

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**Steroid verilen farelerde karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*
sepsisinde tedavi seçenekleri: deneysel çalışma**
Proje No: TSA-11-3615

Proje Türü
Normal Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Yard. Doç. Dr. Hayati Demiraslan
Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı

Yard. Doç. Dr. Gökçen Dinç/Tıbbi Mikrobiyoloji A.D
Doç. Dr. Ferhan Elmalı/İstatistik A.D
Doç. Dr. Gökhan Metan/Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D
Prof. Dr. Mehmet Doğanay/ Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D

Mayıs 2013

KAYSERİ

Teşekkür

Deney hayvanlarıyla ilgili çalışmalarımızı destekleyen Sayın Profesör Dr. Fahrettin Keleştemur'a, karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatını bizimle paylaşma nezaketini gösteren Sayın Doçent Dr. Zerrin Aktaş'a, farelerin dalak örneklerini patolojik açıdan inceleyen Sayın Doç. Dr. Kemal Deniz'e, maddi olarak destek sağlayan Erciyes Üniversitesi "Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi"ne (TSA-11-3615), çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen DEKAM personeline teşekkürü bir borç biliriz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ, AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	10
4. BULGULAR	13
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	14
6. KAYNAKLAR	16
7. EKLER	20

ÖZET

Karbapenem-dirençli *K. pneumoniae* (KRKP) enfeksiyonunun optimal tedavisi hala net değildir. Bu çalışmanın amacı fare sepsis modelinde kolistin, tigesiklin monoterapi ile colistin, tigesiklin kombinasyonunun etkinliğini karşılaştırmak, steroid verilmesinin antibiyotik tedavisi üzerine etkisini araştırmaktır. Balb/c fare modelinde OXA-48 üreten KRKP kullanıldı. Antibiyotiklerin in vitro bakterisidal aktiviteleri time-kill eğrisi kullanılarak test edildi. Ayrıca Etest ve broth makrodilüsyon yöntemi ile duyarlılığı (kolistin için minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIK) 0.5 mg/l, ve tigesiklin için 0.5 mg/l) saptandı. Fareler kompetent ve kompromize iki ana gruba ayrıldı. Her grup (1) kolistin, (2) tigesiklin monoterapi ve (3) kolistin/tigesiklin kombinasyon tedavileri olarak 3 alt gruba ayrıldı. Metil prednizolon asetat farelere intraperitoneal (ip) verildikten 36 saat sonra 10^9 bakteri inokülasyonu yapıldı. Üç saat sonra antibiyotikler başlandı ve her 12 saatte bir devam edildi. Farelerden 24 ve 48 saat sonra belirlenenlere ötenazi yapıldı ve kantitatif karaciğer ve akciğer dokularında gram başına koloni sayımı yapıldı. İn vitro çalışmada, kolistin erken dönemde bakterisidal etki gösterdi fakat 24 saat sonra tekrar üreme oldu. Tigesiklin, bakteristatik etki gösterdi. Kolistin, tigesiklin kombinasyonu da bakterisidal aktiviteyi 8 saatten sonra sürdüremedi. Yirmi dört saat sonra, kompromize ve kompetent gruplarda karaciğer dokusunda, kompetent grubun akciğerin dokusunda hem kolistin, tigesiklin monoterapisi hem de kombinasyon tedavisi kontrole göre bakteri yükünü anlamlı azalttı. Fakat kompromize grubun akciğer dokusunda kolistin, bakteriyel yükü 24 saat sonra kontrole anlamlı azaltmadı. Kolistin, tigesiklin kombinasyon tedavisi monoterapiye göre üstün değildi. Kortikosteroid alan farelerde, kolistin sonrası akciğer dokusunda bakteriyel süpresyon gecikmektedir

Anahtar kelimeler: Karbapenem-dirençli *K. pneumoniae*, deneysel sepsis, metilprednizolon asetat, kolistin, tigesiklin

Abstract

The optimal antimicrobial treatment for carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) infection still remains undetermined and less clinical data is available. This study compared the effect of monotherapy of colistin, tigecycline and their combination in sepsis model of mice. The *in vitro* bactericidal activities of antibiotics were tested using time-kill curves. CRKP OXA-48 strain (with MICs for colistin and tigecycline of 0.5 and 0.5 mg/liter, respectively) was used in Balb/c mice model. The mice were divided into competent and immunocompromised groups. Each group was sub-divided into (1) colistin or (2) tigecycline monotherapy and (3) colistin/tigecycline combination therapy. After three hours of intraperitoneal bacterial inoculation, antimicrobials were administered, and mice were sacrificed at 24 and 48 h. Quantitative bacterial count was assessed in lung and liver as CFU/g. In-vitro study demonstrated colistin sulfate showed early bactericidal activity, with following re-growth. Tigecycline had bacteriostatic activity and adding of tigecycline to colistin did not generate bacterial killing. In immunocompromised and competent groups of mice at 24 h, bacterial counts in liver samples significantly lowered compared to control, however, there were no statistically differences between monotherapy and combination therapy sub-group. Bacterial count in lung samples of competent group was significantly lesser than control for all three antimicrobial sub-groups at 24 h. Colistin plus tigecycline combination therapy was not superior against colistin or tigecycline monotherapy.

