



T.C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK
KOMBİNASYONLARININ İN VİTRO
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Büşra GÜNEYSU YARAR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Şubat 2024
İSTANBUL



T.C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK
KOMBİNASYONLARININ İN VİTRO
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Büşra GÜNEYSU YARAR

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Esra KOÇOĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Şubat 2024
İSTANBUL

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakóltesi'nde Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Yönetmeliğı hükümlerine göre uzmanlık eğitimi gören Dr. Büşra Güneysu Yazar'ın hazırladığı ve jüri önünde savunduğı “KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE* SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ İMZA

İMZA

Prof. Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Orhan BAYLAN
Hamidiye Tıp Fakóltesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Zafer HABİP
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

.....

Tez Savunma Tarihi: 06/02/2024

YAZAR BİLDİRİMİ

“KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” isimli uzmanlık tezinde Dr. Büşra GÜNEYSU YARAR

- Bu tezin kabulünden önce nerede ve ne kadarının yayınlandığını “Bilgilendirme” bölümünde belirtmiştir.
- Tezin hazırlanmasında katkısı olanları “Bilgilendirme” bölümünde eksiksiz olarak belirtmiştir.
- Bu tez ile ilgili çıkar çatışması olup olmadığını “Bilgilendirme” bölümünde belirtmiştir.
- Tez içerisinde başkalarının yayınlanmış veya yayınlanmamış çalışmalarından yapılan alıntılar için gerekli kaynakları açıkça belirtmiştir.
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tırnak içerisinde alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır.

Dr. Büşra GÜNEYSU YARAR

İmza:

BİLGİLENDİRME

“KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE* SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopyalanmadığını, bu tezin hazırlanmasında tez danışmanım Profesör Doktor Mücahide Esra KOÇOĞLU’nun katkıda bulunduğunu, bu çalışmanın daha önce herhangi bir yerde yayınlanmadığını, bu tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar dahilinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgilere ve çıkarımlara kaynak gösterdiğimi, bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, bu çalışmada adı geçen ilaç, tıbbi cihaz ve laboratuvar malzemelerinin üreticileri ile herhangi bir çıkar ilişkimin olmadığını, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu çalışmaya ait herhangi bir çıkar çatışmamın olmadığını beyan ederim.

Dr. Büşra GÜNEYSU YARAR

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim süresince değerli bilgi ve deneyimlerini paylaşan, bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen başta çok kıymetli tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Mücahide Esra Koçoğlu'na,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bizlere yol gösteren Prof. Dr. Tuncer Özekinci'ye,

Asistanlık eğitimim boyunca bilgilerini her zaman bizlerle paylaşmaya hazır olan Dr. Öğr. Üyesi Zafer Habip'e

Klinik Mikrobiyoloji alanındaki birikimi ve tecrübelerinden faydalandığım Uzm. Dr. Neslihan Önder ve Uzm. Dr. Abdurrahman Sarmış'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çok sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Merve Özmen, Dr. Şule Çetin, Dr. Nesibe Sağlam, Dr. R. Tuba Biçer, Dr. Betül Naz Kalyoncu, Dr. Zeynep Cihan, Dr. Tansu Nergis, Dr. İdil Bilge ve Dr. Mustafa Hatipoğlu'na

Tezimin moleküler testleri çalışma aşamamda destek veren Bioeksen Ar Ge teknolojileri Ltd. Şti'ne

Laboratuvarımızda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum başta Mustafa Tosun ve Rifayi Nezim olmak üzere tüm biyolog, teknisyen ve sekreter arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni destekleyen ve bu günlere gelmemde çok büyük emekleri olan kıymetli anneme, babama ve kardeşime,

Bu süreçte ve her daim desteğini hissettiğim kıymetli eşim Murat Hakkı Yazar'a, hayatıma anlam katan canım oğlum Ahmet Alper'e

İçtenlikle teşekkür ederim.

Dr. Büşra Güneysu Yazar

İstanbul-2024

İÇİNDEKİLER

YAZAR BİLGİLENDİRİMİ	iii
BİLGİLENDİRME	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
TABLOLAR	xi
ŞEKİLLER	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>KLEBSİELLA PNEUMONİAE</i>	3
2.1.1. Taksonomi ve Tarihçe	3
2.1.2. Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	3
2.1.3. Virülans Faktörleri	4
2.1.3.1. Kapsül	4
2.1.3.2. Lipopolisakkarit (LPS)	4
2.1.3.3. Sideroforlar	4
2.1.3.4. Fimbriyumlar	4
2.1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nın Sebep Olduğu Enfeksiyonlar	5
2.1.4.1. Pnömoni	5
2.1.4.2. Üriner sistem enfeksiyonları	5
2.1.4.3. Bakteriyemi ve Sepsis	5
2.1.4.4. Menenjit	5
2.1.4.5. Endojen Endoftalmit	5
2.1.4.6. İntraabdominal Enfeksiyonlar	6
2.1.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'da Antimikrobiyal Direnç	6

2.1.5.1. Antibiyotiklerin Enzimatik Olarak İnaktivasyonu ve Modifikasyonu	6
2.1.5.2. Antibiyotiklerin Hedef Bölgelerinin Değiştirilmesi	6
2.1.5.3. Porin Kaybı ve Mutasyonu	7
2.1.5.4. Eflüks Pompası Ekspresyonunun Artması	7
2.1.5.5. Biyofilm Oluşumu	7
2.2. KARBAPENEMAZLAR	7
2.2.1. Karbapenemaz Tiplerinin Dağılımı	8
2.2.2. Karbapenemazların Tespiti için Yapılan Tarama Testleri	9
2.2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi ve Gradient Testi	9
2.2.2.2. Otomatize Sistemler	10
2.2.3. Karbapenemazların Tespiti için Doğrulama Yöntemleri.....	10
2.2.3.1. Fenotipik testler	10
2.2.3.2. Genotipik Testler.....	11
2.3. KARBAPENEMAZ ÜRETEK <i>KLEBSİELLA PNEUMONİAE</i> 'DA TEDAVİ SEÇENEKLERİ	11
2.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ	14
2.4.1. Disk Difüzyon (Kirby-Bauer) Testi	14
2.4.2. Gradyent Test	15
2.4.3. Agar Dilüsyon Testi	15
2.4.4. Sıvı (Broth) Dilüsyon Testleri	15
2.4.5. Otomatize Sistemler	16
2.5. ANTİBİYOTİK KOMBİNASYON TESTLERİ	16
2.5.1. Checkerboard (Dama Tahtası) yöntemi	17
2.5.2. Disk Difüzyon Yöntemi	18
2.5.3. Gradient Test Yöntemi	18
2.5.4. Zamana Bağlı Öldürme (Time Kill) Yöntemi	18
3. MATERYAL ve METOT	19
3.1. KLİNİK ÖRNEKLERİN SEÇİMİ	19
3.2. BAKTERİLERİN TANIMLANMASI	19
3.3. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ	19
3.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi	20

3.3.2. Gradient Test Yöntemi	20
3.4. ANTİBİYOTİK STOK VE ÇALIŞMA SOLÜSYONLAR	21
3.5. KATYON AYARLI MUELLER HİNTON BROTH	22
3.6. AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ	22
3.7. SIVI MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ	23
3.8. DAMA TAHTASI (CHECKER BOARD) SİNERJİ TESTİ	26
3.9. MOLEKÜLER TESTLER	28
3.9.1. Bakteri DNA'sının İzolasyonu	28
3.9.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu	30
3.9.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	31
4. BULGULAR	32
4.1. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI VE DİRENÇ PATERNLERİ..	33
4.2. KOMBİNASYONDAKİ ANTİBİYOTİKLERİN MİK DEĞERLERİ	36
4.3. SEFTAZİDİM-AVİBAKTAM İLE FOSFOMİSİN DAMA TAHTASI TESTİ SONUÇLARI	37
4.4. SEFTAZİDİM-AVİBAKTAM İLE MEROPENEM DAMA TAHTASI TESTİ SONUÇLARI	40
5. TARTIŞMA	43
5.1. Tezin Kısıtlılıkları	49
6. SONUÇLAR	51
KAYNAKLAR	53
EKLER	58
EK-1: BENZERLİK RAPORU	58
EK-2 : ETİK KURUL ONAYI	59

KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection
BK	Besiyeri kontrolü
CFU.....	Colony forming unit (Koloni oluşturan birim)
CLSI.....	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CRE.....	Karbapenem dirençli <i>Enterobacterales</i>
ÇİD.....	Çok ilaca dirençli
CZA.....	Seftazidim-avibaktam
GES.....	Guiana genişletilmiş spektrum
GSBL	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
EUCAST.....	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA.....	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FİK.....	Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon
FOS	Fosfomisin
G-6-P.....	Glukoz-6-fosfat
IMP.....	İmipenemaz
KAMHB.....	Kasyon Ayarlı Mueller Hinton Broth
KDKp.....	Karbapenem dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KKA	%5 Koyun kanlı agar
KPC.....	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemaz
MALDI-TOF MS	Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi
MEM.....	Meropenem
MHA	Mueller Hinton agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MİK.....	Minimum inhibitör konsantrasyon
NDM.....	New Delhi metallo-beta-laktamaz
NMC-A.....	Non-metallokarbapenemaz A
OXA-48.....	Oksasilinaz -48

PBP.....	Penisilin bağlayan protein
PHE.....	İngiltere Halk Sağlığı Kurumu
PCR.....	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
SHV-38.....	Sülfidril reagent variabl-38
SFC-1.....	<i>Serratia fonticola</i> karbapenemaz
ÜK	Üreme kontrolü
VIM.....	Verona integron kodlu metallo-beta-laktamaz
ΣFİK.....	Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi toplamı
XDR.....	Yaygın ilaca dirençli



TABLÖLAR

Tablo 3.1. EUCAST'ın <i>Enterobacterales</i> için önerdiği inhibisyon zon çapları.....	20
Tablo 3.2. EUCAST'ın <i>Enterobacterales</i> için önerdiği MİK sınır değerleri.....	21
Tablo 3.3. Antimikrobiyal ilaç solüsyonları hazırlarken kullanılan çözücü ve sulandırıcılar.....	21
Tablo 3.4. EUCAST V.13.0 a göre <i>Enterobacterales</i> için MİK değerleri.....	25
Tablo 3.5. Seftazidim-avibaktam ve meropenem kombinasyonu mikropak düzeni.....	26
Tablo 3.6. Seftazidim-avibaktam ve fosfomisin kombinasyonu mikropate düzeni.....	27
Tablo 3.7. Reaktiflerin mikropak kuyucuklarına dağıtımı.....	30
Tablo 3.8. PCR Döngü Protokolü.....	30
Tablo 4.1. KDKp izolatlarının otomatize sistemden elde edilen antibiyotik direnç oranları.....	33
Tablo 4.2. KDKp suşlarının seftazidim-avibaktam (CZA) ve fosfomisin (FOS) duyarlılık ve direnç paterni sonuçları.....	34
Tablo 4.3. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının karbapenem direnç genlerinin dağılımı.....	36
Tablo 4.4. İzolatların sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri.....	37
Tablo 4.5. KDKp 71 nolu izolata ait dama tahtası testinin değerlendirilmesi.....	38
Tablo 4.6. KDKp 71 nolu izolatın seftazidim-avibaktam (CZA) ve fosfomisin (FOS) MİK (µg/ml), FİK, kombinasyonun ΣFİK sonuçları ve yorumu.....	39
Tablo 4.7. Seftazidim avibaktam ve fosfomisin için MİK,FİK, ΣFİK sonuçları ve kombinasyonun yorumu.....	39
Tablo 4.8. KDKp 33 izolatına ait mikropak üreme durumunun değerlendirilmesi.....	41
Tablo 4.9. KDKp 33 nolu izolatın seftazidim-avibaktam (CZA) ve meropenem (MEM) MİK(µg/ml), FİK, kombinasyonun ΣFİK sonuçları ve yorumu.....	41
Tablo 4.10. Seftazidim avibaktam ve fosfomisin için MİK, FİK, ΣFİK sonuçları ve kombinasyonun yorumu.....	42

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Üreme kontrol ekimi yapılan besiyeri.....	23
Şekil 3.2. Seftazidim-avibaktam sıvı mikrodilüsyon testi (örnek mikroplak).....	25
Şekil 3.3. Bakteri DNA'sı elde etme aşamaları.....	29
Şekil 3.4. PCR ile pozitif olarak değerlendirilen sigmoidal eğriler (A) HEX kanalıyla saptanan pozitif NDM eğrisi (B) Cy5 kanalıyla saptanan pozitif OXA-48 eğrisi.....	31
Şekil 4.1. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının gönderildiği kliniklere göre dağılımı.....	32
Şekil 4.2. <i>K. pneumoniae</i> izolatların örnek türlerine göre dağılım yüzdeleri.....	32
Şekil 4.3. KDKp 71 nolu izolatın seftazidim-avibaktam-fosfomisin dama tahtası testinin mikroplak görünümü.....	38
Şekil 4.4. KDKp 33 izolatının seftazidim-avibaktam ile meropenem dama tahtası testinin mikroplak görünümü.....	40

ÖZET

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE* SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hastanemizden izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında seftazidim-avibaktam ve fosfomisine direnç oranlarının belirlenmesi, karbapenem direnç genlerinin varlığının incelenmesi ve seftazidim-avibaktama dirençli izolatlarda seftazidim-avibaktamın fosfomisin ve meropenem ile kombinasyonlarının sinerjik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen 01.10.2019-31.07.2023 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve VITEK 2 otomatize sistemi ile karbapeneme dirençli bulunan 100 *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edildi. İzolatların karbapenem direnç genleri (*blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaOXA-51*, *blaOXA-23/OXA-58*) multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırıldı. Fosfomisin duyarlılığının belirlenmesi için agar dilüsyon yöntemi, meropenem ve seftazidim-avibaktam duyarlılığının belirlenmesi için ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Seftazidim-avibaktam dirençli 15 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunda seftazidim-avibaktam ile meropenem ve seftazidim-avibaktam ile fosfomisin kombinasyonları dama tahtası yöntemi ile çalışıldı. Hesaplanan fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (ΣFİK) sonucuna göre kombinasyonların in vitro sinerjik etkisi analiz edildi.

Karbapenem dirençli 100 *K. pneumoniae* izolatının %15'i seftazidim-avibaktama dirençli, %38'i fosfomisine dirençli bulunmuştur. Çalışmamıza dahil edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatların 85'inde karbapenem direnç genlerinden en az biri saptanmıştır. Çalışılan izolatların %39'unun OXA-48, %10'unun KPC, %2'sinin NDM ve %1'inin OXA-51 olmak üzere 52 izolatın direnç genlerinden sadece birini taşıdıkları, %17'sinin OXA-48+KPC, %9'unun OXA-48+NDM, %3'ünün OXA-48+NDM+KPC, %2'sinin OXA-48+OXA-51, %1'inin OXA-48+OXA-23/58, %1'inin OXA-48+OXA-

51+KPC taşıdığı tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinde IMP ve VIM enzimi saptanmamıştır. Onbeş seftazidim-avibaktam dirençli izolatın dama tahtası yöntemiyle yapılan seftazidim-avibaktam ile meropenem kombinasyonunda %100 kısmi sinerjistik etki bulunurken, seftazidim-avibaktam ile fosfomisin kombinasyonunda %33 kısmi sinerjistik etki bulunmuştur.

Hastanemizde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48 geni yaygın olup, %33 oranında birden fazla direnç genine sahip izolat saptandı. Seftazidim-avibaktam dirençli olan ve kombinasyon testine tabi tutulan suşların 14'ü NDM geni taşımaktaydı. Sadece bir tane dirençli suşun direnç paterni tespit edilemedi. Seftazidim-avibaktam dirençli suşların tamamında meropenemli kombinasyonda kısmi sinerjik etki saptanırken fosfomisinli kombinasyonda suşların beşinde (%33) kısmi sinerjik etki saptandı. Seftazidim-avibaktamın fosfomisin ile kombinasyonundan ziyade meropenem ile kombinasyonu ciddi karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında bir tedavi seçeneği olarak önerilebilir. İn vitro çalışmayla elde ettiğimiz sonuçlarımız, in vivo ve klinik çalışmalar ile de desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: *K. pneumoniae*, karbapenem direnci, seftazidim-avibaktam, meropenem, fosfomisin, dama tahtası yöntemi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE IN VITRO EFFECTIVENESS OF ANTIBIOTIC COMBINATIONS ON CARBAPENEM-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

It was aimed to determine the resistance rates to ceftazidime-avibactam and fosfomycin in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates isolated from our hospital, to examine the presence of carbapenem resistance genes, and to investigate the synergistic effect of combinations of ceftazidime-avibactam with fosfomycin and meropenem in ceftazidime-avibactam -resistant isolates.

Between 01.10.2019 and 31.07.2023, 100 *K. pneumoniae* isolates isolated from various clinical specimens at Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın City Hospital Medical Microbiology Laboratory and found carbapenem-resistant by VITEK 2 automated system were included in the study. Carbapenem resistance genes of the isolates (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23/58}) were investigated by multiplex polymerase chain reaction. The agar dilution method was used to determine fosfomycin sensitivity, and the broth microdilution method was used to determine meropenem and ceftazidime avibactam sensitivity. Combinations of ceftazidime-avibactam with meropenem and ceftazidime-avibactam with fosfomycin were studied using the checkerboard method in 15 ceftazidime-avibactam-resistant carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains. The in vitro synergistic effect of the combinations was analysed according to the calculated fractional inhibitory concentration index (Σ FIC).

Of 100 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates, 15% were resistant to ceftazidime-avibactam and 38% were resistant to fosfomycin. At least one of the carbapenem resistance genes was detected in 85 of the carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates included in our study. Of the 52 isolates, 39% carried OXA-48, 10% carried KPC, 2% carried NDM and 1% carried OXA-51. It was determined that 17% carried OXA-48+KPC, 9% carried OXA-48+NDM, 3% carried OXA-48+NDM+KPC, 2% carried OXA-48+OXA-51, 1% carried OXA-48+OXA-23/58, 1% carried OXA-48+OXA-51+KPC. IMP and VIM enzymes were

not detected in any of the isolates. While a 100% partial synergistic effect was found in the combination of ceftazidime-avibactam and meropenem made by the checkerboard method on fifteen ceftazidime-avibactam resistant isolates, a 33% partial synergistic effect was found in the combination of ceftazidime-avibactam and fosfomycin.

The OXA-48 gene is common in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates in our hospital, and 33% of isolates with more than one resistance gene were detected. 14 of the isolates resistant to ceftazidime-avibactam and subjected to combination testing carried the NDM gene. The resistance pattern of only one resistant strain could not be detected. While a partial synergistic effect was detected in the combination with meropenem in all ceftazidime-avibactam-resistant strains, a partial synergistic effect was detected in five (33%) of the strains in the combination with fosfomycin. The combination of ceftazidime-avibactam with meropenem rather than with fosfomycin may be recommended as a treatment option for severe carbapenem-resistant *K. pneumoniae* infections. Our results obtained by in vitro study should be supported by in vivo and clinical studies.

Keywords: *K. pneumoniae*, carbapenem resistance, ceftazidime avibactam, meropenem, fosfomycin, checkerboard method

1. GİRİŞ ve AMAÇ

K. pneumoniae, *Enterobacteriaceae* ailesine ait Gram negatif bir bakteridir. Bu mikroorganizma, sağlıklı mikrobiyatanın bir parçasıdır ve vücudun birçok yerinde kolonize olur. Ancak kritik hastalarda, yenidoğanlarda, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Karbapenemler, özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreticisi *Enterobacterales* 'nin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak karbapenemlerin yaygın ve yanlış kullanımı karbapenemlere dirençli izolatların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKp) suşları, hastane ortamlarında artan prevalansları ve antibiyotik direnci nedeniyle ciddi tehdit oluşturmaktadır. Küresel olarak artan KDKp enfeksiyonları, ölüm oranlarının artmasına ve sağlık sistemleri için önemli maliyetlerin oluşmasına neden olmuştur (1).

Karbapenem direnci, esasen Gram negatif patojenler arasında görülmektedir. Aktarılabılır karbapenemaz kodlayan genlerin aracılık ettiği durumlarda hızla yayılmakta, ciddi salgınlara yol açmakta ve tedavi seçeneklerini önemli ölçüde sınırlamaktadır. Karbapenemlere karşı enzim aracılı direnç, karbapenemleri diğer beta-laktam antibiyotiklerle birlikte inaktive edebilen ve bu nedenle karbapenemaz olarak adlandırılan beta-laktamazların üretiminden kaynaklanmaktadır. Karbapenem direnci, beta-laktamların neredeyse tamamını hidrolize eder. Yüksek seviyelerde karbapenem minimum inhibitör konsantrasyonuna (MİK) yol açan bu enzimler, plazmidler veya transpozonlar tarafından yatay olarak aktarılabilen genler tarafından kodlanır ve genellikle diğer direnç belirleyicilerini kodlayan genlerle ilişkilidir. Karbapenem hidrolizi ve coğrafi yayılım açısından başlıca karbapenemazlar; KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz), VIM (Verona integron kodlu metallo-beta-laktamaz), IMP (imipenemaz), NDM (New Delhi metallo-beta-laktamaz) ve OXA-48(okzasilinaz) tipleridir. Karbapenem direnci tespit edildiğinde sıkı enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması ve karbapenemaz kodlayan genlerin varlığının taranması büyük önem taşımaktadır (2).

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde seftazidim-avibaktam, polimiksin, tigesiklin ve fosfomisin gibi ajanlar kullanılmaktadır. Ancak karbapenemaz üreticileri arasında bu ajanların zorunlu olarak kullanılmasından dolayı, bu ilaçlara da direnç gelişebilmektedir. KDKp'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisindeki zorluklardan dolayı antibiyotikler, kombinasyon halinde eş zamanlı tedavide kullanılmaktadır.

