

İmipenemin Stafilokoklara Paradoks Etkisi

Çiğdem Bal, Belgin Altun, Özdem Anğ

Özet: Bağışıklık sistemi baskı altındaki üç hastanın idrar örneklerinde izole edilen *Staphylococcus haemolyticus* suşlarının antibiyogramlarında imipenem diski etrafında çift üreme zonu saptanmıştır. Agar dilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerleri de disk difüzyon sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Bu üreme tipi, imipenemin stafilokoklara paradoks etkisine örnek olarak bu çalışmada ele alınmıştır.

Anahtar Sözcükler: Çift zon, *Staphylococcus haemolyticus*, imipenem.

Summary: Paradoxical effect of imipenem on staphylococci. A double-zone of growth was detected around imipenem disks on the antibiogram of three *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from three different immunosuppressed patients. The MIC results with the agar dilution method were in parallel with the disk diffusion results. This growth pattern was handled as an example to the paradoxical effect of imipenem on *Staphylococcus haemolyticus* strains.

Key Words: Double-zone, *Staphylococcus haemolyticus*, imipenem.

Giriş

Eagle ve arkadaşları (1) penisilinle in vitro çalışmalarında bir drogun dört etkili konsantrasyonunu şöyle açıklamışlardır: [1] mikroorganizmanın önemli bir bölümünü öldürmeyen fakat üreme hızını azaltan en düşük konsantrasyon, [2] duyarlı mikroorganizmalar için bakterisid olan fakat kültürdeki daha dirençli varyantları öldürmeyen, bu nedenle süspansiyonu sterilize etmeyen biraz daha yüksek bir konsantrasyon, [3] süspansiyondaki tüm mikroorganizmaların öldüğü daha yüksek bir konsantrasyon, [4] mikroorganizmaların maksimal hızla ölümüne yol açan ve yükseltilmesi ölüm hızını artırmayan daha da yüksek bir konsantrasyon.

Bu orantılı etkileşimin dışında çıkan örnekleri ilk kez 1948'de Eagle ve Musselman penisilin *Staphylococcus aureus* ve streptokoklara karşı bir ters etkisi şeklinde gözlemlemişlerdir. Daha sonraları "Eagle fenomeni" olarak adlandırılan bu fenomen, penisilin minimal bakterisid konsantrasyon (MBC) üstündeki dozlarında bakterisid aktivitesinin artış yerine düşüş göstermesi (1,2); MİK düzeyinde ve hemen üzerinde bakterisid, daha yüksek dozlarda bakteriyostatik etkiye dönüşmesi; sonuçta da üremesi duran fakat canlılığını yitirmemiş bakterilere penisilin etkisiz kalması olarak açıklanmıştır (3). Sonralarda in vivo geçerliliği de kanıtlanan Eagle fenomeninin ardından "paradoks etki" ortaya konmuştur (4). Bu etki de genelde MİK değerlerinde inhibisyon sağladığı halde antibiyotiğin MİK'ten yüksek değerlerde etkisiz kalması içeriğini taşıdığından paradoks etki ve Eagle fenomeni birbirinin yerine kullanılan terimler olmuşlardır (1-12). Bununla birlikte Eagle fenomeninde MİK'ten yüksek değerlerde gerçek bir üreme olmadığı için, paradoks etkinin Eagle fenomeninden tümüyle farklı bir etki olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca Eagle fenomeni penisilin yalnızca 1200 µg/ml gibi çok yüksek dozlarında ortaya çıkmakta, öte yanda örneğin imipenemin paradoks etkisi drogun 10 µg/ml gibi farmakolojik olarak kolay erişilebilir dozlarında gözlemlenmektedir (13). İlk olarak 1953'te Albert, bir 8-hidroksikinolin türevidir olan antiseptik oksin'in paradoks etkisini ortaya koymuş, bunu değişik incelemeler izlemiştir (5). Bu kapsamda 1976'da ampicilin *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*'e, karbenisilin *Proteus mirabilis*'e, mesilinamin *Providencia stuartii*'ye (11); 1979'da amikasinin *Escherichia coli*'ye, gentamisin *Klebsiella pneumoniae*'ye, tobramisin *E.coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya (11) ve sefalotin *S.aureus*'a (12); 1983'te imipe-