Keywords: Carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, experimental sepsis, methylprednisolone acetate, colistin, tigecycline

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* sepsisinde hastaların tedavisinde çok geniş bir antibiyotik seçeneği yoktur. Günümüzde tigesiklin ve kolistin kullanılabilen kısıtlı seçenekler olarak gözükmemektedir. Bu tedavi seçeneklerinin etkinliği konusunda da tartışmalar vardır. Tigesiklinin serum konsantrasyonunun bakterinin inhibisyonunu sağlayacak düzeye ulaşmaması nedeniyle bakteriyemilerde kullanımı sınırlıdır. Kolistin kullanımı ile ilgili klinik veri sınırlıdır. Hematolojik maligniteli, solid organ tümörlü, organ nakli yapılan, otoimmün hastalıklara sahip veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan kişilerde immünsüpresif tedavinin en önemli köşetaşlarından birisi steroidlerdir. Steroid kullanımıyla hem hücresel hem de humoral immünite baskılanmakta ve buna bağlı olarak çeşitli bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlara eğilim artmaktadır. Steroid alan hastalarda gelişen dirençli *K. pneumoniae* sepsisinde antimikrobiyal tedavi yanıtının klinik ve mikrobiyolojik olarak değerlendirmek amaçlanmıştır. Bunun için de farelerde deneysel olarak steroid verilerek immünsüpresyon geliştirip KRKP sepsisi oluşturuldu, sonrasında kolistin, tigesiklin monoterapisi ve kolistin/tigesiklin kombinasyon tedavileri verilerek etkinlikleri karşılaştırıldı.

GENEL BİLGİLER

Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olan *Klebsiella* genusunun insanlarda hastalık oluşturan üç alt türünden biri *Klebsiella pneumoniae*'dir. Sağlıklı bireylerde pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu ve karaciğer absesine neden olma yeteneğine sahip başlıca türdür. Fakat çoğu enfeksiyonlar hastanede yatan, alt hastalığı olan ve düşkün hastalarda gelişir (1). Nozokomiyal pnömoni ve idrar yolu enfeksiyonuna ilave olarak yara enfeksiyonu, invaziv alet ilişkili enfeksiyonlar, menenjit, peritonit ve biliyer sistem enfeksiyonlarına da neden olmaktadır. İdrar yolu enfeksiyonlarına bağlı bakteriyemilerin ikinci sık sebebidir. Başlıca virülans faktörü polisakkarit kapsülüdür (2). *K. pneumoniae*'nin tüm türleri ampisiline dirençlidir. Ayrıca nozokomiyal izolatlar çok ilaca direnç plazmidlerinin kazanılmasına bağlı olarak birçok antibiyotiğe dirençlidirler. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) kodlayan plazmid taşıyan türler ile gelişen bakteriyemilerde ölüm ve tedavi yetmezliği oranı yüksektir (3). GSBL pozitif *K. pneumoniae*'nin artmasıyla tedavi seçeneği genelde karbapenemlerdir. Avrupa'da yapılan Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programı 1997-2000 sonuçlarına göre GSBL pozitif *K. pneumoniae* oranı %32.8 bulunurken (4), aynı çalışmanın 2000-2003 yılları arasında Türkiye sonuçlarına göre GSBL pozitif *K. pneumoniae* oranı %48.7 gibi yüksek bulunmuştur (5). Ülkemizde çok merkezli yapılan HITIT-2 çalışmasında ise GSBL pozitif *K. pneumoniae* oranı %41.4 olarak bulunmuştur (6).

Gram negatif organizmaların oldukça dirençli türleri enfeksiyon hastalıklarının çözülmesi en zor sorunlarından biridir (7). Son dönemde Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* (KR-KP) enfeksiyonları da bildirilmeye başlanmıştır. *Klebsiella* türlerinde çok ilaca direnç sıklığı %0.5-17 arasında değişmektedir (8, 9). Çok ilaca dirençli (ÇİD) gram negatif patojenlerin tedavisinde polimiksinler, tigesiklin gibi etkili, sınırlı sayıda ajan vardır (10). Polimiksinler, siklik katyonik polipeptid yapıda yüzey aktif amfipatik deterjanlardır. Hücre membranında fosfolipidlerle etkileşerek hasar oluşturur. Konsantrasyon bağımlı hızlı bakterisidaldir. *Proteus* türleri hariç

