

Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *Enterobacteriaceae*'larda Mutant Engelleme Konsantrasyonunun Saptanması

Determination of Mutant Prevention Concentration in Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Enterobacteriaceae*

Gülşen Altınkanat Gelmez , Güner Söyletir 

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Altınkanat Gelmez G, Söyletir G. Determination of Mutant Prevention Concentration in Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Enterobacteriaceae*. Experimed 2018; 8(1): 1-6.

ÖZ

Amaç: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* kökenleri ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin sıklıkla kullanılması beraberinde karbapenem direnci gelişmesine neden olmuştur. Bu nedenle çalışmamızda karbapenemlerin mutant engelleme konsantrasyonlarının (MEK) saptanması ve tedavi sırasında gelişen dirence GSBL üretiminin herhangi bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya test grubu olarak, imipenem ve meropenem $MIC < 1$ mg/L olan, fenotipik ve genotipik yöntemlerle GSBL enzimlerinden en az birine sahip olan ($n=56$) ve kontrol grubu olarak araştırılan enzimlerden hiçbirini içermeyen ($n=19$) *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökeni dahil edilmiştir. Kökenlerin imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) ve mutant engelleme konsantrasyonları (MEK) agar dilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır.

Bulgular: GSBL (-) kökenlerin MEK90 değerleri duyarlı sınırlarda kalır iken, GSBL üreten kökenlerde MEK90 değerleri $2-8 \mu\text{g/mL}$ ye kadar çıkmıştır. GSBL(+) kökenlerde karbapenem MEK değerleri GSBL(-) kökenlere kıyasla 2-9 kat daha yüksek bulunmuş ancak GSBL enzim türlerinin (TEM, SHV, CTX-M) bu dirence katkı açısından aralarında bir farklılık olmadığı saptanmıştır. GSBL(+) kökenlerde imipenem ve meropenem $0,015-0,06 \mu\text{g/mL}$ gibi çok düşük MİK değerlerinde bile yaklaşık %50 oranında mutant seçimine neden olmaktadır.

Sonuç: Bu verilere göre; i) Köken karbapenem duyarlı olsa da GSBL üretimi karbapenem dirençli mutant seçimine neden olabilir gibi gözükmektedir. ii) Doripenem ve ertapenem en az, imipenem ve meropenem en fazla mutant seçen karbapenemlerdir.

Anahtar Kelimeler: Mutant Engelleme Konsantrasyonu, GSBL, *Enterobacteriaceae*

ABSTRACT

Objectives: The use of carbapenems for treating infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* has increased. Consequently, this practice has resulted in the emergence of carbapenem resistance. In this study, we aimed to determine mutant prevention concentrations (MPCs) of carbapenems and the development of carbapenem resistance in infections caused by ESBL-producing bacteria.

Material and Method: The test group included isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* that produced imipenem and meropenem minimum inhibitor concentration (MIC) < 1 mg/L and at least one of the ESBL ($n=56$). Negatives isolates ($n=19$) for all tested enzymes comprised the control group. Carbapenems included in the study were imipenem, meropenem, doripenem, and ertapenem. The MIC and MPC values of these drugs were determined using the agar dilution method for all tested organisms.

Results: In ESBL-negative isolates, the MPC90 values were in the susceptible range. In contrast, in the ESBL positive isolates, MPC90 value increased to $2-8 \text{ mg/L}$. The MPC values were 2- to 9-fold higher in the ESBL-producing strains compared with the non-ESBL strains. However, the mutant selection rate was not affected by the ESBL enzymes types (TEM, SHV, and CTX-M). In ESBL-positive strains, imipenem and meropenem, even at very low MICs ($0.015-0.06 \mu\text{g/mL}$), showed selective carbapenem-resistant mutants at a rate of 50%.

Conclusion: Our results suggest the following conclusions. i) ESBL production seems to increase carbapenem resistance in mutant strains, even though these are carbapenem susceptible in routine tests. ii) Among carbapenems, doripenem and ertapenem have the least potential for mutant selection whereas imipenem and meropenem have the most potential.

