

Klinik Çalışma

# Tigesiklinin *E. coli* ve *Klebsiella spp.* Suşlarına Karşı İnvitro Etkinliğinin Araştırılması

Esin Doğanekin\*, Akif Doğanekin\*, Zülal Aşçı Toraman\*\*

## Özet

Günümüzde gram negatif basillere bağlı enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı giderek artan direnç tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu durum yeni antimikrobiaların geliştirilmesini gerektirmektedir.

Tigesiklin yeni geliştirilen antimikrobiyal ajanlardan biridir. Glisilsiklin grubu ilaçların ilk üyesidir.

**Amaç:** Bu çalışmada, Fırat Üniveritesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 25 *Escherichia coli*, 25 *Klebsiella spp.*, olmak üzere 50 Gram negatif basilin tigesiklin duyarlılığının araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Bu suşların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlenirken, tigesiklin duyarlılığı ise broth mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir.

**Bulgular:** Test edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının %100'ü tigesikline duyarlı olarak bulunmuştur.

**Tartışma:** Çalışmamızın sonunda tigesiklinin *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarına karşı invitro etkinliğinin diğer beta laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Tigesiklin, Antibiyotik duyarlılık testi, Broth mikrodilüsyon yöntemi, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*

Antimikrobik maddelere karşı gelişen direnç günümüzde bütün insanlığı tehdit edecek düzeyde önemli bir sorundur. Birden fazla ilaca karşı dirençli kökenlerle gelişen hastane enfeksiyonları, hastanede kalış süresini ve ölüm oranlarını artırmakta ve oldukça fazla ek maliyet oluşmasına neden olmaktadır. Artık günümüzde sadece hastane kökenleri değil, toplumdan kazanılmış kökenlerde de direnç önemli oranlarda artmakta ve bu olay sorunu daha da büyütüp ciddi boyutlara taşımaktadır (1).

Gram negatif bakteriler, dış membran porin proteinlerindeki değişim ve aktif pompa sistemleri nedeniyle antibiyotiğin hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi, antibiyotiği inaktive eden enzimlerin üretimi veya antibiyotiğin hedefi olan yapıdaki değişimler nedeniyle sağaltımda kullanılan antibakteriyellere direnç kazanmaktadır (2, 3).

Gram negatif basillerin etken olarak sık görüldüğü toplum kökenli enfeksiyonların başında üriner enfeksiyon ve gastrointestinal enfeksiyonlar gelmektedir (4). Toplum kökenli sepsisler için de önemli bir kaynak oluşturan toplum kökenli üriner enfeksiyonlarının en sık görülen etkeni *Escherichia coli* (*E.coli*)'dir ve bu enfeksiyonların sağaltımında sıklıkla florokinolonlar, trimetoprim/sulfametaksazol ve beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları uygulanmaktadır. Ancak son yıllarda kinolonlara karşı %30' lara, diğer antibakteriyeller için ise %50' lere varan direnç oranları bildirilmektedir (5-8).

Tigesiklin, glisilsiklin grubu antibiyotiklerin ilk üyesidir. Yapısal olarak minosiklinin semisentetik bir derivativesidir (4). Ribozomal korunma ve efluks mekanizmalarıyla tetrasikline direnç geliştiren Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkili olması en önemli özelliğidir. Tigesiklin, bakterilerin 30S ribozomal alt ünitesine bağlanır ve tRNA'nın hedefine ulaşmasını engelleyerek protein sentezini inhibe eder. Bakteriyostatik etkili bir antibiyotiktir (5, 6).

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* suşlarına karşı tigesiklinin in-vitro aktivitesi

\*Bingöl Devlet Hastanesi, Bingöl, Türkiye

\*\*Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

**Yazışma Adresi:** Dr. Esin Doğanekin  
Bingöl Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Birimi  
Tel: 0 90 505 637 09 63

