

Karbapeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarına Karşı Sulbaktam ile İmipenem, Meropenem ve Sefoperazon Kombinasyonlarının İn Vitro Sinerjistik Aktivitesi

In Vitro Synergistic Activity of Sulbactam in Combination with Imipenem, Meropenem and Cefoperazone Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates

Hatice TÜRK DAĞI¹, Halit KUŞ¹, Uğur ARSLAN¹, İnci TUNCER¹

¹ Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

¹ Selçuk University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Konya, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 17.09.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 31.01.2014

ÖZET

Acinetobacter baumannii nozokomiyal epidemilere yol açan, fırsatçı bir patojendir. Antibiyotiklere çoklu direnç geliştirdiği için direnç oranları yüksek ve tedavisi zordur. Bu çalışmanın amacı, hastane-mizde yatan hastalardan izole edilen *A.baumannii* izolatlarının sulbaktam, imipenem, meropenem ve sefoperazon MİK değerlerinin saptanması ve imipenem, meropenem ve sefoperazonun sulbaktam ile kombinasyonlarının in vitro sinerjistik etkilerinin belirlenmesidir. Çalışmaya, çeşitli klinik örneklerinden izole edilen ve disk difüzyon yöntemi ile karbapenemlere dirençli bulunan 40 *A.baumannii* suşu dahil edilmiştir. İzolatlar, konvansiyonel yöntemler ve VITEK2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak tanımlanmıştır. Sulbaktam, imipenem, meropenem ve sefoperazon MİK değerleri CLSI önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmış; in vitro sinerji testi ise dama tahtası mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır. İlaç kombinasyonlarının sinerjik, aditif, farksız (indiferan) ve antagonist etkileri fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksi ile değerlendirilmiştir. FİK indeksi ≤ 0.5 ise sinerjik, 0.5-1 arasında ise kısmi sinerjik; 1 ise aditif; 1-4 arasında ise farksız ve ≥ 4 ise antagonistik olarak kabul edilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi ile 40 *A.baumannii* izolatının hepsi imipenem ve sefoperazona dirençli iken, ikisi meropeneme duyarlı, yedisi orta duyarlı ve 31'i dirençli bulunmuştur. Sulbaktam MİK değerleri, izolatların ikisinde 4 µg/ml, beşinde 8 µg/ml, üçünde 16 µg/ml, 13'ünde 32 µg/ml, üçünde 64 µg/ml, altısında 128 µg/ml ve sekizinde > 128 µg/ml olarak tespit edilmiştir. FİK indeksine göre, imipenem/sulbaktam kombinasyonunda, izolatların 18 (%45)'inde sinerjik, 4 (%10)'ünde kısmi sinerjik ve 2 (%5)'inde farksız etki; meropenem/sulbaktam kombinasyonunda, izolatların 19 (%48)'unda sinerjik, 3 (%7.5)'ünde kısmi

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Uğur Arslan, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Selçuklu 42131, Konya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 332 224 4746, **E-posta (E-mail):** drarslanugur@gmail.com

sinerjik ve 3 (%7.5)'ünde farksız etki; sefoperazon/sulbaktam kombinasyonunda ise, 10 (%25) izolatta sinerjik, 2 (%5)'inde kısmi sinerjik ve 2 (%5)'inde farksız etki saptanmıştır. Hiçbir kombinasyonda antagonistik etki izlenmemiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, karbapenemlere dirençli *A.baumannii* izolatlarında sulbaktam MİK değerlerinin de genellikle yüksek olduğu ve izolatların yaklaşık yarısında, karbapenem-sulbaktam kombinasyonunun sinerjik etki gösterdiği saptanmıştır. Ancak bu veriler, ampirik tedavi ve klinik etkinliği belirlemede yetersiz olduğundan, ileri klinik çalışmalarla desteklenmelidir

