

İmipeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Kolistin-Ampisilin/Sulbaktam Kombinasyonu Etkinliğinin Değerlendirilmesi*

Evaluation of Colistin-Ampicillin/Sulbactam Combination Efficacy in Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains

Aytekin ÇIKMAN¹, Mehmet Reşat CEYLAN², Mehmet PARLAK³,
Mustafa Kasım KARAHOCAGİL², Mustafa BERKTAŞ⁴

¹ Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Erzincan.

¹ Erzincan Mengücek Gazi Education and Research Hospital, Microbiology Department, Erzincan, Turkey.

² Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

² Yuzuncu Yil University Health Research and Practice Hospital, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Van, Turkey.

³ Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Van.

³ Van Education and Research Hospital, Microbiology Department, Van, Turkey.

⁴ Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

⁴ Yuzuncu Yil University Health Research and Practice Hospital, Department of Medical Microbiology, Van, Turkey.

* Bu çalışma, 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (12-16 Kasım 2011, Antalya)'nde sözel bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 19.06.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 29.11.2012

ÖZET

Karbapenemler dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe dirençli olan *Acinetobacter baumannii* suşlarının hastane enfeksiyonları etiyolojisinde artış göstermesi, bu bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda çeşitli antimikrobiyal kombinasyonların kullanımını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada, hastane enfeksiyonu etkeni olan imipeneme dirençli *A.baumannii* suşlarına karşı kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonunun değerlendirilmesi amacıyla, antibiyotiklerin MİK değerleri ve in vitro sinerjistik etkinliği E-test yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmaya, çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve imipeneme dirençli olduğu belirlenen hastane enfeksiyon etkeni 33 *A.baumannii* suşu alınmıştır. Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan *A.baumannii* suşlarının imipenem direnci, BD Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile belirlenmiştir. İzolatların kolistin ve ampisilin/sulbaktam için MİK değerleri ile in vitro sinerjistik etkinliği Mueller-Hinton agar besiyerinde E-test yöntemiyle (AB Biodisk, İsveç) araştırılmıştır. *A.baumannii* suşlarının sinerjik, aditif, indiferan ve antagonist etkileri fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FIK) indeksi ile değerlendirilmiştir.

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Aytekin Çıkman, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Başbağlar Mahallesi, Erzincan, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 446 212 2222, **E-posta (E-mail):** draytekin65@hotmail.com

rilmiş; FLK indeksi ≤ 0.5 ise sinerji, $1 - >0.5$ ise aditif ve ≥ 2 ise antagonist etki olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya alınan 33 *A.baumannii* suşunun 21'i kolistine dirençli, 12'si duyarlı bulunurken, 30 izolat ampisilin/sulbaktama dirençli, üçü ise orta duyarlı olarak saptanmıştır. *A.baumannii* suşlarının kolistin için MLK_{50} , MLK_{90} ve MLK aralığı sırasıyla; 8, 32 ve 0.13-128 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş; ampisilin/sulbaktam için bu değerler sırasıyla; 48, 256 ve 12-256 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. FLK indeksine göre, kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonu ile, suşların 15'inde sinerjik, dördünde aditif, beşinde indifferan ve dokuzunda antagonist etki görülmüştür. CLSI kriterlerine göre kolistine duyarlı bulunan 12 *A.baumannii* suşunun dokuzunda antagonistik, ikisinde indifferan ve birinde sinerjik etki saptanmış; buna karşın kolistine dirençli 21 suşun 14'ünde sinerjik, dördünde aditif ve üçünde indifferan etki belirlenmiştir. Sonuç olarak; kolistinin ampisilin/sulbaktamla kombinasyonu in vitro şartlarda yüksek sinerjik etki göstermiştir. Ancak bu kombinasyonun sinerjik etkisi kolistine dirençli suşlarda daha belirgin olup, kolistine duyarlı suşlarda antagonist etkinin belirgin olduğu izlenmiştir. Bu nedenle *A.baumannii* enfeksiyonlarında kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonu yerine öncelikle kolistin direncinin araştırılması, direncin saptanması durumunda bu kombinasyonun uygulanmasının daha etkin olacağı düşünülmüş; bu verilerin ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*; ampisilin/sulbaktam; kolistin; sinerji.