Çalışmamızda Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında 01.10.2019-31.07.2023 tarihleri arasında çeşitli klinik numunelerden izole edilen KDKp izolatlarında referans yöntemler ile seftazidim-avibaktam ve fosfomisine direnç oranlarını belirlemeyi, karbapenem direncinin moleküler paternini, seftazidim-avibaktam dirençli izolatlarda seftazidim-avibaktamın fosfomisin ve meropenem ile kombinasyonlarının sinerjistik etkisinin dama tahtası yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

2.1.1. Taksonomi ve Tarihçe

K. pneumoniae türü, taksonomik sınıflandırmada prokaryot canlılar içerisinde, bakteriler aleminde, Proteobacteria şubesinde, Gammaproteobacteria sınıfında, Enterobacterales takımında, Enterobacteriaceae ailesinde, Klebsiella cinsinde bulunur. Enterobacterales takımı filogenomik analizlerle yedi aileye (Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Hafniaceae, Morganellaceae ve Budviciaceae) ayrılmıştır (3).

Klebsiella cinsi, başlangıçta tıbbi önemi olan ve sebep olduğu hastalıklara karşılık gelen *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis* olmak üzere üç türe bölünmüştür (4). 1882 yılında Carl Friedlander, *K. pneumoniae* bakterisini pnömoniden ölenlerin akciğerlerinden izole etmiş ve kapsüllenmiş bir basil olarak tanımlamıştır. Başlangıçta Friedlander basili olarak adlandırılmıştır (5). *Klebsiella* cinsi, Enterobacteriaceae ailesinde yer alıp 1885 yılında Trevisan tarafından bakteriyi ilk izole eden kişi olan Alman mikrobiyolog Edwin Klebs (1834-1913) onuruna isimlendirilmiştir. Trevisan tarafından tanımlanan ilk *Klebsiella* türü rinokleromlu hastalardan elde edilen kapsüllü bir basil olan *Klebsiella rhinoscleromatis*'tir (6).

K. pneumoniae, Gram negatif, kapsüllü, hareketsiz bir bakteridir. Bu bakteri, insanda orofarenks ve gastrointestinal kanalın mukozal yüzeylerini kolonize eder. Diabetes mellitus ve alkol kullanım bozukluğu olan kişilerde pnömoni ile ilişkilidir (6).

K. pneumoniae, oldukça virülen ve antibiyotiklere dirençli klinik patojenler olarak bilinen ESKAPE mikroorganizmalarından (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) biridir (7).

2.1.2. Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

K. pneumoniae, boyutları yaklaşık genişliği 0,3-1,0 µm, uzunluğu 0,6-6,0 µm olan basillerdir. Mikroskopta kısa, dolgun basiller şeklinde görünür. Mikroskopta tek başına, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde ve bazen de kümeler halinde görülebilir. Oksidaz negatif, sporsuz, hareketsiz, kapsüllü, Gram negatif boyanan bir bakteridir. Laboratuvarlarda birçok

sıradan besiyerinde 12°C ile 43°C arasındaki sıcaklıklarda (optimum 37°C), pH 7 olan ortamlarda, aerobik veya fakültatif anaerobik şartlarda elverişli ürerler. *K. pneumoniae* kanlı agarda mukoid, hemolitik olmayan koloniler oluştururken, MacConkey agarda mukoid, pembe renkli koloniler oluştururlar (8).

K. pneumoniae, katalaz testi pozitif, oksidaz testi negatiftir. Nitratı nitrite indirgerler. Hidrojen sülfür (H₂S) üretimi yoktur. Üçlü Şeker Demir (TSI) agarda asit/asit reaksiyon gösterirler. İndol testi negatif, metil kırmızısı testi negatif, Voges-Proskauer testi pozitif, sitrat testi pozitifdir. Üreyi hidrolize ederler. Karbonhidratları (glikoz, laktoz, sükroz, mannitol) fermantasyon yoluyla metabolize ederek asit ve gaz üretirler.

2.1.3. Virülans Faktörleri

K. pneumoniae'nin başlıca virülans faktörleri, polisakkarit kapsül, lipopolisakkarit (LPS), fimbriyumlar ve sideroforlardır.

2.1.3.1. Kapsül: Polisakkarit kapsül, *K. pneumoniae*'nin ana virülans faktörüdür. *K. pneumoniae*'de K antijenine göre 80'den fazla kapsüller serotip tanımlanmıştır (9). İn vitro çalışmalar, kapsülün fagositoza ve opsonizasyona karşı korumaya aracılık ettiğini göstermiştir (10). Son yıllarda K1 ve K2 kapsüller serotipleri, Asya ülkelerinde karaciğer apseleriyle ilişkilendirilmektedir (11).

2.1.3.2. Lipopolisakkarit: LPS'ler, O-antijen, çekirdek oligosakkarit ve lipit A'dan oluşan bakteriyel dış membranın bileşenleridir. *K. pneumoniae* enfeksiyonları sırasında, LPS O-antijenleri, kompleman bileşeni C3b'yi bağlayabilir ve kompleman aracılı öldürmeyi bozar ve bakterinin hayatta kalmasını sağlar. Farklı serotipler, O-antijen moleküler yapılarına göre tanımlanır ve şu anda 10 serotip vardır. O1-antijeni, *K. pneumoniae* klinik izolatlarında daha baskın olmasına rağmen O2-antijeninin çok ilaca dirençli (ÇİD) suşlarda, özellikle de insan serumunda daha iyi sağkalım sağlayan O2afg alt tipinde yaygın olduğu gözlemlenmiştir (12).

2.1.3.3. Sideroforlar: Sideroforlar, pekçok mikroorganizma tarafından salgılanan ve birçok Gram negatif bakteride virülans için kritik olan küçük, yüksek afiniteli demir şelatlayıcı moleküllerdir (13). Hipervirülan *K. pneumoniae*'nin, klasik *K. pneumoniae*'dan daha fazla miktarda siderofor salgıladığı gösterilmiştir. Yüksek siderofor üretim seviyelerinin fare sepsis modelli deneylerde ağır hastalık veya ölümle ilişkili olduğu bildirilmiştir (14).

2.1.3.4. Fimbriyumlar: Bakterilerin konak mukozal yüzeylerine yapışması, genellikle enfeksiyon gelişiminde önemli bir adımdır. Gram negatif bakterilerde yapışma, genellikle bakteri hücresinin yüzeyinde eksprese edilen filamentöz yapılar olan fimbriyumlar aracılığıyla gerçekleşir. Çoğu klinik *K. pneumoniae* izolatı, iki fimbrial adezin olan tip 1 fimbrium ve tip 3

fimbrium üretebilmektedir. Tip 1 fimbriumlar, konak hücreler ve hücre dışı matriks üzerindeki mannoz içeren yapılara yapışmaya aracılık eder. Tip 3 fimbriumun, in vitro biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (15).

2.1.4. *Klebsiella pneumoniae*'nın Sebep Olduğu Enfeksiyonlar

K. pneumoniae, pnömoni, bakteriyemi, sepsis, idrar yolu enfeksiyonu, yara enfeksiyonları, menenjit, piyojenik karaciğer apselerine yol açan fırsatçı bir patojendir.

2.1.4.1. Pnömoni: *K. pneumoniae*, hem toplum hem de hastane kaynaklı pnömonilere neden olan bir bakteridir. Bakteriyemik pnömoni olgularında yüksek mortaliteye yol açar. *K. pneumoniae*'nin hipervirülan suşları toplum kökenli pnömonilerde, KDKp suşları ise hastane kaynaklı pnömonilerde daha yaygın saptanmaktadır (16).

2.1.4.2. Üriner Sistem Enfeksiyonları: *K. pneumoniae*, üriner sistem enfeksiyonlarının yaygın nedenlerindendir. Son yıllarda antibiyotik dirençli *K. pneumoniae*'nin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonları, özellikle hastanede yatan hastalarda görülmekte olup toplumda da sıklığı artmıştır. Daha önce hastaneye yatış, antibiyotik kullanımı ve üriner katater kullanımı, bu durumun sebeplerindendir (17). KDKp izolatlarının sağlık hizmeti ortamlarından topluma yayılması, KDKp izolatlarının hastaların gastrointestinal sistemlerinde kolonize olmasına, personelin elleri yoluyla çevreye yayılmasına bağlanmaktadır (18).

2.1.4.3. Bakteriyemi ve Sepsis: *K. pneumoniae*'nin neden olduğu bakteriyemi ve sepsis, ciddi oranda morbidite ve mortaliteye yol açar. Bulaş, doğrudan kişiden kişiye temas ve kontamine tıbbi ekipman yoluyla meydana gelir (19). Çok ilaca dirençli *K. pneumoniae*'a bağlı kan dolaşımı enfeksiyonları, klinik açıdan ciddi risk oluşturmaktadır. Çünkü tedavi seçeneği olarak az sayıda antimikrobiyal mevcuttur. Karbapenemlere olan bağımlılığın artması, karbapenem direncinin artmasına yol açmıştır (20).

2.1.4.4. Menenjit: *K. pneumoniae* nadiren menenjite neden olur ve prognozu kötü seyirlidir. *K. pneumoniae* menenjitinin klinik spektrumu, üç farklı şekilde kategorize edilebilir: birincisi, özellikle uzak karaciğer apselerinden kaynaklanan metastatik menenjit, ikincisi, beyin lezyonları veya kafa travması için nöroşirürji prosedürlerini takiben kraniyotomi sonrası gelişen menenjit ve üçüncüsü, genellikle yaşlı hastalar veya altta yatan bağışıklık sistemi baskılanmış koşulları olanlar arasında izlenen primer veya spontan menenjit (21).

2.1.4.5. Endojen Endoftalmit: Endojen endoftalmit, bir mikroorganizmanın enfektif bir odakta kan-oküler bariyer boyunca hematogen yolla yayılması sonucu ciddi göz içi enflamasyonu oluşturması sonucu gelişir. Etken mikroorganizmanın epidemiyolojisinde bölgesel farklılıklar mevcuttur. Kuzey Amerika ve Avrupa'da genellikle Gram pozitif bakteriler

ve mantarlar neden olmaktadır. Ancak Doğu Asya'da mikrobiyolojik spektruma Gram negatif bakteriler, özellikle de *K. pneumoniae* hakimdir (22). *K. pneumoniae* karaciğer apseleri, % 3 ila 11 oranında endojen endoftalmit insidansı ile ilişkilidir. Bu oküler tutulum oranı, diğer sistemik enfeksiyonların oküler tutulumundan çok daha yüksektir. Ayrıca, *Klebsiella* türlerinin neden olduğu endoftalmit, karaciğer apsesi olan hastalarda artmış mortalite ile ilişkilidir (23).

2.1.4.6. İntraabdominal Enfeksiyonlar: Sık görülen cerrahi durumlardan biridir ve yüksek oranda mortaliteye neden olurlar. İntraabdominal enfeksiyonlar, esas olarak Gram negatif bakterilerden özellikle de başta *E. coli* ve *K. pneumoniae*'dan kaynaklanır. Bu enfeksiyonlara yol açan KDKp suşları, her geçen gün artmaktadır. Bu suşlar, en yaygın olduğu yoğun bakım ünitelerinden diğer hastane bölümlerine yayılabilir. Bir hastanede yayıldıktan sonra, taburcu edilen hasta taşıyıcılar tarafından topluma bulaşabilir (24).

2.1.5. *Klebsiella pneumoniae*'da Antimikrobiyal Direnç

Fırsatçı bir bakteriyel patojen olan *K. pneumoniae*, antimikrobiyal direnç genlerinin yüksek sıklığı ve çeşitliliği ile bilinmektedir. Çok ilaca dirençli *K. pneumoniae* suşlarının dünya çapında artan prevalansı ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Çok ilaca dirençli ve virülen suşlar ciddi enfeksiyonlardan ve artan morbidite ve mortaliteden sorumludur. *K. pneumoniae*, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) ve İngiltere Halk Sağlığı Kurumu (PHE) tarafından insan sağlığı için acil bir tehdit olarak tanımlanan bu ÇİD organizmalardan biridir (25).

K. pneumoniae'nın antibiyotik direnci, başlıca şu beş yolla oluşur: (1) antibiyotiklerin enzimatik olarak inaktivasyonu ve modifikasyonu, (2) antibiyotiklerin hedef bölgelerinin değiştirilmesi, (3) porin kaybı ve mutasyonu, (4) efluks pompası ekspresyonunun artması ve (5) biyofilm oluşumu (26).

2.1.5.1. Antibiyotiklerin Enzimatik Olarak İnaktivasyonu ve Modifikasyonu: Beta-laktamaz üretimi beta-laktam halkasını hidrolize eden önemli bir direnç mekanizmasıdır. Beta-laktamazlar; genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL'ler), sefalosporinazlar (AmpC) ve karbapenemazlar olarak ayrılırlar. Bu enzimlerin *K. pneumoniae*'de ekspresyonu, onu penisilinlere, sefalosporinlere ve karbapenemlere dirençli hale getirir.

2.1.5.2. Antibiyotiklerin Hedef Bölgelerinin Değiştirilmesi: *K. pneumoniae*, hedef geni mutasyona uğratarak veya bazı bazları metilleyerek, antimikrobiyal ajanların hedef bölgeye bağlanamaması sebebiyle ilaç direncine neden olur. *K. pneumoniae*'de polimiksine karşı direnç mekanizması, genellikle lipid A'nın modifikasyonunu içerirken fosfomisine karşı direnç mekanizması, MurA'yı hedef alan modifikasyonu içerir.

2.1.5.3. Porin Kaybı ve Mutasyonu: *K. pneumoniae*, dış membran por proteinini azaltarak antimikrobiyal ajanların bakteri içine girişini zorlaştırmasıyla direnç geliştirir.

2.1.5.4. Eflüks Pompası Ekspresyonunun Artması: Eflüks pompaları, antimikrobiyal ajanları hücre dışına atarak hücre içi ilaç konsantrasyonlarını azaltan ve böylece çoklu antibiyotiklere karşı duyarlılığı azaltmada rol oynayan membran proteinleridir.

2.1.5.5. Biyofilm Oluşumu: Biyofilmler, ozmotik bariyer özelliğine sahiptir ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir. *K. pneumoniae*, biyofilm oluşturmaya eğilimlidir ve kapsül ve pilus gibi yapılar, biyofilm oluşumuna katkı sağlar (26).

2.2. KARBAPENEMAZLAR

Karbapenemazlar; penisilinleri, sefalosporinleri, monobaktamları ve karbapenemleri hidrolize etme yeteneğine sahip beta-laktamazlardır. Bu beta-laktamazları üreten bakteriler, karbapenemaz aktivitesinin birçok beta-laktam antibiyotiği etkisiz hale getirdiği için ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Beta-laktamazlar, fonksiyonel ve moleküler olmak üzere iki özelliğe göre sınıflandırılmıştır. Beta-laktamazlar; Ambler sınıflandırmasına göre aminoasit ve nükleotid sekans analizi temeline dayalı A, B, C ve D olmak üzere dört farklı sınıfa ayrılmıştır. Karbapenemazlar, moleküler sınıf A, B ve D beta-laktamazların üyeleridir. A, C ve D sınıfı beta-laktamazlar, beta-laktam ilacın inaktivasyonu için katalitik olarak aktif bir serin kalıntısı kullanırken, B sınıfı enzimler katalitik aktiviteleri için metal kofaktör olarak çinko gerektiren metalloenzimlerdir (27).

Sınıf A Karbapenemazlar: A sınıfı karbapenemazlar, filogenetik olarak altı farklı gruba ayrılabilir; bunlardan dört grubu GES (Guiana genişletilmiş spektrum), KPC, SME (*Serratia marcescens* enzimi), IMI/NMC-A (imipenemase / non-metallokarbapenemase-A) enzimlerinin üyeleri oluştururken SHV-38 (sülfidril reagent variabl) ve SFC -1 (*Serratia fonticola* karbapenemaz)'in her biri ayrı bir grup oluşturur (28). KPC tipi plazmidler, üzerindeki transpozonlar aracılığıyla aktarılır. KPC, *K. pneumoniae*'de yaygın olarak bildirilmiştir. Yirmiden fazla farklı KPC varyantı tanımlanmış olsa da, KPC-2 ve KPC-3, en yaygın tipler olmaya devam etmektedir (29). SME ve IMP/NMC-A, kromozomal olarak kodlanır (30).

Sınıf B Karbapenemazlar: Sınıf B karbapenemazlar, beta-laktamların etkin hidrolizi için çinkoya gereksinim duyarlar. Bu sayede iki değerli katyon şelatörü olan EDTA tarafından inhibe edilirler. Bu enzim grubu; penisilinleri, sefalosporinleri ve karbapenem grubu antibiyotikleri hidrolize ederken, aztreonam gibi monobaktamları hidrolize edemezler. Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam ve avibaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilemezler (27). Sınıf B karbapenemazlar da B1, B2, B3 olarak alt sınıflara

ayrılırlar. En sık tanımlanan metallo-beta-laktamazlar olan VIM, IMP ve NDM B1 alt sınıfına aittir (31).

Sınıf D Karbapenemazlar: Oksasilin ve kloksasilini klasik penisilinlerden, yani benzilpenisilinden çok daha hızlı hidrolize ederler. OXA tipi enzimler veya oksasilinazlar olarak da adlandırılırlar. D sınıfı beta-laktamazların OXA olarak adlandırılması, tercih ettikleri penisilin substratını ifade etmektedir (32). Klavulanik asit ve EDTA tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilirler. Gram negatif bakterilerde yaygın olarak bulunan 350'den fazla genetik çeşitliliğe sahip enzimlerdir (33).

2.2.1. Karbapenemaz Tiplerinin Dağılımı

Karbapenem dirençli bakteriler hızla yayılmakta ve her geçen gün sayıları artmaktadır. Hem klonal yayılım hem de plazmid aracılı bulaşma, bu bakterilerin görülme sıklığında devam eden artışa katkıda bulunmaktadır. Epidemiyolojik veriler, kontrol önlemlerinin planmasında önemlidir. KPC, NDM, IMP, VIM ve OXA ailesi sıklıkla rastlanan ve karbapenem direncinden başlıca sorumlu enzimlerdir. Bu enzimleri üreten bakteriler, normalde sadece karbapenemlere değil, çoğu zaman bu plazmidler üzerinde taşınan ek direnç genleri nedeniyle neredeyse tüm antibiyotiklere dirençlidirler (34). KPC, IMP, VIM, OXA-48 ve NDM karbapenemazların sırasıyla İsrail, Japonya, Yunanistan, Türkiye ve Hindistan'da endemik olduğu ve dünya geneline yayıldığı bilinmektedir (35).

İlk olarak KPC geni Kuzey Carolina'daki bir izolattan tanımlanmış ve KPC-1 olarak adlandırılmıştır (36). Avrupa'da ise KPC üreten *Enterobacterales* insidansı, en fazla Akdeniz ülkelerinde, özellikle İtalya ve Yunanistan'da bulunmaktadır. İtalya ve Yunanistan'da KPC, karbapenem direncinin en yaygın etiyolojisi olarak bulunmaya devam etmektedir (34). KPC-2, dünya çapında yaygın olarak görülmektedir ve Amerika Birleşik Devletleri'nde, Avrupa (özellikle Yunanistan) ve Çin'de salgınlara yol açmaktadır. KPC-3, çoğunlukla Amerika Birleşik Devletleri, Latin Amerika ve İsrail'de tespit edilmiştir (36). KPC'lerin hızla yayılmasına, plazmid kaynaklı genler ve yaygın uluslararası seyahatler katkıda bulunmaktadır (37).

Metallo-beta-laktamaz sınıfındaki karbapenemazlar, özellikle Asya'da görülmekte olup dünya çapında giderek yaygınlaşmaktadır. *bla_{NDM-1}*, ilk olarak 2007 yılında Hindistan'a seyahat eden ve *K. pneumoniae* kaynaklı idrar yolu enfeksiyonu geçiren İsveçli bir hastada tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar, NDM-1 aracılı karbapenem direncinin, Hindistan, Pakistan ve Bangladeş'te yaygın olduğunu göstermiştir. Avrupa'da NDM, Romanya, Polonya ve Danimarka'da yaygın olarak görülür. İspanya, İtalya ve Macaristan'da VIM, yaygın metallo-beta-laktamazdır. Sırbistan ve Karadağ'da ise NDM enzimleri daha yaygındır (38).

Rapor edilen ilk OXA-48 üreten *Enterobacterales*, 2001 yılında Türkiye'de izole edilen bir *K. pneumoniae* suşudur. OXA-48 benzeri üreten *K. pneumoniae* klonları, Türkiye'de hastane enfeksiyonlarının bir nedeni olarak varlığını sürdürmektedir. Türkiye, 2014-2015 yıllarında bu suşların en yüksek epidemiyolojik seviyesine (evre 5 "endemik durum") sahip ülke olarak rapor edilmiştir (34).

2.2.2. Karbapenemazların Tespiti için Yapılan Tarama Testleri

Karbapeneme dirençli *Enterobacterales* 'nin (CRE) neden olduğu enfeksiyonların sınırlı tedavi seçenekleri ve yüksek mortaliteye neden olmaları nedeniyle, karbapenem varlığını saptama ve bu enfeksiyonları önleme son derece önemlidir. Sürveyans çalışmaları, sadece salgınlar sırasında değil CRE için rutin bir önlem olarak enfeksiyon kontrol programlarında da yapılmalıdır. Asemptomatik kolonizasyonu belirlemek için hastaların taranması ve önleyici temas izolasyonu önlemlerinin alınması, hastadan hastaya bulaşları ve kolonizasyonu azaltmakta ve uygun antimikrobiyal tedavinin başlatılmasındaki gecikmeyi azaltarak hasta mortalitesini azaltmaktadır. İsrail'de, 2008 yılında tüm tesislerin bir CRE tarama politikası uygulamasını gerektiren ulusal kılavuzların dağıtılması, 2006 yılında başlayan ülke çapındaki salgının azaltılmasına yardımcı olmuştur (39). Karbapenemazların saptanması, epidemiyolojik sürveyans ve hasta yönetiminde en etkili antimikrobiyal seçimi için gereklidir.

