

Laboratuvar Koşullarında Elde Edilen Sefoksitine Dirençli Mutant *Bacteroides fragilis* Kökenlerinin Diğer Antibiyotiklere Çapraz Direnç Durumlarının Araştırılması (*)

Nurver ÜLGER (TOPRAK) (**), Tamer ÇOŞKUN (***), Raşit AKDENİZ (***),
İbrahim M. AYDIN (***), Ahmet BANİSİ (***), Recep SADE (***), Güner SÖYLETİR (**)

(*) Bu çalışma, MaSCo- Marmara Tıp Öğrenci Kongresi'nde (17-18 Mayıs 2004) sunulmuştur

(**) Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

(***) Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Öğrencileri, İstanbul

ÖZET

Bu çalışma 2003-2004 eğitim-öğretim yılında, "Klinik Uygulamaya Giriş Programı" çerçevesinde, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi öğrencileri ile yürütülmüştür. Çalışma, öğrencilerin antibiyotiklere direnç gelişimi konusunda bilgilerini arttırmaları ve antibiyotikleri daha akılcı kullanmaları konusunda tutum geliştirmeleri amaçlanarak planlanmıştır. Süperatif anaerop infeksiyonlardan en sık izole edilen ve normalde kolon florasında bulunan *Bacteroides türleri*, pek çok antibiyotiğe direnç göstermektedir. Bu çalışmada ikisi farklı hastaların dışkılarından izole edilmiş, diğeri ATCC standart kökeni olmak üzere toplam üç *Bacteroides fragilis* kökeni, subinhibitör konsantrasyonla (256µg/ml) başlayarak ikişer misli artan oranda sefoksitin ile muamele edilmiş, dirençli mutantlar elde edilmiştir. Dışkı izolatlarına ait sefoksitine dirençli mutantların aynı zamanda tetrasikline direnç (64µg/ml) ve piperasiline orta düzeyde direnç (64µg/ml) geliştirdikleri, standart ATCC kökeninden elde edilen mutantın ise klindamisine direnç (8µg/ml) geliştirdiği, piperasilin MİK değerinde dört misli, tetrasiklin MİK değerinde ise sekiz misli artış gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda öğrenciler, antibiyotiklerin kullanımına bağlı dirençli mutant kökenlerin gelişebileceğini deneysel olarak görmüşler, direnç gelişiminin en az seviyede olması için antibiyotiklerin akılcı kullanılması gerektiğini benimsemişlerdir.

Anahtar kelimeler: *Bacteroides fragilis*, sefoksitin, antibiyotik duyarlılık, çapraz direnç

SUMMARY

Investigation of Cross-Resistance to Other Antibiotics in Cefoxitin-Resistant Mutant *Bacteroides fragilis* Strains Obtained in Laboratory Condition

Students in this study were involved according to "Introduction to Clinical Practice Program" at Marmara University, School of Medicine, during 2003-2004 educational period. The aim of this study was to increase the students' knowledge and awareness about development of antimicrobial resistance in bacteria and acquire attitudes necessary for rational usage of antibiotics. *Bacteroides* species are the microorganisms most often isolated from patients with suppurative anaerobic infections and resistant to most of the antibiotics. In the present study, 3 cefoxitin-resistant *Bacteroides fragilis* mutants (two strains from stool specimens of different persons, one strain was ATCC *Bacteroides fragilis*) were obtained by selection with increasing concentrations of cefoxitin (ranging from subinhibitor concentration to 256µg/ml). The mutant strains showed decreased susceptibilities not only to cefoxitin but also to other antibiotics; two cefoxitin resistant mutants isolated from stool specimens showed resistance to tetracycline (64µg/ml) and intermediate resistance to piperacillin, ATCC strain showed resistance to clindamycin (8µg/ml) and 4-8 fold decreased susceptibilities to piperacillin and tetracyclin respectively. In conclusion, the students demonstrated that use of antibiotics can encourage the selection of resistance and assumed that in order to minimize the potential development of resistance, rational use of antibiotic is critical.