ABSTRACT

The increasing emergence of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* strains as nosocomial pathogens lead to the use of antimicrobial combinations in the treatment of infections due to these bacteria. The aim of this study was to determine the MIC values of colistin and ampicillin/sulbactam and their in vitro synergistic activities by E-test in order to evaluate the effect of this combination against imipenem-resistant *A.baumannii* isolates. A total of 33 *A.baumannii* strains isolated from clinical specimens as etiologic agents of nosocomial infections and identified as imipenem-resistant were included in the study. Identification of the isolates was performed by conventional methods and their imipenem resistance was detected with BD Phoenix automated system (Becton Dickinson, USA). MIC values and in vitro synergistic activity of colistin and ampicillin/sulbactam combination were analyzed by E-test (AB Biodisk, Sweden) on Mueller-Hinton agar medium. Synergistic, additive, indifferent and antagonist effects of *A.baumannii* strains were evaluated by fractional inhibitory concentration (FIC) index. The combination was considered to be synergistic when the FIC index was ≤ 0.5 , additive when it was $1 - > 0.5$ and antagonistic when ≥ 2 . Of the 33 strains included in the study, 21 were resistant to colistin; 30 were resistant and 3 were moderately susceptible to ampicillin/sulbactam. MIC_{50} and MIC_{90} values and MIC range of *A.baumannii* strains for colistin were 8, 32 and 0.13-128 $\mu\text{g/ml}$; for ampicillin/sulbactam those values were 48, 256 and 12-256 $\mu\text{g/ml}$, respectively. According to the FIC indices, 15 strains showed synergistic, four additive, five indifferent and nine antagonistic activity to colistin and ampicillin/sulbactam combination. Among the 12 colistin-susceptible strains, nine showed antagonistic, two indifferent and one synergistic activity to the tested combination while among the 21 colistin-resistant strains 14 showed synergistic, four additive and three indifferent activity. As a result, the combination of colistin with ampicillin/sulbactam, demonstrated high synergistic activity in vitro. While the synergistic effect of this combination was more significant in colistin-resistant strains, antagonistic effect of colistin-susceptible strains was found to be notable. Therefore, colistin resistance should be primarily determined before using colistin and ampicillin/sulbactam combination in *A.baumannii* infections since this combination seemed to be more effective in case of colistin resistance. However, these data should be supported by further advanced clinical studies.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; ampicillin/sulbactam; colistin; synergy.

GİRİŞ

Çoklu ilaç direnci nedeniyle dikkat çeken *Acinetobacter baumannii*, en önemli nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinden biridir. *A.baumannii*, hastane ortamında yaygın olarak bulunmakta ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olmaktadır^{1,2}. Karbapenemler dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe dirençli olan *A.baumannii* suşlarının hastane enfeksiyonları etiyolojisinde artış göstermesi, bu bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda çeşitli antimikrobiyal kombinasyonların kullanımını zorunlu kılmaktadır³⁻⁵. Çok ilaca dirençli enfeksiyon etkenlerinin tedavisinde kullanılan kombinasyon tedavileri için in vitro sinerji testlerinin yapılması, en uygun kombinasyonun bu şekilde belirlenmesinin doğru olacağı önerilmektedir⁶. Bu çalışmada, hastane enfeksiyonu etkeni olan imipeneme dirençli *A.baumannii* suşlarına karşı kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonunun değerlendirilmesi amacıyla, antibiyotiklerin MİK değerleri ve in vitro sinerjistik etkinliği E-test yöntemi ile araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Aralık 2007-Temmuz 2011 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve imipeneme dirençli olduğu belirlenen hastane enfeksiyon etkeni 33 *A.baumannii* izolatu dahil edildi. Hastane enfeksiyonlarının tanısı, "Centers for Disease Control and Prevention, Hastalık Kontrol Merkezinin (CDC)" kriterleri kullanılarak konuldu^{7,8}.