E-mail: esindogantekin@yahoo.com.tr

Makalenin Geliş Tarihi: 31.01.2013

Makalenin Kabul Tarihi: 04.02.2013

Broth mikrodilüsyon testi yardımıyla belirlenmeye çalışılmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen örneklerden izole edilen toplam 50 *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kan, periton sıvısı vb. steril vücut sıvıları örnekleri aerop, anaerop veya pediatrik BacT/Alert kan kültür şişelerine alınarak otomatize kan kültür cihazında inkübe edilmiştir. Cihazda üreme gözlenen şişelerden kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agar besiyerlerine pasajları yapılmıştır. Balgam, idrar, yara ve diğer örnekler direkt kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agar besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 35°C' de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde üreme gözlenen kolonilerden Gram boyama yapılarak Gram negatif basil olduğu belirlenen bakteriler için daha ileri identifikasyon aşamalarına geçilmiştir. Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanamayan suşlar API ID 32 GN/ Mini API, Biomerieux (Fransa) identifikasyon kitleri ile tanımlanmıştır. Duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Tigesiklin duyarlılığı plak mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Tigesiklin (Wyeth Research, Pearl River, NY, ABD) aktif maddesi üreticinin önerileri doğrultusunda serum fizyolojik içerisinde süspanse edilerek hazırlanmıştır. İlk olarak tigesiklinin 256µg/ml olacak şekilde, Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB, Oxoid, İngiltere) ile ilk konsantrasyonu hazırlanmıştır. İki katlı dilüsyonlar halinde sulandırılmış bakteri süspansiyonu; direkt koloni süspansiyonu metodu ile serum fizyolojik içerisinde McFarland 0.5 bulanıklıkta olacak şekilde hazırlanıp 96 kuyucuklu plastik plaklara konulmuştur. Üzerine 100µg bakteri süspansiyonu ilave edilerek ilk kuyucuktan başlayarak seri dilüsyonu hazırlanmıştır. (128-0,062µg/ml) (9).

*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* için FDA (Food and Drug Administration) tarafından açıklanan MİK değerleri referans alındı. *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* için tigesiklinin MİK değerleri  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  duyarlı,  $\geq 8\mu\text{g/ml}$  dirençli olarak bildirilmektedir (10).

Sonuç değerlendirmesi; 35°C'de 18 saatlik inkübasyondan sonra gözle görülebilen üremeyi

engelleyen en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir (9).

### Bulgular

Çalışmada kullanılan *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının GSBL(+) ve GSBL(-) sayı ve yüzdeleri Tablo 1'de gösterilmektedir.

Çalışmada incelenen *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 2' de gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan *E.coli*, *Klebsiella spp.* suşlarının mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenen tigesiklin MİK değerleri Tablo 3' de gösterilmektedir.

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen mikroorganizmaların türleri, sayıları ve %'leri

Mikroorganizma Adı	Sayı (n)	%
<i>E.coli</i> GSBL (+)	15	30
<i>E.coli</i> GSBL (-)	10	20
<i>K.pneumoniae</i> GSBL (+)	21	42
<i>K.oxytoca</i> GSBL (-)	4	8
Toplam	50	100

### Tartışma

Gram negatif bakteri türleri gerek hastane gerekse toplum kökenli enfeksiyonların önde gelen etkenlerindedir. Hücre duvarlarındaki dış membran yapısı nedeniyle antibiyotiklere, Gram pozitif bakterilere kıyasla dirençli olan bu mikroorganizmalar, ayrıca genetik madde aktarımı ve antibiyotiklerin seçici baskısı ile çoklu direnç özelliği kazanmıştır (11).

Çalışmamızda 50 Gram negatif basilin izole edildiği örneğin 25'i (%50) idrar, 13'ü (%26) kan, 6'sı (%12) yara, 4'ü (%8) balgam, 2'si (%4) periton sıvısı idi. Bu konudaki kaynakları incelediğimizde ülkemizde yapılan çalışmalarda, bu çalışmada olduğu gibi etkenlerin büyük çoğunluğu idrar örneklerinden izole edilmiştir. Gram negatif basiller insanlarda sıklıkla üriner sistem enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Bu çalışmada da Gram negatif basillerin idrar örneklerinden daha fazla oranda izole edilme nedeninin bu olduğu düşünülmüştür.

Çoğul dirençli bakteri tedavisinde alternatif ilaç seçeneklerinden biri de minosiklin derivesi ve glisilsiklin grubundan bir antibiyotik olan tigesiklidir. Tigesiklin bakteriyostatik etkili