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*; karbapenem; direnç; sefoperazon; sulbaktam; sinerji.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii which is an opportunistic pathogen leading to nosocomial epidemics, exhibit high rates of antimicrobial resistance. Treatment of *Acinetobacter* infections is a challenge since most of the isolates are multiple antibiotic resistant. The aim of this study was to investigate minimum inhibitory concentrations (MICs) of sulbactam, imipenem, meropenem, and cefoperazone and in vitro synergistic activity of sulbactam in combination with imipenem, meropenem and cefoperazone against *A.baumannii* isolates of hospitalized patients. Forty *A.baumannii* strains isolated from various clinical specimens and found to be resistant to carbapenems by disc diffusion method, were included in the study. The isolates were identified by conventional methods and VITEK 2 (bioMerieux, France) automated identification system. MICs of sulbactam, imipenem, meropenem, and cefoperazone were determined by the broth microdilution method according to the standards of CLSI and in vitro synergy test was performed using the checkerboard microdilution method. Synergistic, partial synergistic, additive, indifferent and antagonistic effects of drug combinations were evaluated with the fractional inhibitory concentration index (FICI). Interpretation of the FICI was as follows: ≤ 0.5 synergy; > 0.5 to < 1 partial synergy; 1 additive; > 1 to < 4 indifference; and ≥ 4 antagonism. Forty *A.baumannii* isolates were resistant to imipenem and cefoperazone, but two were susceptible, seven were moderately susceptible and 31 were resistant to meropenem with the microdilution method. MIC values of the isolates for sulbactam were found to be 4 µg/ml in two, 8 µg/ml in five, 16 µg/ml in three, 32 µg/ml in 13, 64 µg/ml in three, 128 µg/ml in six and > 128 µg/ml in eight isolates. According to the FICI; imipenem/sulbactam combination exhibited synergy in 18 (45%), partial synergy in 4 (10%) and indifferent effect in 2 (5%) isolates, the combination of meropenem and sulbactam showed synergy in 19 (48%), partial synergy in 3 (7.5%), and indifferent effect in 3 (7.5%) isolates, the combination of cefoperazone/sulbactam demonstrated synergy in 18 (45%), partial synergy in 2 (5%), and indifferent effect in 2 (5%) isolates. There was no antagonistic effect with the tested combinations. In conclusion, MIC values of sulbactam were generally high in carbapenem-resistant *A.baumannii* strains. However, synergistic effect was detected in approximately half of the strains with the sulbactam/carbapenem combinations. The data obtained in this study should be supported by further advanced in vitro and clinical studies to predict the accurate clinical efficacy of sulbactam containing combinations on *A.baumannii* infections.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; carbapenem; resistance; cefoperazone; sulbactam; synergy.

GİRİŞ

Fırsatçı bir patojen olan *Acinetobacter baumannii* önemli bir nozokomiyal enfeksiyon etkenidir. Antibiyotiklere çoklu direnç geliştirdiği için direnç oranları yüksektir ve enfeksiyonların tedavisi zordur. Karbapenemler, bakteri tarafından üretilen beta-laktamaz enzimlerinin hidrolizine karşı stabil olmaları nedeniyle *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir seçenek olmuştur^{1,2}. Ancak imipenem direncinin ilk kez belirlendiği tarihten bu yana, bu bileşiklere direnç oranları da tüm dünyada hızla artmaktadır. Bu

nedenle *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif antibiyotik kombinasyonlarının kullanımı gündeme gelmiştir^{3,4}.