aerobik gram negatiflere karşı etkilidir ve dirençli gram negatif organizmaların tedavisinde kullanılmaktadır (11). Glisilsiklin sınıfının üyesi olan tigesiklin, ÇİD *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında ümit vaat etmektedir. Deri ve yumuşak doku, intra abdominal enfeksiyonlarda başarıyla kullanılabilirken düşük serum konsantrasyonlarına bağlı olarak bakteriyemilerde etkinliği sınırlıdır (10). Polimiksin ve tigesiklin invitro duyarlı bulunan tedavi seçenekleri olarak görülmektedir. Son dönemde polimiksin MIC değerlerinde yükselme görülen *K. pneumoniae* izolatları da bildirilmiştir. İn-vitro tigesiklin ve polimiksin kombinasyonunun sinerjistik etkisi görülmediğini bildiren çalışma (12) yanında hafif sinerjiden bahseden çalışmalar da vardır (13, 14). Yeni ilaç kombinasyonları için KR-KP ile yapılan in-vitro çalışmada polimiksin B ile sefazolin, seftriakson, sefepim, imipenem, gentamisin, tigesiklin, doksisisiklin ve rifampisin kombinasyonları değerlendirilmiş ve polimiksin MIC değerinde en az dört kat artış saptanan rifampisin veya doksisisiklin ile polimiksin kombinasyonlarında sinerjistik etki görülmüştür (14). Ayrıca Bratu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 16 KR-KP izolatının 15 inde polimiksin ve rifampisin kombinasyonunun sinerjistik etkili olduğu, imipenem ve polimiksin kombinasyonunun 10/16 KR-KP izolatına bakterisidal etkili olduğu gösterilmiştir (15). KR-KP'ye karşı doripenem, polimiksin ve rifampisin kombinasyonu ile in vitro 4/5 (%90) bakterisidal aktivite başarıldığı da bildirilmiştir (16). Glukokortikoidler (GK) adaptif hücrel ve humoral immün yanıtı etkiler. Dolaşan lökosit popülasyonunu değiştirir, proinflamatuvar moleküller ve sitokinlerin sentezini inhibe eder, IL-2 reseptör sentezini inhibe ederek lenfosit çoğalmasını önler, antijen sunan hücre (APC) yüzeyindeki MHC moleküllerinin ekspresyonunda azalmaya neden olarak antijen sunumunu baskılar. Lipit çözünürlüğü yüksek olduğundan hücre zarından kolayca geçer. GK alan hastalar bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlar açısından anlamlı risk altındadır (17). Prednison >20mg/gün dozunda enfeksiyon riski kontrol grubuna göre iki kat artarken prednison <10mg/gün dozunda enfeksiyon riskinde artış saptanmamıştır (18). İmmünsüpresyon dozunu belirlemek için yapılan bir çalışmada metil

prednizolon 600mg/kg ile iyi bir fare immünsüpresyon modeli oluşturulabileceği ve 14 güne kadar devam ettiği bildirilmiştir (19). European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive (EORTC) kriterlerine göre üç haftadan uzun ve 0.3mg/kg/gün dozunda prednison kullanımı mantar enfeksiyonu için risk oluşturmakta olduğu kabul edilmiştir (20). Daha önce yaptığımız çalışmada 10 gün metil-prednizolon 16mg/kg dozda ip verilerek immünsüpresyon oluşturulmuştur (21). Glukokortikoidler inflamatuvar hastalıkların çoğunun tedavisinde önemli bir yer tutar. Enfeksiyonda ortaya çıkan inflamasyonu baskılamak amacıyla tüberküloz menenjit, *Pneumocystis jirovecii* pnömonisinde steroid kullanılabilmesi gibi özellikle yüksek doz steroid kullanımına bağlı fırsatçı enfeksiyonlar da karşımıza çıkmaktadır.

GEREÇLER VE YÖNTEM

Bakteriyel tür

KRKP pozitif OXA-48 türü (İstanbul Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji) kullanıldı. Tekrar tanımlaması ve antimikrobiyal duyarlılık testleri Vitek® 2 Compact System (bioMérieux, France) ile yapıldı. Bakteri sefotaksim, ertapenem, imipenem, gentamisine dirençli, siprofloksasin, amikasine duyarlıydı. Tigesiklin ve kolistin için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) değerleri Etest ve broth makrodilüsyon metodu kullanılarak CLSI rehberi önerilerine göre tesbit edildi (22).

İlaçlar: İn vitro çalışmalarda kolistin sülfat (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) ve tigesiklin (Pfizer, Carolina, Puerto Rico) kullanıldı. Metil prednizolon asetat (MPA) (Eczacıbaşı pharmaceutical, İstanbul, Türkiye), kolistimetat sodyum (Koçak pharmaceutical, Tekirdağ, Türkiye), tigesiklin (Pfizer, Carolina, Puerto Rico) and ketamin (Pfizer, Lüleburgaz, Türkiye) ise in vivo çalışmada kullanıldı. İlaç dozları daha önce yapılan deneysel hayvan modeli çalışmalarından alındı (23).

İn vitro çalışmalar: Bakteri için kolistin ve tigesiklin Etest (Diagnostic Liofilchem) çalışıldı (Etest uygulama notu EAS 023). Her antibiyotik ve diğer antibiyotikler ile kombinasyonu Etest

ile çalışıldı (Etest uygulama notu EAS 021). Fraksiyone inhibitör konsantrasyon indeksi (FIKI) şu şekilde hesaplandı; $FIKA+FIKB=FIKI$. FIKA, kombinasyondaki A ilacının MIK değeri / A ilacının MIK değeri; FIKB, kombinasyondaki B ilacının MIK değeri / B ilacının MIK değeridir. FIKI sonucuna göre sinerji, $FIKI \leq 0,5$; aditif, $>0.5 FIKI \leq 1$; indifferens, $>1 FIKI \leq 4$; antagonizma, $FIKI >4$.

