

DIŞA ATIM POMPA İNHİBİTÖRÜ 1-(1-NAPHTHYLMETHYL)-PİPERAZİNE'İN SİPROFLOKSASİNE DİRENÇLİ GRAM-NEGATİF BAKTERİLERİN SİPROFLOKSASİN MİK DEĞERLERİNE ETKİSİ*

EFFECT OF EFFLUX PUMP INHIBITOR 1-(1-NAPHTHYLMETHYL)-PIPERAZINE TO MIC VALUES OF CIPROFLOXACIN IN CIPROFLOXACIN RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Ahmet Yılmaz ÇOBAN¹, Zeynep BAYRAM¹, Fikriye MİLLETLİ SEZGİN¹, Belma DURUPINAR¹

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

ÖZET

Bakterilerde çoklu antimikrobiyal direncin gelişiminde aktif dışa atım pompa sistemlerinin büyük önemi vardır. Bu çalışmada, dışa atım pompa inhibitörü olan 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP)'in gram-negatif bakterilerden *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarının siprofloksasin (CIP) minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerine olan etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, CIP'a dirençli 19 *P.aeruginosa*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif 37 *E.coli* ve GSBL pozitif 13 *K.pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Her bir izolatın CIP MİK değeri CLSI önerilerine göre buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiş, daha sonra her bir izolatın CIP MİK değerleri 100 µg/ml NMP varlığında tekrar test edilmiştir. Çalışmaya alınan tüm izolatların CIP MİK değerleri 4 µg/ml'ye eşit veya daha yüksektir. Çalışmada 100 µg/ml NMP varlığında *P.aeruginosa* izolatlarının hiçbirinin CIP MİK değerinin değişmediği gözlenmiştir. Buna karşın *E.coli* izolatlarının 22 (%59.4)'ünde 4 kat ve üzerinde, 14 (%37.8)'ünde ise 2 kat azalma saptanırken bir izolatın MİK değerinde değişme olmamıştır. NMP'nin ayrıca, *K.pneumoniae* izolatlarının 10 (%76.9)'unda 4 kat ve üzeri azalmaya, 3 (%23.1)'ünde ise 2 kat azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak NMP'nin, *E.coli* ve *K.pneumoniae* klinik izolatlarının CIP MİK düzeylerini önemli oranda azalttığı, ancak *P.aeruginosa* izolatlarının CIP MİK değerlerine etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, dışa atım pompa inhibitörü, 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, siprofloksasin, direnç.

* Bu çalışma, XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (21-25 Ekim 2008, Bodrum) poster olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

Effective efflux pump systems play a crucial role in the development of multiple antimicrobial resistance in bacteria. In this study, the effects of an efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine on ciprofloxacin (CIP) minimum inhibitory concentration (MIC) values in gram-negative bacteria including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* were investigated. Nineteen CIP-resistant *P.aeruginosa*, 37 extended spectrum beta-lactamase (ESBL) positive *E.coli* and 13 ESBL positive *K.pneumoniae* clinical isolates were included to the study. CIP MIC values of each isolate were determined by broth microdilution method as recommended by CLSI. MIC values were determined also in the presence of 100 µg/ml NMP. CIP MICs for all isolates were 4 µg/ml or higher. In the presence of 100 µg/ml NMP, CIP MICs did not change for *P.aeruginosa* isolates. While MICs decreased $\geq$ 4-fold for 22 (59.4%) *E.coli* isolates, 2-fold decrease was detected only for 14 (37.8%) isolates. MIC value did not change for 1 isolate. While MICs decreased $\geq$ 4-fold for 10 (76.9%) *K.pneumoniae* isolates, $\geq$ 2-fold decrease was detected for 3 (23.1%) isolates. In conclusion, while NMP consistently reduced the MIC of ciprofloxacin in *E.coli* and *K.pneumoniae* clinical isolates, no effects was observed in *P.aeruginosa* isolates.

Key words: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, efflux pump inhibitor, 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, ciprofloxacin, resistance.

GİRİŞ

Bakterilerde çoklu antimikrobiyal direncin gelişiminde aktif dışa atım pompa sistemlerinin katkısı büyüktür. Çoklu ilaç dışa atım pompa sistemlerinin büyük çoğunluğu "resistance-nodulation-cell division (RND)" süper ailesine ait olup genellikle periplazmada yer alan bir membran füzyon proteini ve dış membranda yer alan bir kanal proteini ile kompleks oluşturur^{1,2}. RND pompa proteinlerinin aşırı üretimi beta-laktam, florokinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim gibi birçok antibiyotige direnç neden olur³.