Key words: *Bacteroides fragilis*, cefoxitin, antibiotic susceptibility, cross-resistance

GİRİŞ

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi birinci, ikinci ve üçüncü sınıf öğrencilerinin, hastane eğitimine başlamadan önce gerek bilgi ve becerilerini arttırmak

gerekse davranış ve tutumları açısından kliniğe hazırlamak amacıyla yapılan uygulamada, 4 veya 5 öğrenciden oluşan küçük gruplar oluşturulmakta, öğrenci grupları hazırladıkları projeyi, sorumlu eğitmenin gözetiminde yürütmektedirler. Bu çalışma, öğ-

İletişim: Nurver Ülger (Toprak)

e-posta: nulger@marmara.edu.tr

rencilere ileriki hekimlik hayatlarında doğru antibiyotik kullanma bilincini kazandırmak amacıyla planlanmıştır. Gereksiz veya uygun olmayan dozlarda kullanılan antibiyotiklerin dirençli kökenler yaratabileceğini göstermek, antibiyotik kullanımı sırasında normal flora elemanlarının da dirençli hale gelebileceğini vurgulamak, bu dirençli kökenlerin oluşturacağı muhtemel fırsatçı infeksiyonların tedavisinde güçlükler yaşanabileceğine dikkat çekmek istenmiştir.

Bu çalışmada, pek çok laboratuvarında rutinde kültürü yapılmayan, varlığından şüphe duyulan durumlarda ampirik tedavisi yapılan, fırsatçı patojenlerden, kolon florası elemanı *Bacteroides fragilis* kökenleri seçilmiştir (1). Anaerob infeksiyonlardan en sık izole edilen bu türün, artan oranda antibiyotiklere direnç geliştirdiği dünyanın pek çok ülkesinden bildirilmiştir (2, 3).

Çalışmamızda çarpıcı bir sonuç elde etmek için, *Bacteroides fragilis* kökenleri, antianaerob etkiye sahip sefalosporinlerden sefoksitin subinhibitör konsantrasyonla başlayarak kademeli olarak artan dozları ile muamele edilmiş, dirençli mutant kökenler elde edilmiştir. Bu dirençli kökenlerin diğer antibiyotiklere çapraz direnç oluşturup oluşturmadıkları araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış farklı iki kişinin dışkılarından izole edilen, sefoksitine duyarlı *B. fragilis* (n:2) ve ATCC 25285 *B. fragilis* kökenleri kullanılmıştır.

Bakteri izolasyonu ve tanımlanması. Dışkı örnekleri "Bacteroides Bile Esculin Agar" besiyerine (BBE Agar) ekilmiş, anaerob ortamda, 37°C'de 2-4 gün inkübe edilmiştir. Oluşan koloniler morfolojileri ve aerotolerans özellikleri yönünden incelenmiştir. Sadece anaerob ortamda üreyen gram negatif çomaklardan, klasik yöntemlerle tanımlanan ve API 20A (Biomerioux, France) ile doğrulanan *B. fragilis* kökenleri çalışmaya alınmıştır (4).

Antibiyotik duyarlılık testi. Bakterilerin duyarlılıkları NCCLS'nin önerdiği, agar dilüsyon yöntemi-

le çalışılmış, ampisilin, sulbaktam/ ampisilin, sefoksitin, piperasilin, klindamisin, tetrasiklin, metronidazol ve kloramfenikol antibiyotikleri kullanılmıştır (5). Gerek ana kökenlerin gerekse sefoksitine dirençli mutantların duyarlılık testleri aynı koşullarda üç kez yapılmış, MİK (minimal inhibitör konsantrasyonu) değerlerinde iki ve daha fazla dilüsyonluk değişiklik direnç gelişimi açısından dikkate alınmıştır.