Keywords: Mutant Prevention Concentration (MPC), ESBL, *Enterobacteriaceae*

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Gülşen Altınkanat Gelmez **E-mail:** gulsenaltinkanat@yahoo.com

Geliş Tarihi/Received Date: 11.01.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 01.02.2018 **Çevrimiçi Yayın Tarihi/Available Online Date:** 09.05.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Enterobacteriaceae üyelerinde beta laktam direncinden sıklıkla sorumlu olan mekanizma genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimidir. Özellikle *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* kökenlerinde görülür ve sayıları 350'yi aşan genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) ile oluşan direnç tüm dünyada ve ülkemizde hızla artarak önemli bir sorun haline gelmiştir. Karbapenemler dışında hemen hemen tüm beta laktamlara direnç gelişimine neden olan GSBL üretimi tedavide kullanılacak etkin antibiyotik sayısını kısıtlamaktadır. Karbapenemler GSBL üreten mikroorganizmalar için oldukça etkili, sıklıkla başvuru birinci seçenek antibiyotiklerdir. Ancak yıllar içerisinde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu enfeksiyonların artmasına paralel olarak karbapenemlerin sıklıkla kullanılması beraberinde karbapenem direnç oranlarında artışa neden olmuştur (1-3). Bunun en iyi göstergesi, hastanemizde *K. pneumoniae* kökenlerinde 2008 yılında karbapenem direnci %1 iken, 2012 yılı itibarıyla bu oran % 5, 2016 yılı itibarıyla %20'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direncine neden olan en önemli mekanizma karbapenemleri hidroliz eden bir karbapenemaz üretimidir. Ancak son yıllarda karbapenemlerle tedavi sırasında dış membran proteinlerinde (OMP) meydana gelen nokta mutasyonlarının neden olduğu karbapenem direncinde de artış olduğu bildirilmektedir. Özellikle *E. coli*'de *OmpF* ve *OmpC*, *K. pneumoniae*'de *OmpK35* ve *OmpK36* porinlerinde meydana gelen mutasyonların karbapenem direncinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, yapılan çalışmalarda GSBL veya *AmpC* beta laktamazların aşırı üretimine ilaveten OMP'lerde mutasyon meydana gelmesinin yüksek düzey karbapenem direncine yol açtığı gösterilmiştir (2, 4, 5). Bu şekilde gelişen karbapenem direncinin gelecekte yol açabileceği sorun düşündürücüdür. Ülkemizde enterik bakterilerdeki GSBL pozitif mikroorganizma oranlarının azımsanmayacak düzeylerde olması ve bunlara bağlı enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin yaygın kullanımı gelecekte mutasyona bağlı karbapenem direnci ile karşı karşıya kalacağımızın göstergesi olabilir. Bu nedenle karbapenemlerle tedavi sırasında OMP mutantlarının oluşmasını engelleyecek yeni stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Son yıllarda araştırmacılar, mutant bakterilerin neden olduğu antimikrobiyal direncin önüne geçilmesinde yeni bir yaklaşım olan "Mutant Engelleme Konsantrasyonu (MEK)" kavramını gündeme getirmişlerdir. Araştırmacılar spontan nokta mutasyonları ile gelişen dirençli mutant kökenlerin ancak yüksek inokulum varlığında (10^{10} cfu/mL) saptanabileceğinden bahsetmektedirler. *In vitro* duyarlılık testlerinde yüksek bakteri yoğunluğunda birinci basamak mutant kökenlerin inhibisyonuna neden olan konsantrasyonun saptanmasının enfeksiyon bölgesindeki gerçek direnci daha iyi yansıtaacağı belirtilmektedir. Geleneksel tedavi protokolleri ise antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonlarına (MİK) göre belirlenmektedir. Ancak MİK sadece duyarlı bakteri popülasyonunu hedef alan ve dirençli mutant kökenler hakkında bilgi vermeyen bir parametredir. Bu nedenle tedavi sırasında mutant bakterilerin seleksiyona izin vermeyen MEK, direnç gelişiminin önlenmesinde yeni bir tedavi stratejisi olmaya adaydır (6-9).