Dışa atım pompasına bağlı direnç yaygın olarak görülmesine rağmen, günümüzde bu pompaları inhibe eden ve klinik kullanımı kanıtlanmış bir etken henüz bulunmamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda bazı kimyasal maddelerin dışa atım pompalarını inhibe ettiği gösterilmiş ve bunlardan birisi olan 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP)'in gram-negatif bakterilerde en sık çoklu ilaç direncine yol açan RND tipi pompa sistemlerini inhibe ettiği belirtilmiştir^{4,5}. Farklı mikroorganizmalarla NMP'nin etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, kinolonlar da dahil olmak üzere birçok antibakteriyel ajanın minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinde azalma sağlandığı tespit edilmiştir⁵. Ancak literatüre bakıldığında dışa atım pompaları ve bu pompaların direnç katkısı iyi tanımlanmış olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı NMP'nin etkinliğinin araştırılmadığı görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, dışa atım pompa inhibitörü NMP'nin siprofloksasin (CIP)'e dirençli gram-negatif bakterilerden *P.aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarının CIP MİK düzeylerine etkilerinin in vitro araştırması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen CIP'a dirençli 19 *P.aeruginosa*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif 37 *E.coli* ve GSBL pozitif 13 *K.pneumoniae* suşu alındı. Kontrol olarak *E.coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve *K.pneumoniae* ATCC 700603 suşları kullanıldı.

CIP etken maddesi (Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti) suda çözülerek 8196 µg/ml son konsantrasyonda hazırlandı. NMP (Sigma-Aldrich, Germany) ise DMSO ile çözülerek son konsantrasyonu 20.000 µg/ml olacak şekilde hazırlandı.

CIP'ın MİK değerlerinin belirlenmesinde katyon ayarlı Mueller-Hinton besiyeri (KAMHB) içeren U-tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl KAMHB konularak CIP'ın 128- 0.125 µg/ml'lik dilüsyonları hazırlandı. İlk kuyucuk üreme kontrol kuyucuğu olacağından CIP eklenmedi. NMP'nin etkilerini araştırmak için plaklar içerisinde 100 µg/ml NMP içeren KAMHB besiyeri de yukarıdaki gibi hazırlandı.

MİK değerlerinin belirlenmesi, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından önerilen buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle yapıldı⁶. Test edilecek izolatlar kanlı agar besiyerine pasajlanarak 37°C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı ve 1:100 oranında sulandırıldıktan sonra her kuyucuğa 100 µl inoküle edildi. Plaklar 37°C'de bir gece inkübe edildi ve sonuçlar değerlendirildi. NMP'nin etkilerini araştırmak için MİK testi 100 µg/ml NMP içeren plaklarda aynı şekilde tekrarlandı. Tüm testler 2 kez yapıldı. İnkübasyon sonrasında üremenin gözlenmediği en son kuyucuk MİK olarak belirlendi.

BULGULAR

Test edilen izolatların CIP MİK değerleri ≥ 4 µg/ml olarak bulunmuştur. 100 µg/ml NMP varlığında *P.aeruginosa* izolatlarının hiçbirisinin CIP MİK değerinin değişmediği gözlenmiştir. *E.coli* izolatlarının 22 (%59.4)'ünde ≥ 4 kat azalma saptanırken, 14 (%37.8)'ünde 2 kat azalma saptanmış, bir izolatta ise MİK değeri değişmemiştir. *K.pneumoniae* izolatlarının 10 (%76.9)'ünde ≥ 4 kat azalma saptanırken, 3 (%23.1)'ünde 2 kat azalma gözlenmiştir (Tablo I). Çalışmamızda, *P.aeruginosa* hariç *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarının MİK değerlerinde belirgin bir azalma gözlenmesine rağmen, NMP varlığında duyarlı hale gelen izolat yoktur (Tablo I).

Tablo I. Test Edilen Klinik İzolatların NMP Varlığında MİK Değerlerinde Gözlenen Değişimler

Bakteriler	MİK değeri değişmeyenler	MİK değeri 2 kat azalanlar	MİK değeri 4 kat ve daha fazla azalanlar	Toplam
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	0	0	19
<i>Escherichia coli</i>	1	14	22	37
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	3	10	13

NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazin, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