Broth makrodilüsyon yöntemi: Tigesiklin ve kolistin 0,0625µg/ml ile 16µg/ml arasındaki konsantrasyonları çalışıldı ve kontrol olarak *E coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı. CLSI M07-A9 standardı kullanılarak çalışıldı (24).

MIK sınırları: EUCAST, *Enterobacteriaceae* için tigesikline karşı MIK sınırlarını $S \leq 1$ ve $R > 2$ mg/L olarak belirlemektedir (25). *E.coli* ATCC 25922 için 2011 sınırları kullanıldı (kolistin için susceptible, $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$; resistant, $2 \mu\text{g/ml}$ ve tigesiklin için $0.03-0.25 \mu\text{g/ml}$) (22)[1]. EUCAST, *Enterobacteriaceae* için kolistin karşı sınırları; susceptible, $\leq 2 \mu\text{g/ml}$; resistant, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ olarak önermektedir (26).

Başlangıçta kolistine dirençli subpopülasyonun varlığını saptamak için popülasyon analiz profili (PAP) yapıldı. Mueller Hinton Agar hazırlandıktan sonra petrilere dökmeden önce 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 mg/l final konsantrasyonlarda kolistin sülfat olacak şekilde, membran filtreden geçirilerek 7 ayrı MHA şişesine aktarıldı ve petrilere döküldü. Bakteri bir gece TSB’de üredikten sonra 10^8 cfu/ml konsantrasyonda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Her bir colistin konsantrasyonu için 10 kat sulandırmalar yapılarak bakteri ekimi yapıldı, 48 saat sonra üremeler kontrol edilerek koloni sayıları not edildi. Kolistin heterorezistansı araştırması daha önceki çalışmalarda önerildiği gibi yapıldı (27, 28).

Antibiyotiklerin bakterisidal aktivitesi “time–kill” deneyi kullanılarak değerlendirildi (29). Time–kill eğrisi için MIK’in $2\times$, $4\times$, $8\times$ ve bakterinin 10^6 CFU/ml konsantrasyonları kullanıldı. Logaritmik üreme fazında KRKP içeren katyon düzeltilmiş MHB (50 ml) hazırlandı ve 3 ml içerecek şekilde 8 tüpe bölündü. Sonra kolistin ve tigesiklinin final konsantrasyon 2, 4 ve 8 kat

MIKleri ve kombinasyonları için 4 kat MIK olacak şekilde solüsyonlar hazırlanıp tüplere konuldu. Test tüpleri su banyosunda 140 rpm devirde ve 35°C karıştırılarak inkübe edildi. Süspansiyondan her 0, 2, 4, 6, 8 ve 24 saatlerde örnek alınarak 10 kat sulandırmalar yapıldı. Trypticase soy agara (TSA) ekildi ve 35 °C’de 18-24 saat beklendi. Öldürme eğrileri 24 saate kadar zaman içinde \log_{10} CFU/ml olarak işaretlendi ve bakteriyel konsantrasyondaki değişiklikler belirlendi. Bakterisidal aktivite bakteriyel yükte inokuluma göre $\geq 3 \log_{10}$ düşme, bakteriyostatik aktivite ise $< 3 \log_{10}$ düşme olması olarak tanımlandı. Sinergi ise kombinasyonun en aktif ajandan $\geq 2 \log_{10}$ düşüş sağlaması olarak tanımlandı (30, 31).

Hayvanlar: İmmunocompetent Balb/c 8–14 haftalık fareler Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırma ve Klinik Uygulama Merkezi’nden sağlandı. Beşerli gruplar halinde kafeslendi ve serbest su ve gıdaya ulaşım sağlandı. Çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Çalışmaları için Yerel Etik Kurul’dan onay alındı (No: 11/57).

Çalışma düzeni ve hayvan deneyi

Fareler competent ve compromise olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. İmmüno-supresyon 600 mg/kg MPA’nın intraperitoneal yolla (i.p.) verilmesi ile sağlandı (32). Sepsis geliştirmek için, 36 saat sonra ön çalışmada belirlenen 10^9 CFU/ml bakteri süspansiyonu ip verildi. Her grup kolistin, tigesiklin monoterapisi, kolistin/tigesiklin combination tedavisi verilmek üzere 3 alt gruba ayrıldı. İlk antibiyotik dozu bakteriyel inokülasyondan 3 saat sonra başlandı, her 12 saatte tekrarlandı ve 24 ve 48 saat sonra fareler yüksek doz ketamin ile öldürüldü (Şekil 1). Akciğer, karaciğer, kalp, periton ve dalak sürüntüleri alınarak sepsis gelişip gelişmediği kontrol edildi. Akciğer ve karaciğerleri 1ml serum fizyolojik (SF) içinde homojenize edildi (Heidolph SilentCrusher M, Schwabach, Germany) ve 10 kat sulandırarak TSA’ya ekildi. Koloniler 37 °C’de 20-24 saat inkübasyon sonrası sayıldı. Ayrıca, 7 sterid alanlardan ve 8 competent gruptna olmak üzere 15 dalak % 10 formalinle fikse edildi ve parafin blok hazırlandı. Örnekler 5mm

kesitler halinde hazırlanarak hematoksilen eozin ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Yüksek doz steroid alanlar ile almayanların dalak özellikleri karşılaştırıldı.

