infect Control* 2006; 34 (Suppl 1): 11-9.
2. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 135-6.
3. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 275-80.
4. Amyes SG. Enterococci and streptococci. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29 (Suppl 3): 43-52.
5. Donowitz GR. Oxazolidinones, p: 436. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Dolin and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
6. Jones RN, Ross JE, Fritsche TR, Sader HS. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nations. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 279-87.
7. Wilson P, Andrews JA, Charlesworth R, et al. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 186-8.
8. Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, Kelkar S, DenBesten K, Quinn JP. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* 2001; 357: 1179.
9. Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1010-5.
10. Wexler HM. In vitro activity of ertapenem: review of recent studies. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53 (Suppl 2): ii11-21.
11. Grohs P, Kitzis MD, Gutmann L. In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 418-20.
12. Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V, et al. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 857-64.
13. Jacqueline C, Navas D, Batard E, et al. In vitro and in vivo synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 45-51.
14. Jacqueline C, Caillon J, Grossi O, et al. In vitro and in vivo assessment of linezolid combined with ertapenem: a highly synergistic combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2547-9.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S15. 2005, 15th Informational Supplement, Wayne, PA.
16. Pillai SK, Mollering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations, pp: 365-440. In: Lorian V (ed), Antibiotics in Laboratory Medicine. 2005, 5th ed. Williams and Wilkins, New York.
17. Lentino JR, Narita M, Yu VL. New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 3-15.
18. Linden PK. Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 632-45.
19. Hilliard NJ, Johnson CN, Armstrong SH, et al. In vitro activity of ertapenem (MK-0826) against multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae* compared with 13 other antimicrobials. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20: 136-40.
20. Jacqueline C, Asseray N, Batard E, et al. In vivo efficacy of linezolid combined with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 393-6.