Karbapenemlerin gram negatif bakterilerde MEK değerlerinin belirlenmesi, tedavide kullanılacak doz aralığının güvenli olup olmadığını belirleyecektir. Karbapenem grubu antibiyotiklerin etkilerini kaybetmeden, daha etkin kullanılabilmesi için oluşturabilecekleri mutant seleksiyon sıklığının ve MEK'in belirlenmesiyle gelecekte mutasyona bağlı gelişebilecek karbapenem direncinin önlenmesinde önemli bir adım olacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakterilerin Seçimi

Çalışmamızda, Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden etken olarak izole edilen ve otomatize sistem (VITEK, BioMerieux, Fransa) ile tanımlanmış; i) İmipenem ve meropenem MİK değerleri $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ii) GSBL enzimlerinden en az birini ürettiği fenotipik yöntemlerle saptanan iii) Genotipik olarak GSBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) genlerinden en az birini taşıyan *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenleri çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak fenotipik ve genotipik olarak test edilen hiçbir enzimi üretmediği saptanan *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenleri alınmıştır.

Fenotipik Yöntemler: GSBL üretiminin fenotipik olarak doğrulanmasında CLSI önerileri doğrultusunda seftazidim (CAZ), seftaksim (CTX), seftazidim klavulanik asit (CAZ/CLA) ve seftaksim klavulanik asit (CTX/CLA) kullanılarak kombine disk yöntemi kullanılmıştır. Sefalosporinlerin tek başlarına oluşturdukları zon çapı ile klavulanik asitli bileşikler arasında >5mm fark olması GSBL üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (10).

Genotipik Yöntemler: Kökenlerde GSBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}), genlerinin varlığı uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) ile araştırılmıştır. Kökenlerin DNA'ları üretici firmanın önerileri doğrultusunda High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kullanılarak izole edilmiştir. 10X PCR buffer, 2 mM dNTP, 3 pmol primer, 2,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimeraz ve 2 μl of genomik DNA içeren 50 μl 'lık PCR karışımı hazırlanıp her gen için uygun reaksiyon koşulları kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (11).

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu ve Mutant Engelleme Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

Fenotipik ve genotipik yöntemlerle GSBL enzimlerinden en az birini ürettiği saptanan test kökenleri ile araştırılan enzimleri üretmediği belirlenen *E. coli* ve *K. pneumoniae* kontrol kökenlerinde imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem MİK'leri CLSI standartlarına uygun olarak agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (10). Mutant engelleme konsantrasyonunun belirlenmesi için her bir köken bir gece katyon eklenmiş Müeller Hinton Agar'da (CA-MHA) inkübe edildikten sonra üreyen tüm bakteriler bir eküvyon yardımıyla toplanarak 100 ml katyon eklenmiş Müeller Hinton Broth'da(CA-MHB) süspansiyon edilmiştir. Süspansiyonlar çalkalayıcı etüvde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, spektrofotometrede 600nm dalga boyunda absorbans 1 olacak şekilde bakteri süspansiyonu ($>10^{10}$ cfu/mL) hazırlanmıştır. Elden edilen süspansiyon +4°C'de 5000g'de 30 dakika santrifüj edilip sediment 4 ml CA-MHB ile tekrar süspansiyon edilmiştir. İmipenem (0,06-256 $\mu\text{g/mL}$) meropenem (0,008-256 $\mu\text{g/mL}$), dori-

penem (0,015-256 µg/mL) ve ertapenemin (0,004-256 µg/mL) belirtilen konsantrasyonlarını içeren CA-MHA besiyerleri hazırlanarak, >10¹⁰ cfu/mL içeren bakteri süspansiyonundan 100 µl inoküle edilip ve 48 saat 35-37 °C'de inkübe edilmiştir. Hem 24. hem de 48. saatlerde petriyeler kontrol edilip mutant kökenlerin üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon MEK değeri olarak kaydedilmiştir (12).

BULGULAR

Yapılan fenotipik test sonuçlarına göre 56 kökenin GSBL ürettiği tespit edilmiştir. Fenotipik olarak GSBL pozitif bulunan kökenlerin 23 tanesi tek gen [TEM(n=8), SHV(n=5), CTX-M(n=10)], 23 tanesi 2 gen [TEM+SHV(n=2), TEM+CTX-M(n=11), SHV+CTX-M(n=10)], 10 tanesi 3 geni(TEM+SHV+CTX-M) bir arada

içerdiği tespit edilmiştir. Araştırılan enzimlerden hiçbirini içermeyen 9 *E. coli*, 10 *K. pneumoniae* kökeni kontrol grubu olarak test edilmiştir.