Tablo 2. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık % leri

Antibiyotikler	Dirençli <i>E.coli</i> %	Dirençli <i>Klebsiella spp</i> %
Ampisilin	76	96
Sefalotin	72	92
Gentamisin	24	76
Amikasin	12	24
Amoksisilin/klavulanat	56	72
Sefuroksim	32	88
Sefoksitin	0	0
Sefotaksim	52	84
Siprofloksasin	48	80
Sefepim	72	84
İmipenem	0	0
Meropenem	0	0
Piperasilin	76	88
SXT	80	92
Aztreonam	56	84
Seftazidim	52	84
Karbenisilin	84	92

geniş spektrumlu bir minosiklin derivesidir (12). Tigesiklinin etkinliği 1997 yılından beri yapılan çok sayıda çalışmada araştırılmıştır. Yeni bir glisilsiklin olan tigesiklin Gram pozitif, Gram negatif bakteriler, atipikler ve anaeroplolar olmak üzere birçok önemli patojene karşı in vitro etkilidir. Tetrasiklin direncinden sorumlu efluks pompası (tet A-E) ve ribosomal korunma (tet M) gibi iki farklı genetik mekanizmadan etkilenmemektedir ve bu nedenle tetrasiklin ve minosiklin dirençli mikroorganizmalara da oldukça aktiftir. Aminoglikozitler, beta-laktamlar ve kinolonlarla arasında çapraz direnç söz konusu değildir (13,14).

Tigesiklinin invitro aktivitesini belirlemek amacıyla *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarıyla yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Çok merkezli bir çalışma olan Sader ve ark. (15)'nin çalışmasında kan dolaşımı örneklerinden izole edilen 26474 Gram pozitif ve negatif etkende tigesiklin duyarlılığı araştırılmış, MİK90 değerleri *E.coli* için 0.25µg/mL, *Klebsiella spp.* için ise 1.0µg/mL olarak bildirilmiştir. Waites ve ark. (16) tüm bu suşlar için MİK90 değerlerini ≤2.0µg/mL olarak

tespit edip duyarlılık yüzdelerini *E.coli* için %92.1, *Klebsiellalar* için ise %93 olarak bildirmişlerdir. Soulin M ve ark. (17)'nin çalışmasında ise 33 GSBL (+) *E.coli* suşunda MİK50: 0.125µg/mL, MİK90: 0.94µg/mL ve duyarlılığı %100 olarak bildirilirken, 98 GSBL (+) *K. pneumoniae* suşunda ise MİK50: 0.5µg/mL, MİK90: 1µg/mL ve duyarlılığı ise %96.9 olarak tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada 15 GSBL (+) *E.coli* suşunun tigesiklin için MİK aralığı ≤0.125-2.0µg/mL, MİK50: 0.5µg/mL ve MİK90: 1µg/mL, 10 GSBL (-) *E.coli* suşunun ise MİK aralığı ≤0.062-1.0µg/mL, MİK50: 0.125µg/mL ve MİK90: 0.94µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Yine bizim çalışmamızda 21 adet GSBL (+) *K.pneumoniae* suşunda tigesiklinin MİK aralığı ≤0.125-2.0µg/mL, MİK50: 0.5µg/mL ve MİK90: 2µg/mL bulunmuş, 4 adet GSBL (-) *K.oxytoca* suşunda ise MİK aralığı ≤0.125-0.5µg/mL, MİK50: 0.25µg/mL ve MİK90: 0.5µg/mL olarak tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında elde ettiğimiz verilerin literature uygun olduğunu ve tigesiklinin

Tablo 3. Çalışmada kullanılan *E.coli*, *Klebsiella spp.* suşlarının mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenen tigesiklin MİK değerleri (µg/mL)

Mikroorganizma Adı	MİK aralığı	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
<i>E.coli</i> GSBL (+) (n: 15)	0.125-2	0.5	1
<i>E.coli</i> GSBL (-) (n: 10)	0.062-1	0.125	0.5
<i>K.pneumoniae</i> GSBL (+) (n: 21)	0.125-2	0.5	2
<i>K.oxytoca</i> GSBL (-) (n: 4)	0.125	0.25	0.5

Enterobacteriaceae ailesinin iki önemli üyesi olan *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarına karşı oldukça etkili olduğunu görmekteyiz.

Sonuç olarak; Gram negatif bakterilerin son dönemlerde klinik izolatlardan fazlaca izole edildiği ve bu izolatların pek çok ilaca direnç gösterdiklerini görmekteyiz. Karbapenemler ise Gram negatif bakteriler üzerindeki etkilerini artan direnç oranına rağmen hala korumaktadırlar. Yaşanan bu direnç sorunundan dolayı yeni kullanıma giren antibiyotiklerden olan tigesiklinin karbapenemlere alternatif oluşturarak antimikrobiyal tedavide önemli yer edineceğini düşünmekteyiz.