2.2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi ve Gradient Testi: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'ne göre bir izolatin CRE olarak tanımlanabilmesi için disk difüzyon yöntemine göre veya Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) sınır değerlerinin belirlenmesi yoluyla karbapenemlerden (imipenem, meropenem, doripenem veya ertapenem) herhangi birine karşı direnç göstermesi veya fenotipik testlerle karbapenemaz enzimine sahip olduğunun kanıtlanması gerekmektedir (40). CRE'nin saptanması için tarama önerileri, CLSI ve EUCAST tarafından sağlanmaktadır. Ancak optimum tarama sınır değerleri tartışma konusudur ve yerel epidemiyolojiye bağlıdır (41).

Disk difüzyon testinde test edilecek 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu, agar plaklara inoküle edilir; agar yüzeyine karbapenem diskleri konulur ve inkübe edilir. İnkübasyon sonunda karbapenem disklerinin inhibisyon zon çapı ölçülerek zon çapı ≤ 22 mm olarak ölçülenler, karbapenem dirençli kabul edilir. Karbapenem direncinin tespiti için imipenem (10 mg), meropenem (10 mg) ve ertapenem (10 mg) ticari diskleri yaygın olarak kullanılır. Meropenem, karbapenemaz üretiminin saptanması amacıyla yapılan taramalarda duyarlılık ve özgüllük olarak en iyi ajandır. Ertapenem duyarlılığı, daha yüksek olmasına rağmen, özgüllüğü düşüktür.

Gradient test yönteminde ise test edilecek bakteri, 0.5 McFarland yoğunluğa getirilip Mueller Hinton agar yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Agar yüzeyine, karbapenem grubu antibiyotik içeren E-test şeritleri yerleştirilir. Plaklar 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübe edilip MİK değeri belirlenir. Şeritlerin etrafında eliptik inhibisyon bölgeleri belirir ve inhibisyon bölgesi ile şerit kenarı arasındaki kesişme noktası, MİK'i gösterir.

2.2.2.2. Otomatize Sistemler: Otomatize sistemler, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının bakterileri hızlı ve doğru bir şekilde tanımlamasını ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasını sağlar. Otomatik tanımlama sistemleri ideal olarak referans yöntemlere kıyasla en az %90'lık bir doğruluk oranına ulaşmalıdır (42).

2.2.3. Karbapenemazların Tespiti için Doğrulama Yöntemleri

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında karbapenemazların saptanması zorlu bir konudur. Antibiyotik testi sonuçlarının karbapenemlerin sınır değerleri ile karşılaştırılması, karbapenemaz tespitinin taranmasında ilk adımdır. Karbapenemazların tespiti için ülke politikasına, mali desteğe, laboratuvar ekipmanına, iş gücüne vb. bağlı olarak fenotipik ve genotipik analiz amacıyla farklı testler kullanılmaktadır.

2.2.3.1. Fenotipik Testler: Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından yaygın olarak kullanılan pek çok fenotipik test kullanılmaktadır.

Modifiye Hodge Testi (MHT), CIM (Karbapenem İnaktivasyon Metodu) bir karbapenem antibiyotiğinin varlığında organizmanın çoğalmasına dayalı olarak karbapenem direncini ölçen çoğalmaya dayalı testlerdir.

Carba NP testi ve MALDI-TOF MS (uçuş kütle spektrometresinin matris destekli lazer desorpsiyonu-iyonizasyon süresi), karbapenemaz enzimleri tarafından katalize edilen hidroliz ürününü tespit eden hidroliz yöntemleridir.

Lateral flow immünoassay testleri, spesifik antikorların kullanımı yoluyla karbapenemaz enzimlerini tespit eden testlerdir.

Bu testler karbapenemaz üretimini tanımlar, ancak geleneksel formlarında üretilen spesifik karbapenemaza ilişkin rehberlikten yoksundur (43).

2.2.3.2. Genotipik Testler: Karbapenemazların tespiti için kullanılan moleküler yöntemler, diğer tekniklerden daha güvenilir ve doğrudur. PCR tabanlı yöntemler, hibridizasyon tabanlı teknikler ve tüm genom dizilemesi (WGS), karbapenemazların tespiti için kullanılan genotipik testlerdir. Bu testler ile bakteri izolatlarından veya doğrudan hasta örneklerinden karbapenemaz genleri belirlenmektedir. Karbapenemaz tespiti için kullanılan ticari panel testleri ise en yaygın enzimleri bulmak için üretildiğinden tüm karbapenemazlar ve varyantları tespit edemeyebilir. Konvansiyonel PCR ve real time PCR, karbapenemazları tanımlamak için nükleik asit amplifikasyonunun kullanıldığı en yaygın yöntemlerdir ve klinik ortamlarda rutin kullanım için daha pratiktir.

Real time PCR, floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı amplifikasyon esnasında tüp içerisinde oluşan floresanı tespit eden bir yöntemdir. PCR işlemi, normalde üç döngüden oluşur. İlk aşama olan DNA zincirinin açılması (denatürasyon)'da kalıp DNA (template DNA) yaklaşık 95°C 1-2 dakika tutularak, çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. İkinci aşama olan primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması (bağlanma)'da reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C'ye düşürülerek primerlerin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Üçüncü aşama olan primer uzaması (primer ekstansiyon) 72°C'de DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polimeraz) aracılığıyla uzatılmasıdır.

Bakterilerin tüm genomunu analiz ederek karbapenemaz genlerini tanımlayabilen başka bir genotipik yöntem olan Tüm Genom Dizileme (WGS) yöntemi ile sürveyans ve salgın araştırmaları yapılmaktadır (44).

2.3. KARBAPENEMAZ ÜRETEK *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*'DA TEDAVİ SEÇENEKLERİ

Karbapenemazlar, karbapenem grubu antibiyotikleri hidrolize ederek direnç kazandıran enzimlerdir. KDKp nedeniyle meydana gelen enfeksiyonlarda kullanılacak antibiyotik seçenekleri sınırlıdır (45).

Aminoglikozidler: Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*'ya karşı en etkili aminoglikozid gentamisindir. Antibiyotik seçimi antibiyotik duyarlılık testleri sonucuna dayanarak önerilmektedir. Kolistin ve KDKp enfeksiyonlarında gentamisin ile yapılan kombinasyon tedavileri sağkalımı artırmıştır. Ancak yüksek renal toksisite riski nedeniyle kolistin ile kombinasyon tedavisinden kaçınılmalıdır (45).

Karbapenemler: Gram negatif, Gram pozitif ve anaerobik bakterilerile etkili beta-laktam antibiyotiklerdir. Gram negatif hücre membranını çok hızlı geçerek penisilin bağlayan proteinlere (PBP) yüksek afinite ile bağlanarak onları inaktif hale getirir ve hücre duvarının

sentezinini inhibe ederler. Çeşitli çalışmalar karbapenem içeren kombinasyon tedavilerinin KDKp enfeksiyonlarında etkili olduğunu göstermiştir. Örneğin 105 KPC enfeksiyonu vakasının incelendiği bir derlemede, karbapenem bazlı kombinasyon tedavisinde karbapenem monoterapisine göre tedavi başarısı daha yüksek bulunmuştur (%60'a karşı %26) (46). Ayrıca çeşitli hayvan enfeksiyon modeli çalışmalarına dayanarak, karbapenemlerin yüksek dozda, uzun süreli infüzyonunun, 8 mg/L'ye kadar MİK'lere sahip KPC üreten *K. pneumoniae* izolatları ile enfekte olmuş immün sistemi sağlam hayvanlarda bakterisidal etkiler sağlayabileceği öne sürülmüştür (47).

Kolistin: Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonlarını tedavi etmek için çok az tedavi seçeneği mevcuttur ve polimiksin grubu antibiyotik olan kolistin, genellikle son basamak tedavidir. Şiddetli KDKp enfeksiyonlarında kolistin genellikle tigesiklin, meropenem, gentamisin veya fosfomisin gibi diğer antibiyotiklerle birlikte kullanılır (48).

Fosfomisin: Fosfomisin, peptidoglikan sentezindeki ilk adımlardan birini inhibe ederek bakterisidal aktivite sergileyen bir fosfoenolpiruvat analogudur. Yapısal olarak diğer antibiyotiklerle etkileşime girmeyip çapraz direnç yol açmaz ve düşük moleküler ağırlığına sahiptir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, enterokoklar dahil Gram pozitifler ve CRE dahil birçok Gram negatif bakterilere etkili geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Fosfomisine karşı in vitro duyarlılığı belirlemek için agar dilüsyon, sıvı mikrodilüsyon, disk difüzyon ve gradient test gibi yöntemler bulunmaktadır. Hem CLSI hem EUCAST'a göre fosfomisin için referans yöntem olarak 25 mg/L glukoz-6-fosfat ilave edilmiş agar dilüsyonudur. Komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarında oral tedavide kullanılan eski bir antibiyotik olmasına rağmen hem Gram pozitif hem de Gram negatif patojenler arasında artan antibiyotik direnç oranları nedeniyle kullanımı yeniden değerlendirilmiştir. Çok ilaca dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında fosfomisin tek başına veya kombinasyon tedavilerinde kullanımı, klinisyenler tarafından gözden geçirilmektedir. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* 'ye karşı, direncin tam mekanizması belirtilmeden, karbapenemlerle (%70), kolistinle (%36), tigesiklinle (%30) ve netilmisin (%42) ile sinerji olduğu rapor edilmiştir (49).

Tigesiklin: Tigesiklin, KDKp'ye karşı in vitro ve in vivo etkinliğe sahiptir. Tigesiklinin serum konsantrasyonları düşüktür. Prospektif çalışmalardan elde edilen veriler, monoterapinin ciddi enfeksiyonları kontrol altına almak için yeterli olmayabileceğini ve muhtemelen yalnızca hafif komplike intraabdominal enfeksiyonları olan seçilmiş hastalarda ve diğer birkaç yeterli alternatif seçeneği olan komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermiştir (50).

Seftazidim-avibaktam: Üçüncü kuşak sefalosporin olan seftazidim ile beta-laktam olmayan beta-laktamaz inhibitörü avibaktamın intravenöz olarak uygulanan bir

kombinasyonudur. Seftazidim, diğer beta-laktam antibiyotikler gibi, PBP'lere bağlanır, böylece hücre duvarı sentezinde peptidoglikan çapraz bağlanmasını inhibe ederek bakteriyel hücre lizisine ve ölümüne yol açar ve antibakteriyel etki gösterir. Önemli antimikrobiyal aktivitesi olmayan avibaktam, seftazidimi çeşitli serin beta-laktamazlardan koruyarak seftazidim-avibaktamın'nın aktivitesine katkıda bulunur. Ambler sınıf A (GSBL'ler, KPC), sınıf C (AmpC) ve bazı sınıf D (OXA-48) enzimlerine karşı aktivitesi ile klasik beta-laktamaz inhibitörlerinden daha geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Sınıf B enzimlerine (metallo-beta-laktamazlar) karşı etkili değildir. Komplike intraabdominal enfeksiyonlarda, ventilatörle ilişkili pnömoniler dahil hastane kaynaklı pnömonilerde, yetişkinlerde akut piyelonefrit dahil komplike idrar yolu enfeksiyonlarında ve sınırlı tedavi seçenekleri mevcut hastalarda aerobik Gram negatif bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavilerinde kullanılır (51).

Seftazidim-avibaktam yeni bir antibiyotik olmasına rağmen direnç oranları artmaktadır. Klinik olarak önemli Gram negatif patojenler antibiyotiklerin inaktivasyonuna neden olan enzimatik direnç, antibiyotik hedefinin kimyasal modifikasyonu veya alternatif bir hedefin ekspresyonu ve hücre geçirgenliğinde veya efluks pompalarının ekspresyonunda değişiklikler gibi mekanizmalarla seftazidim-avibaktama karşı direnç geliştirebilir (52).

Meropenem-Vaborbaktam: Meropenem-vaborbaktam, bir karbapenem ile tek başına antibakteriyel etkisi olmayan bor bazlı beta-laktamaz inhibitörü olan vaborbaktamın kombinasyonudur. A ve C sınıfı karbapenemazlara sahip *Enterobacterales*'e oldukça etkili iken, OXA-48 veya metallo-beta-laktamazlara karşı etkili değildir (53).

Aztreonam-avibaktam: Metallo-beta-laktamazlar, aztreonam hariç tüm beta-laktamları hidrolize edebilmektedir. Bu spesifik özellik, aztreonamın metallo-beta-laktamaz üreten suşlara karşı yeniden klinik kullanımını gündeme getirmiştir. Ancak metallo-beta-laktamaz üreten suşlarda A sınıfı beta-laktamazların veya AmpC tipi determinantların sıklıkla birlikte üretilmesi nedeniyle aztreonam suşların yalnızca üçte birinde etkili olmaktadır. Avibaktam, A sınıfı beta-laktamazlara ve AmpC tipi determinantlara karşı güçlü bir aktiviteye sahip beta-laktam olmayan beta-laktamaz inhibitörüdür. Klinisyenler aztreonamı inhibisyonla korumak ve aztreonam-avibaktam tek bir ürün olarak bulunmadığı için seftazidim-avibaktam ve aztreonam kombinasyon tedavisini uygulamışlardır (54).

Sefiderokol: Sefiderokol, Ekim 2019'da idrar yolu enfeksiyonlarının ve Eylül 2020'de hastane kaynaklı pnömoni ve ventilatörle ilişkili bakteriyel pnömoni tedavisi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almıştır. Sefiderokol, bir sefalosporin kısmı ve katekol tipi bir siderofordan oluşan, demire bağlanan ve aktif demir taşıyıcıları kullanarak bakteriyel hücre girişini kolaylaştıran sentetik bir konjugattır. Periplazmik boşluğa girdiğinde demirden ayrışır ve sefalosporin kısmı öncelikle PBP-3'e bağlanarak bakteriyel hücre duvarı sentezini inhibe

eder. Sefiderokolün kimyasal yapısı ve hücre giriş mekanizması, porin kanallarının kaybına, efluks pompalarının aşırı ekspresyonuna ve karbapenemazların inaktivasyonuna karşı gelişmiş koruma sağlayabilir. Sefiderokol, serin karbapenemaz veya metallo-beta-laktamazlar üreten *K. pneumoniae* tedavisinde etkindir (55).

Eravasiklin: Eravasiklin, karbapeneme dirençli Gram negatif bakteriler de dahil olmak üzere geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip ciddi enfeksiyonların tedavisi için geliştirilen sentetik bir florosiklidir (56).

Plazomisin: Plazomisin, sisomisinden sekiz aşamalı bir sentezle oluşturulan yarı sentetik bir aminoglikoziddir. Yakın bir zamanda ÇİD *Enterobacterales*'in neden olduğu komplike idrar yolu enfeksiyonları ve piyelonefrit tedavisi için onaylanmıştır. Plazomisin direnci, NDM içeren karbapenemaz suşları ile ilişkilendirilmiştir (57).

İmipenem-Relebaktam: İmipenem-relebaktam, karbapeneme dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarını tedavi etmek için yeni bir beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonudur. FDA tarafından 2019 yılında onaylanan imipenem-relebaktam kombinasyonu, metallo-karbapenemaz üreticileri hariç, CRE'ye karşı etkinliğe sahiptir (58).

2.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

2.4.1. Disk Difüzyon (Kirby-Bauer) Testi

Disk difüzyon testi 1940'ta geliştirilmiş olup, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin antimikrobiyal duyarlılık testleri için kullanılan resmi bir yöntemdir. Bu yöntemde agar plakları, test mikroorganizmasının standartlaştırılmış bir inokulumu ile inoküle edilir. Belli dozlarda antibiyotik emdirilmiş yaklaşık 6 mm çapında diskler agar yüzeyine yerleştirilir. Petri kapları, uygun koşullar altında inkübe edilir. İnkübasyon sonunda antimikrobiyal ajan agara difüze olur ve disk etrafında oluşan zon çapı ölçülerek antibiyotiğe duyarlılık ya da direnç durumu belirlenir. Bakterileri duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize ederek kalitatif sonuçlar sağlar. Bakteriyel üreme inhibisyonu, bakteriyel ölüm anlamına gelmediğinden, bu yöntem bakterisidal ve bakteriyostatik etkileri ayırt edemez. Disk difüzyon testinin basit uygulanabilirliği, düşük maliyeti, çok sayıda antimikrobiyal ajanı test etmesi, sonuçları yorumlama kolaylığı gibi diğer yöntemlere göre pekçok avantajı bulunmaktadır (59).

2.4.2. Gradient Test

Antimikrobiyal gradient yöntemi, MİK değerini belirlemek için dilüsyon ve difüzyon yöntemlerinin prensibini birleştirir. Etest (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), bu tekniğin ticari bir adıdır. Antimikrobiyal ajanın bir uçtan diğerine artan bir konsantrasyon gradienti ile emdirilmiş bir şerit, test mikroorganizmasının standartlaştırılmış bir inokulumu bulunan agar yüzeyine yerleştirilir. Bakteriyel üreme sonucunda inkübasyondan sonra şerit boyunca ortalanmış simetrik bir inhibisyon elipsi görülür. MİK değeri, elips kenarının şeritle kesiştiği yerde $\mu\text{g/mL}$ cinsinden skaladan okunur (59).

2.4.3. Agar Dilüsyon Testi

Bu yöntemde test edilecek antibiyotik dilüe edilerek bir dizi konsantrasyon elde edilir. Bu konsantrasyonlar agar ile birleştirilir. Daha sonra standart bir konsantrasyonda hazırlanan bakteriler, her bir plağa nokta başına 10^4 cfu/mL olacak şekilde eklenir. İnkübasyondan sonra, inoküle edilen noktalarda bakteri üremesi olup olmadığını belirlemek için plaklar incelenir. Bakteri üremesini engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu, o antibiyotiğin o bakteriye karşı MİK değeri olarak kabul edilir. Test edilen mikroorganizmanın MİK değerini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren agar plaklarının kullanılması gerekir. Bu yöntem, antibiyotik direncini değerlendirmek için altın standart olarak kabul edilir. Ancak zahmetli ve zaman alıcı bir yöntemdir (60).

2.4.4. Sıvı (Broth) Dilüsyon Testleri

Sıvı makrodilüsyon ve mikrodilüsyon, en temel antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleridir. Antimikrobiyal ajanın minimum 2 mL hacimli cam tüplere (makrodilüsyon) veya 96 kuyucuklu mikropalak (mikrodilüsyon) kullanılarak daha küçük hacimlere dağıtılan sıvı bir üreme ortamında seri dilüsyonunu içerir. Ardından, her tüp veya kuyucuk 0,5 McFarland ayarlanmış standart mikrobiyal süspansiyonun seyreltilmesinden sonra aynı besiyerinde hazırlanan mikrobiyal inokulum ile inoküle edilir. İyi karıştırıldıktan sonra, inoküle edilen tüpler veya 96 kuyucuklu mikropalak test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında inkübe edilir. Minimum inhibitör konsantrasyon, çıplak gözle tespit edildiği üzere tüplerde veya mikrodilüsyon kuyucuklarında organizmanın büyümesini tamamen engelleyen en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonudur. İyi standardize edilmiş güvenilir yöntemlerdir; fakat zahmetlidir (59).

2.4.5. Otomatize Sistemler

Otomatize antibiyotik duyarlılık sistemleri, MİK panellerinin otomatik inokülasyonu ve inkübasyonu ardından manuel müdahale gerektirmeyen bilgisayar destekli okuma, yorumlama ve raporlamadan oluşur. Otomatize sistemler, test süresini önemli ölçüde azaltarak tedavi kararlarını hızlandırır. İnsan hatasını en aza indirerek tutarlı ve güvenilir sonuçlar sağlar. Çok sayıda numuneyi aynı anda çalışabilir (61).

2.5. ANTİBİYOTİK KOMBİNASYON TESTLERİ

Antibiyotik kombinasyon tedavileri, genellikle ciddi Gram negatif enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır. Monoterapiyle karşılaştırıldığında kombinasyonlarla elde edilen potansiyel başarılar arasında; daha geniş bir antibakteriyel spektrum, sinerjistik etkiler ve tedavi sırasında direnç ortaya çıkma riskinin azalması yer alır. Fakat artan toksisite riski, süperenfeksiyonlar, dirençli suşların ortaya çıkışı ve yüksek maliyetlerden dolayı kombinasyonların aşırı kullanımından kaçınılmalıdır (62). Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkileşimini değerlendirmek için sinerji testi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu testler arasında dama tahtası (checkerboard) yöntemi, zamana bağlı öldürme (time-kill) yöntemi, disk difüzyon yöntemi, gradient test yöntemi bulunmaktadır (63).

İki veya daha fazla ilaç aynı anda birlikte test edildiğinde sinerjik etki, additif etki, indiferans etki ve antagonistik etki olarak farklı fenotipik etkiler verebilir.

Sinerjik etki, kombinasyonu oluşturan antibiyotiklerin birlikte etkisi, her bir antibiyotiğin tek başına kullanımı ile oluşan etkisinden anlamlı miktarda artmasıdır. Örneğin; 1 (İlaç A)+ 1 (İlaç B)= ≥ 3

Additif etki, birlikte kullanılan antibiyotiklerin etkisi ayrı ayrı etkilerinin toplamı olarak belirtilir. Kısmi sinerjiyi gösterir. Örneğin; 1 (İlaç A)+ 1 (İlaç B)= 2.