GSBL negatif kökenler tüm karbapenmlere duyarlı bulunurken, GSBL pozitif kökenlerde, imipenem, meropenem ve doripenem MİK değerleri duyarlılık sınırlarında saptanmıştır. Ertapenem MİK'leri ise 1 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* kökeninde dirençlilik sınırının üzerinde (MİK=2-4 µg/mL) bulunmuştur (Tablo 1).

GSBL negatif kökenlerin imipenem, meropenem, doripenem ve ertapenem MİK₉₀ değerleri 0,03-0,25 µg/mL iken MEK₉₀ değerleri 0,125-1µg/mL arasında olup duyarlılık sınırları içerisinde bulunmuştur. Ancak bu kökenlerde imipenem için saptanan MEK₉₀ değerlerinin 1µg/mL olarak bulunması karbapenem gru-

Tablo 1. Kökenlerin MİK50 ve MİK90 değerleri

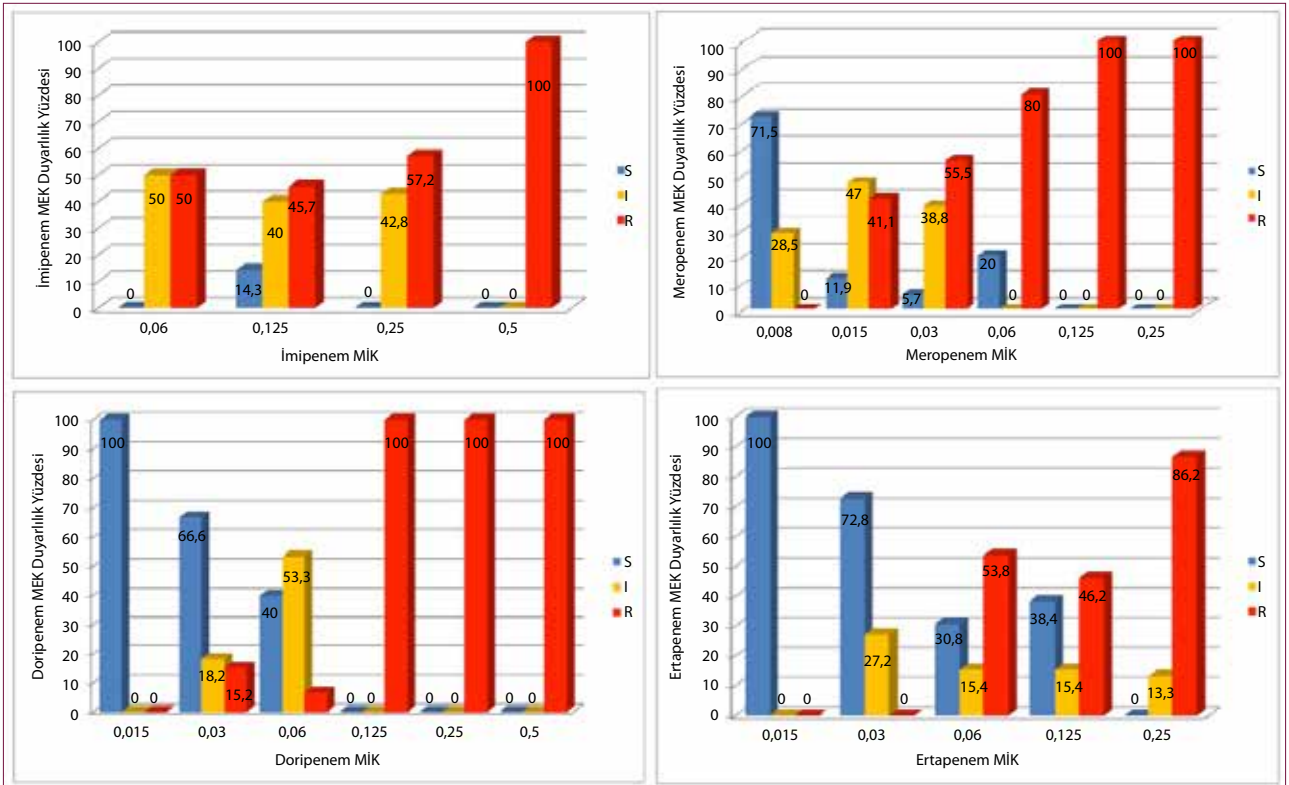
Kökenler	İmipenem			Meropenem			Doripenem			Ertapenem		
	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
GSBL(-) (n=19)	0,06-0,25	0,125	0,25	0,008-0,03	0,03	0,03	0,015-0,03	0,015	0,03	0,015-0,03	0,015	0,03
GSBL(+) (n=56)	0,06-0,5	0,125	0,25	0,008-0,25	0,015	0,06	0,015-0,06	0,03	0,06	0,015-4	0,125	0,25
CLSI Kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıkları	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4	≤0,5	1	≥2