İstatistiksel analiz

Sonuçlar SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak analiz edildi. Bakteri sayıları ve antibiyotik ilişkileri incelenmesinde logaritmik transformasyon yapıldı. Veriler, ortalama± standart sapma olarak verildi. One-way varyans analizi (ANOVA) ve T test normal dağılımlarda kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

İn-vitro çalışma

Hem Etest hem de broth makrodilüsyon yöntemi ile tigesiklin ve kolistin MİK'i 0.5mg/l olarak saptandı. FIKI 2,5 (indiferens) olarak hesaplandı. Bakterinin kolistine duyarlılığı PAP analizi ile belirlendi (Şekil 2). Kolistine heteroresistans saptanmadı.

Kolistin and tigesiklin, kolistin/tigesiklin kombinasyonunun time-kill profilleri Şekil 3'de gösterilmiştir. Tigesiklin, KRKP'ye karşı 2X, 4X ve 8X MİK'te 24 saatte bakteriyostatik etki gösterdi (1.48 log₁₀ CFU/ml). Kolistin ise 2X, 4X ve 8X MİK'te 4 saatte bakterisidal etkiliyken 6 saatten sonra koloni sayılarında artış gözlemlendi ve 24 saatte bakterisidal aktivite kayboldu. Tigesiklin/kolistin kombinasyonu 4 ve 8 saatte bakterisidal aktivite göstermesine rağmen 24 saatte yeniden üreme gözlemlendi.

İn vivo çalışma

Bu çalışmada 67 fare kullanıldı. Karaciğer ve akciğer dokusunda bakteriyel konsantrasyonlar belirlendi (Table 1). Yirmi dört saatte hem kompromize ($p=0.005$) hem de kompetent ($p=0.032$) grupların karaciğer dokusundaki bakteriyel yükleri kolistin, tigesiklin monoterapisi ve kombinasyon tedavisi ile kontrole göre anlamlı düşüktü (Şelik 4). Kombinasyon tedavisi ile kolistin ve tigesiklin monoterapisi arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu.

Kompromize ($p=0.069$) ve kompetent grupların akciğer dokusundaki bakteriyel yükleri kolistin, tigesiklin monoterapisi ve kombinasyon tedavisi ile kontrole göre düşük olmasına rağmen bu düşüş sadece kompetent grupta anlamlıydı ($p=0.003$). Kombinasyon tedavisi ile colistin ve tigesiklin monoterapisi arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu.

Kırksekiz saat sonra kompromize ($p=0.077$) ve kompetent ($p=0.074$) grupların akciğer ve karaciğer dokusundaki bakteriyel yükleri kolistin, tigesiklin monoterapisi ve kombinasyon tedavisi ile kontrole göre düşük olmasına rağmen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4).

Kompromize grubun akciğer dokusunda 24 saat sonra kolistin altgrubunda bakteriyel yükte anlamlı düşüş olmadı.

Dalak histolojisi: İmmünokompromize grupta beyaz pulpada azalma, kırmızı pulpada eksramedüller hemopoezde artış ve lenfoid folikülde azalma gözlemlendi. Kompetent grupta genişlemiş beyaz pulpa izlendi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbapenemaz üreten bakteriler tarafından sebep olunan enfeksiyonlar sefalosporinler ve karbapenemler ile tedavi edilemezler. Kısıtlı antimikrobiyal tedavi seçeneğinden dolayı KRKP enfeksiyonlarının tedavisi sorun oluşturmaktadır (33, 34). İzolatların çoğu colistin ve tigesikline hassastır (35). KRKP ile enfekte hastalar özellikle yoğun bakımlarda birçok komorbiditeye muzdarip olduklarından klinik olarak antimikrobiyallerin rolünü değerlendirmek zor olabilir (36). Bu çalışmada immün kompromize ve kompetan farelerde OXA-48 üreten KRKP sepsis modelinde kolistin, tigesiklin ve kombinasyonlarının etkinliği değerlendirilmiştir.

Kill-time çalışmasında bazı *K. pneumoniae* türleri inkübasyonun 8–16 saatinden sonra hafif bir yeniden üreme göstermişlerdir (31). Bunun dışında tigesiklin ile KRKP tedavisi sırasında tigesiklin MİK seviyesinde yükselme ile birlikte olan tedavi yetmezlikleri de bildirilmiştir (34, 37). Tam tersine OXA-48 üreten *Enterobacteriaceae* (1, *K. pneumoniae*; 1, *E. coli*) 2

bakteriyemi vakasının tigesiklin monoterapisi ile tedavi olduğu bildirilmiştir. Bu vakaların biri intra-abdominal enfeksiyon, diğeri deri-yumuşak doku enfeksiyonuydu (38). Sepsis fare modelinde tigesiklin subgrubunda bakteri sayısı kontrole göre $> 2 \log_{10}$ düşüş sağladı. Tigesiklinin KRKP'ye etkisi kolistin ve kolistin/tigesiklin kombinasyonuna benzerdi. Tigesiklin alan kompromize fareler 24 ve 48 saat sonra kompetan farelerden daha yüksek bakteriyel yüke sahiplerdi, fakat fark anlamlı değildi.