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan *A.baumannii* suşlarının imipenem direnci BD Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile belirlendi ve izolatların kolistin ve ampisilin/sulbaktam için MİK değerleri ile in vitro sinerjistik etkinliği Mueller-Hinton agar besiyerinde (Oxoid, İngiltere) E-test yöntemiyle (AB Biodisk, İsveç) araştırıldı. Kolistin ve ampisilin/sulbaktam direnci CLSI kriterlerine göre belirlendi⁹.

A.baumannii suşlarının sinerjik, aditif, indiferan ve antagonist etkileri fraksiyonel inhibitor konsantrasyon (FK) indeksi ile değerlendirildi. E-test ile FK indeksini belirlemek için önce kombinasyonda yer alan A ve B antibiyotiklerinin MİK değerleri kaydedildi. Kombinasyon MİK değerini saptamak için besiyerine önce B şeridi konuldu ve 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra, konsantrasyon çizgileri tam çakışacak şekilde B'nin yerine A şeridi yerleştirildi. Besiyerleri 37°C'de 18-20 saat inkübe edildikten sonra, inhibisyon zon çapının E-test strip kenarını kestiği noktada B'nin varlığında A'nın MİK sayısal değeri kaydedildi. Aynı işlem önce A ve sonra B antibiyotiği olacak şekilde tekrarlandı. Kombinasyonun etkinliğinin belirlenmesinde; " Σ FK indeksi = FK A (= B'nin varlığında A'nın MİK sayısal değeri/Tek başına A'nın MİK sayısal değeri) + FK B (= A'nın varlığında B'nin MİK sayısal değeri/Tek başına B'nin MİK sayısal değeri)" formülü kullanıldı. Toplam FK indeksi ≤ 0.5 ise sinerji, $1 - > 0.5$ ise aditif, $< 2 - > 1$ ise indiferan ve ≥ 2 ise antagonist etki olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 33 *A.baumannii* suşunun 21'i kolistine dirençli, 12'si duyarlı bulunurken, 30'u ampisilin/sulbaktama dirençli, üçü ise orta duyarlı olarak saptanmıştır. İzolatların kolis-

tin için MIK_{50} , MIK_{90} ve MIK aralığı sırasıyla; 8, 32 ve 0.13-128 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuş; ampisilin/sulbaktam için bu değerler sırasıyla; 48, 256 ve 12-256 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan *A.baumannii* suşları için kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonu değerlendirildiğinde; FLK indeksine göre suşların 15'inde sinerjik, dördünde aditif, beşinde indiferan ve dokuzunda antagonist etki görülmüştür. Kolistine duyarlı bulunan 12 *A.baumannii* suşunun ampisilin/sulbaktam ile etkileşimi incelendiğinde, dokuzunda antagonistik, ikisinde indiferan ve birinde sinerjik etki izlenmiş; buna karşın kolistine dirençli 21 *A.baumannii* suşunun 14'ünde sinerjik, dördünde aditif ve üçünde indiferan etki belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda giderek artan oranlarda görülen nozokomiyal *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisindeki en önemli problem, neredeyse suşların tamamında karbapenemler dahil birçok antibiyotiğe direnç görülmesi ve tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerinin tükenmesidir¹⁰. Bu durum klinisyenleri yeni tedavi seçeneklerine yönlendirmekte ve çok ilaca dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde hem başarı sağlamak hem de direnç gelişimini önlemek amacıyla kombine antibiyotik kullanımı önerilmektedir¹¹⁻¹⁴. Bu önerilerden birisi de Col-A/S kombinasyonudur. Bu kombinasyonunun sinerjik etkinliği birçok çalışmada gösterilmiştir^{15,16}. Lee ve arkadaşları¹⁵, bakteriyemi ve menenjit etkeni olan çoğul dirençli *A.baumannii* suşlarında bu kombinasyonun etkinliğini araştırmış ve sulbaktama dirençli suşlarda sulbaktam/kolistin kombinasyonunun sinerjik etkinlik gösterdiğini ve iyi bir tedavi seçeneği olabileceğini bildirmiştir. Çalışmamızda, imipeneme dirençli *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisine alternatif olması amacıyla kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonunun sinerjistik aktivitesi değerlendirilmiş; yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak, bu kombinasyonun imipeneme dirençli *A.baumannii* suşlarının %45 (15/33)'i üzerinde sinerjik etkinlik gösterdiği, %27'sinde ise antagonist etkileşim oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca kolistine dirençli suşlarda, kolistinin ampisilin/sulbaktam ile yüksek oranda sinerjik etki gösterdiği, buna karşın kolistine duyarlı suşlarda bu kombinasyonun daha ziyade antagonist etki oluşturduğu belirlenmiştir.