İndiferans etkide ise ilaçların kombinasyondaki etkisi, daha etkili olan diğerinin tek başına yaptığı etki kadardır. Antibiyotikler birbiriyle etkileşmezler.

Antagonistik etki, iki ilaç bir arada kullanıldığında biri diğerinin etkisini zayıflatıyorsa ve etki toplamı her birinin tek başına yaptığından düşükse aralarında antagonsitik etkileşmeden bahsedilir.

İn vitro bulguların klinik önemi belirsizdir. Bu yüzden in vitro modeller, hayvan çalışmalarında ve ileriye dönük klinik çalışmalarda daha fazla araştırılacak sinerjik kombinasyonlar için geniş ölçekli bir tarama yapmak için kullanılabilir. Ayrıca, kanıta dayalı tedavi seçeneklerinin bulunmadığı durumlarda, in vitro veriler, ÇİD Gram negatif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlar için terapötik kararları desteklemek için yararlı olabilir.

2.5.1. Dama tahtası (Checkerboard) Yöntemi

Dama tahtası (checkerboard) yöntemi, kolay anlaşılabilir bir mantığı ve sonuçları yorumlamak için kullanılan matematiksel hesaplamaların zor olmaması sebebiyle antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkisini ölçmede sık olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem için 96 kuyucuklu U tabanlı steril mikrolaklar kullanılır. Her bakteri suşu ve denenecek kombinasyon için bir mikrolaka kullanılır. Antibiyotiklerin stok solüsyonları hazırlanır ve ayrı tüplerde çift kat seri dilüsyonlar yapılır. Tüplerde bulunan konsantrasyonlar, kombinasyonda denenecek her kuyucuk için son konsantrasyonun iki katı olmalıdır. Çünkü aynı kuyucukta her iki antibiyotik eşit miktarlarda bulunup birbirini bir kat dilüe edecektir. Her mikrolak için bir yatay sıra ve bir dikey sütun kuyucukları, antibiyotiklerin MİK'lerinin belirlenmesi için kullanılır. Yine her deneyde bir kuyucuk antibiyotiksiz bırakılarak üreme kontrolü olarak ve bir kuyucuk da sadece besiyeri eklenip besiyeri sterilite kontrolü olarak kullanılır. Diğer kuyucuklara antibiyotiklerin kombinasyonları eklenir. Kombinasyondaki her antibiyotiğin test edilecek mikroorganizma için bilinen veya beklenen MİK değerinin en az üç-dört dilüsyon aşağısı ile iki, sekiz katına kadarki dilüsyonları kullanılmalıdır.

Deneyde kullanılacak suşların kanlı agar gibi seçici olmayan bir besiyerindeki bir gecelik taze kültürü kullanılır. Üreyen saf kolonilerden bakteri süspansiyonu hazırlanıp her kuyucuk için son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 cfu/mL olacak şekilde inoküle edilir. Uygun ATCC suşlarıyla aynı antibiyotik stok solüsyonları ve sulandırımalarla testin kalite kontrolü yapılır. Dama tahtası deneyi tamamlandıktan sonra mikrolağın kapağı kapatılır ve 16-20 saat $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilir. Kalite kontrol suşlarının MİK değerleri uygunsa ve üreme ve besiyerleri kontrolü yapıp mikrolakalar değerlendirilir. Her mikrolaka için kombinasyonda kullanılan antibiyotiklerin tek başına MİK değerleri okunur ve kaydedilir. Daha sonra kombinasyon testinde üreme olan kuyucuklar, pozitif kabul edilir ve üreme olmayanlar, boş bırakılıp kayıt formuna işaretlenir.

Sonuçlar yorumlanırken önce her iki antibiyotiğin üreme olmayan kuyucuklarda ayrı ayrı fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) değerleri hesaplanır. FİK değeri, her ilacın kombinasyon halinde kullanıldığında MİK değerinin, tek başına kullanıldığında MİK değerine bölünmesiyle belirlenir. FİK indeks toplamı ($\Sigma\text{FİK}$) ise kombinasyonda test edilen her ilacın FİK değerlerinin toplamıdır. $\Sigma\text{FİK}$, test edilen ilaçlar arasındaki etkileşimi kategorize etmek için kullanılır.

$\Sigma\text{FİK} \leq 0.5$ ise sinerjik etki (0,5'e eşit veya düşük ise)

$0,5 > \Sigma\text{FİK} < 1$ ise additif etki (kısmi sinerjik etki)

$1 \leq \Sigma\text{FİK} \leq 4$ indifferans etki

$\Sigma FİK > 4$ antagonisitik etki şeklinde yorumlanır.

2.5.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemde antibiyotik diskleri, bakteri inoküle edilen plaklara birbirinden her iki inhibisyon zon çapının toplamı mesafeye yerleştirilmektedir. 16-20 saatlik inkübasyondan sonra iki antibiyotik arasında sinerjik etki mevcutsa, disklerin inhibisyon zon çaplarının birbirine bakan taraflarında genişleme oluşmakta, antagonistik etki mevcut ise inhibisyon zon çapı düzleşmekte, etkileşim yoksa inhibisyon zonları değişmemektedir (64).

2.5.3. Gradient Test Yöntemi

Bu yöntemde bakteri inoküle edilen plaklara iki ilaçtan birine ait gradient strip yerleştirilir ve 1 saat 37°C’de inkübe edilir. Daha sonra bu strip kaldırılarak diğer ilaca ait strip konsantrasyon çizgileri tam çakışacak şekilde yerleştirilip 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda gradient stripin etrafında oluşan duyarlılık zonunun kesiştiği yer kaydedilir. Aynı işlem diğer ilaç önce olacak şekilde tekrarlanır. Farklı şekilde uygulanan gradient strip sinerji yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemi değerlendirirken FİK indeksi kullanılabilir. Ya da ilaçların kombine edildiğinde MİK değeri tek başına çalışıldığında daha aktif olan ilacın MİK değerinden en az iki dilüsyon düşük ise sinerji, en az iki dilüsyon yüksek ise antagonizma, bu ikisinin arasında ise additif etki şeklinde yorumlanır (65).

2.5.4. Zamana Bağlı Öldürme (Time Kill) Yöntemi

Bu yöntemde sinerji araştırması yapılacak ilaçların tek tek ve kombine olduğu tüplere ekim yapılır. 24 saatlik inkübasyon esnasında belli aralıklarla katı besiyerine pasajlanır. 24 saatlik inkübasyon sonunda plaklarda bakteri kolonileri sayılarak cfu/mL değerleri semilogaritmik kağıtlarda işaretlenir. Test edilen antibiyotiklerin sinerjik etkisini tespit etmek için önce kombinasyondaki daha aktif antibiyotiğin koloni sayıları kaydedilir. Bu değere oranla kombinasyonda 24 saatlik koloni sayılarında ≥ 100 kat ($2 \log_{10}$) düşüş sinerjistik etkiyi, ≥ 100 kat ($2 \log_{10}$) artış antagonistik etkiyi, < 10 kat artış ve azalış ise additif veya indifferans etkiyi gösterir. Uzun ve zahmetli bir yöntem olduğu için az sayıda kombinasyon ve suş denenebilir (66).

3. MATERİYAL ve METOT

Bu çalışma, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 11.10.2023 tarihi 2023/0677 karar no ile onaylanmıştır (Bkz. EK 1).

3.1. KLİNİK İZOLATLARIN SEÇİMİ

Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 01.10.2019-31.07.2023 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen, MALDI-TOF MS (bioMerieux, Fransa) ile tanımlanmış, antibiyotik duyarlılıkları otomatize sıvı mikrodilüsyon sistemi (VITEK2, bioMerieux, Fransa) ile çalışılmış olan ve karbapenem grubu antibiyotiklerden (meropenem, ertapenem, imipenem) en az birine dirençli olan 100 adet *K. pneumoniae* suşu dahil edildi. Tüm suşlar, çalışmanın yapılacağı tarihe kadar -20°C’de %15’lik gliserin içeren stok besiyerlerinde saklandı. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanıldı.

3.2. BAKTERİLERİN TANIMLANMASI

Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına kabulü yapılan klinik örnekler, laboratuvar tanı algoritmasına uygun olarak %5 koyun kanlı agar (KKA), çikolatamsı agar ve kromojenik agar besiyerlerine ekildi. Örnek türüne uygun olarak besiyerleri 35±2°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası besiyerlerinde saf koloni halinde üreyen bakterilerin tanımlanması MALDI-TOF MS (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak yapıldı.

3.3. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

K. pneumoniae suşlarının antibiyotik duyarlılık testleri, VITEK 2 (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi ile çalışıldı. Otomatize sistem ile karbapenemlerden en az birine direnç saptandığında Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ya da gradient test yöntemi ile doğrulama yapıldı. Seftazidim-avibaktam duyarlılığının belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı.

3.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Bu yöntem için taze kültürde bulunan saf bakteri kolonilerinden birkaç tanesi, steril pamuklu eküvyon çubuğa alınarak 3 cc fizyolojik tuzlu su içinde densitometre cihazı (DensiCHEK plus, Biomerieux, Fransa) kullanılarak 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ cfu/mL) bulanıklığında ölçülen bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril pamuklu eküvyon çubuğu, bu süspansiyonun içerisine daldırıp pamuktaki fazla su tüpün duvarlarına bastırılarak fazla sıvı atıldı ve pamuktaki inokulum Mueller Hilton agar (MHA)'ın her tarafına eşit olacak şekilde yayıldı. Meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), ertapenem (10 µg) (Bioanalyse, Türkiye) diskleri ve seftazidim-avibaktam (10/4) µg (Bioanalyse, Türkiye) diski, süspansiyonun inokülasyonundan sonra Mueller Hilton agara yerleştirildi. Diskler yerleştirildikten sonra besiyerleri, $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bakterilerin inhibisyon zon çapları ölçüldü. İnhibisyon zon çapları, EUCAST v.13.0'a göre karbapenemaz üreten *Enterobacterales* için klinik sınır değerler ve tarama eşik değerleri tablosuna göre değerlendirildi. EUCAST'ın *Enterobacterales* için önerdiği inhibisyon zon çapları, Tablo 3.1'de gösterilmiştir (67).

Tablo 3.1. EUCAST'ın *Enterobacterales* için önerdiği inhibisyon zon çapları.

Antibiyotikler	İnhibisyon zon çapı (mm)	
	S $\geq$	R<
Ertapenem (10 ug)	25	25
Meropenem (10 ug) (menenjit dışında)	22	16
İmipenem (10 ug)	22	19
Seftazidim-avibaktam (10-4 ug)	13	13

3.3.2. Gradient Test Yöntemi

Bu yöntem taze kültürdeki saf bakteri kolonilerinden birkaç tanesi steril pamuklu eküvyon çubuğa alınıp 3 cc fizyolojik tuzlu su içerisinde densitometre cihazı (DensiCHEK plus, Biomerieux, Fransa) ile 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan steril pamuk uçlu eküvyon yardımıyla Mueller Hilton agara eşit bir şekilde inoküle edildi. İnokülasyondan sonra 15 dakika içerisinde 0,002-32 µg/ml aralığında ertapenem, meropenem, imipenem içeren gradient test şeritleri (Biomeriux, Fransa) yerleştirildi. Gradient test yerleştirildikten sonra besiyerleri $35 \pm 2^\circ\text{C}$ etüve kaldırılıp 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elips şeklindeki inhibisyon zonunun gradient test şeridi ile kesiştiği bölgedeki değer minimum inhibitor konsantrasyon değeri olarak kabul edildi. Minimum inhibitor konsantrasyon değerleri, EUCAST v.13.0 e göre karbapenemaz üreten *Enterobacterales* için klinik sınır değerler ve tarama eşik değerleri tablosuna göre

değerlendirildi. EUCAST'ın *Enterobacterales* için önerdiği MİK sınır değerleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir (67).

Tablo 3.2. EUCAST'ın *Enterobacterales* için önerdiği MİK sınır değerleri.

Karbapenem	MİK sınır değerleri	
	≤S	>R
Ertapenem	0,5	0,5
Meropenem(menenjit dışı)	2	8
İmipenem	2	4

3.4. ANTİBİYOTİK STOK VE ÇALIŞMA SOLÜSYONLARI

İn vitro çalışmalarda kullanacağımız Cefprozil hidrat powder (CAS Number: 120618-65-7, Sigma-Aldrich, ABD), Avibaktam sodium powder (CAS number:1192491-61-4, RayBiotech, ABD), Fosfomisin sodium (CAS number: 26016-99-9, Sigma Aldrich, ABD), Meropenem trihidrat powder (CAS number: 119478-56-7, Sigma-Aldrich, ABD) potens değerleri göz önünde bulundurularak hedeflenen stok solüsyon için gerekli hacim aşağıdaki formüle göre hesaplandı (68).

$$\text{Hacim(ml)} = \text{Ağırlık(mg)} \times \text{Potens}(\mu\text{g/mg}) / \text{Konsantrasyon}(\mu\text{g/ml})$$

Çalışmalarda test edilecek antibiyotiklerin başlangıç konsantrasyonlarının 10 katı olacak şekilde, Tablo 3.3'te verilen çözücü ve sulandırıcılar kullanılarak, stok solüsyon hazırlandı ve steril ependorflara bölünerek -80 °C' de saklandı. Hazırlanan stok solüsyonlar antibiyotik duyarlılık çalışmaları yapılacağı zaman yine kılavuzda önerilen sulandırıcılar ile sulandırılıp uygun konsantrasyonda çalışma solüsyonları hazırlandı (68).

Seftazidim stok solüsyonu hazırlarken seftazidimin %10'u kadar sodyum karbonat kullanıldı. Sodyum karbonat hesaplanan distile suyun bir kısmı içerisinde çözelti haline getirildi. Seftazidim önce bu çözeltide çözdürülüp sonra gerekli hacime kadar distile su eklendi.

Tablo 3.3. Antimikrobiyal ilaç solüsyonları hazırlarken kullanılan çözücü ve sulandırıcılar.

Antibiyotik	Çözücü	Sulandırıcı
Seftazidim	Sodyum Karbonat+Distile Su	Distile Su
Avibaktam	Distile Su	Distile Su
Meropenem	Distile Su	Distile Su
Fosfomisin	Distile Su	Distile Su

3.5. KATYON AYARLI MUELLER HINTON BROTH

Sıvı mikrodilüsyon ve dama tahtası sinerji testleri için gerekli katyon ayarlı Mueller-Hinton broth (KAMHB) sıvı besiyeri hazırlamak için ticari olarak temin edilmiş olan toz haldeki Mueller Hinton Broth (Cat. Num: 70192; Sigma-Aldrich, ABD) besiyerinin 23 gr'ı 1 L distile su içerisinde çözüldü. Otoklavda (Nüve Steamart, Ankara, Türkiye) 121°C'de 15 dk sterilize edilip oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu ve bir gece 2-8°C'de bekletildi. Katyon ayarları için kalsiyum klorür (CAS number: 10043-52-4, Merck, Germany) ve magnezyum klorür (CAS number: 7786-30-3 Sigma-Aldrich, ABD) kullanıldı.

Kalsiyum klorür stok çözeltisi hazırlamak için 100 ml deiyonize suda 3,68 gr kalsiyum klorür çözdürüldü, magnezyum klorür stok çözeltisi hazırlamak için ise 100 ml deiyonize suda 8,36 gr magnezyum klorür çözdürüldü. CLSI'nin besiyeri için önerdiği katyon oranlarını (kalsiyum 20-25 mg/L, magnezyum 10-12,5 mg/L) sağlayacak şekilde, hazırlanmış olan stok çözeltileri membran filtreden (220 nm, Sartorius, Almanya) geçirilerek besiyerine eklendi. Fosfomisin için antibiyotik duyarlılık testi ve dama tahtası testi çalışılacağına, bir litre besiyeri için 25 mg glukoz-6-fosfat (G-6-P) tartılıp 20 ml MHB içerisinde çözdürüldü ve membran filtreden geçirilerek besiyerine konuldu. Hazırlanan besiyeri en fazla 1 hafta süreyle +4°C'de saklandı.

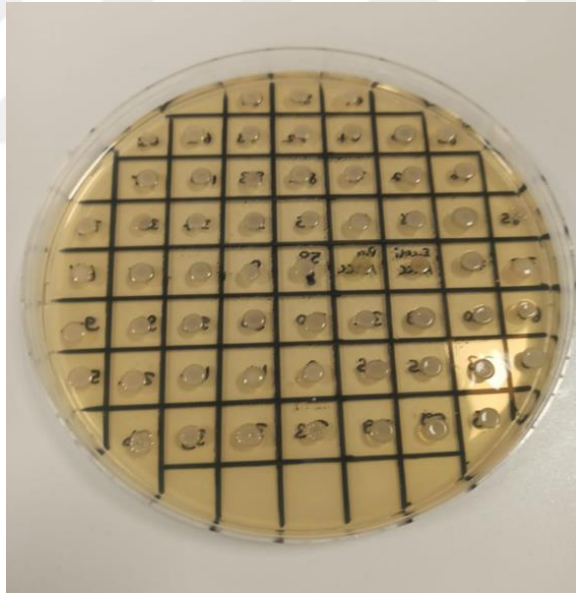
3.6. AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ

EUCAST fosfomisin için antibiyotik duyarlılığı belirlemede referans yöntem olarak agar dilüsyonu önermektedir. Dama tahtası yöntemi ile sinerji çalışması yapılmadan önce *K. pneumoniae* suşlarının fosfomisin MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi ile çalışıldı. Agar dilüsyon yöntemi, EUCAST tanımlayıcı döküman 3.1 kılavuzu önerileri ile yapıldı (69). 14 cm çapındaki steril petrilerin yüzeyi kalem ile çalışılacak köken sayısına bölündü. Her bir petrinin üzerine içerdiği anbiyotik adı ve antibiyotik konsantrasyonu yazıldı. Mueller Hinton agar (MHA) (Oxoid, United Kingdom), üretici firmanın önerileri doğrultusunda tartıldı. Ardından 1 atm basınçta 121°C'de 15 dakika otoklavda (Nüve Steamart, Ankara, Türkiye) sterilize edildi. Sterilize edildikten sonra 45°C-50°C'ye kadar soğutulup fosfomisinin etkinliğinin artırmayı sağlayan G-6-P (25µg/ml) eklendi. Ardından seri sulandırımı yapılmış antibiyotiklerin bulunduğu petrilere 4 mm kalınlıkta, antibiyotik solüsyonu /besiyeri oranı 1/10 olacak şekilde hazırlanan besiyeri eklendi. Antibiyotiklerin besiyerinde homojen dağılması için petriler çevrilerek karıştırıldı ve düz bir zeminde soğumaya bırakıldı. Böylece her biri farklı konsantrasyonda antibiyotik içeren (0,25µg/mL, 0,5µg/mL, 1µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64µg/mL, 128 µg/mL) katı besiyerleri elde edildi.

Agar dilüsyon testi için öncelikle bakteri süspansiyonu 0,5 MacFarland olacak şekilde ayarlandı. Ardından 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 cfu/mL bakteri yoğunluğu elde edildi. Hazırlanan süspansiyondan 2µl alınarak ekim yapıldı. Bu şekilde agar plağındaki son bakteri konsantrasyonunun 10^4 cfu/mL olması sağlandı. Bakteri ekimleri düşük antibiyotik konsantrasyonu içeren plaktan başlanarak daha yüksek antibiyotik konsantrasyon içeren petrilere doğru yapıldı. Son olarak antibiyotik içermeyen bir besiyerine üreme kontrolü amacıyla suşların ekimi yapıldı (Şekil 3.1). Oda sıcaklığında inokulum alanları kuruduktan sonra petrilere ters çevrilerek 35 ± 2 °C olan etüvde 18 ± 2 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra sonuçların değerlendirilmesinde agar plakta ekim noktalarında gözle görülür üremeler değerlendirildi. Üremenin olmadığı ilk plak konsantrasyonu o izolat için fosfomisin MİK değeri olarak belirlendi. MİK sonuçları EUCAST V.13.0 kriterlerine göre değerlendirilerek MİK ≤ 32 mg/L olan değerler duyarlı, >32 mg/L olan değerler ise dirençli olarak yorumlandı.

Agar dilüsyon testi, elde edilen sonuçları doğrulamak için iki kez çalışıldı. Agar dilüsyon testinin kalite kontrolü amacıyla *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 suşları kullanıldı.



Şekil 3.1. Üreme kontrol ekimi yapılan besiyeri.

3.7. SIVI MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ

Çalışmaya dahil edilen 100 adet KDKp izolatının seftazidim-avibaktam minimum inhibitör konsantrasyon duyarlılığı EUCAST V.13.0 klavuzuna göre standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edildi. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile seftazidim-avibaktam dirençli bulunan 15 izolata dama tahtası yöntemi ile sinerji testi çalışılacağı için fosfomisin ve meropenem MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edildi.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için 96 kuyucuklu her kuyucuğun hacmi 0,2 ml olan steril U tabanlı mikroplakalar kullanıldı. Antibiyotik seri dilüsyonunda kullanmak amacıyla Mueller-Hinton Broth (MHB) üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanıp otoklavlandı.

Meropenem sıvı mikrodilüsyon testi için mikroplaktaki tüm kuyucuklara 100 mikrolitre KAMHB konuldu. Meropenem için başlangıç konsantrasyonu 128 µg/ml olarak belirlendi. Başlangıç konsantrasyonunun iki katı olacak şekilde (256 µg/ml) hazırlanan çözeltiden 100 µl alınarak pleytin her satırının ilk kuyucuğuna eklendi. Çok kanallı pipet yardımıyla seri sulandırım yapıldı. 10.kuyucuktan sonra 100 µl'lik miktar dışarı atıldı. Böylece her bir kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu yarıya düşürülüp 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml konsantrasyonları elde edildi. Satırların 11. kuyucuğu üreme kontrolü, 12. kuyucuğu ise besiyeri kontrolü olarak belirlendi ve bu kuyucuklara antibiyotik eklenmedi.