Sonuç olarak, kill-time çalışmasında kolistin 4 saatte KRKP'ye karşı bakterisidal etki göstermesine rağmen bu etkisi 24 saate kadar devam etmedi. Tigesiklin ise bakteriyostatik bir etki gösterdi. Yirmidört saat sonra kompromize ve kompetent grubun karaciğer dokusunda ve yine kompetent grubun akciğerinde bakteri yükü kolistin, tigesiklin monoterapisi ve kombinasyon tedavisi ile anlamlı azaldı. KRKP sepsisinde kolistin ve tigesiklin kombinasyon tedavisi monoterapiye üstün değildir. Yüksek doz kortikosteroid alan deneklerde kolistin tedavisiyle erken dönemde (24 saat) akciğer dokusunda bakteriyel baskılanma sağlanamamıştır. KRKP tedavisi için geniş çaplı ve randomize, kontrollü klinik çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2010: 2815-2833.
2. Bishara J, Leibovici L, Huminer D, et al. Five-year prospective study of bacteraemic urinary tract infection in a single institutum. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16: 563-567.
3. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, et al. Bloodstream infections caused by extended spectrum beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 498-504.
4. Jones RN, Pfaller MA, MYSTIC study group (Europe). Antimicrobial activity against strains *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. resistance phenotypes consistent with an extended-spectrum β -lactamase in Europe. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 708-712.
5. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B, Turkish MYSTIC Study Group. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000–2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. Diagnostic Microbiol Infect Dis 2007; 59: 453–457.
6. Gur D, Hascelik G, Aydın N, et al. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. J Chemother 2009; 21(4): 383-9.
7. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 813–821.
8. La Bombardi VJ. The emergence of the KPC carbapenemases: clinical and laboratory issues. Rev Med Microbiol 2007; 18:29–34.
9. Mc Donald LC. Trends in antimicrobial resistance in health care-associated pathogens and effect on treatment. Clin Infect Dis 2006; 42 (Suppl.2):S65–S71.
10. Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram negative infections: what are the treatment options? Drugs 2009; 69 (14): 1879-901.
11. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: A critical review. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 1206-1215.

12. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigeciklin in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J. Antimicrob. Chemother* 2006; 57:5 73–576.
13. Lee J, Patel G, Huprikar H, Calfee DP, Jenkins SG. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Clin Microbiol* 2009. 47:1611–1612.
14. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10):3558-62.
15. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Agents* 2005; 56:128–132.
16. Urban C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(6):2732-4.
17. Bart PA, Pantaleo G. Immunodeficiencies associated with immunosuppressive agents. In: Cohen J, Opal SO, Powderly WG, eds. *Infectious Diseases*. 3rd ed. China: Mosby Elsevier; 2010: 894–902.
18. Stuck AE, Minder CE, Frey FJ. Risk of infectious complications in patients taking glucocorticosteroids. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 954-963.
19. Miller TA, Schaefer FW 3rd. Methylprednisolone acetate immune suppression produces differing effects on *Cryptosporidium muris* oocyst production depending on when administered. *Vet Parasitol* 2007;149(1-2):77-84.
20. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(12): 1813–1821.

21. Bakır M, Doğanay M, Dökmetaş M. Steroid verilen farelerde oluşturulan deneysel E. coli sepsisinde antibiyotik ile beraber immünoglobulin G tedavisi. *Mikrobiyol Bul* 1990; 24: 336-343.
22. CLSI CaLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S21. Wayne PA2011.
23. Song JY, Cheong HJ, Lee J, Sung AK, Kim WJ. Efficacy of monotherapy and combined antibiotic therapy for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in an immunosuppressed mouse model. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:33-9.
24. CLSI CaLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. M07-A9. Wayne, Pennsylvania2012.
25. EUCAST TECoASTSC. EUCAST Technical Note on tigecycline. Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 1.0 *Clinical Microbiology and Infection*. 2006;12:1147-9.
26. EUCAST ECoAST. Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 1.0 Colistin2010.
27. Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I, Sofianou D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:946-7.
28. Bergen PJ, Forrest A, Bulitta JB, Tsuji BT, Sidjabat HE, Paterson DL, et al. Clinically relevant plasma concentrations of colistin in combination with imipenem enhance pharmacodynamic activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at multiple inocula. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:5134-42.
29. CLSI CaLSI. Methods for Determining Bacterial Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute1999.
30. Petersen PJ, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline and comparative agents by time-kill kinetic studies in fresh Mueller-Hinton broth. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59:347-9.
31. Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroulia E, Poulou A, et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37:244-7.