Bakterilerde sefoksitine direnç oluşturma. Çalışmanın başlangıcında yapılan duyarlılık testinde, sefoksitin MİK değeri iki *B. fragilis* kökeninde 16µg/mL, ATCC *B. fragilis* standart suşunda ise 8µg/mL bulunmuştur. Bakteriler, subinhibitör konsantrasyonda (dışkıdan izole edilen kökenler 8µg/mL, standart suş ise 4µg/mL) sefoksitin içeren, %5' koyun kanı, hemin ve K vitamini bulunduran Brucella agara ekilmiştir. Anaerob ortamda 2-4 günlük inkübasyonun ardından, az sayıda ve küçük kolonilerden oluşan üreme tespit edilmiştir. Bu küçük koloniler, aynı konsantrasyonda antibiyotik içeren besiyerlerine pasajlanmış, aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İşlemler iyi bir üreme elde edilinceye kadar sürdürülmüş ve bu kolonilerden, iki misli sefoksitin içeren (16µg/mL ve 8µg/mL) besiyerlerine pasajlanmıştır. Sefoksitin dozu kademeli olarak (16µg/mL, 32µg/mL, 64µg/mL...şeklinde) arttırılmış, her bir kademede aynı işlemler yapılmış, ve >256µg/mL MİK değerlerine sahip kökenler elde edilmiştir (6).

BULGULAR

Ampisilin dışındaki diğer antibiyotiklere duyarlı olan; ikisi dışkıdan izole edilmiş, birisi ATCC standart kökeni olmak üzere üç *B. fragilis* kökeni, subinhibitör konsantrasyonla başlayarak artan oranda sefoksitin ile muamele edilmiş, dirençli mutantlar elde edilmiştir. Bu sefoksitine direnç kazanan mutant kökenlerden dışkıdan izole edilenlerin aynı zamanda tetrasikline direnç (64µg/ml), piperasiline orta düzeyde direnç (64µg/ml) geliştirdikleri, standart ATCC kökeninin ise klindamisine direnç (8µg/ml) geliştirdiği, piperasilin MİK değerinde dört misli (iki dilüsyon), tetrasiklin MİK değerinde ise sekiz misli bir artış (orta düzey direnç) gösterdiği saptanmıştır (Tablo1).

Tablo 1: Antibiyotiklerin, kökenler üzerindeki MİK değerleri (µg/mL)

Antibiyotikler*	Kökenler					
	<i>B. fragilis</i> 1		<i>B. fragilis</i> 2		ATCC <i>B. fragilis</i>	
	Ana köken	Dirençli Mutant	Ana köken	Dirençli Mutant	Ana köken	Dirençli Mutant
Sefoksitin	16	>256	16	>256	8	>256
Piperasilin	16	64	16	64	8	32
Ampisilin	32	32	32	64	32	64
Sulbaktam/Ampisilin	2	4	4	4	4	4
Tetrasiklin	4	64	4	64	1	8
Klindamisin	2	2	8	8	2	8
Kloramfenikol	8	8	8	16	8	16
Metronidazol	2	4	4	4	2	4

*NCCLS'e göre antibiyotiklerin duyarlılık MİK değerleri:
Sefoksitin: ≤ d16µg/mL, piperasilin: ≤ d32µg/mL,
ampisilin: ≤ d0,5µg/mL, sulbaktam/ampisilin: ≤ d4/2µg/mL,
tetrasiklin: ≤ d4µg/mL, klindamisin: ≤ d2µg/mL,
kloramfenikol: ≤ d8 µg/mL, metronidazol: ≤ d8µg/mL.

TARTIŞMA

Ülkemizde, kolay ulaşılabilen ve yaygın şekilde kullanılan ilaç gruplarından birisini antibiyotikler oluşturmaktadır. Kullanılma oranlarıyla doğru ilişkili olarak antibiyotiklere direnç gelişmektedir. Direnç gelişimini sınırlamak için önerilen yollardan birisi antibiyotiklerin doğru ve kontrollü kullanılmasıdır (2). Geleceğin hekimlerinde, doğru antibiyotik kullanma bilincini geliştirmek, gereksiz ve hatalı antibiyotik kullanımını önleyecek, dolayısıyla direncin sınırlandırılmasına önemli katkı sağlayacaktır.