Fosfomisin sıvı mikrodilüsyon testi için mikroplaktaki tüm kuyucuklara 100 µL KAMHB (G-6-P içeren) konuldu. Fosfomisin için başlangıç konsantrasyonu 128 µg/ml olarak belirlendi. Başlangıç konsantrasyonunun iki katı olacak şekilde (256 µg/ml) hazırlanan çözeltiden 100 µl hacminde satırların ilk kuyucuğuna eklendi. Çok kanallı pipet yardımıyla seri sulandırım yapıldı. 10.kuyucuktan sonra 100 µl'lik miktar dışarı atıldı. Böylece kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonları yarı yarıya düşürülüp 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml konsantrasyonları elde edildi. Satırların 11. kuyucuğu üreme kontrolü, 12. kuyucuğu ise besiyeri kontrolü olarak belirlendi ve bu kuyucuklara antibiyotik eklenmedi.

Seftazidim-avibaktam sıvı mikrodilüsyon testi için seftazidim ve avibaktam için ayrı ayrı stok çözeltileri hazırlandı. Mikroplaktaki tüm kuyucuklara 100 µl KAMHB eklendi. Seftazidim için başlangıç konsantrasyonu 128 µg/ml olarak belirlendi. Başlangıç konsantrasyonunun iki katı olacak şekilde (256 µg/ml) hazırlanan çözeltiden 100µl alınarak pleytin her satırının ilk kuyucuğuna eklendi. Çok kanallı pipet yardımıyla seri sulandırım yapıldı. 10. kuyucuktan sonra 100 µl'lik miktar dışarı atıldı. Stok olarak hazırlanan 400 µg/ml konsantrasyonundaki avibaktam çözeltilisinden 0,5 ml alınıp 1,5 ml distile su ile sulandırıldı. 100 µg/ml konsantrasyonunda 2 ml hacminde antibiyotik çözeltisi elde edildi. Seftazidim içeren tüm kuyucuklara son konsantrasyon (4mg/L) olacak şekilde 4µL avibaktam dağıtıldı. Böylece kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonları 128/4 µg/ml, 64/4µg/ml, 32/4 µg/ml, 16/4 µg/ml, 8/4 µg/ml, 4/4 µg/ml, 2/4 µg/ml, 1/4 µg/ml, 0,5/4 µg/ml, 0,25/4 µg/ml olarak elde edildi. Satırların 11. kuyucuğu üreme kontrolü, 12. kuyucuğu ise besiyeri kontrolü olarak belirlendi ve bu kuyucuklara antibiyotik eklenmedi. Şekil 3.2'de seftazidim-avibaktam sıvı mikrodilüsyon testi yapılmış bir mikroplak gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Seftazidim-avibaktam sıvı mikrodilüsyon testi (örnek mikrolak).

Sıvı mikrodilüsyon testi yapılacak olan ve -20 C’de saklanan suşlar %5’lik koyun kanlı agara pasajlanıp $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ikinci kez pasajlanıp üreyen saf bakteri kolonilerinden 0,5 McFarland bulanıklığında (1×10^8 cfu/ml) bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon 1:10 oranında dilüe edilip mikrolakta besiyeri kontrol kuyucuğu dışındaki tüm kuyucuklara son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde 5µl eklendi. Mikrolakların kapağı kapatılıp $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bakteri üremesinin tamamen inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak değerlendirildi. MİK sonuçları EUCAST V.13.0 kılavuzuna göre yorumlandı (Tablo 3.4).

Çalışmada meropenem ve fosfomisin için kalite kontrolü için *E.coli* ATCC 25922, seftazidim-avibaktam kalite kontrolü için *K. pneumoniae* ATCC 700603 standart suşu kullanıldı.

Tablo 3.4. EUCAST V.13.0 a göre *Enterobacterales* için MİK değerleri.

Antibiyotik	S≤	R>
Meropenem	2	8
Fosfomisin	32	32
Seftazidim-avibaktam	8	8

3.8. DAMA TAHTASI (CHECKERBOARD) SİNERJİ TESTİ

Seftazidim-avibaktam dirençli bulunan bakteriler için seftazidim-avibaktam+meropenem ve seftazidim-avibaktam+fosfomisin antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik etkinliğini belirlemek için dama tahtası sinerji testi çalışıldı (70).

Bu test her bir kuyucuk hacmi 0,2 ml olan 96 (8×12) kuyucuklu U tabanlı steril mikropalaklar kullanılarak çalışıldı. Her izolat için bir mikropalak kullanıldı. A12 kuyucuğu besiyeri kontrolü, H12 kuyucuğu üreme kontrolü olarak belirlendi ve bu kuyucuklara 100 µl KAMHB eklendi. Mikropalak çalışma düzeninde H satırı seftazidim-avibaktam için MİK değerini, 11.sütun ise meropenem ve fosfomisin MİK değerini belirlemede kullanıldı.

Seftazidim-avibaktam+meropenem kombinasyonu dama tahtası testi için H1 ile H10 satırında bulunan kuyucuklara seftazidim-avibaktam MİK değerini saptamak için seftazidim 0,5µg/ml ile 256 µg/ml arasındaki konstrasyonlarda 100 µl konuldu. Bu kuyucukların hepsinde avibaktam son konsantrasyonu 4 mg/L'de sabit tutuldu. 50 µL KAMHB 1-9 sütuna ilk 7 satırdaki tüm kuyucuklara eklendi. 100 µL hacminde 512 µg/ml konsantrasyonunda seftazidim 10.sütundaki tüm kuyucuklara konulup çok kanallı pipet ile 1.sütuna kadar her kuyucukta 3-5 kez pipetaj yapılarak 50 µL aktarılıp seri dilüsyon yapıldı. 1.sütundan 50 µL dışarı atıldı. Stok çözeltilerden son sulandırılması KAMHB ile yapılmış meropenem çalışma solüsyonlarından 256 µg/ml konsantrasyonu mikropalağın A satırına, 128 µg/ml konsantrasyonu B satırına, 64 µg/ml konsantrasyonu C satırına, 32 µg/ml konsantrasyonu D satırına, 16 µg/ml konsantrasyonu E satırına, 8 µg/ml konsantrasyonu F satırına, 4 µg/ml konsantrasyonu G satırına 50 µl hacminde dağıtıldı.

Tablo 3.5. Seftazidim-avibaktam ve meropenem kombinasyonu mikropalak düzeni.

↓Meropenem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	128 0,5/4	128 1/4	128 2/4	128 4/4	128 8/4	128 16/4	128 32/4	128 64/4	128 128/4	128 256/4	128	BK
B	64 0,5/4	64 1/4	64 2/4	64 4/4	64 8/4	64 16/4	64 32/4	64 64/4	64 128/4	64 256/4	64	
C	32 0,5/4	32 1/4	32 2/4	32 4/4	32 8/4	32 16/4	32 32/4	32 64/4	32 128/4	32 256/4	32	
D	16 0,5/4	16 1/4	16 2/4	16 4/4	16 8/4	16 16/4	16 32/4	16 64/4	16 128/4	16 256/4	16	
E	8 0,5/4	8 1/4	8 2/4	8 4/4	8 8/4	8 16/4	8 32/4	8 64/4	8 128/4	8 256/4	8	
F	4 0,5/4	4 1/4	4 2/4	4 4/4	4 8/4	4 16/4	4 32/4	4 64/4	4 128/4	4 256/4	4	
G	2 0,5/4	2 1/4	2 2/4	2 4/4	2 8/4	2 16/4	2 32/4	2 64/4	2 128/4	2 256/4	2	
H	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	32/4	64/4	128/4	256/4		ÜK

←Seftazidim-Avibaktam

Seftazdim-avibaktam+fosfomisin kombinasyonu dama tahtası testi için H1 ile H10 satırında bulunan kuyucuklara seftazidim-avibaktam MİK değerini saptamak için 0,5 µg/ml ile 256 µg/ml arasındaki konstrasyonlarda 100 µl konuldu. Bu kuyucukların hepsinde avibaktam son konsantrasyonu 4 mg/L'de sabit tutuldu. 50 µL G-6-P içeren KAMHB 1-9 sütuna ilk 7 satırdaki tüm kuyucuklara eklendi. 100 µL hacminde 512 µg/ml konsantrasyonunda seftazidim 10. sütundaki tüm kuyucuklara konulup çok kanallı pipet ile 1. sütuna kadar her kuyucukta 3-5 kez pipetaj yapılarak 50 µL aktarılıp seri dilüsyon yapıldı. 1. sütundan 50 µL dışarı atıldı. Stok çözeltilerden son sulandırılması G-6-P içeren KAMHB ile yapılmış fosfomisin çalışma solüsyonlarından 128 µg/ml konsantrasyonu mikropiğin A satırına, 64 µg/ml konsantrasyonu B satırına, 32 µg/ml konsantrasyonu C satırına, 16 µg/ml konsantrasyonu D satırına, 8 µg/ml konsantrasyonu E satırına, 4 µg/ml konsantrasyonu F satırına, 2 µg/ml konsantrasyonu G satırına 50 µl hacminde eklendi.

Tablo 3.6. Seftazidim-avibaktam ve fosfomisin kombinasyonu mikropiğin düzeni.

↓Fosfomisin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	64 0,5/4	64 1/4	64 2/4	64 4/4	64 8/4	64 16/4	64 32/4	64 64/4	64 128/4	64 256/4	64	BK
B	32 0,5/4	32 1/4	32 2/4	32 4/4	32 8/4	32 16/4	32 32/4	32 64/4	32 128/4	32 256/4	32	
C	16 0,5/4	16 1/4	16 2/4	16 4/4	16 8/4	16 16/4	16 32/4	16 64/4	16 128/4	16 256/4	16	
D	8 0,5/4	8 1/4	8 2/4	8 4/4	8 8/4	8 16/4	8 32/4	8 64/4	8 128/4	8 256/4	8	
E	4 0,5/4	4 1/4	4 2/4	4 4/4	4 8/4	4 16/4	4 32/4	4 64/4	4 128/4	4 256/4	4	
F	2 0,5/4	2 1/4	2 2/4	2 4/4	2 8/4	2 16/4	2 32/4	2 64/4	2 128/4	2 256/4	2	
G	1 0,5/4	1 1/4	1 2/4	1 4/4	1 8/4	1 16/4	1 32/4	1 64/4	1 128/4	1 256/4	1	
H	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	32/4	64/4	128/4	256/4		ÜK

←Seftazidim-Avibaktam

Dama tahtası çalışmak için ayrılan suşlar -20°C'den çıkarılıp oda ısısına getirildi. %5 koyun kanlı agar pasaj alınarak 18-24 saat 35±2°C'de aerob etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen koloniler tekrar pasajlandı. İkinci kez üreyen saf bakteri kolonilerinden steril öze ile alınarak %0,45'lik fizyolojik tuzlu su karıştırılıp 0,5 McFarland (1×10^8 cfu/ml)

yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Ardından 1:10 dilüe edildi (1×10^7 cfu/ml) ve 5 µL hacminde alınıp ilk 11 sütundaki tüm kuyucuklara ve üreme kontrolü olan H12 kuyucuğuna dağıtıldı. Böylece kuyucuklardaki son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 cfu/ml oldu. Mikroplakların kapağı kapatılıp 18-24 saat $35 \pm 2^\circ\text{C}$ de ve aerop ortamda inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda mikroplaklar hem gözle değerlendirildi hem de spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, ABD) 490 nm’de optik yoğunlukları ölçülerek kaydedildi.

Her mikroplağın ilk olarak besiyeri kontrol ve üreme kontrol kuyucukları değerlendirildi. Pleytlerdeki seftazidim-avibaktam ve kombine edilen antibiyotiklerin MİK değeri belirlendi ve sonuçlar kaydedildi. Mikroplaklarda üreme olmayan tüm kuyucuklar incelenip kaydedildi.

Üreme olmayan kuyucuklarda kombinasyondaki ilaçların etkileşimini incelemek için Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) ve Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksi (FİKİ) hesaplandı. Mikroplak incelemesinde en düşük FİKİ hesaplanarak, antibiyotiklerin birbiri ile sinerjik etkileşimi belirlendi (70).

FİK Seftazidim-avibaktam = Kombinasyonda Seftazidim-avibaktam’ın MİK sonucu / Seftazidim-avibaktam’ın tek başına MİK sonucu

FİK x = Kombinasyondaki diğer ilacın MİK sonucu / Diğer ilacın tek başına MİK sonucu

$\Sigma\text{FİK}$ (Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonu İndeksi) = FİK Seftazidim-avibaktam + FİK x

$\Sigma\text{FİK} \leq 0,5$ ise **sinerjistik etki**

$0,5 < \Sigma\text{FİK} < 1$ ise **additif etki** (kısmi sinerji)

$1 \leq \Sigma\text{FİK} \leq 4$ ise **indiferans** (tanımlanamayan etki)

$\Sigma\text{FİK} > 4$ ise **antagonistik etki**

3.9. MOLEKÜLER TESTLER

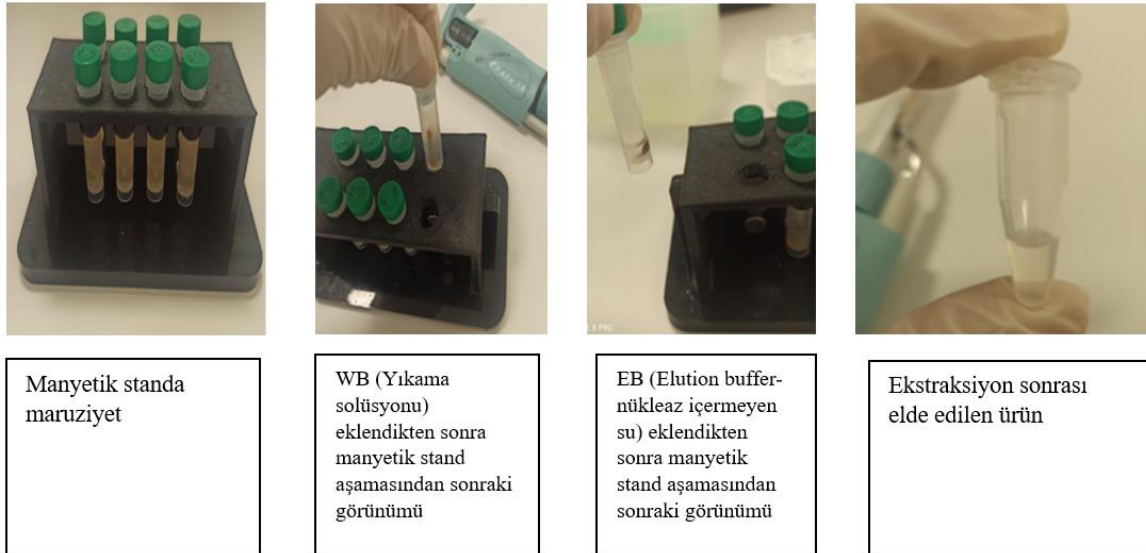
Karbapenem dirençli saptanan *K. pneumoniae* izolatlarının direnç profillerinin ortaya çıkarılması amacıyla real time PCR testi kullanıldı. Bunun için Bioksen manyetik boncuk bazlı nükleik asit izolasyon kiti (Kat. No: BS-NA-IS01R, Bioeksen, Türkiye) ile saf şekilde ekstrakte edilen bakteri DNA’ları Karbapenem Direnci qPCR kiti (Kat. No: BS-AR-CR-100, Bioeksen, Türkiye) kullanılarak karbapenem direnç genleri araştırıldı.

3.9.1. Bakteri DNA’sının İzolasyonu

%5 koyun kanlı agara ekilerek bir gece inkübe edilen saf bakteri kolonilerinden DNA izolasyonu, ticari olarak sağlanan izolasyon kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılarak gerçekleştirildi.

Lizis protokolü: Her bir izolat için stok besiyerinden %5 koyun kanlı agara taze pasajı yapıp $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ etüve kaldırılıp 18-24 saat inkübe edildi. 50 μL “5min NA” (lizis) ve 1000 μL “LB” (lizis) lizis solüsyonları vida kapaklı tüpe aktarıldı. Hazırlanan taze kültürden steril öze ile koloni büyüklüğüne göre 1-3 adet koloni tüpe aktarılıp ve 10 saniye maksimum hızda vortekslendi. Tüp 4 dakika 70°C ’de ısıtıcı blokta inkübe edilip örnek saflaştırmaya hazır hale getirildi.

Saflaştırma Protokolü: Lizisin gerçekleştirildiği tüpe 25 μL Bio-Speedy Manyetik boncuk aktararak 30 saniye maksimum hızda vortekslendi ve 30 saniye Bio-Speedy Manyetik Standa maruz bırakıldı. 30 saniye sonunda manyetik boncuklar yan yüzeyde toplandı ve tüpteki tüm sıvı mikropipet yardımıyla atıldı. Tüpe 1500 μL WB (Yıkama solüsyonu) aktararak 15 saniye maksimum hızda vortekslendi ve 30 saniye Bio-Speedy Manyetik Standa maruz bırakıldı. 30 saniye sonunda manyetik boncuklar yan yüzeyde toplandı ve tüpteki tüm sıvı mikropipet yardımıyla atıldı. Tüpe 100 μL EB (Elution buffer-nükleaz içermeyen su) aktararak 15 saniye maksimum hızda vortekslendi ve 30 saniye Bio-Speedy Manyetik Standa maruz bırakıldı. 30 saniye sonunda manyetik boncuklar yan yüzeyde toplandı. Tüpteki tüm sıvı mikropipet yardımıyla nükleaz içermeyen bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak nükleik asit kullanıma hazır hale geldi. Mikrosantrifüj tüpü içerisinde saf şekilde elde edilen bakteri DNAsı, 24 saat içinde yapılacak olan multiplex PCR testinde kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ ’de bekletildi. Daha sonra ise -20°C ’de saklandı.



Şekil 3.3. Bakteri DNA’sı elde etme aşamaları.

3.9.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Multipleks PCR testinde her bir bakteri izolatu için toplam reaksiyon hacmi 10 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropakta ikişer kuyucuk kullanıldı. İlk kuyucuğa ayrıntıları Tablo 3.3'te gösterilen qPCR testi için optimize edilmiş kullanıma hazır mix karışımından oluşan 2xqPCR miksinden 5 µl, ilk kuyucuğun hedef oligo miksi olan KPC, NDM, VIM, IMP karbapenem direnci oligo miksinden 2,5 µl ve elde ettiğimiz kalıp nükleik asitten 2,5 µl ilave edildi. İkinci kuyucuğa ilkinden farklı olarak hedef oligo miksi için OXA-51, OXA-23/58, OXA-48 karbapenem direnci oligo miksi ilave edilirken diğer reaktifler birinci kuyucukla aynı olacak şekilde eklendi. Her çalışmada negatif kontrol NTC (Nükleaz içermeyen su) ve her iki oligo miksi için pozitif kontrol (PC- CRE, PC-OXA) kullanıldı.

Tablo 3.7. Reaktiflerin mikropak kuyucuklarına dağıtımı.

İçerik	Kullanım Amacı	Birim Reaksiyon Hacmi
2× qPCR MİX	qPCR testi için optimize edilmiş kullanıma hazır mix	5 µL
CRE Oligo Mix	Spesifik nükleik asit amplifikasyonu ve tespiti: FAM: KPC HEX: NDM ROX: VIM CYP: IMP	2,5µL
OXA Oligo Mix	FAM: OXA-51 HEX: İnsan (IC-Dahili Kontrol) ROX: OXA-23, OXA -58 CY5: OXA-48	2,5µL
Kalıp Nükleik Asit		2,5µL
Toplam Reaksiyon Hacmi		10µL

Reaktifler belirtilen sıra ve miktarlarda mikropolağa eklendikten sonra spin santrifüj edildi. Ardından CFX96 Real-Time PCR cihazı (Bio-Rad Laboratories, ABD) kullanılarak Tablo 3.4'te verilen qPCR döngü protokolüne uygun şekilde amplifikasyon aşaması gerçekleştirildi.

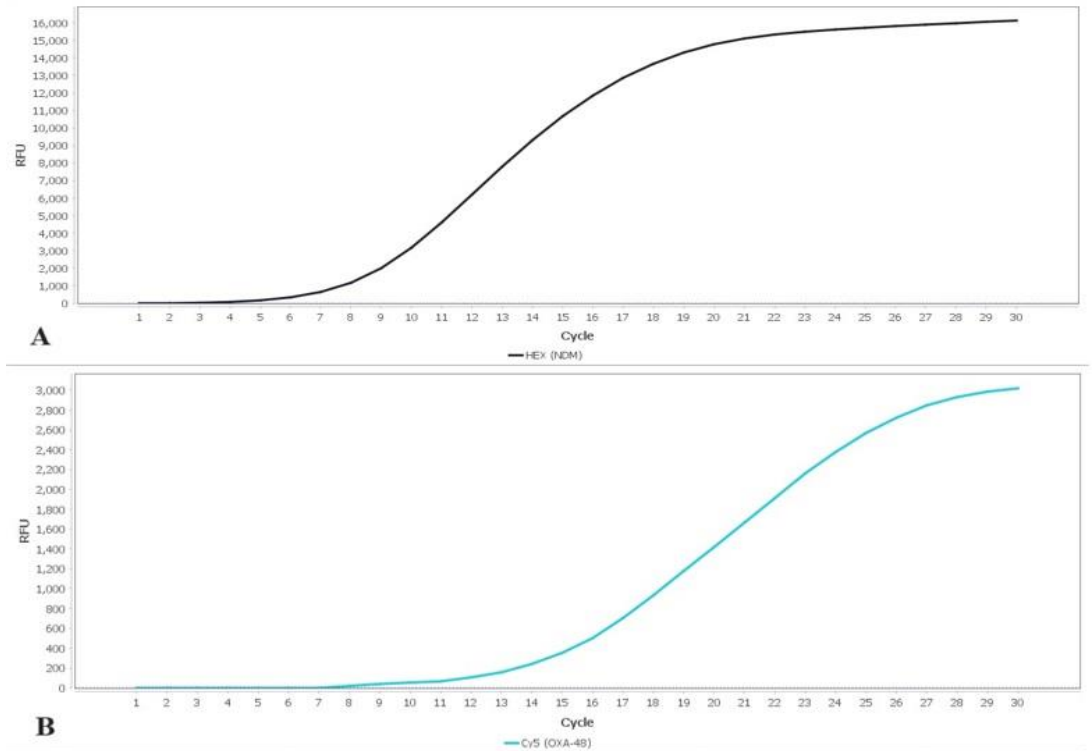
Tablo 3.8. PCR Döngü Protokolü.