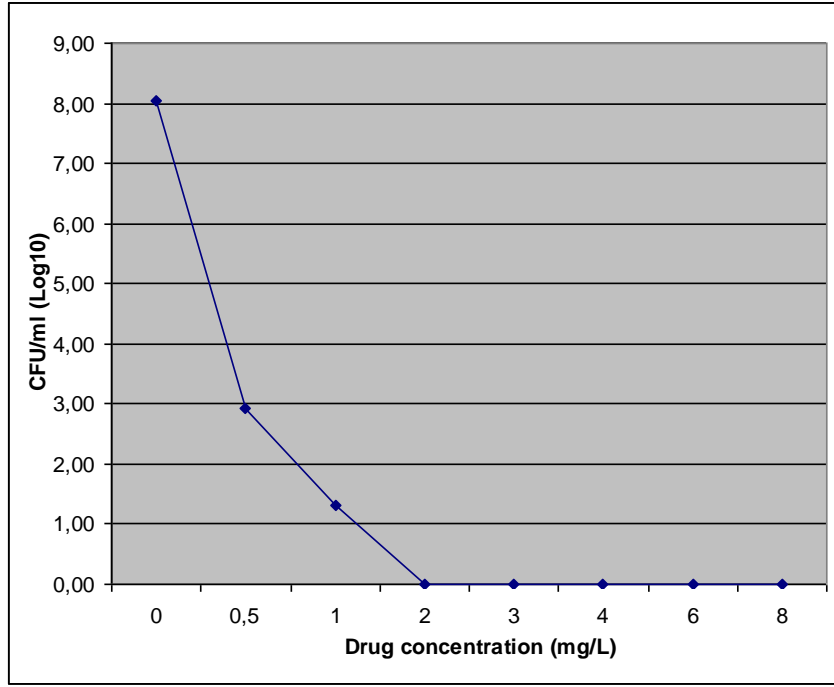
32. Miller TA, Schaefer FW, 3rd. Characterization of a single dose methylprednisolone acetate immune suppression model using *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol.* 2006;141:66-83.
33. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:228-36.
34. Hong T, Moland ES, Abdalhamid B, Hanson ND, Wang J, Sloan C, et al. *Escherichia coli*: development of carbapenem resistance during therapy. *Clin Infect Dis.* 2005;40:e84-6.
35. Maherault AC, Nordmann P, Therby A, Pagon B. Efficacy of imipenem for the treatment of bacteremia due to an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Clin Infect Dis.* 2012;54:577-8.
36. Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:439-48.
37. Daly MW, Riddle DJ, Ledebor NA, Dunne WM, Ritchie DJ. Tigecycline for treatment of pneumonia and empyema caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacotherapy.* 2007;27:1052-7.
38. Navarro-San Francisco C, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, Moreno-Ramos F, Rico-Nieto A, Ruiz-Carrascoso G, et al. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a major clinical challenge. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E72-9.

EKLER

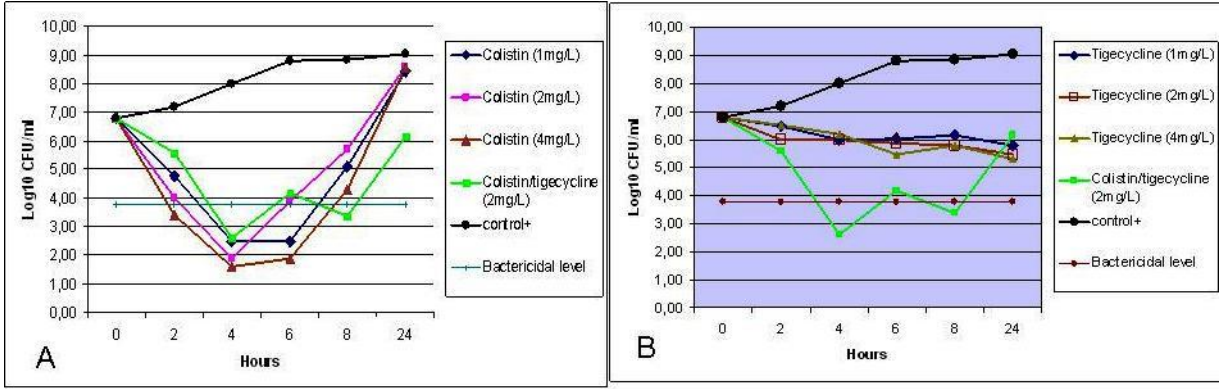
		Sacrifiye 24		Sacrifi 48			
Grup 1 n,35	MPA 600mg/ kg	0,5ml bakteri 4936, 10 ⁹ cfu/ml inoküle	Kontrol+/- (7/2)	(4/1)	(3/1)		
			Tg (8)	(4)	(4)		
			Ks (10)	(6)	(4)		
			Tg+ks (8)	(4)	(4)		
			-1,5 days	0 day	3.hours	24 hours	48 hours
Grup 2 n,32	Serum fizyolojik	0,5ml bakteri 4936, 10 ⁹ cfu/ml inoküle	Kontrol+/- (7/2)	(4/1)	(3/1)		
			Tg (7)	(4)	(3)		
			Ks (8)	(4)	(4)		
			Tg+Ks (8)	(4)	(4)		