Çeşitli beta-laktamazlara karşı güçlü bir inhibitör olan sulbaktam, *A.baumannii*'ye karşı yüksek düzeyde inhibitör aktiviteye sahiptir. Ancak sınır değerlerinin olmaması, sulbaktamın tek başına ciddi *A.baumannii* enfeksiyonlarında kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle sulbaktam, kombine olarak kullanılmakta ve penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak beta-laktamların bakterisidal aktivitesini artırmaktadır⁵. Bu çalışmada, yatan hastalardan izole edilen *A.baumannii* izolatlarının sulbaktam, imipenem, meropenem ve sefoperazon minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi ve sulbaktam ile imipenem, meropenem ve sefoperazon kombinasyonlarının in vitro sinerjistik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2009-2013 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen ve disk difüzyon yöntemi ile karbapenemlere dirençli bulunan 40 *A.baumannii* izolatı alındı. Aynı hastadan izole edilen suşlardan sadece biri çalışmaya dahil edildi. Bakteri tanımlaması konvansiyonel yöntemler ve VITEK2 (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak yapıldı. Sulbaktam (SUL), imipenem (IPM), meropenem (MEM) ve sefoperazon (CFP) MİK değerleri CLSI⁶ önerilerine göre mikrodilüsyon yöntemiyle araştırıldı ve in vitro sinerji testi dama tahtası (checkerboard) mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı. İlaç kombinasyonlarının sinerjik, aditif, farksız (indiferan) ve antagonistik etkileri fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksi ile değerlendirildi. Hesaplanan FİK değerleri ≤ 0.5 ise sinerjik, 0.5 ile 1 arasında ise kısmi sinerjik; 1 ise aditif; 1 ile 4 arasında ise farksız ve ≥ 4 ise antagonistik olarak kabul edildi⁷. Kalite kontrol suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan *A.baumannii* izolatlarının 23'ü kan, 12'si trakeal aspirat, 3'ü yara ve 2'si idrar örneklerinden izole edilmiştir. İzolatların MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri IPM için 32-128, 64 ve 128 µg/ml; MEM için 4-128, 16 ve 64 µg/ml; CFP için > 128 , > 128 ve > 128 µg/ml; SUL için 4- > 128 , 32 ve > 128 µg/ml olarak saptanmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi ile 40 *A.baumannii* izolatının hepsi IPM ve CFP'ye dirençli bulunurken, ikisi MEM'e duyarlı, 7'si orta duyarlı, 31'i ise dirençli olarak saptanmıştır. SUL için MİK değerleri, izolatların 2'sinde 4 µg/ml, 5'inde 8 µg/ml, 3'ünde 16 µg/ml, 13'ünde 32 µg/ml, 3'ünde 64 µg/ml, 6'sında 128 µg/ml ve 8'inde > 128 µg/ml olarak tespit edilmiştir. FİK indeksine göre, IPM/SUL kombinasyonunda, izolatların 18 (%45)'inde sinerjik, 4 (%10)'ünde kısmi sinerjik ve 2 (%5)'inde farksız etki saptanırken; MEM/SUL kombinasyonunda bu değerler sırasıyla 19 (%48), 3 (%7.5) ve 3 (%7.5); CFP/SUL kombinasyonunda ise, 10 (%25), 2 (%5) ve 2 (%5) olarak belirlenmiştir. Hiçbir kombinasyonda antagonist etki izlenmemiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda *A.baumannii* izolatlarında aminoglikozidler, kinolonlar ve karbapenemleri de kapsayan çoklu ilaç direnci bildirilmekte ve bu suşlarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kombine antibiyotikler kullanılmaktadır^{8,9}. Kombine tedavide uygulanan antibiyotiklerin arasında sinerjik aktivitenin olması klinik açıdan önemlidir ve in vitro sinerji testleri bu bağlamda yol göstericidir.

Sulbaktam, *A.baumannii*'ye karşı yüksek düzey inhibitör aktiviteye sahiptir. Çin'de yapılan bir çalışmada, imipeneme dirençli *A.baumannii* izolatlarında sulbaktam MİK aralığı 8-64 µg/ml olarak bulunmuştur⁵. Bizim çalışmamızda sulbaktam MİK aralığı 4- > 128 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 32 ve > 128 µg/ml olarak saptanmıştır. Ancak sulbaktamın sınır değerlerinin olmaması nedeniyle bu sonuçlar, izolatların duyarlı olup olmadığı, uygun antibiyotik dozu veya klinik etkinliği hakkında fikir vermemektedir.

Karbapenem/sulbaktam kombinasyonunun, çok ilaca dirençli *A.baumannii* izolatlarında sinerjik etkileri gösterilmiştir^{4,10}. Kiffer ve arkadaşları¹⁰, 48 *A.baumannii* izolatında meropenem ve sulbaktamın MİK₅₀ değerlerini 1 µg/ml, MİK₉₀ değerlerini ise sırasıyla 8 ve 32 µg/ml olarak bulmuşlardır. Bu araştırmacılar, meropenem ve sulbaktam kombinasyonunun etkileşimini dama tahtası yöntemi ile araştırmışlar ve izolatların %29.2'sinde sinerji, %47.9'unda kısmi sinerji, %10.5'inde aditif, %6.2'sinde farksız ve %6.2'sinde antagonist etki saptamışlardır¹⁰. Song ve arkadaşları⁴ da, imipenem ve sulbaktam MİK₅₀ değerleri sırasıyla 32 ve 16 µg/ml, MİK₉₀ değerleri ise 32 µg/ml olan 43 *A.baumannii* izolatının 42'sinde, zaman-öldürme yöntemiyle imipenem/sulbaktam kombinasyonunun in vitro sinerjik etkili olduğunu göstermişlerdir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, meropenemin sulbaktam ile kombinasyonunda kısmi sinerjik, aditif ve farksız etkiler saptanırken, sinerjik aktivite görülmemiştir¹¹. Bizim çalışmamızda, imipenemin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 64 ve 128 µg/ml, meropenemin ise 16 ve 68 µg/ml olarak bulunmuştur. FİK indeksine göre, imipenem/sulbaktam kombinasyonunda, izolatların 18 (%45)'inde sinerjik, 4 (%10)'ünde kısmi sinerjik ve 2 (%5)'sinde farksız etki; meropenem/sulbaktam kombinasyonunda, izolatların 19 (%48)'unda sinerjik, 3 (%7.5)'ünde kısmi sinerjik ve 3 (%7.5)'ünde farksız etki saptanmıştır.