MİK: minimum inhibitör konsantrasyonu; GSBL: genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

Tablo 2. Kökenlerin MEK50 ve MEK90 değerleri

Kökenler	İmipenem			Meropenem			Doripenem			Ertapenem		
	MEK Aralığı	MEK ₅₀	MEK ₉₀	MEK Aralığı	MEK ₅₀	MEK ₉₀	MEK Aralığı	MEK ₅₀	MEK ₉₀	MEK Aralığı	MEK ₅₀	MEK ₉₀
GSBL(-)												
<i>E. coli</i> (n=9)	1	1	1	0,25-0,5	0,25	0,5	0,06-0,25	0,06	0,125	0,06-0,125	0,125	0,125
<i>K. pneumoniae</i> (n=10)	1	1	1	0,25-0,5	0,5	0,5	0,125-0,5	0,125	0,25	0,125-0,25	0,25	0,25
GSBL(+)												
<i>E. coli</i> (n=32)	0,5-16	2	4	0,125-8	2	4	0,125-8	0,5	2	0,125-16	0,5	4
<i>K. pneumoniae</i> (n=24)	2-32	4	8	0,25-8	4	4	0,25-4	2	4	0,25-16	4	4
CLSI Kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıkları	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4	≤0,5	1	≥2

MEK: mutant engelleme konsantrasyonu; GSBL: genişlemiş spektrumlu beta laktamaz



Şekil 1. GSBL pozitif kökenlerde imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem MİK değerleri ile MEK duyarlılık etkileşimi

bu antibiyotikler için yüksek bir konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. GSBL pozitif kökenlerde ise tüm karbapenemler için MEK₉₀ değerleri 2-8 µg/mL olup dirençlilik sınırının üzerine çıkmıştır. GSBL negatif kökenlerle karşılaştırıldığında GSBL pozitif kökenlerin MEK₉₀ değerlerinin 2-9 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 2). Bu sonuçlara göre, GSBL üretiminin mutant seçimine daha fazla katkı sağladığı, ancak kökenlerin farklı tip GSBL enzimleri içermelerinin mutant seleksiyon profili üzerinde bir farklılık yaratmadığı gözlemlenmiştir.

GSBL pozitif kökenlerde doripenem, ertapenem, meropenem ve imipenem MEK değerlerinin duyarlılık sınırlarında kalma oranları sırasıyla %58,9, %32,1, %25 ve %8,9 olarak tespit edilmiştir. MEK değeri orta kategorisinde yer alan kökenlerde dahil edildiğinde bu oranların sırasıyla %84, %48,2, %60 ve %50 olduğu gözlemlenmiştir.

GSBL pozitif kökenlerde karbapenemlerin MİK değerlerinin MEK'i öngörüp göremeyeceği analiz edildiğinde imipenem (MİK aralığı: 0,06-0,5 µg/mL) için en düşük MİK değeri olan 0,06 µg/mL'de bile %50 oranında mutant seçimine neden olduğu görülmüş, MİK 0,5 µg/mL olduğunda bu oranın %100'e çıktığı gözlemlenmiştir. Yani GSBL pozitif kökenlerde imipenem MİK değeri ne olursa olsun mutant seçimine büyük oranda katkıda bulunmaktadır. Meropenem (MİK aralığı: 0,008-0,25 µg/mL) için en düşük MİK değeri olan 0,008 µg/mL'de mutant seçimine neden olmazken, ≥0,06 µg/mL 'de %80 gibi büyük oranlarda mutant seçimine neden olmaktadır. Doripenem (MİK aralığı:

0,015-0,5 µg/mL) için en düşük MİK değeri olan 0,015 µg/mL'de mutant seçimine neden olmazken, ≥0,125 µg/mL üzerindeki tüm değerlerde ise %100 oranında mutant seçimi gerçekleşmektedir. Ertapenem (MİK aralığı: 0,015-0,25 µg/mL) için ise ≤0,03 µg/mL'de mutant seçimine neden olmazken, ≥ 0,25 µg/mL'de %80 oranında mutant seçimine neden olmaktadır (Şekil 1). Bu sonuçlar irdelendiğinde doripenem ve ertapenem mutant bakteri seçiminin en az olduğu karbapenemler olarak değerlendirilmiştir. Bir diğer deyişle MİK'i <0,125 µg/mL olan değerlerde doripenem ve ertapenem tedavide sorunsuz olarak kullanılabilirken meropenem için 0,015 µg/mL MİK değerine sahip kökenlerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde bile neredeyse yarıya yakın oranda mutant seçiminin gerçekleşeceği gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA

Mutant engelleme konsantrasyonu, özellikle antibiyotik kullanımı sırasında spontan mutasyonlarla gelişen mutant bakterilerin üremesini önleyecek konsantrasyonların belirlenmesi umuduyula geliştirilmiş bir kavramdır. Dolayısıyla klinikte ve *in vitro* ortamda gözlemlenen primer direnç mekanizmasının mutasyon kaynaklı olması durumunda MEK'in etkin bir parametre olacağından bahsedilmektedir. Bir antibiyotikğin tedavi başarısı, ilacın hedef dokuda ulaştığı konsantrasyonun ne kadar süre ile MEK'in üstünde olduğu ile orantılı olup seleksiyonun en sık gözlemlendiği mutant seleksiyon penceresi (MSP) aralığında bu mikroorganizmanın ne kadar az süreyle kaldığı ile

de ilişkilidir (6). Geleneksel tedavi doz ayarlamaları MİK değeri göz önünde bulundurularak yapılmakta ve antibiyotik konsantrasyonunun bu değerin üzerine çıkması sağlanmaktadır. MİK saptanması dünya çapında kabul görmüş bir testtir ancak mutant altpopülasyon hakkında bilgi vermemektedir. Dolayısıyla birçok antibiyotik için uygulanan ilaç konsantrasyonu mutant seleksiyon penceresi içinde kalmaktadır ve dirençli altpopülasyonun üremesine izin vermektedir. Günümüzde direnç probleminin engellenebilmesi için tedavide seleksiyon indeksi düşük olan antibiyotiklerin ve MEK üzerindeki serum/doku konsantrasyonlarına ulaşılacak antibiyotik dozlarının kullanılması gerekmektedir. Eğer antibiyotik konsantrasyonları bu pencerenin üzerinde tutulmıyorsa mutant bakterilerin seleksiyonunu engellemek için kombine tedavi tercih edilmelidir. Mutant seleksiyon profillerinin araştırıldığı farklı antibiyotikler için kısıtlı sayıda çalışmalar mevcut olmakla birlikte bugüne kadar en çok çalışılan antibiyotik grubu florokinolonlar olmuştur. Karbapenemlere ilişkin çalışma ise yok denecek kadar azdır. Ancak literatürdeki karbapenem kullanımı sırasında OMP'lerde meydana gelen mutasyonlar sonucu gelişen karbapenem direnci ile ilişkili saptamalar, karbapenemlerin mutant seleksiyonuna katkılarının araştırılmasını önemli hale getirmiştir (1, 8, 13, 14).

Karbapenem direncinden her ne kadar çoğunlukla bir karbapenemaz üretimi sorumlu olsa da son yıllarda porin kaybı ile ilişkili karbapenem direnci birçok ülkede önemli hale gelmiştir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki karbapenem tedavisi sırasında gelişen porin mutasyonları sonucu karbapenem dirençli olgular giderek artmaktadır (15-18).