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1 Döngü	52 °C	3 dakika
1 Döngü	95 °C	10 saniye
12 Touchdown Döngüsü: Döngü başına bağlanma sıcaklığında 1°C azalma	95 °C	1 saniye
	67°C- 56°C	15 saniye
30 döngü	95 °C	1 saniye
	55°C	15 saniye
	FAM/HEX/ROX/CY5 okuma	

3.9.3 Sonuçların Değerlendirilmesi

Real time PCR cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra sonuçların yorumlanması aşamasında Ct değeri ve oluşan eğrilerin sigmoidal olup olmadığı değerlendirildi (Şekil 3.3). Test analizi üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Örnekteki pozitiflik ya da negatiflik durumu döngü eşik değeri “cycle threshold (Ct)” dikkat alınarak değerlendirildi. NDM için 2500 rfu taban eşik değeri (Baseline threshold) ve döngü eşik değeri (Ct) 26, KPC, VIM, IMP, OXA-23/58, OXA-48 gen hedefleri için 750 rfu taban eşik değeri (Baseline threshold) ve döngü eşik değeri (Ct) 26, OXA-51 için 750 rfu taban eşik değeri (Baseline threshold) ve herhangi bir Ct değeri pozitif olarak kabul edildi.

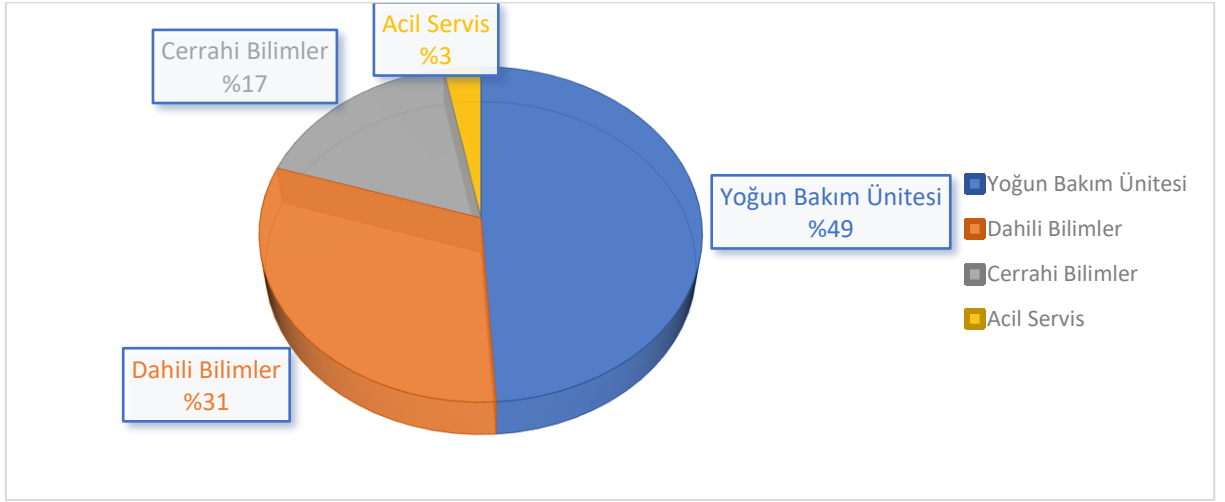
Sonuçlar ayrıca üretici firma tarafından sağlanan “Sigmoida” yazılımı kullanılarak da otomatik olarak yorumlandı. Her bir bakteri izolatının çalışılan karbapenem direnç genlerini (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA23/58}, *bla*_{OXA-48}) taşıyıp taşımadığı kayıt altına alındı. Herhangi bir kanaat oluşturulamayan suşlarda deney tekrar edildi. Her çalışmada pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.



Şekil 3.4. PCR ile pozitif olarak değerlendirilen sigmoidal eğriler (A) HEX kanalıyla saptanan pozitif NDM eğrisi, (B) Cy5 kanalıyla saptanan pozitif OXA-48 eğrisi.

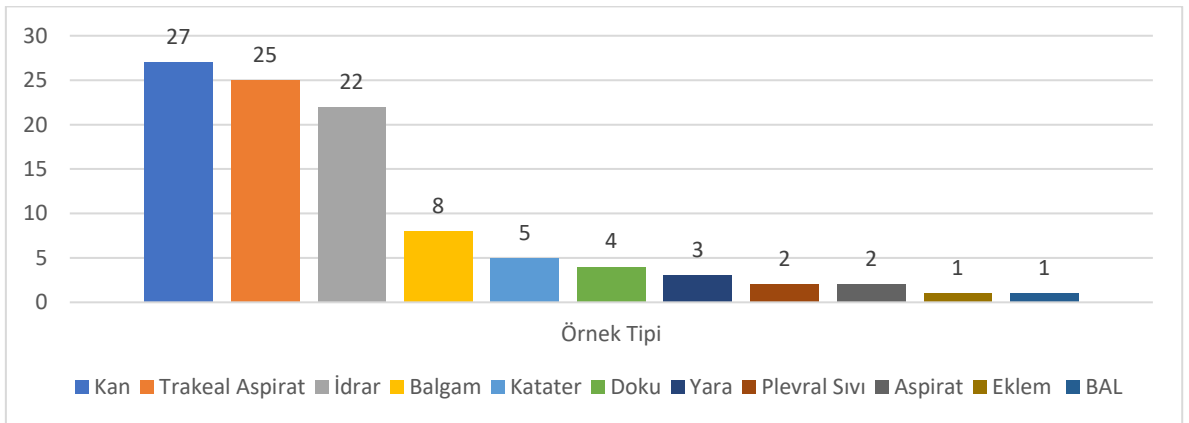
4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 100 klinik izolatin 33'ü kadın, 67'si erkek hastadan izole edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması $61,07 \pm 25,23$ (yıl) olarak hesaplanmıştır. Klinik izolatların %49'u yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarının kliniklere göre dağılımı Şekil 4.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *K. pneumoniae* izolatlarının gönderildiği kliniklere göre dağılımı.

K. pneumoniae suşlarının 27 tanesi kan kültüründen, 25 tanesi trakeal aspirat kültürü ve 22 tanesi idrar kültüründen izole edilmiştir. Tüm suşların numunelere göre dağılımı Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *K. pneumoniae* izolatların örnek türlerine göre dağılımı (%).

4.1. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI VE DİRENÇ PATERNLERİ

Çalışmaya dahil edilen suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılık testleri Vitek 2 otomatize sistemlerinde (BioMerieux, Fransa) çalışılmıştır. Ampisilin, amoksisilin klavulanik asit, sefuroksim, sefuroksim aksetil, sefazolin, seftazidim, sefepim, seftriakson, piperasilin tazobaktam, ertapenem, meropenem ve aztreonama %100 direnç, siprofloksasine %97, imipeneme %93, trimetoprim sülfametaksazole %80, gentamisine %79, amikasin %62 oranında direnç tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. KDKp izolatlarının otomatize sistemden elde edilen antibiyotik direnç oranları.

Antibiyotik	Çalışılan Suş Sayısı (n)	Dirençli Suş(%)
Ampisilin	100	100
Amoksisilin klavulanik asit	100	100
Sefuroksim	100	100
Sefuroksim aksetil	100	100
Sefazolin	38	100
Seftriakson	100	100
Seftazidim	100	100
Sefepim	100	100
Piperasilin Tazobaktam	100	100
Ertapenem	100	100
Meropenem	100	100
İmipenem	100	93
Aztreonam	38	100
Trimetoprim sülfametaksazol	100	80
Gentamisin	100	79
Amikasin	100	62
Siprofloksasin	100	97

Çalışmaya dahil edilen KDKp suşları hem disk difüzyon yöntemi ile hem de sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile seftazidim-avibaktam duyarlılık testi çalışılmış ve %15 oranında direnç tespit edilmiştir. Her iki yöntemle dirençli bulunan izolatların aynı olduğu belirlenmiştir. Fosfomisin duyarlılık testi, agar dilüsyon yöntemi ile çalışılmış ve %38 oranında direnç tespit edilmiştir.

Real time PCR yöntemi ile karbapenem direncinden sorumlu olan direnç genlerinin araştırılması sonucu suşların %39'unda *bla_{OXA-48}*, %10'unda *bla_{KPC}*, %2'sinde *bla_{NDM}*, %1'inde *bla_{OXA-51}* tespit edilmiştir. Suşların %17'sinde *bla_{OXA-48+KPC}*, %9'unda *bla_{OXA-48+NDM}*, % 2'sinde *bla_{OXA-48+OXA-51}*, % 1'inde *bla_{OXA-48+OXA 23/58}*, % 1'inde *bla_{OXA-48+OXA-51+KPC}* %3'ünde *bla_{OXA-48+NDM+KPC}* olmak üzere birden fazla karbapenemaz geni saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen suşların hiç birinde *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* tespit edilememiştir. Yine suşların %15'ünde araştırılan genlerin hiçbirisi saptanamamıştır. Suşların seftazidim-avibaktam ve fosfomisin duyarlılık

sonuçları karbapenem direnç paternleri ile birlikte Tablo 4.2’de verilmiştir. Tablo 4.3’te de *K. pneumoniae* izolatlarının karbapenem direnç genlerinin dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.2. KDKp suşlarının seftazidim-avibaktam (CZA) ve fosfomisin (FOS) duyarlılık ve direnç paterni sonuçları

	CZA SMD	CZA SMD Yorum	CZA Disk Çapı	CZA Disk Yorum	FOS Agar Diltüsyon	FOS Agar Diltüsyon Yorum	Direnç paterni
KDKP-1	2	S	18	S	32	S	OXA-48
KDKP-2	>128	R	10	R	16	S	NDM
KDKP-3	1	S	21	S	>128	R	OXA-48
KDKP-4	1	S	26	S	64	R	OXA-48
KDKP-5	1	S	21	S	>128	R	OXA-48
KDKP-6	1	S	21	S	32	S	
KDKP-7	0.5	S	20	S	>128	R	OXA-48
KDKP-8	>128	R	12	R	16	S	OXA-48+NDM
KDKP-9	>128	R	6	R	8	S	OXA-48+NDM
KDKP-10	2	S	21	S	>128	R	OXA-48
KDKP-11	1	S	21	S	32	S	OXA-48
KDKP-12	0.5	S	25	S	>128	R	OXA-48
KDKP-13	8	S	16	S	32	S	OXA-51
KDKP-14	1	S	25	S	64	R	OXA-48
KDKP-15	8	S	17	S	8	S	
KDKP-16	0,5	S	22	S	8	S	OXA-48
KDKP-17	1	S	20	S	>128	R	OXA-48
KDKP-18	4	S	15	S	32	S	KPC
KDKP-19	2	S	20	S	32	S	
KDKP-20	4	S	16	S	8	R	KPC
KDKP-21	1	S	20	S	32	S	
KDKP-22	>128	R	10	R	32	S	OXA-48+ NDM+KPC+
KDKP-23	4	S	18	S	64	R	KPC
KDKP-24	8	S	23	S	>128	R	OXA-48
KDKP-25	4	S	20	S	64	R	OXA-48
KDKP-26	1	S	22	S	64	R	OXA-48+OXA 23/58
KDKP-27	1	S	24	S	16	S	OXA-48
KDKP-28	8	S	17	S	16	S	
KDKP-29	8	S	17	S	64	R	
KDKP-30	1	S	20	S	128	R	OXA48+KPC
KDKP-31	4	S	20	S	32	S	OXA-48
KDKP-32	8	S	17	S	64	R	KPC
KDKP-33	>128	R	10	R	4	S	OXA48+NDM
KDKP-34	2	S	20	S	4	S	OXA48
KDKP-35	>128	R	11	R	32	S	OXA48+NDM
KDKP-36	2	S	22	S	16	S	OXA-48
KDKP-37	4	S	19	S	32	S	KPC
KDKP-38	>128	R	12	R	16	S	OXA-48+NDM
KDKP-39	4	S	19	S	32	S	OXA-48+OXA-51
KDKP-40	4	S	20	S	64	R	OXA-48
KDKP-41	4	S	22	S	32	S	
KDKP-42	2	S	22	S	128	R	OXA-48
KDKP-43	0,5	S	25	S	>128	R	OXA-48

Tablo 4.2 devam. KDKp suşlarının seftazidim-avibaktam (CZA) ve fosfomisin (FOS) duyarlılık ve direnç paterni sonuçları.

	CZA SMD	CZA SMD Yorum	CZA Disk Çapı	CZA Disk Yorum	FOS Agar Dilüsyon	FOS Agar Dilüsyon Yorum	Direnç paterni
KDKP-44	2	S	21	S	32	S	OXA-48
KDKP-45	>128	R	11	R	2	S	OXA-48+NDM
KDKP-46	4	S	21	S	128	R	OXA-48
KDKP-47	1	S	21	S	128	R	OXA-48
KDKP-48	2	S	22	S	64	R	OXA48+KPC
KDKP-49	8	S	20	S	32	S	OXA48+KPC
KDKP-50	4	S	18	S	64	R	OXA48+KPC
KDKP-51	4	S	20	S	>128	R	OXA48+KPC
KDKP-52	1	S	19	S	64	R	OXA48+KPC
KDKP-53	4	S	22	S	32	S	OXA-48
KDKP-54	4	S	20	S	>128	R	OXA-48
KDKP-55	8	S	20	S	16	S	OXA-48+KPC
KDKP-56	2	S	21	S	16	S	OXA-48
KDKP-57	8	S	17	S	32	S	OXA-48+KPC
KDKP-58	8	S	16	S	8	S	KPC
KDKP-59	4	S	20	S	32	S	OXA-48+KPC
KDKP-60	2	S	21	S	32	S	
KDKP-61	4	S	19	S	8	S	OXA-48
KDKP-62	4	S	18	S	16	S	OXA-48
KDKP-63	1	S	25	S	16	S	
KDKP-64	4	S	18	S	32	S	OXA-48
KDKP-65	4	S	18	S	32	S	OXA-48+OXA-51
KDKP-66	2	S	18	S	16	S	OXA-48
KDKP-67	4	S	21	S	32	S	
KDKP-68	4	S	20	S	8	S	
KDKP-69	4	S	20	S	8	S	OXA-48
KDKP-70	2	S	20	S	128	R	OXA-48+OXA-51+KPC
KDKP-71	>128	R	10	R	32	S	OXA-48+NDM
KDKP-72	2	S	21	S	64	R	OXA-48
KDKP-73	4	S	18	S	64	R	KPC
KDKP-74	>128	R	13	R	16	S	OXA-48+NDM+KPC
KDKP-75	2	S	20	S	16	S	OXA-48
KDKP-76	2	S	20	S	32	S	OXA-48
KDKP-77	2	S	21	S	64	R	OXA-48
KDKP-78	4	S	19	S	2	S	KPC
KDKP-79	4	S	20	S	>128	R	OXA-48+KPC
KDKP-80	4	S	19	S	4	S	OXA-48+KPC
KDKP-81	2	S	19	S	>128	R	OXA-48
KDKP-82	4	S	18	S	16	S	OXA-48+KPC
KDKP-83	4	S	19	S	32	S	
KDKP-84	2	S	21	S	16	S	OXA-48
KDKP-85	8	S	22	S	8	S	OXA-48+KPC
KDKP-86	>128	R	12	R	8	S	
KDKP-87	4	S	19	S	16	S	OXA-48
KDKP-88	4	S	21	S	>128	R	
KDKP-89	>128	R	12	R	16	S	OXA-48+NDM
KDKP-90	1	S	21	S	>128	R	OXA-48+KPC

Tablo 4.2 devam. KDKp suşlarının seftazidim-avibaktam (CZA) ve fosfomisin (FOS) duyarlılık ve direnç paterni sonuçları.

	CZA SMD	CZA SMD Yorum	CZA Disk Çapı	CZA Disk Yorum	FOS Agar Dilüsyon	FOS Agar Dilüsyon Yorum	Direnç paterni
KDKP-91	8	S	17	S	64	R	KPC
KDKP-92	4	S	25	S	>128	R	OXA-48+KPC
KDKP-93	8	S	19	S	64	R	
KDKP-94	>128	R	10	R	8	S	NDM
KDKP-95	8	S	16	S	16	S	OXA-48+KPC
KDKP-96	8	S	18	S	8	S	OXA-48+KPC
KDKP-97	2	S	20	S	>128	R	OXA-48
KDKP-98	2	S	18	S	32	S	KPC
KDKP-99	>128	R	8	R	16	S	OXA-48+NDM+KPC
KDKP-100	>128	R	12	R	32	S	OXA-48+NDM

S: Duyarlı

R: Dirençli

SMD: Sıvı mikrodilüsyon

Tablo 4.3. *K. pneumoniae* izolatlarının karbapenem direnç genlerinin dağılımı.

Karbapenemaz geni	n	%
OXA-48	39	39
KPC	10	10
NDM	2	2
OXA-51	1	1
OXA-48+KPC	17	17
OXA-48+NDM	9	9
OXA-48+OXA-51	2	2
OXA-48+OXA-23/58	1	1
OXA-48+NDM+KPC	3	3
OXA-48+OXA-51+KPC	1	1
Karbapenemaz geni saptanmayan	15	15

4.2. KOMBİNASYONDAKİ ANTİBİYOTİKLERİN MİK DEĞERLERİ

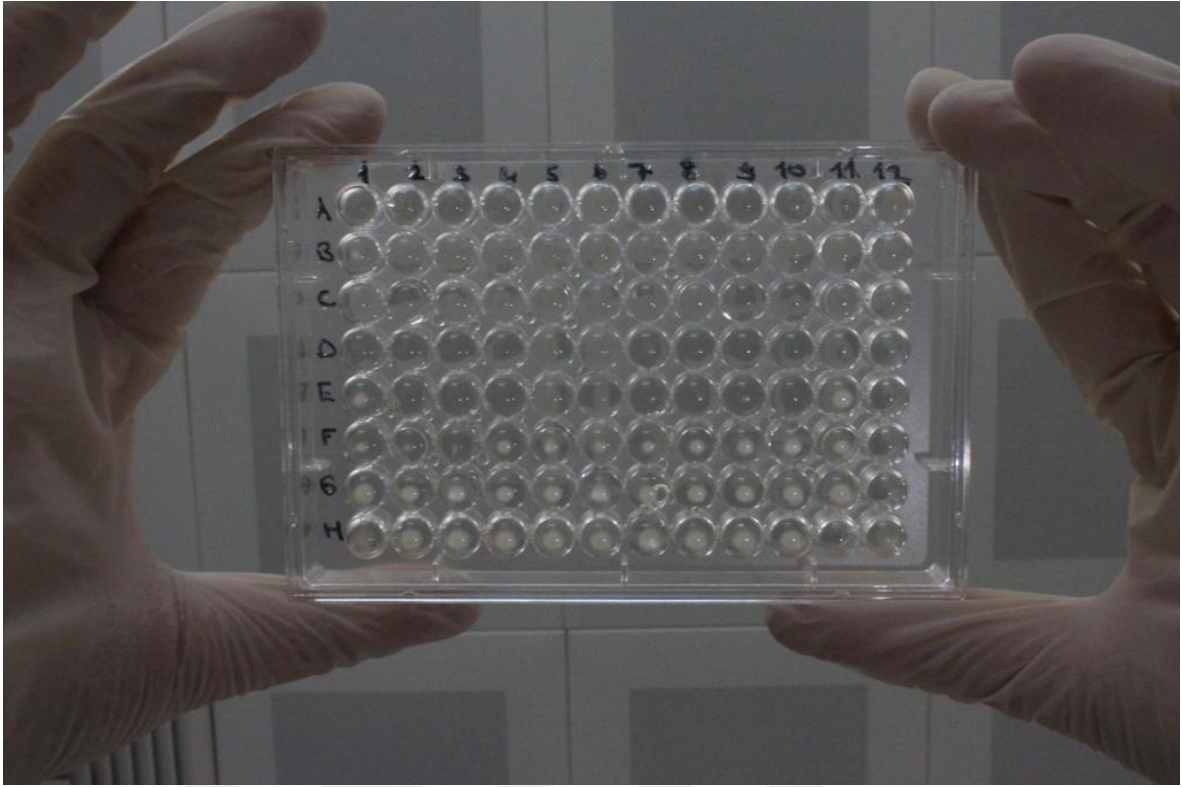
Çalışmaya dahil edilen seftazidim-avibaktam dirençli 15 izolatın meropenem ve fosfomisine karşı duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca bu izolatların fosfomisin antibiyotik duyarlılık testi referans yöntem olan agar dilüsyon testi ile de çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 15 izolat ve kalite kontrol suşu olan *E.coli* ATCC 25922'nin sıvı mikrodilüsyon ile MİK sonuçları Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. İzolatların sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri.