Sefoperazon-sulbaktam, özellikle *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen bir ilaç olmasına rağmen, yıllar içinde bu ilaca da direnç gelişmiştir¹². Taiwan'da yapılan bir çalışmada, piperasilin ve sefoperazonun sulbaktam ile kombinasyonunun, gram-negatif basillere karşı etkinliği artırdığı belirtilmiştir¹³. Çalışmamızda sefoperazon MİK değerleri oldukça yüksek bulunmuştur. Sefoperazon/sulbaktam kombinasyonunda, izolatların 10 (%25)'unda sinerjik, 2 (%5)'sinde kısmi sinerjik ve 2 (%5)'sinde farksız etki saptanmıştır.

A.baumannii izolatlarında yapılan çeşitli çalışmalarda, karbapenem-sulbaktam sinerji testlerinde aynı yöntem kullanılmasına rağmen elde edilen oranlar oldukça farklıdır^{10,11}. Sinerji testi için kullanılan dama tahtası yönteminin uygulanması standart olmasına rağmen, elde edilen sonuçların yorumlanması ve değerlendirilmesinde, araştırmacılar tarafından farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu nedenle testin yorumlama yönteminin, tıpkı

uygulama yönteminde olduğu gibi standardize edilmesi gerekmektedir¹⁴. Ayrıca aynı yöntemle yapılmış olsa bile, araştırılan mikroorganizmanın test edilen ilaca duyarlı ya da dirençli olma özelliği ve ilacın konsantrasyon aralığı gibi farklılıklar dikkate alınmalıdır.

Sonuç olarak çalışmamızda, karbapenemlere dirençli *A.baumannii* izolatlarında sulbaktam MİK değerleri de genellikle yüksek bulunmuştur. Karbapenemlerin sulbaktam ile kombinasyonunda izolatların yaklaşık yarısında, sefoperazon/sulbaktam kombinasyonunda ise izolatların dörtte birinde sinerjik etki saptanmıştır. Hiçbir kombinasyonda antagonist etki tespit edilmemiştir. Direnç oranlarının daha da yükselmemesi için, uygun endikasyonlarda kombinasyon halinde antibiyotik kullanılması yararlı olabilir. Ancak bu çalışmanın verileri, ampirik tedavi ve klinik etkinliği belirleyemeyeceğinden ileri klinik çalışmalarla desteklenmelidir kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(5): 881-5.
2. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51(1): 79-84.
3. Choi JY, Park YS, Cho CH, et al. Synergic in vitro activity of imipenem and sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(12): 1098-101.
4. Song JY, Kee SY, Hwang IS, et al. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(2): 317-22.
5. Ji J, Du X, Chen Y, Fu Y, Wang H, Yu Y. In vitro activity of sulbactam in combination with imipenem, meropenem, panipenem or cefoperazone against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41(4): 400-1.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21st Informational Supplement. CLSI Document M100-S21, 2011. CLSI, Wayne, PA.
7. Moody J. Synergism testing: Broth microdilution checkerboard and broth microdilution methods, pp: 5.12.1-5.12.23. In: Isenberg HD (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2004, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
8. Van Looveren M, Goossens H; ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(8): 684-704.
9. Perez F, Hujer MA, Hujer MK, Decker KB, Rather PN, Bonomo AR. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(10): 3471-84.
10. Kiffer CR, Sampaio JL, Sinto S, et al. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diag Microbiol Infect Dis* 2005; 52(4): 317-22.
11. Deveci A, Coban AY, Acicbe O, Tanyel E, Yaman G, Durupinar B. In vitro effects of sulbactam combinations with different antibiotic groups against clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Chemother* 2012; 24(5): 247-52.
12. Özdem B, Gürel FÇ, Çelikkalek N, Bıçakçı H, Açıkgöz ZC. Çeşitli klinik örneklerden 2007-2010 yıllarında izole edilen *Acinetobacter* türlerinin direnç profilleri. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3): 526-34.
13. Kuo HY, Wang FD, Yen YF, Lin ML, Liu CY. In vitro activities of piperacillin or cefoperazone alone and in combination with beta-lactamase inhibitors against gram-negative bacilli. *New Microbiol* 2009; 32(1): 49-55.
14. Özseven AG, Sesli Çetin E, Özseven L. Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu? *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 410-20.