GSBL negatif kökenlerde MEK₉₀ değerleri irdelendiğinde, meropenem, ertapenem ve doripenemin duyarlılık sınırlarında kalarak mutant geliştirmedeği gözlemlenmiştir. Ancak bu kökenlerde imipenem için saptanan MEK₉₀ değerinin 1 µg/mL olması karbapenem grubu bir antibiyotik için yüksek bir konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuç imipenem tedavisi sırasında GSBL negatif kökenlerde dahi mutant geliştirme olasılığını akla getirmekle birlikte bu kökenlerin karbapenemlerle tedavilerinde herhangi bir sorun söz konusu değildir. Ancak, GSBL üreten kökenlerin MEK₉₀ değerleri (2-8 µg/mL) bu kökenlerle gelişen enfeksiyonların karbapenemlerle tedavisinde sorunla karşılaşılabileceğini düşündürmektedir. GSBL pozitif kökenlerde MEK değerleri GSBL negatif kökenlere kıyasla 2-9 kat daha yüksek saptanmıştır. Dolayısıyla, GSBL üretimi mutant seleksiyonuna daha fazla katkı sağlamaktadır.

Dirençli mutant seleksiyonu hakkında bilgi veren MEK'in saptanması mikrobiyoloji laboratuvarı için önemlidir. Ancak MEK'in saptanmasının oldukça zahmetli olması ve 96 saat gibi uzun zaman gerektirmesi mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak çalışılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar MİK'e göre MEK'in yorumlanabilirliğini özellikle de florokinolonlarda değerlendirmişler ancak konuyu tam açıklığa kavuşturamamışlardır (5, 19, 20). Çalışmamızda karbapenemlerin MİK ile MEK değerleri arasında tam bir korelasyon bulunmamasına rağmen MEK'in öngörülmesine yardımcı olacak önemli veriler elde edilmiştir. İmpenemin test edilen en düşük konsantrasyonlarda

bile %50 oranında mutant seçimine neden olması mutant seleksiyonunu minimuma indirebilmek için imipenemin mutlaka farklı ilaç grupları ile kombine kullanılması gerekliliğini vurgulamaktadır. Meropenem 0,008 µg/mL gibi düşük MİK değerlerinde güvenli bir şekilde kullanılabilirken, MİK değeri ≥0,03 µg/mL'de mutant seçimine büyük oranda katkı sağlamaktadır. Doripenem ve ertapenem için ise MİK değeri ≥0,125 µg/mL'nin üzerindeki konsantrasyonlarda büyük oranda mutant seçimi gerçekleşmektedir. Bu veriler, geleneksel karbapenem dozları ile duyarlı bakteri popülasyonunun yok edilebileceğini ancak özellikle imipenem ve meropenemin tedavide kullanımı sırasında mutant kökenlerin gelişebileceğini göstermektedir. Ayrıca, tedavi sırasında bu mutant kökenlerin seleksiyona uğraması klinik başarısızlığa ya da tedavinin sonlandırılmasından kısa bir süre sonra dirençli mutant alt kökenlerle relapslara neden olabileceğini akla getirmektedir ki bu da imipenem ve meropenemin mümkün olduğunca tek başlarına kullanılmaması gerektiğini bir kez daha vurgulamaktadır.

Tedavide mutant engelleme konsantrasyonları göz önünde bulundurularak yeni doz ayarlamaları yapılabilir. Yapılan çalışmalarda karbapenemlerin uzamış infüzyon sürelerinin mutant seleksiyonunun önlenmesinde önemli olduğunu da vurgulanmaktadır (21). Görünen o ki, antibiyotik tedavisi sırasında gelişebilecek direncin sınırlandırılmasında etkili olabilecek en önemli parametre MEK'tir. Yaptığımız çalışma ile karbapenemlerin MEK ve mutant seleksiyon sıklıkları hakkında önemli bilgiler edinilmiştir. Ancak karbapenemlerin MEK'leri konusunda yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı sayıda olup *in vitro* çalışmalardan ibarettir (22). Dolayısıyla MEK'in klinik önemini ortaya koyacak hayvan modelleri ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonu'ndan alınmıştır (30.11.2010-09).