mpa: Metil prednizolon asetat, Tg: tigesiklin, Ks: kolistin,

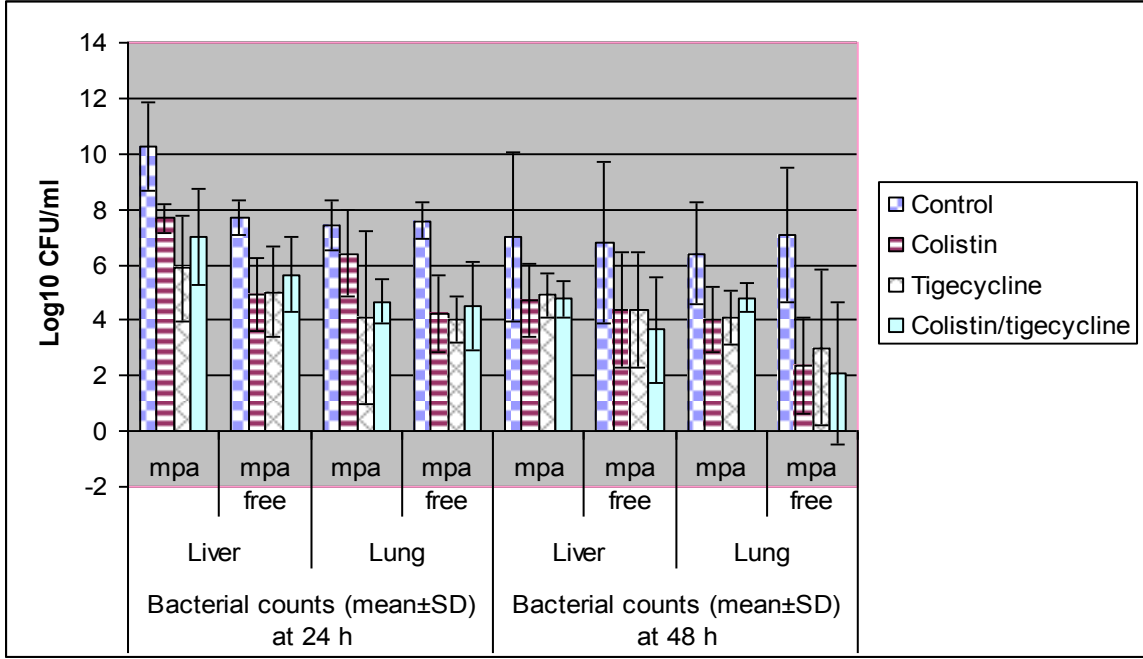
Şekil 1: Farelerin gruplara ayrılması ve steroid verilmesi ile ilgili çalışma düzeni



Şekil 2: Kolistine heterorezistans test edilen karbapenem-dirençli *K. pneumoniae*'nin koloni sayıları, tür kolistine hassas.



Şekil 3: KRKP'ye karşı kolistin (A), tigesiklin (B) ve kolistin/tigesiklin kombinasyonlarının time-kill eğrisi



Şekil 4: 24 ve 48 saat sonra kompetent ve kompromize grupların akciğer ve karaciğer dokularında ortalama bakteriyel sayıların karşılaştırılması.

mpa: Metil prednizolon asetat, CFU, koloni oluşturan ünite, SD: standart sapma.

Tablo 1: Farelerin akciğer ve karaciğer örneklerindeki bakteri konsantrasyonu

	Bakteri sayısı (ort±SS) 24 saat sonra				Bakteri sayısı (ort±SS) 48 saat sonra			
	Karaciğer (log10 cfu/g)		Akciğer (log10 cfu/g)		Karaciğer(log10 cfu/g)		Akciğer (log10 cfu/g)	
	mpa	Mpasız	mpa	Mpasız	mpa	Mpasız	mpa	Mpasız
Kontrol	10,24±1,60	7,70±0,60	7,41±0,92	7,59±0,65	7,00±3,06	6,79±2,89	6,41±1,86	7,09±2,41
Kolistin	^{ab} 7,67±0,50	^a 4,91±1,31	6,41±1,57	^a 4,24±1,39	4,69±1,32	4,36±2,07	4,02±1,19	2,36±1,72
Tigesiklin	^a 5,87±1,89	^a 5,01±1,62	4,10±3,12	^a 4,02±0,85	4,90±0,79	4,39±2,09	4,10±0,95	3,02±2,82
Kolistin /tigesiklin	^a 7,03±1,73	^a 5,65±1,36	4,68±0,81	^a 4,48±1,59	4,76±0,67	3,65±1,93	4,81±0,54	2,06±2,56

mpa: Metil prednizolon asetat, CFU, koloni oluşturan ünite, SD: standart sapma

^ap < 0.05 grup içi kontrolle karşılaştırma

^bp < 0.05 mpaşız grupla karşılaştırma