nemin *Staphylococcus epidermidis* ve *S.simulans*'a (6); 1987'de sefmenoksimin *Proteus vulgaris*'e (10); 1988'de ise yine imipenemin *Staphylococcus haemolyticus*'a paradoks etkisi gösterilmiştir (14,15). Bu normal çizgi dışındaki etki araştırmacılar tarafından ya "Eagle effect", ya paradoks etki, ya da daha değişik terimlerle adlandırılarak sunulmuştur. Kokart tipinde üreme (15), pencere etkisi, hedef etkisi, anormal etki, atlanmış tüp, konsantrasyon sönmesi bunlardandır (5). En yaygın kullanımda olan "paradoks etki" terimidir. Adı her ne olursa olsun, bu etki yalnızca in vitro deneylerde ilgi çekici bir fenomen olmakla kalmayıp, paradoks etki ifadesini in vivo koşullarda da bulduğu için önem taşımaktadır. Eagle, Fleischmann ve Musselman (1,4) 1950'de penisilin B-grubu streptokoklara, Ikeda ve arkadaşları (9) 1990'da sefmenoksimin *P.vulgaris*'e paradoks etkisinin in vivo kanıtlarını hayvan deneyleriyle ortaya koymuşlardır. Penisilin bu in vivo ters etkisi bebek ve erişkin endokarditlerinde kesin olarak saptanmış, yüksek dozda tedavi seçilene kadar MİK düzeyine inildiğinde mikroorganizmalar elimine edilerek klinik iyilik sağlanabilmiştir (7,8).

Yöntemler

Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Transplantasyon Ünitesi'nden Mart-Haziran 1994 tarihleri arasında Anabilim Dalımıza kültür için yollanan üç idrar örneğinde saf kültür halinde üreyen çoğul dirençli *Staphylococcus haemolyticus* suşları, antibiyogramlarında gözlemlenebilen imipenem diski çevresindeki çift üreme zonu nedeniyle ilginç bulunmuştur. Bu çift zon, disk etrafında üreme, bunu izleyen bir inhibisyon zonu ve bu zonu çevreleyen ikinci bir üreme alanı; inhibisyon zonunun içinde ise iki suşta tek düşmüş az sayıda koloni şeklinde ortaya çıkmıştır (Resim 1 ve 2). Paradoks etki için prototip sayılabilecek bu üremenin incelenmesi yoluna gidilmiştir.

Kültürde üreyen stafilokok cinsi bakteriler serbest ve bağlı koagülaz açısından lam ve tüp deneyleriyle negatif bulunarak koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) arasında tür ayırımına gidilmiştir. Bu amaçla suşların DNaz, oksidaz, üreaz, eskülin reaksiyonları; laktoz, sakkaroz, manitol, mannoz, maltoz, arabinoz, ksiloz, trehaloz ve fruktozdan asid oluşturma eğilimleri ile novobiyosin (5 µg) duyarlılıkları incelenmiştir.

Sonuçlar

Kloos ve Schleifer'in ayırım şemaları öncelikle esas alınarak suşlara *Staphylococcus haemolyticus* tamsı konmuştur (16-18) (Tablo 1).

Disk difüzyon deneyinde ortaya çıkan imipenem diski etrafın-

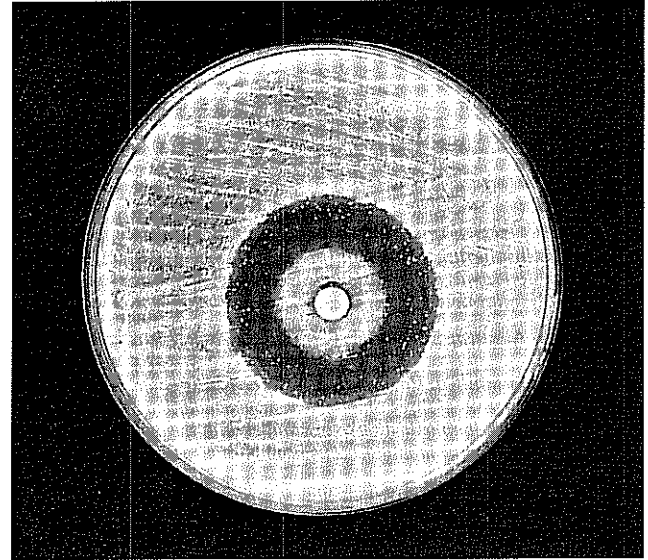
Tablo 1. İzole Edilen *S. haemolyticus* Suşlarının Özellikleri