TARTIŞMA

Gram-negatif bakterilerin dışa atım pompaları özellikle RND ailesine ait olup, bunlara bağlı direnç fenilalanil-arjinil-beta-naftilamid (PAßN) veya küçük N-heterosiklik organik kimyasal maddeler ile mekanizması henüz açıklanamamış bir yol ile inhibe edilmektedir⁴. RND tipi dışa atım pompalarına bağlı direnç özellikle *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* ve *E.coli*'nin bazı suşlarında gösterilmiştir⁸. Son yıllarda Bohnert ve Kern⁴, RND tipi dışa atım pompası eksprese eden *E.coli* izolatlarında bu direnci inhibe eden yeni bir dışa atım pompası (NMP) tanımlamışlar ve NMP'nin, florokinolonlara ve diğer ajanlara karşı duyarlılığı ve levofloksasin (LEV) ile etidyum bromürün hücre içi konsantrasyonunu artırdığını rapor etmişlerdir. Kern ve arkadaşları⁵, NMP'nin *E.coli* klinik izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarına etkilerini araştırmışlar ve 25 µg/ml NMP konsantrasyonunun antimikrobiyal MİK değerlerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını gözlerken, 100 µg/ml NMP varlığında önemli bir azalma saptamışlardır. Florokinolonlara duyarlı 23 ve dirençli 37 *E.coli* izolatının test edildiği çalışmada; florokinolon grubu antibiyotiklerden yalnızca LEV kullanılmış ve duyarlı suşların 12 (%52)'sinin LEV MİK değerinde 4 kat ve üzerinde, birinde ise 16 kat ve üzerinde azalma görülürken, dirençli suşların 28 (%76)'inde LEV MİK değerinde 4 kat ve üzerinde azalma belirlenmiştir⁵. Bizim çalışmamızda ise florokinolonlardan CIP test edilmiş olup, *E.coli* izolatlarının 22 (%59.4)'sinin CIP MİK değerlerinde 100 µg/ml NMP varlığında 4 kat ve üzerinde, 14 (%37.8)'ünde 2 kat azalma tespit edilmiş, bir izolatta ise MİK değerinde değişiklik saptanmamıştır.

Schumacher ve arkadaşları⁷, Enterobacteriaceae üyelerinin (*E.coli* hariç) antibiyotik duyarlılıklarına NMP'nin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 38 *K.pneumoniae* klinik izolatını test etmişler, 29 (%76)'unun levofloksasin MİK değerinin 4 kat ve üzerinde azaldığını, bir izolatta ise 16 kat ve üzerinde azalma olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da, *K.pneumoniae* izolatlarının 10 (%76.9)'unda CIP MİK değerlerinin 4 kat ve üzerinde azaldığı saptanırken, 3 (%23.1)'ünde 2 kat azalma tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, 34 *Citrobacter freundii*, 25 *Enterobacter aerogenes* ve 70 *Serratia marcescens* klinik izolatu da test edilmiş ve çalışılan antibiyotiklerin çoğunun MİK değerlerinde belirli oranlarda azalma gözlenmiştir⁷. Bu bilgiler ışığında NMP'nin, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *C.freundii*, *E.aerogenes*, ve *S.marcescens* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarına etkili olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda ise, CIP'a dirençli *E.coli* ve *K.pneumoniae* klinik izolatlarının CIP MİK değerlerine NMP'nin etkileri araştırılırken, diğer çalışmalardan farklı olarak CIP'a dirençli *P.aeruginosa* izolatlarına da etkileri test edilmiştir. Lomovskaya ve arkadaşları⁸, PAßN'nin *P.aeruginosa*'da dışa atım pompasının aşırı ekspresyonuna bağlı olarak kazanılmış florokinolon direncini önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Coban ve arkadaşları⁹ PAßN'nin CIP, ofloksasin ve levofloksasin ile kombinasyonlarının *P.aeruginosa* klinik izolatlarında florokinolon direncini azalttığını rapor etmişlerdir. Ancak literatürde NMP'nin *P.aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarına etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu konudaki ilk çalışmamızda, NMP'nin (100 µg/ml) *P.aeruginosa* izolatlarının CIP MİK değerleri üzerine etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bunun nedeni, NMP'nin *P.aeruginosa* dışa atım pompalarına etki etmemesi ya da florokinolon di-

rencinin diğer mekanizmalara (plazmid aracılı veya hedef enzim mutasyonu gibi) bağlı olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak, NMP'nin *E.coli* ve *K.pneumoniae* klinik izolatlarının CIP MİK değerlerinde belirgin azalmaya neden olduğu, ancak izolatların hiçbirinin duyarlı hale gelmediği saptanmıştır. Ayrıca, *P.aeruginosa* izolatlarının MİK değerlerinde herhangi bir değişim olmaması, direncin dışı atım pompası dışında diğer direnç mekanizmalarına bağlı olarak da meydana gelmiş olabileceğine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 215-23.
2. Li XZ, Nikaido H. Efflux mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 64: 159-204.
3. Bal Ç. Toplum kökenli enfeksiyonlarda gram-negatif çomak direnci. *Ankem Derg* 2006; 20: 278-81.
4. Bohnert JA, Kern WV. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 849-52.
5. Kern WV, Steinke P, Schumacher A, Schuster S, von Baum H, Bohnert JA. 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.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement M100-S18, 2008. CLSI, Wayne, Pa.
7. Schumacher A, Steinke P, Bohnert JA, Akova M, Jonas D, Kern WV. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 344-48.
8. 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. *Antimicrobial Agents Chemother* 2001; 45: 105-16.
9. Coban AY, Ekinci B, Durupinar B. A multidrug efflux pump inhibitor reduces fluoroquinolones resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Chemotherapy* 2004; 50: 22-6.