Suş No	Meropenem MİK	Fosfomisin MİK
KDKp-2	16	4
KDKp-8	32	16
KDKp-9	64	8
KDKp-22	64	32
KDKp-33	64	4
KDKp-35	32	4
KDKp-38	32	16
KDKp-45	64	2
KDKp-71	32	8
KDKp-74	64	8
KDKp-86	32	8
KDKp-89	32	32
KDKp-94	16	8
KDKp-99	32	8
KDKp-100	32	8
E.Coli ATCC 25922	0,0156	1

4.3. SEFTAZİDİM-AVİBAKTAM İLE FOSFOMİSİN DAMA TAHTASI TESTİ SONUÇLARI

Seftazidim-avibaktam dirençli olan *K. pneumoniae* izolatlarının referans yöntemler ile elde edilen MİK sonuçlarına göre dama tahtası yöntemi çalışıldı. Bu yöntem ile kombine edilen antibiyotiklerin MİK değerleri, elde edilen MİK değerlerine göre FİK değerleri ve FİK indeksi değerleri hesaplandı. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. 71 nolu KDKp suşuna ait mikroplaka görünümü Şekil 4.3'te, dama tahtası testinin değerlendirilmesi Tablo 4.5'te, seftazidim-avibaktam ve fosfomisine ait MİK($\mu\text{g/ml}$), FİK, kombinasyonun $\Sigma\text{FİK}$ sonuçları ve yorumu Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Tablo 4.7'de dama tahtası testi yapılan tüm suşların seftazidim-avibaktam ve fosfomisin için MİK, FİK, $\Sigma\text{FİK}$ sonuçları ve kombinasyonun yorumu gösterilmiştir.



Şekil 4.3. KDKp 71 nolu izolatin seftazidim-avibaktam ile fosfomisin dama tahtası testinin mikropilaka görünümü.

Tablo 4.5. KDKp 71 nolu izolata ait dama tahtası testinin değerlendirilmesi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											FOS 64	BK
B											FOS 32	
C											FOS 16	
D	İND										FOS 8	
E		ADD	ADD	ADD	ADD	ADD	ADD	ADD	ADD	ADD	FOS 4	
F											FOS 2	
G											FOS 1	
H	CZA 0,5	CZA 1	CZA 2	CZA 4	CZA 8	CZA 16	CZA 32	CZA 64	CZA 128	CZA 256		ÜK

(Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucukları, boyanmamış kuyucuklar üreme olmayan kuyucukları göstermektedir. CZA: seftazidim-avibaktam FOS: osfomisin ÜK: üreme kontrol kuyucuğu, BK: besiyeri kontrol kuyucuğu, ADD: additif, İND: İndiferans)

Tablo 4.6. KDKp 71 nolu izolatin seftazidim-avibaktam (CZA) ve fosfomisin (FOS) MİK(μg/ml), FİK, kombinasyonun ΣFİK sonuçları ve yorumu.

Kuyucuk	CZA MİK	CZA FİK	FOS MİK	FOS FİK	ΣFİK	YORUM
D1	>256	0,0019	8	1	1,0019	İndiferans
E2	>256	0,0039	4	0,5	0,5003	Kısmi Sinerji
E3	>256	0,0078	4	0,5	0,5078	Kısmi Sinerji
E4	>256	0,0156	4	0,5	0,5156	Kısmi Sinerji
E5	>256	0,03125	4	0,5	0,53125	Kısmi Sinerji
E6	>256	0,0625	4	0,5	0,5625	Kısmi Sinerji
E7	>256	0,125	4	0,5	0,625	Kısmi Sinerji

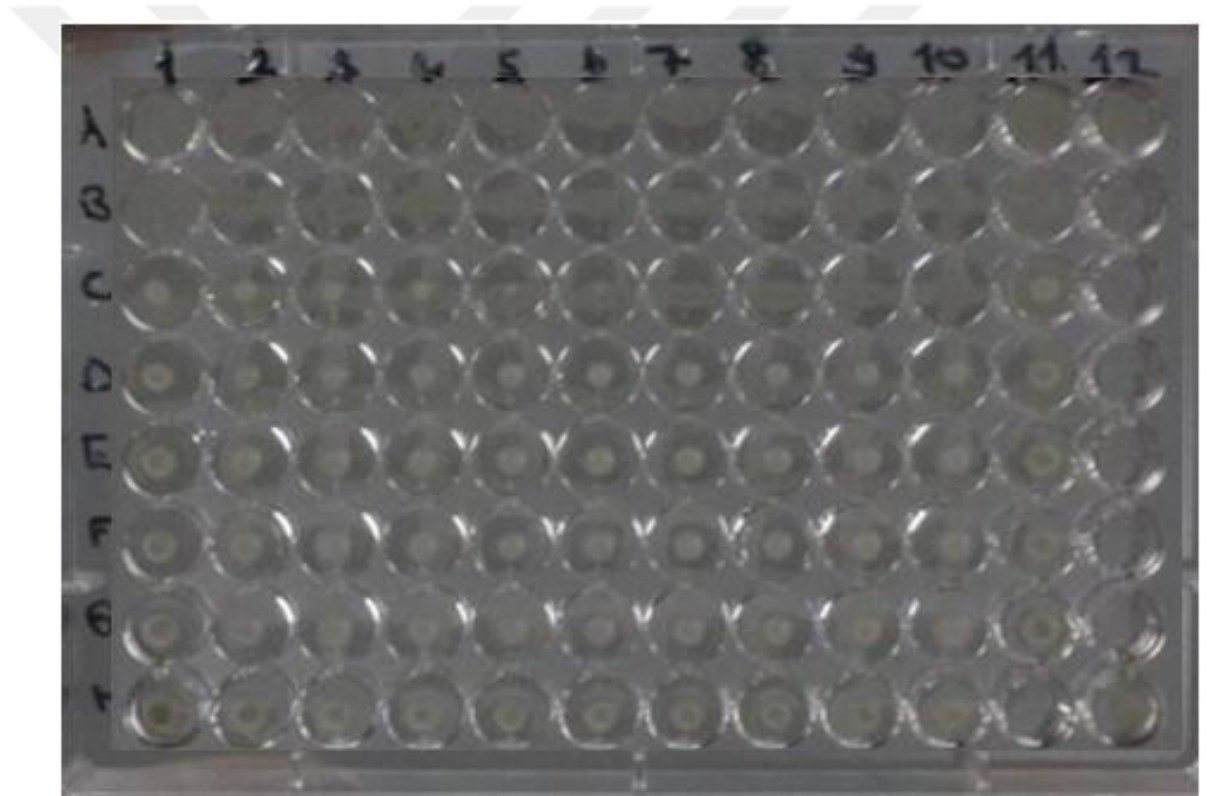
Tablo 4.7. Seftazidim avibaktam (CZA) ve fosfomisin (FOS) için MİK, FİK, ΣFİK sonuçları ve kombinasyonun yorumu.

Suş no	Direnc Geni	Antibiyotikler	MİK değerleri		FİK Değerleri		İn vitro sonuç
			CZA FOS	Kombinasyon	FİK	Σ FİK	
KDKp-2	NDM	CZA FOS	256 4	32 2	0,125 0,5	0,625	Kısmi Sinerji
KDKp-8	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 16	8 16	0,031 1	1,031	İndiferans
KDKp-9	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 8	32 8	0,125 1	1,125	İndiferans
KDKp-22	OXA-48+NDM+KPC	CZA FOS	256 32	1 32	0,003 1	1,003	İndiferans
KDKp-33	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 4	8 4	0,031 1	1,031	İndiferans
KDKp-35	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 4	32 4	0,125 1	1,125	İndiferans
KDKp-38	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 16	16 8	0,0625 0,5	0,562	Kısmi Sinerji
KDKp-45	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 2	4 2	0,015 1	1,015	İndiferans
KDKp-71	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 8	1 4	0,0039 0,5	0,5003	Kısmi Sinerji
KDKp-74	OXA-48+NDM+KPC	CZA FOS	256 8	8 8	0,125 1	1,125	İndiferans
KDKp-86		CZA FOS	256 8	32 4	0,125 0,5	0,625	Kısmi Sinerji
KDKp-89	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 32	32 16	0,125 0,5	0,625	Kısmi Sinerji
KDKp-94	NDM	CZA FOS	256 8	32 8	0,125 1	1,125	İndiferans
KDKp-99	OXA-48+NDM+KPC	CZA FOS	256 8	32 8	0,125 1	1,125	İndiferans
KDKp-100	OXA-48+NDM	CZA FOS	256 8	16 8	0,062 1	1,062	İndiferans
E.Coli ATCC 25922		CZA FOS	0,25 1	0,031 0,0625	0,124 0,0625	0,186	Sinerji

Seftazidim-avibaktam ile fosfomisinin sinerjistik aktivitesine baktığımızda suşların 10'unda (%66) indiferans etki, beşinde (%33) kısmi sinerjistik etki bulunmuştur. Suşlarda antagonistik etki saptanmamıştır.

4.4. SEFTAZİDİM-AVİBAKTAM İLE MEROPENEM DAMA TAHTASI TESTİ SONUÇLARI

Seftazidim-avibaktam dirençli olarak bulunan suşların seftazidim-avibaktam ile meropenem arasındaki sinerjistik aktivitesi, referans yöntemler ile elde edilen MİK sonuçları göz önünde bulundurularak, dama tahtası yöntemi ile çalışılmıştır. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. 33 nolu KDKp suşuna ait mikroluka görünümü Şekil 4.4'te, dama tahtası testinin değerlendirilmesi Tablo 4.8'de, seftazidim-avibaktam ve meropeneme ait MİK ($\mu\text{g/ml}$), FİK, kombinasyonun $\Sigma\text{FİK}$ sonuçları ve yorumu Tablo 4.9'da gösterilmiştir. Tablo 4.10'da dama tahtası testi yapılan tüm suşların seftazidim-avibaktam ve meropenem için MİK, FİK, $\Sigma\text{FİK}$ sonuçları ve kombinasyonun yorumu gösterilmiştir.



Şekil 4.4. KDKp 33 nolu izolatın seftazidim-avibaktam ile meropenem dama tahtası testinin mikroluka görünümü.

Tablo 4.8. KDKp 33 nolu izolata ait dama tahtası testinin değerlendirilmesi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											MEM 128	BK
B	İND	İND	İND	İND	İND						MEM 64	
C						ADD	ADD	ADD	ADD	ADD	MEM 32	
D											MEM 16	
E											MEM 8	
F											MEM 4	
G											MEM 2	
H	CZA 0,5	CZA 1	CZA 2	CZA 4	CZA 8	CZA 16	CZA 32	CZA 64	CZA 128	CZA 256		ÜK

(Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucukları, boyanmamış kuyucuklar üreme olmayan kuyucukları göstermektedir. CZA: Seftazidim-avibaktam MEM: Meropenem ÜK: üreme kontrol kuyucuğu,BK: besiyeri kontrol kuyucuğu, ADD: additif, İND: İndiferans)

Tablo 4.9. KDKp 33 nolu izolatin seftazidim-avibaktam (CZA) ve meropenem (MEM) MİK(µg/ml), FİK, kombinasyonun ΣFİK sonuçları ve yorumu.

Kuyucuk	CZA MİK	CZA FİK	MEM MİK	MEM FİK	ΣFİK	SONUÇ
C6	>256	0,0625	64	0,5	0,562	Kısmi Sinerji
C7	>256	0,125	64	0,5	0,625	Kısmi Sinerji
C8	>256	0,25	64	0,5	0,75	Kısmi Sinerji
C9	>256	<0,5	64	0,5	<1	Kısmi Sinerji
B4	>256	0,0156	64	1	1,0156	İndiferans

Tablo 4.10. Seftazidim-avibaktam (CZA) ve meropenem (MEM) için MİK, FİK, ΣFİK sonuçları ve kombinasyonun yorumu.

Suş no	Direnç Geni	Antibiyotikler	MİK değerleri		FİK Değerleri		İn vitro sonuç
			CZA MEM	Kombinasyon	FİK	Σ FİK	
KDKp-2	NDM	CZA MEM	256 16	16 8	0,0625 0,5	0,5625	Kısmi Sinerji
KDKp-8	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 32	4 16	0,156 0,5	0,515	Kısmi Sinerji
KDKp-9	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 64	8 32	0,031 0,5	0,531	Kısmi Sinerji
KDKp-22	OXA-48+NDM+KPC	CZA MEM	256 64	4 32	0,015 0,5	0,515	Kısmi Sinerji
KDKp-33	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 64	16 32	0,0625 0,5	0,562	Kısmi Sinerji
KDKp-35	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 32	16 16	0,0625 0,5	0,562	Kısmi Sinerji
KDKp-38	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 32	16 16	0,0625 0,5	0,562	Kısmi Sinerji
KDKp-45	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 64	2 32	0,007 0,5	0,507	Kısmi Sinerji
KDKp-71	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 32	16 16	0,0625 0,5	0,5625	Kısmi Sinerji
KDKp-74	OXA-48+NDM+KPC	CZA MEM	256 64	2 32	0,078 0,5	0,507	Kısmi Sinerji
KDKp-86		CZA MEM	256 64	2 32	0,078 0,5	0,507	Kısmi Sinerji
KDKp-89	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 32	32 16	0,125 0,5	0,625	Kısmi Sinerji
KDKp-94	NDM	CZA MEM	256 16	32 8	0,125 0,5	0,625	Kısmi Sinerji
KDKp-99	OXA-48+NDM+KPC	CZA MEM	256 32	8 16	0,031 0,5	0,531	Kısmi Sinerji
KDKp-100	OXA-48+NDM	CZA MEM	256 32	64 16	0,25 0,5	0,75	Kısmi Sinerji
E.Coli ATCC 25922		CZA MEM	0,25 0,0156	0,0625 0,0078	0,25 0,5	0,75	Kısmi Sinerji

Seftazidim-avibaktam ile meropenemin sinerjistik aktivitesine baktığımızda suşların tamamında (%100) kısmi sinerjistik etki bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

K. pneumoniae hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenlerinden biridir. Karbapenemler, AmpC beta-laktamazlar ve genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL'ler) gibi ÇİD *Enterobacterales*'in neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda karbapenemlerin yaygın kullanımı *K. pneumoniae* arasında karbapenem direncinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. *K. pneumoniae*'da karbapenem direnci ilk kez 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde rapor edilmiş ve daha sonra birçok ülkede ortaya çıkmıştır. *K. pneumoniae* karbapenemaz (KPC) olarak adlandırılan karbapenemaz grubu bu enzim *K. pneumoniae* suşlarına karbapenem direnci kazandırmakta ve dünya çapında hızla yayılmaktadır (71). Karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* ciddi enfeksiyonlara ve yüksek mortaliteye neden olan nozokomiyal bir patojendir. Karbapenemazlar genellikle plazmit veya transpozon gibi çok çeşitli direnç genleri içeren aktarılabılır genetik yapılar tarafından eksprese edilir ve bakteriler arasında serbestçe aktarılıp daha sonra tüm dünyaya yayılabilir. Bu nedenle, karbapenemaz kodlayan genler, *K. pneumoniae*'daki antimikrobiyal dirençte önemli bir rol oynamaktadır. Karbapenemaz üreten izolatlarda birçok antibiyotiğin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) yükselmeye devam etmektedir ve artan polimiksin direnci raporlanmaktadır. Artan direnç oranları KDKp'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini giderek zorlaştırmakta ve klinisyenleri kombinasyon tedavisine yönlendirmektedir. Birden fazla antibiyotiğin eş zamanlı uygulanması, farmakodinamik öldürme aktivitesini artırabilir, aktivite spektrumunu genişleterek ve farklı etki mekanizmalarından yararlanarak potansiyel olarak direncin ortaya çıkmasını engelleyebilir veya geciktirebilir (72).

Moleküler teknikler, karbapenemaz genlerinin hızlı ve kesin bir şekilde tanımlanması için duyarlı ve doğru bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemler dirençli suşların doğru bir şekilde tanımlanmasına olanak sağlar. Bu suşlarla enfekte olan hastaların da en doğru ve en uygun tedaviyi almasına, böylece akılcı antibiyotik tedavi uygulamalarına hizmet ederek direnç yayılımının önlenmesine katkı sağlar. Bu amaçla biz de hastanemizde izole etmiş olduğumuz KDKp suşlarının, antibiyotik duyarlılıklarını, direnç paternlerini ve bunların tedavisinde seçenek oluşturabilecek antibiyotik kombinasyonlarını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamıza 100 adet KDKp izolatu dahil edildi. Bu izolatlar en sık yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan (%49) izole edildi. *K. pneumoniae* suşlarının klinik örneklerle

dağılımı incelendiğinde ise en sık kan (%27), trakeal aspirat (%25) ve idrar (%22) numunelerinden izole edildiği belirlendi. Ülkemizde KDKp suşları ile yapılan çalışmalarda da numuneler benzer şekilde en sık yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiş, kan ve solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir (73,74).

Seftazidim-avibaktam sınıf A (*bla_{KPC}*, *bla_{GSBL}*), sınıf C (*bla_{AmpC}*), sınıf D (*bla_{OXA}*) beta-laktamazlara sahip izolatlar karşı in vitro ve in vivo aktivite gösteren ve CRE enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bir ajandır. Seftazidim-avibaktam antibiyotik duyarlılık testi için referans yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemi olup klinik laboratuvarlarda disk difüzyon ve gradient testler daha sık kullanılmaktadır (75). 2015 yılında FDA tarafından klinik kullanım için onaylanan yeni bir antibiyotik olmasına rağmen seftazidim-avibaktam direnç oranları artmaktadır. Çalışmamıza dahil ettiğimiz izolatlarının disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile seftazidim-avibaktam duyarlılık testi yapılmış ve suşların %15'inde seftazidim-avibaktam direnci saptanmıştır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada yoğun bakımda yatan hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında disk difüzyon yöntemi ile seftazidim-avibaktam duyarlılığı çalışılmış ve 37 *K. pneumoniae* izolatının %16,3'ünde (n= 6) direnç saptanmıştır (76). Yapılan bir diğer çalışmada ise ventilatör ilişkili pnömoni tanısı almış hastalardan izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* izolatlarında seftazidim-avibaktam duyarlılığı çalışılmış, *K. pneumoniae* izolatlarında %22,2 oranında seftazidim-avibaktam direnci saptanmıştır (77). Fransa'da 2018 ile 2019 yıllarında solunum yolu enfeksiyonu olan hastaların numunelerinden elde edilen XDR (yaygın ilaca dirençli) *K. pneumoniae* izolatlarında yapılan bir çalışmada sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile seftazidim-avibaktam direnci %19,6 tespit edilmiştir (78). Çin'de yapılan çok merkezli bir çalışmada 458 *Enterobacterales* klinik izolatının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testinde suşların %17,2'sinde seftazidim-avibaktama direnç raporlanmıştır (79). Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur.

Çok ilaca dirençli *Enterobacterales*'deki artış ve bunların tedavisinde seçenek oluşturabilecek antimikrobiyal ajanların yetersizliği sonucunda, araştırmalar fosfomisin gibi eski ajanların tek başına kullanımı ve/veya kombinasyon tedavilerine dahil edilip edilmemesi konusuna yoğunlaşmıştır. Fosfomisin geniş spektrumlu aktiviteye sahip bakterisidal bir ajandır. Ayrıca immünomodülatör aktivitesi ve bakteriyel biyofilmlere karşı aktivitesi de bulunmaktadır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan kılavuzlar (CLSI, EUCAST) fosfomisin duyarlılığı için altın standart olarak agar dilüsyon yöntemini önermektedir. Çalışmaya dahil ettiğimiz suşların fosfomisin duyarlılık testleri agar dilüsyon yöntemi ile çalışılmış ve %38 oranında (n=38) direnç bulunmuştur.

Zarakolu ve ark. 2022 yılında nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole ettikleri 126 adet *E. coli* ve 220 adet *K. pneumoniae* izolatında fosfomisin in vitro aktivitesini agar dilüsyon ve gradient test ile değerlendirmişler ve fosfomisin duyarlılığını karbapenem duyarlı *K. pneumoniae*'da %90,7 ve KDKp'da ise %69,4 olarak tespit etmişlerdir (80).

Yapılan bir başka çalışmada 147 ÇİD veya yaygın ilaca dirençli (XDR) CRE suşlarında agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisin direnci %67,35 olarak raporlanmıştır (81). Yine başka bir çalışmada da 155 KDKp suşunda fosfomisin duyarlılığı agar dilüsyon ile %65,1 ve fosfomisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 32 ve 256 mg/L raporlanmıştır (82). Bizim fosfomisin duyarlılık oranımız (%62) literatür verileriyle uyumludur.

Ampler sınıflamasında Sınıf A, Sınıf C ve Sınıf D beta-laktamazlar beta-laktam ilacın inaktivasyonu için katalitik olarak aktif bir serin içerirken, B sınıfı enzimler katalitik aktiviteleri için metal kofaktör olarak çinko içerirler (27). Avibaktam (beta-laktamaz inhibitörü), beta-laktamazın aktif merkezinde bulunan serin ile kovalent bir bağ oluşturur ve enzim tarafından hidrolize olmayıp aktivitesini inhibe eder. Ancak aktif bölge serin kalıntısının yokluğu nedeniyle metallo-beta-laktamazlara (NDM, VIM, IMP) etkili değildir. NDM pozitif gene sahip izolatlardaki seftazidim-avibaktam direnci beklediğimiz bir bulgudur ve bu izolatlarda seftazidim-avibaktam için MİK seviyeleri (> 128 µg/ml) yüksektir. Karbapenem direncinin saptandığı suşların moleküler paterninin bilinmesi tedavinin doğru ve etkin yapılmasına katkı sağlayacaktır.

Bizim çalışmamıza dahil edilen KDKp izolatların %39'unun OXA-48, %10'unun KPC, %2'sinin NDM ve %1'inin OXA-51 olduğu tespit edilmiştir.