### Searching the invitro antibacterial activity of tigecycline on *E.coli* and *Klebsiella spp.*

#### Abstract

*At the present day, gradually increasing resistance to antimicrobial agents utilised for infections related to gram negative bacilli have become an important healthcare problem in our country, as in the whole world. This situation requires to develop new antimicrobial agents.*

*Objective: Tigecycline is one of the last recent developed antimicrobial agents. It is the first member of glycilcycline group of drugs.*

*Material and methods: In this study, that planned to search sensitivity of tigecycline on 50 Gram negative bacilli, 25 of them Escherichia coli, 25 of them Klebsiella spp, isolated from different clinical specimens in Fırat University Microbiology Laboratory. While antimicrobial susceptibility of these strains were determined with disc diffusion method, tigecycline susceptibility was tested by broth microdilution method.*

*Results: 100% of 25 Escherichia coli, 100% of 25 Klebsiella spp strains tested were detected susceptible to tigecycline.*

*Conclusion: At the end of our study it was found that tigecyclin had better in vitro efficiency on E. Coli and Klebsiella species than beta lactam antibiotics, aminoglycozides, or fluoroquinolones.*

**Key words:** Tigecycline, antibiotic susceptibility test, Broth microdilution method, Escherichia coli, Klebsiella spp

### Kaynaklar

1. Candevir A. Hastanemiz Yoğun Bakımlarında Gelişen Bakteriyemilerde Etkenler ve Antibiyotik Duyarlılıkları. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi. Adana 2005: 2.
2. Gülay Z. Gram olumsuz bakterilerdeki direnç moleküler temelleri, "Yüce A, Çakır N (editörler): Hastane enfeksiyonları" Güven Kitabevi 2003; 87.
3. Gür D: Gram negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları, Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (editörler): Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri Enfeksiyonları" Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004: 69.
4. Willke Topçu A: Toplum kökenli Gram negatif çomaklarda direnç ve tedavi sorunu, XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre kitabın, Kuşadası 2004: 92.
5. Bayraktar B, Özcan N, Borahan I, Başarı F, Bulut E: Yatan ve ayaktan hastalardan izole edilen üriner sistem enfeksiyonu etkeni Gram negatif çomaklarda antibiyotiklere direnç, Ankem Derg 2004; 18: 137.
6. ErtuğrulMB, Çolak N: idrardan izole edilen toplum kökenli Escherichia coli suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, Ankem Derg 2004; 18: 161.
7. Şahin İ, Öksüz Ş, Kaya D, Şencan İ, Gülcan A: Çocuk yaş grubunda servis ve poliklinik kökenli üropatojen Gram negatif çomakların antibiyotik duyarlılıkları, Ankem Derg 2004; 18: 101.
8. Taşbakan MI, Pullukçu H, Yamazhan T, Arda B, Ulusoy S: Toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarından soyutlanan Escherichia coli suşlarına fosfomisin in vitro etkinliğinin diğer antibiyotiklerle karşılaştırılması, Ankem Derg 2004; 18: 216.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow

- Aerobically. Approved Standard, ed 7. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
10. Wyeth Pharmaceuticals Inc. Tygacil Product Insert, June 2005, Philadelphia (PA), <http://www.Tygacil.com>.
  11. Zeynep GÜLAY: Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası, ANKEM Derg 2005; 19: 66-77.
  12. Bouchillon SK, Hoban DJ, Johnson BM. In Vitro Evaluation of Tigecycline and Comparative Agents in 3049 Clinical Isolates: 2001 to 2002, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 291-295.
  13. Reinert, RR, Low, DE, Rossi, F. Antimicrobial Susceptibility Among Organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America Collected as Part of TEST and the In Vitro Activity of Tigecycline, *J. Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1018-1029.
  14. Rose WE, Rybak MJ. Tigecycline: First of a New Class of Antimicrobial Agents, *Pharmacotherapy*, 2006; 26: 1099-1110.
  15. Sader HS, Jones RN, Stilwell MG, Dowzicky MJ, Fritsche TR: Tigecycline activity tested against 26, 474 bloodstream infection isolates: a collection from 6 continents, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 181-6.
  16. Waites KB, Duffy LB, Dowzicky MJ: Antimicrobial susceptibility among pathogens collected from hospitalized patients in the United States and in vitro activity of tigecycline, a new glycylcycline antimicrobial, *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3479-84.
  17. Soulin M, Kontopidou VF, Koratzanis E, Antoniadou A, Giannitsioti E, Evangelopoulou P, Kannavaki S. In vitro activity of tigecycline against Multiple-drug-resistant, including pan-resistant, gram negative and gram positive clinical isolates from Grek Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3166-3169.