	Suş 1	Suş 2	Suş 3
Katalaz	+	+	+
Lam koagülaz	-	-	-
Tüp koagülaz	-	-	-
Oksidaz	-	-	-
Üreaz	-	-	-
Eskülin	-	-	-
Mannitol	+	+	+
Ksiloz	-	-	-
Trehaloz	+	+	+
Laktoz	+	+	+
Maltoz	+	+	+
Sakkaroz	+	+	+
Mannoz	-	-	-
Arabinoz	-	-	-
Fruktoz	+	+	+
Novobiyosin (5 µg disk) direnci	-	-	-

daki çift üreme zonunu MİK sonuçlarıyla da doğrulama amacıyla Mueller-Hinton Agar (Oxoid) kullanarak agar dilüsyon yöntemiyle suşların imipenem (Merck-Sharp-Dohme) için MİK değerlerini saptama yoluna gidilmiştir. Alınan MİK sonuçları disk difüzyon sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Dış ve iç üreme zonlarından ayrı ayrı yinelenen disk difüzyon deneylerinde orijinalin aynı çift zon paterni elde edilmiş, inhibisyon zonu içinde kalan tek kolonilerden yapılan deneyde ise tam direnç (6 mm'lik zon) saptanmıştır. Benzer şekilde dış ve iç üreme alanlarında MİK değerleri 0.06 µg/ml'ye kadar üreme, 0.13-1 µg/ml arasında inhibisyon, 2-64 µg/ml arasında yeniden üreme şeklinde ortaya çıkmıştır. Disk difüzyon deneyinde inhibisyon zonu içindeki tek kolonilerin MİK değerleri ise 64 µg/ml'ye kadar kesintisiz üreme şeklindedir (Tablo 2).

İrdeleme

Paradoks etki konusunda buyyon-dilüsyon yöntemiyle MİK incelemelerinde Lorian ve arkadaşları (11) ara tüplerdeki üreme yokluğunun, atlama tüpü olarak da adlandırılan rastlantıya ya da uygulamacıya bağlı hatalardan kaynaklanmadığını ortaya koy-



Resim 1. Birinci ve ikinci suşta ortak olan çift zon paterni ve inhibisyon zonu içinde defektif varyant kolonileri.

muşlardır; çünkü bu ara tüplerin altındaki ve üstündeki değerlerde üreme görülen tüplerden ve orijinal suştan aynı anda yapılan MİK deneylerinin tümünde birbirinin eşi paradoks etki paterni saptanmıştır. Böylece tümüyle farklı bir fenomen olarak varlığı kabul gördükten sonra bu etkiye yol açan nedenler araştırılmış, öncelikle besiyeri içeriğinin çift zon oluşumunda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (6, 13). Ayrıca duyarlık deneyi öncesinde inkübe edilen bakteri süspansiyonunda bakterilerin havalanma farkına bağlı üreme gecikmesi ve buna paralel ara inhibisyon zonu ve çift üreme zonu görülmesi gibi açıklamalar da yapılmıştır (6). Tam netlik sağlanamadıysa da tüm araştırmacıların birleştiği sonuç bu fenomenin antibiyotik konsantrasyonuna bağlı olduğu; MİK değeri üzerine çıktığında bakteride protein ve dolayısıyla direnç enzimleri sentezinin indüklendiği ve beta-laktamaz üretimi yoluyla