Rodriguez ve arkadaşları¹⁷, karbapeneme dirençli bazı *A.baumannii* suşlarında antimikrobiyal ajanların kolistin ile kombine edilmesinin aktivitede azalmaya ve antibiyotik direncine neden olduğunu göstermiştir. Principe ve arkadaşları¹⁸ *A.baumannii* suşlarındaki bu antibiyotik direncinin, birden çok mekanizma ile karmaşık etkileşimler sonucunda geliştiğini göstermiştir. Bu nedenle direncin önüne geçmek ve antagonist etkileşimi azaltmak için kolistin ile yapılan kombinasyon terapisinin iyi belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın verileri, kolistinin ampisilin/sulbaktam ile kombinasyonunun in vitro şartlarda yüksek sinerjik etki gösterdiğini ortaya koymuş; bu kombinasyonun sinerjik etkisinin kolistine dirençli suşlarda daha belirgin olduğu, kolistine duyarlı suşlarda ise antagonist etkinin belirgin olduğu izlenmiştir. Sonuç olarak, *A.baumannii* enfeksiyonlarında kolistin-ampisilin/sulbaktam kombinasyonu uygulanmasından önce kolistin direncinin belirlenmesi, direnç saptanması durumunda bu kombinasyonun verilmesinin daha etkin olacağı kanısına varılmış; ancak bu verilerin geniş kapsamlı ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol* 2011; 6(4): 407-22.
2. Aşık G. Current approaches to explain the virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 371-80.
3. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23(4): 332-9.
4. Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, et al. Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 1165-72.
5. Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H. Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40(3): 117-20.
6. Akalın H. Çoklu ilaç direncinde tedavi yaklaşımı ve ilaç politikaları. *ANKEM* 2007; 21(Ek 2): 186-91.
7. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; 16(3): 128-40.
8. Horan TC, Andrus M, Dudek MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36(5): 309-32.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement, M100-S20, 2010. CLSI, Wayne, PA.
10. Yıldırım Mİ, Tuğrul HM. Assessment of efficacies of imipenem, cefoperazone-sulbactam and cefepime in rats with experimental thigh abscess model with multidrug resistant and susceptible *Acinetobacter baumannii* strains. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3): 422-9.
11. Yıldız O. Çoklu dirençli Gram-negatiflerde tedavi yaklaşımı: *Acinetobacter* türleri. *Yoğun Bakım Derg* 2007; 7(1): 144-50.
12. Çiftçi İH, Aşık G. *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. *ANKEM* 2011; 25(3): 196-207.
13. Ozdem B, Gürelik FC, Celikbilek N, Balıkcı H, Açıkgöz ZC. Antibiotic resistance profiles of *Acinetobacter* species isolated from several clinical samples between 2007-2010. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3): 526-34.
14. Punpanich W, Munsrichoom A, Srisarang S, Treeratweeraphong V. In vitro activities of colistin and ampicillin/sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *J Med Assoc Thai* 2011; 94(Suppl 3): S95-100.
15. Lee CH, Tang YF, Su LH, Chien CC, Liu JW. Antimicrobial effects of varied combinations of meropenem, sulbactam, and colistin on a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate that caused meningitis and bacteremia. *Microb Drug Resist* 2008; 14(3): 233-7.
16. Sung H, Choi SJ, Yoo S, Kim MN. In vitro antimicrobial synergy against imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Lab Med* 2007; 27(2): 111-7.
17. Rodriguez CH, De Ambrosio A, Bajuk M, et al. In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. *J Infect Dev Ctries* 2010; 4(3): 164-7.
18. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8: 18.