Anaerob bakterilerden etken olarak en çok izole edilen, antibiyotiklere artan oranda direnç gösteren *Bacteroides* türlerinin halk sağlığını tehdit ettiği vurgulanmakta ve gelecekte ciddi problemler yaratacağı düşünülmektedir (1). *Bacteroides* türlerinin, anaeroplara etkili antibiyotiklerden sefoksitine önemli oranda direnç geliştirdiği saptanmıştır (7). Direnç oranı ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte, yüksek oranlar Kanada (%26.6), ve İspanya'dan (%21.5) elde edilmiş, ülkemizde ise farklı merkezlerden %6.3 ile %89'e varan oranlarda sefoksitine direnç bildirilmiştir (8-13). Çalışmamızda çarpıcı bir sonuç elde etmek için, normal barsak florasında bulunan ve cerrahi yara enfeksiyonlarında en sık izole edilen anaerob bakterilerden *B. fragilis* türleri seçilmiş, bu türler batın ameliyatlarında profilaksi ama-

çıyla kullanılan sefoksitin ile muamele edilerek dirençli mutantlar oluşturulmuştur. Mutant kökenlerin, sefoksitin yanı sıra diğer bazı antibiyotiklere direnç geliştirdikleri veya duyarlılıklarında azalma gösterdikleri (MİK değerlerinde artış) saptanmıştır.

Çalışmalarından esinlendiğimiz Fang ve ark. (6), sefoksitin ile muamele ederek dirençli iki mutant *Bacteroides thetaiotaomicron* kökeni geliştirmiş, bu bakterilerin diğer beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç durumlarını araştırmışlardır. Mutant kökenlerin piperasilin, sefoperazon, ampisiline de direnç kazandıkları, imipenem ve amoksisilin/klavulanata hassas kalmakla beraber, MİK değerlerinde dört misli bir artış geliştirdiklerini gözlemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda ilk bakteriler ile mutant bakterilerin β- laktamaz üretimini, penisilin bağlayan protein yapılarını ve dış zar proteinlerini incelemişlerdir. İki grup arasında, üretilen β- laktamaz miktarı bakımından bir farklılık gözlememiş, ancak mutant kökenlerin penisilin bağlayan proteinlerinde %50' den fazla azalma veya kayıp tespit etmişlerdir. Ayrıca mutant kökenlerin dış zarında 37 kDa'lık bir proteinin bulunmadığını saptamış, bu protein kaybının, geçirgenliğin azalmasına neden olabileceğini savunmuşlardır. Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda oluşturulan sefoksitine dirençli mutantlarda da benzer değişikliklerin gerçekleşebileceği, ve benzer etki mekanizmasına sahip β- laktam grubu antibiyotiklerden piperasiline çapraz direnç gelişmiş olabileceği varsayılabilir.

Elde ettiğimiz mutant kökenlerin farklı etki mekanizmalarına sahip; bakteri protein sentezini inhibe ederek etki gösteren klindamisine ve tetrasikline de direnç geliştirdikleri gözlenmiştir. Fang ve ark.'nın (6) oluşturduğu mutant *B. thetaiotaomicron* kökenlerinin de aynı zamanda klindamisine direnç geliştirdikleri, metronidazole ise düşük duyarlılık (MİK: 8µg/ml) gösterdikleri saptanmıştır. Literatürde *Bacteroides* türlerinden sefoksitine dirençli kökenlerin, klindamisine fenotipik olarak yüksek oranda direnç gösterdiğini bildiren çalışmalar bulunmakla beraber, bu iki grup antibiyotiğe çapraz direnç oluşumunu açıklayacak bir mekanizma veya genetik bir bağlantı henüz belirlenmemiştir (14, 15). Kuşkusuz, çok

sayı ve çeşitte direnç geni taşıyan ve pek çok antibiyotiğe direnç geliştiren *Bacteroides* türlerinde, çapraz direnç oluşumunda farklı mekanizmaların yer alabileceği tartışma götürmez. Ancak, anaerob bakterilerde, genetik ve moleküler antibiyotik direncine ait elde bulunan veriler birkaç cins veya tür ve az sayıda antibiyotikle sınırlı olup tüm direnç mekanizmalarını kapsamamaktadır (16, 17).