Tablo 2. İzole Edilen *S. haemolyticus* Suşlarının İmipenem için MİK Değerleri

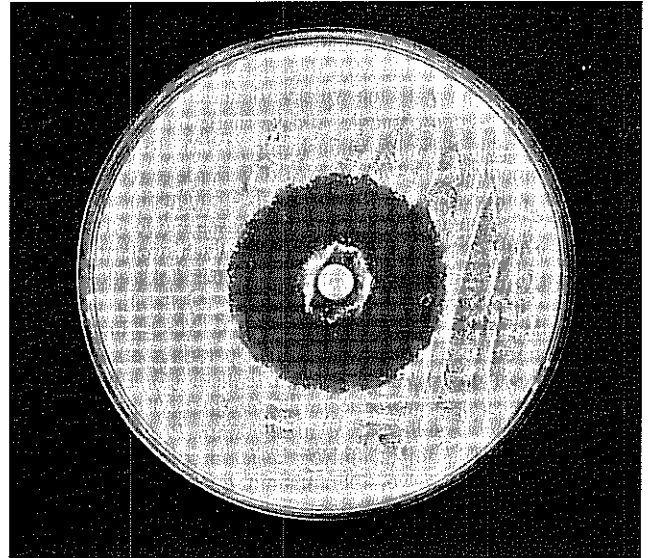
µg/ml	Suş 1			Suş 2			Suş 3 (d)	
	zon 1 (a)	zon 2 (b)	ara koloniler (c)	zon 1	zon 2	ara koloniler	zon 1	zon 2
512	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-
64	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
1	-	-	+	-	-	+	-	-
0.5	-	-	+	-	-	+	-	-
0.25	-	-	+	-	-	+	-	-
0.13	-	-	+	-	-	+	-	-
0.06	+	-	+	+	-	+	-	+
0.03	+	+	+	+	+	+	+	+

(a): Disk Etrafında Başlayan Üreme Zonu.

(b): İnhibisyon Zonundan Sonra, Diskin Uzağında Yer Alan Üreme Zonu.

(c): Defektif Varyant Olarak Tanımlanan ve İnhibisyon Zonu İçinde Üreyen Koloniler.

(d): Suş 3'de İnhibisyon Zonu İçinde Üreme Olmamıştır.



Resim 2. Üçüncü suşta görülen ve defektif varyant içermeyen çift zon paterni.

drogün inaktivasyonuna yol açıldığı şekildedir (3,6,9,11,12). İnhibisyon zonu içinde üreyen az sayıdaki koloninin ise imipenem direncini baskılayan gen açısından defektif varyantlar olduğu öne sürülmektedir (6).

Schwable ve arkadaşları (19) 1990'da *Staphylococcus haemolyticus* suşlarında imipenem diskiyle paradoks etki saptamışlar; konuyu irdelediklerinde vankomisin baskısı ile seleksiyonda canlı kalabilen vankomisine dirençli *S.haemolyticus* suşlarının imipenem diski etrafında çift zon verdiğini bulmuşlardır. Buradan yola çıkarak imipenemin paradoks etki gösterdiği ve disk etrafında çift zon veren *S.haemolyticus* suşlarının vankomisine direnç potansiyeli açısından, kendi deyimleriyle bir "marker" olarak kullanılabileceğini ve klinisyene bildirilebileceğini öne sürmüşlerdir (19). Herwaldt ve arkadaşları (14)'nın bulguları da imipenemin paradoks etkisinin görüldüğü suşlarla gelişen infeksiyonlarda dikkatli olunması gerektiği, bu suşların vankomisin MİK'lerinde yükselme görüldüğü şekildedir.

Çalışmamızda çift zon oluşumuna besiyeri içeriğinin katkısını denemek amacıyla Mueller-Hinton agarı; triptik soya agar ve adi agar kullanılmış, tüm besiyerlerinde imipenem diski etrafında çift üreme zonu saptanmış ve besiyerinin bu olayda rolü olmadığı kanısına varılmıştır. Yine duyarlık deneyi öncesinde bakteri süspansiyonları iktibe edilirken etüvde 37°C üremeye bırakılan süspansiyonlarla 170-180 rpm'de 37°C de çalkalanan süspansiyonlar arasında bir fark bulunmamış, bu nedenle paradoks etkide ve çift zon oluşumunda bakterilerin havalanma farkının belirleyici olmadığı düşünülmüştür. Suşları vankomisine direnç potansiyeli açısından incelemek amacıyla vankomisin MİK'leri saptanmış ve ilk iki suş için 2 µg/ml, üçüncü suş içinse 4 µg/ml değerleri bulunmuştur.