Hasta Onamı: N/A.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - G.A.G., G.S.; Tasarım - G.A.G., G.S.; Denetleme - G.A.G., G.S.; Kaynaklar - G.A.G., G.S.; Gereçler - G.A.G., G.S.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - G.A.G., G.S.; Analiz ve/veya Yorum - G.A.G., G.S.; Literatür Taraması - G.A.G., G.S.; Yazıyı Yazan - G.A.G., G.S.; Eleştirel İnceleme - G.A.G., G.S.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu tarafından SAG-C-DRP-070211-0031 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of Marmara University Institute of Health Sciences Clinical Research Commission (30.11.2010-09).

Informed Consent: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - G.A.G., G.S.; Design - G.A.G., G.S.; Supervision - G.A.G., G.S.; Resource - G.A.G., G.S.; Materials - G.A.G., G.S.; Data Collection and/or Processing - G.A.G., G.S.; Analysis and/or Interpretation - G.A.G., G.S.; Literature Search - G.A.G., G.S.; Writing - G.A.G., G.S.; Critical Reviews - G.A.G., G.S.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was supported by Scientific Research Fund of Marmara University.

KAYNAKLAR

- Gür D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gültekin M, Oğulnç D, et al. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother* 2009; 21: 383-9. [\[CrossRef\]](#)
- Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Rodríguez MC, Velasco M, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 534-7. [\[CrossRef\]](#)
- Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 371-9. [\[CrossRef\]](#)
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm. *Trends Mol Med* 2012; 18: 263-72. [\[CrossRef\]](#)
- Song W, S.B, Choi JY, Jeong SH, Jeon EH, Lee YK, et al. In vivo selection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by OmpK36 loss during meropenem treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65: 447-9. [\[CrossRef\]](#)
- Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 11-7. [\[CrossRef\]](#)
- Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 681-8. [\[CrossRef\]](#)
- Sindelar G, Zhao X, Liew A, Dong Y, Lu T, Zhou J, et al. Mutant prevention concentration as a measure of fluoroquinolone potency against mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3337-43. [\[CrossRef\]](#)
- Zhao X, Drlica K. A unified anti-mutant dosing strategy. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 434-6. [\[CrossRef\]](#)
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance of standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-two Information Supplement M100-S22. 2012; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- Öksüz L, Gürler N. Typing of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. strains and analysis of plasmid profiles. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43: 183-94.
- Hansen G, Blondeau JM. Comparison of the minimum inhibitory, mutant prevention, and minimum bactericidal concentrations of ciprofloxacin, levofloxacin, and garenoxacin against enteric gram-negative urinary tract infection pathogens. *J Chemother* 2005; 17: 484-92. [\[CrossRef\]](#)
- Smith HJ, Nichol KA, Hoban DJ, Zhanel GG. Stretching the mutant prevention concentration (MPC) beyond its limits. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1323-5. [\[CrossRef\]](#)
- Zhao X, Drlica K. Restricting the Selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 2001; 33(Suppl 3): 147-56. [\[CrossRef\]](#)
- D'Andrea MM, Giani T, Arena F, Borgianni L, Gesu G, Li Bergoli M, Manso E, Mussap M, Sambri V, Sarti M, Luzzaro F, Rossolini GM. Multifocal emergence of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* clone with differential non-carbapenemase-mediated resistance to carbapenems in Italian hospitals. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16 - 19 May 2009, Helsinki, Finland, p.1700.
- Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla ACT-1 beta lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3396-406. [\[CrossRef\]](#)
- Lee K, Yong D, Choi YS, Yum JH, Kim JM, Woodford N, et al. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 beta-lactamases co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 201-6. [\[CrossRef\]](#)
- Poirel L, Heritier C, Spicq C, Nordmann P. In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3831-3. [\[CrossRef\]](#)
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009; 73: 345-54. [\[CrossRef\]](#)
- Drlica K, Zhao X, Blondeau JM, Hesje C. Low correlation between MIC and mutant prevention concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 403-4. [\[CrossRef\]](#)
- Roberts JA, Kruger P, Paterson DL, Lipman J. Antibiotic resistance: What's dosing got to do with it? *Crit Care Med* 2008; 36: 2433-40. [\[CrossRef\]](#)
- Credito K, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC. Mutant prevention concentrations of four carbapenems against gram-negative rods. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2692-5. [\[CrossRef\]](#)