Sonuç olarak çalışmamızda, bakterilerin kullanılan antibiyotiklere zaman içinde direnç geliştirebilecekleri, bu direncin sadece kullanılan antibiyotikle sınırlı kalmayıp aynı zamanda diğer antibiyotiklere karşı da gerçekleşebileceği deneysel yöntemle gözler önüne serilmiştir. Antibiyotiklerin gelişigüzel kullanımının önüne geçmek, dolayısıyla direncin gelişimini sınırlamak için uygun antibiyotik kullanımı konusunda, geleceğin hekim adaylarını duyarlı kılmak amacıyla yapılan bu çalışmanın yararlı olacağını umuyoruz.

KAYNAKLAR

- 1. Finegold SM:** Anaerobic bacteria: General concepts. "Mandel GL, Bennet JE, Dolin R. (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed:", p2519, Churchill Livingstone, Pennsylvania (2000).
- 2. Garcia-Rodriguez JA, Garcia-Sanchez JE, Munoz-Bellido JL:** Antimicrobial resistance in anaerobic bacteria: Current situation. *Anaerobe* 1:69 (1995).
- 3. Ramussen BA, Bush K, Tally FP:** Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clin Infect Dis* 24 (Suppl 1): 110 (1997).
- 4. Koneman EW, Allen SP, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn W:** The Anaerobic Bacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 5th Ed,p709, J B Lippincott, Philadelphia(1997).
- 5. National Committee for Clinical Laboratory Standarts:** Methods for antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, 4th ED, Approved Standart M11-A3, Vol 13, No .26, Villanova (1997).
- 6. Fang H, Edlund C, Nord CE, Hedberg M:** Selection of cefoxitin-resistant *Bacteroides thetaiotaomicron* mutants and mechanisms involved in β -lactam resistance. *Clin Infect Dis* 35 (Suppl 1):47 (2002).

7. Nord CE, Hedberg M: Resistance to β -Lactam antibiotics in anaerobic bacteria. *Rev Infect Dis* 12 (Suppl 2): 231 (1990).

8. Labbe AC, Bourgault AM, Vincelette J, Turgeon PL, Lamothe F: Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of the *Bacteroides fragilis* group from 1992 to 1997 in Montreal, Canada. *Antimicrob Agent Chemother* 43: 2517 (1999).

9. Baquero F, Reig M: Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 1016 (1992).

10. Zandi H, Gürler N: Muayene maddelerinden izole edilen anaerob Gram Negatif çomakların identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 32:58 (2002).

11. Torun M, Bahar H, Yüksel P: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerin antimikrobiklere direnç durumları ve β -Laktamaz aktiviteeleri. *ANKEM Derg* 14: 104 (2000).

12. Mutlu E, Yücesoy M: Klinik örneklerden soyutlanan anaerob bakterilerde β -Laktamaz aktivitesi ve antibiyotik direncinin belirlenmesi, XXX.Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, s300 (2002).

13. Ülger (Toprak) N, Çelik C, Çakıcı O, Söyletir G: Antimicrobial susceptibilities of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* strains isolated from clinical specimens and human intestinal microbiota. *Anaerobe* 10: 255 (2004).

14. Aldridge KE: Cross-resistance to β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations and clindamycin among cefoxitin-resistant and cefoxitin-susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 17:251 (1993).

15. Ülger (Toprak) N, Çakıcı O, Çelik C, Söyletir G: Klindamisine in vitro dirençli *Bacteroides fragilis* ve *Bacteroides thetaiotaomicron* kökenlerinin diğer antibiyotiklere direnç durumu, 6.Antimikrobik Kemoterapi Günleri, P34 (2004).

16. Tally FP, Cuchural GJ, Malamy MH: Mechanisms of resistance and resistance transfer in anaerobic bacteria: Factors influencing antimicrobial therapy. *Rev Infect Dis* 6 (Suppl 1): 260 (1984).

17. Salyers AA, Shoemaker NB: Resistance gene transfer in anaerobes: New insights, new problems. *Clin Infect Dis* 23 (Suppl1): 36 (1996).