S.haemolyticus, yenidoğan bakteriyemisinde kateter ve yapay kalp kapağı ya da şant sistemleri gibi yabancı cisimlere bağlı infeksiyonlara kadar birçok olgudan (20,21) ve hastane infeksiyonlarından (22) sorumlu olduğu bilinen bir patojendir. KNS içinde en kolay direnç geliştiren türlerden biri olan *S.haemolyticus*'ta vankomisin direnci de giderek daha sık gözlenmektedir (16,23). In vitro paradoks etki görülen bu suşların yol açtığı infeksiyonlarda, tedavide imipenemle in vivo aynı etki görüleceği için suşun imipenem direncine kesin, vankomisin direncine ise olası gözülüyle bakılması ve alternatif antibiyotik uygulanması, tedavi sürecini olumlu etkileyecektir.

Kaynaklar

1. Shah PM. Paradoxical effect of antibiotics. The "Eagle effect." *J Antimicrob Chemother* 1982; 10: 259-60
2. Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991: 93
3. Töreci K. Bakterilerde antibiyotik toleransı. In: Çalangu S, Eraksoy H, Özslüt H, ed. *İnfeksiyon Hastalıkları 92*. İstanbul: Yüce Yayınları, 1992: 39-58
4. Shah PM, Troche G, Stille W. Effect of concentration on bactericidal activity of cefotaxime. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5: 419-22
5. Annear DI. Paradoxical effect of antibiotics. II. Comment and bibliography. *J Antimicrob Chemother* 1982; 10: 259-60
6. Blumenthal RM, Raeder R, Takemoto CD, Freimer EH. Occurrence and expression of imipemide (N-formimidoyl thienamycin) resistance in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24: 61-9
7. George RH, Dyas A. Paradoxical effect of penicillin in vivo. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17: 684-5
8. Griffiths LR, Green HT. Paradoxical effect of penicillin in vivo. *J Antimicrob Chemother* 1985; 15: 507-8
9. Ikeda Y, Fukuoka Y, Motomura K, Yasuda T, Nishino T. Paradoxical activity of beta-lactam antibiotics against *Proteus vulgaris* in experimental infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 94-7
10. Ikeda Y, Nishino T, Tanino T. Paradoxical antibacterial activity of cefmenoxime against *Proteus vulgaris*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 865-9
11. Lorian V, Silletti RP, Biondo FX, DeFreitas CCD. Paradoxical effect of aminoglycoside antibiotics on the growth of Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5: 613-4
12. Nishino T, Nakazawa S. Bacteriological study on effects of beta-lactam group antibiotics in high concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9: 1033-43
13. Kerry DW, Hamilton-Miller JMT, Brumfitt W. Paradoxical effect of mecillinam on *Providencia stuartii*. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2: 386-8
14. Herwaldt L, Boyken L, Pfaller M. In vitro selection of resistance to vancomycin in bloodstream isolates of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 1007-12
15. Traub WH, Kohl KH, Spohr M. *Staphylococcus haemolyticus*: cocarboxylase growth around imipenem discs. *Chemotherapy* 1988; 34: 467-71
16. Kloos WE, Lambe DW Jr. *Staphylococcus*. In: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991: 222-37
17. Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human staphylococcus species. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 82-8
18. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr, eds. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1992: 405-30
19. Schwable RS, Ritz WJ, Verma PR, Barranco EA, Gilligan PH. Selection for vancomycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *J Infect Dis* 1990; 161: 45-51
20. Froggatt JW, Johnston JL, Galetto DW, Archer GL. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 460-6
21. Kloos WE, Bannermen TL. Update on clinical significance of coagulase negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 117-40
22. Hebert GA, Cooksey RC, Clark NC, Hill BC, Jarvis WR, Thomsherry C. Biotyping coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1950-6
23. Veach LA, Pfaller MA, Barrett M, Koontz FP, Wenzel RP. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2064-8