Ülkemizde ilk defa 2014 yılında saptanan ve sınıf A da yer alan KPC direnç geni ve Sınıf D'de yer alan ve ilk olarak ülkemizde 2001'de saptanan OXA-48 geni karbapenem direncinden yaygın bir şekilde sorumlu tutulmaktadır. Yine ülkemizde ilk kez 2008 yılında saptanan ve Yeni Delhi metallo-beta-laktamaz-1 (NDM-1) olarak adlandırılan ve beta-laktamaz inhibitörlerinin de hidrolizine neden olan karbapenemazlar tedavide başarısızlıklara neden olmaktadır. Bu enzimler bazı suşlarda tek başına bulunurken bazı suşlarda birden fazla genin birlikte bulunduğu gözlenmektedir.

2012-2020 yılları arasını kapsayan bir çalışmada 291 adet KDKp suşunda karbapenem direnç genleri araştırılmış ve suşların %38,8'inde OXA-48, %11'inde NDM-1, %2,4'ünde KPC ve %1,7'sinde VIM geninin saptandığı raporlanmıştır (83). 2014 yılında ülkemizden 18 merkezin katıldığı bir çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz tipleri, VIM, IMP, NDM, KPC ve OXA-48 karbapenemaz genlerine özgül primerler kullanılarak multipleks-polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılmıştır (84). 136 izolatta tek başına OXA-48 geni suşların %84,6'sında, NDM geni suşların %6,3'ünde, VIM geni suşların

%2,8'inde ve IMP geni suşların %1,4'ünde tespit edilmiştir. Kutlu ve ark.'nın yaptığı çalışmada 2010-2014 yılları arasında CRE izolatlarında karbapenemaz genlerinin dağılımı araştırılmıştır (85). 112 adet izolatın %74,1'inin OXA-48, %1,8'inin NDM, %6,3'ünün hem OXA-48 hem de VIM, %8'inin de VIM taşıdığı raporlanmıştır. Üçüncü basamak bir devlet hastanesinde 49 adet KDKp klinik izolatta *bla_{KPC}* geni araştırılmıştır ve bir izolatta pozitiflik saptanmıştır (86). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada 48 CRE izolatının %14,7'sinde KPC geni raporlanmıştır (87). Ülkemizde üçüncü basamak bir hastanede yatan hastaların enfeksiyon bölgelerinden ve rektal sürüntülerinden elde edilen *K. pneumoniae* izolatlarında PCR ile karbapenemaz kodlayan genler araştırılmıştır. İzolatların %90,3'ünde OXA-48, %6,5'inde NDM-1 tespit edilmiştir (88). Malezya'da üçüncü basamak bir hastanede 63 KDKp izolatında yapılan çalışmada baskın karbapenemaz geni olarak *bla_{OXA-48}* (%63,5) ve ardından *bla_{NDM}* (%36,5) tespit edilmiştir (89). Mısır'da bir hastanede 160 *K. pneumoniae* klinik izolatında multipleks PCR yöntemi ile karbapenem direnç profili incelenmiştir. İzolatların %15,5'inde OXA-48, %15'inde VIM, %7,5'inde IMP, %4'ünde KPC, %3,8'sinde NDM tespit edilmiştir (90).

Ülkemizde Budak S. ve ark.'nın sunduğu bir olguda yoğun bakım ünitesinde yatan bir hastanın trakeal aspirat kültüründen OXA-51 geni taşıyan *K. pneumoniae* suşu izole edildiği raporlanmıştır (91). Çalışmamızda ülkemizdeki literatür verileri ile uyumlu olarak Türkiye'de halen en yaygın karbapenemaz direnç geni olan OXA-48 en sık tespit edilmiştir. Tek direnç geni bulunan izolatlarda ikinci sıklıkta KPC geni tespit edilmiştir. Yine literatür verileri ile uyumlu olarak NDM geni ülkemizde giderek yaygınlaşmakta ve OXA-23/58, OXA-51, VIM, IMP geni göreceli olarak daha az saptanmaktadır. Bir üniversite hastanesinde 2017-2019 yılları arasında klinik örneklerden izole edilen 93 adet karbapenem ve kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşunun karbapenem ve kolistin direncinin moleküler karakterizasyonu araştırılmıştır. İzolatların tümünde OXA-48, ikisinde OXA-48 ve NDM tespit edilirken, IMP, VIM tespit edilmemiştir (92). Ülkemizde nadiren saptanan IMP ve VIM genleri çalışmamızda tespit edilmemiştir.

Çalışmaya dahil edilen KDKp izolatlarının %17'sinin OXA-48+KPC, %9'unun OXA-48+NDM, %3'ünün OXA-48+NDM+KPC, %2'sinin OXA-48+OXA-51, %1'inin OXA-48+OXA-23/58, %1'inin OXA-48+OXA-51+KPC olmak üzere 33'ünde birden fazla direnç geni taşıdığı tespit edilmiştir.

2012-2020 yılları arasını kapsayan bir çalışmada 291 adet KDKp suşunda karbapenem direnç genleri araştırılmıştır. Suşların 123'ünde OXA-48+NDM, ikisinde OXA-48+KPC, ikisinde OXA-48+VIM, bir adet NDM+IMP olarak birden fazla direnç geni tespit etmişlerdir (83). 2014 yılında ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae*

izolatlarında multipleks-polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile karbapenemaz genleri araştırılmıştır. İzolatların %2,1'inde OXA-48 + NDM, %2,1'inde OXA-48+VIM, %0,7'sinde VIM + NDM olarak toplam 7 izolatta iki gen birarada bulunmuştur (84). Kutlu ve ark.'nın 112 adet CRE izolatında karbapenemaz genlerinin araştırdığı bir çalışmada izolatların %6,3'ünde OXA-48+VIM genleri birlikte tespit edilmiştir (85). Tekintaş ve ark. 2015-2016 yılları arasında izole edilen 54 adet KDKp izolatın 19'unda (%35,2) OXA-48+NDM genlerini birlikte bulmuşlardır (93). Ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan bir çalışmada 74 adet *K. pneumoniae* ve 15 adet *E. coli*'de karbapenemaz genlerini araştırılmıştır. Altı izolatta (%6,7) OXA-48 ile NDM, bir izolatta ise (%1,2) OXA-48, VIM ve IMP-1 gen birlikteliği tespit edilmiştir. Yazarlar *K. pneumoniae*'da OXA-48, VIM ve IMP-1 genlerinin birlikteliğini raporlayan ilk çalışma olduğunu beyan etmişlerdir. (94). Çalışma verilerimize göre, literatürle uyumlu olarak, *K. pneumoniae* izolatlarında saptamış olduğumuz birden fazla karbapenemaz geni taşıyan suşların oranının fazla olması (%33) dikkat çekicidir.

Çalışmamızda test ettiğimiz KDKp suşlarının 15'inde test edilen direnç genleri (KPC, OXA-48, NDM-1, VIM, IMP, OXA-51, OXA-23/58) saptanamamıştır. Bu suşlardaki karbapenem direnci, test edilmeyen direnç genleri (SIM, GIM, SME, IMI vb.) veya porin kaybı gibi farklı direnç mekanizmalarından kaynaklanıyor olabilir.

Dirençli *K. pneumoniae*'ya bağlı enfeksiyonlarda fosfomisin, bazı aminoglikozidler, rifampin ve karbapenemler kombinasyon tedavilerinin bir parçası olarak kullanılmaktadır. Meropenem ciddi bakteriyel enfeksiyonların ampirik tedavisi için sıkça kullanılan geniş spektrumlu karbapenem grubu antibakteriyel bir ajandır. Karbapeneme dirençli suşlarda karbapenemaz varlığına rağmen, meropenemin yüksek dozlarda ve uzun süre infüzyonla verilmesi bakterisidal etki sağlamaktadır.

Çalışmamızda seftazidim-avibaktam dirençli olan 15 izolatın tamamına karşı seftazidim-avibaktam ve meropenem kombinasyonunun kısmi sinerjistik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Literatürde in vitro çalışmalar genellikle seftazidim-avibaktam duyarlı izolatlar ile yapılmış ve çoğunlukla seftazidim-avibaktam ile meropenem ile yapılan çalışmalarda sinerjistik etki bulmuşlardır.

Gaibani ve ark. seftazidim-avibaktam 'a duyarlı (n= 11) ve dirençli (n = 2) olmak üzere 13 KPC üreten *K. pneumoniae* izolatında seftazidim-avibaktam ile altı antimikrobiyal ajanın (ertapenem, imipenem, meropenem, gentamisin, tigesiklin ve siprofloksasin) in vitro etkileşimlerini gradient test ile değerlendirmişlerdir (95). Tüm KPC-Kp izolatlarında seftazidim-avibaktam ile imipenem ve meropenem arasında sinerjistik etki olduğu bulunmuştur. Özellikle, seftazidim-avibaktamın meropenem ve imipenem için MİK değerlerinin tüm suşlarda sınır değerlerinin altına düştüğü de raporlanmıştır.

Ülkemizde Köle ve ark. 42 KDKp izolatında seftazidim-avibaktam, meropenem ve kolistin antibiyotiklerinin in vitro etkileşimlerini dama tahtası (checkerboard) ve zamana bağlı öldürme (time-kill) yöntemleri ile değerlendirmiştir (96). İzolatların seftazidim-avibaktam ve meropenem ile seftazidim-avibaktam ve kolistin kombinasyonlarında %97,6'sında sinerjik etki, meropenem ile kolistin kombinasyonunda ise %50 sinerjik etki tespit etmişlerdir. Nath ve ark. 4 adet KPC üreten *K. pneumoniae* izolatına karşı polimiksin B, seftazidim-avibaktam, meropenem, rifampisin ve amikasinin tek başına ve kombinasyon halinde aktivitesini incelemek için Time Kill yöntemi ve *Galleria mellonella* in vivo modeli kullanmışlardır (97). Seftazidim-avibaktam MİK değerleri sınır değerlere yakın izolatlarda seftazidim-avibaktamın amikasin veya meropenem ile kombine edildiğinde in vitro olarak sinerjik etki saptanmıştır.

Çalışmamızda 15 suşun 14 tanesi NDM geni taşıyordu. Ancak birinde herhangi bir gen tespit edilememişti. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz veriler, NDM geni taşıyan suşların tamamının seftazidim-avibaktam ve meropenem kombinasyonunda saptanan kısmi sinerjistik etkiden dolayı, ciddi KDKp enfeksiyonlarında bir tedavi seçeneği olarak akılda tutulması gerektiği kanaati oluşturmuştur.

Bakteriyel direncin dünya çapında yaygınlığının artmasıyla birlikte, eski bir antibiyotik olan fosfomisin'in yeniden kullanımı gündeme gelmiştir. Fosfomisin, fosfoenolpiruvatın bir analogu gibi davranıp hücre duvarı sentezini erken bir aşamada geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Bu etki mekanizması sayesinde diğer antibiyotik sınıflarıyla çapraz direnç daha az meydana gelir. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkinlik sağlar. Ayrıca ÇİD bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kombine tedavi seçenekleri arasında büyük önem kazanmaktadır (98).

Çalışmamızda 15 seftazidim-avibaktam dirençli KDKp izolatının seftazidim-avibaktam ve fosfomisin dama tahtası testinde 10 (%66) izolatta indifferans etki ve beş (%33) izolatta kısmi sinerjistik etki bulundu. Çalışmada antagonistik etki tespit edilmedi.

Uzuner ve ark., KDKp izolatlarında fosfomisin direncini ve fosfomisin'in amikasin, meropenem, imipenem ile sinerjistik etkisini agar dilüsyon yöntemi ile araştırmışlardır. İzolatların %97,2'sini fosfomisine, %69'unu amikasına, %84,5'ini meropeneme ve %94,4'ünü imipeneme dirençli bulmuşlardır. Antibiyotiklerin fosfomisin ile kombinasyonu yapıldığında suşların %45'inde fosfomisin-meropenem, %25,4'ünde fosfomisin-amikasin, %21,1'inde fosfomisin-imipenem arasında sinerjik etki tespit etmişlerdir (99).

Temoçin ve ark.'ı intravenöz fosfomisin'in (IV) klinik kullanımını araştırmışlardır (100). 30 hasta (%83,3) üst üriner sistem enfeksiyonu, üç hasta (%8,3) alt solunum yolu enfeksiyonu, iki hasta (%5,5) kemik-eklem enfeksiyonu ve bir hasta (%2,7) ise kan dolaşımı enfeksiyonu sebebiyle fosfomisin (IV) kullanmıştır. Fosfomisin (IV) tedavisi alan hastalarda etken %75

oranında *K. pneumoniae*, %19,4 oranında *P.retgerii* ve %5,6 oranında *E. coli* saptanmıştır. Fosfomisin (IV) kullanan hastaların %72,7'sinde mikrobiyolojik kür saptanmıştır. Bu hastaların yarısında fosfomisin diğer antibiyotiklerle kombine (meropenem, imipenem, amikasin ve gentamisin) olarak tedavide kullanılmıştır. Fosfomisinin tek başına ve kombinasyon halinde kullanımı arasında mikrobiyolojik yanıt, yan etki ve 14 günlük mortalite açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Önal ve ark. üçüncü basamak bir merkezde KDKp'nın neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonu veya ventilatör ilişkili pnömoni enfeksiyonlarında fosfomisin (IV) kombinasyon tedavilerini retrospektif olarak değerlendirmişlerdir (101). Çalışmada 62 hastada fosfomisinin bir veya iki antibiyotik ile kombinasyon tedavilerinin 14 ve 30 günlük mortalite açısından anlamlı fark tespit edilemediği raporlanmıştır.

Ülkemizde Adaleti ve ark.'ı ÇİD Gram negatif basillerde meropenem/fosfomisin kombinasyonunun in vitro etkililiğini agar dilüsyon yöntemi ile araştırmışlardır. Bu kombinasyonun sinerji ve parsiyel sinerjik etkisi *E.coli*'de %83.3 (5/6) ve *K. pneumoniae*'da %100 (8/8), *A.baumannii*'de %100 (6/6) ve *P.aeruginosa*'da %25 (1/4) olarak raporlanmıştır (102).

Romanelli ve ark. 10 adet KPC üreten *K. pneumoniae* klinik izolatında seftazidim-avibaktamın tek başına ve fosfomisin ve karbapenemlerle (imipenem, meropenem, ertapenem) kombinasyonunun in vitro etkileşimini gradient test yöntemiyle değerlendirmişler ve seftazidim-avibaktam ve karbapenemler arasında sinerjistik etki (FİKİ <0,5) saptanırken seftazidim-avibaktam'ın fosfomisin ile kombinasyonunda kısmi sinerjistik etki (FİKİ 0,58-1,17) tespit etmişlerdir (103).

Literatürdeki çoğu çalışmanın seftazidim-avibaktam duyarlı olan izolatlarda yapıldığı görülmektedir. Çalışmamızda seftazidim-avibaktam dirençli izolatlar üzerine seftazidim-avibaktam ile fosfomisin kombinasyonunun sinerjistik etkisi araştırılmış olup %33 oranında kısmi sinerjistik etki saptanmıştır. Bu sonuç KDKp izolatlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda fosfomisinin seftazidim-avibaktam ile kombine edilerek sınırlı tedavi seçenekleri arasında tedavinin bir parçası olarak kullanılabileceği kanaati oluşturmaktadır.

5.1. Tezin Kısıtlılıkları

Çalışmamıza yaklaşık dört yıllık bir dönemde 100 suş dahil edilebilmiştir. Daha fazla suş dahil edilmesi amaçlanmış ancak, salgın (COVİD) döneminin de etkisiyle, hedefe ulaşamamıştır.

Çalışmaya dahil etmiş olduğumuz suşların birbirleriyle olan klonal ilişkisi araştırılamamıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik durumları ve risk faktörleri ile ilgili veri sağlanamamıştır. Çalışmadan elde edilen verilerin bu parametreler ile birlikte tartışılması mümkün olamamıştır.

Çalışmamızda seftazidim-avibaktam ve fosfomisin ile seftazidim-avibaktam ve meropenem kombinasyonunun etkinliği sadece dama tahtası yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. İn vitro sinerjinin değerlendirilmesi için altın standart bir yöntem olan Time kill yöntemi çalışma bütçesinin kısıtlılığı ile birlikte zaman alıcı ve emek yoğun olması nedeniyle çalışılamamıştır.



6. SONUÇLAR

1. Çalışma döneminde 100 adet KDKp izolatu toplanmıştır.
2. Suşların %49'u yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir.
3. Suşlar en fazla kan, idrar ve trakeal aspirat numunelerinden izole edilmiştir.
4. Bu isolatların %15'i seftazidim-avibaktama, tamamı meropeneme, %38'i fosfomisine dirençli bulunmuştur.
5. Hastanemizde KDKp suşlarında en yaygın karbapenemaz tipinin OXA-48 (%39), ikinci sıklıkta OXA-48+KPC (%17) olduğu bulunmuştur.
6. Çalışmaya dahil edilen KDKp isolatlarının %39'unda *bla*_{OXA-48}, %10'unda *bla*_{KPC}, %2'sinde *bla*_{NDM}, %1'inde *bla*_{OXA-51} tespit edilmiştir.
7. Suşların %17'sinde *bla*_{OXA-48+KPC}, %9'unda *bla*_{OXA-48+NDM}, % 2'sinde *bla*_{OXA-48+OXA-51}, % 1'inde *bla*_{OXA-48+OXA 23/58}, % 1'inde *bla*_{OXA-48+OXA-51+KPC} %3'ünde *bla*_{OXA-48+NDM+KPC} olmak üzere birden fazla karbapenemaz geni saptanmıştır.
8. Çalışmaya dahil edilen suşlerin hiç birinde *bla*_{VIM} ve *bla*_{IMP} tespit edilememiştir.
9. Çalışmada seftazidim-avibaktam dirençli isolatlarda seftazidim-avibaktam ile meropenem kombinasyonunun sinerji testi dama tahtası yöntemiyle çalışılmış ve %100 oranında kısmi sinerjistik etki saptanmıştır.
10. Çalışmada seftazidim-avibaktam dirençli isolatlarda seftazidim-avibaktam ile fosfomisin kombinasyonunun sinerji testi dama tahtası yöntemiyle çalışılmış ve %33 oranında kısmi sinerjistik etki saptanmıştır.
11. Çalıştığımız kombinasyonlardan elde ettiğimiz in vitro sonuçlarımız KDKp'yı tedavi etmek için en uygun kombinasyon tedavisinin seftazidim-avibaktam ile meropenem olabileceğini düşündürmektedir.
12. Çalışmamızın önemli bir kısıtlılığı çalışmaya alınan bakterilerin izole edildiği hastalara ait klinik veriler sağlanamadığından dolayı tartışmamız sadece in vitro çalışmalardan elde edilen verilerle yapılabilmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda hastalara ait risk faktörlerinin de değerlendirmeye alınması daha efektif ve kullanılabilir sonuçların sağlanmasına katkı sağlayacaktır.
13. Çalışmaya dahil etmiş olduğumuz suşların birbirleriyle olan klonal ilişkisi araştırılamamıştır. Daha sonraki araştırmalarda bu ilişkinin de belirlenmesi hastane enfeksiyonlarını kontrol altında tutmaya ve bu tip hastaların tedavisinin etkin bir şekilde

yapılmasına olanak sağlayacaktır.

14. Çok ilaca dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında son tedavi seçenekleri olan antibiyotiklere bile direnç gelişmektedir. Direnç gelişiminin önüne geçmek için akılcı antibiyotik kullanımına dikkat edilmeli ve enfeksiyon kontrol önlemlerine sıkı bir şekilde uyulmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Reyes J, Aguilar AC, Caicedo A. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Microbiology Key Points for Clinical Practice. *Int J Gen Med*. 2019;12:437-46.
2. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(1):15-21.
3. Ma Y, Wu X, Li S, Tang L, Chen M, An Q. Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov. *Research in Microbiology*. 202;172(6):103851.
4. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11(4):589-603.
5. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. in: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
6. Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. The Genus *Klebsiella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. New York, NY: Springer; 2006. p. 159-96.
7. Dong N, Yang X, Chan EWC, Zhang R, Chen S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine*. 2022; 79: 103998.
8. De Jesus MB, Ehlers MM, Dos Santos RF, Kock MM. Review - Understanding β -lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae*. In: *Antimicrobial Resistance - An Open Challenge*. IntechOpen; 2015. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/49539> (Erişim Tarihi: 24 Ekim 2023)
9. Huang X, Li X, An H, et al. Capsule type defines the capability of *Klebsiella pneumoniae* in evading Kupffer cell capture in the liver. *PLoS Pathog*. 2022;18(8):e1010693.
10. Rendueles O. Deciphering the role of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* during pathogenesis: A cautionary tale. *Molecular Microbiology*. 2020;113(5):883.
11. Cruz-Córdova A, Esteban-Kenel V, Espinosa-Mazariego K, et al. Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains associated with their persistence in the hospital environment. *Bol Med Hosp Infant Mex* (English version). 2014;71(1):15-24.
12. Bulati M, Busà R, Carcione C, et al. *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharides Serotype O2afg Induce Poor Inflammatory Immune Responses Ex Vivo. *Microorganisms*. 2021;9(6):1317.
13. Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia. *mBio*. 2016;7(5):e01397-16.
14. Namikawa H, Niki M, Niki M, et al. Siderophore production as a biomarker for *Klebsiella pneumoniae* strains that cause sepsis: A pilot study. *J Formos Med Assoc*. 2022;121(4):848-855.
15. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun*. 2008;76(9):4055-4065.
16. Chen IR, Lin SN, Wu XN, Chou SH, Wang FD, Lin YT. Clinical and Microbiological Characteristics of Bacteremic Pneumonia Caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:903682.
17. Vergadi E, Bitsori M, Maraki S, Galanakis E. Community-onset carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infections in infancy following NICU hospitalisation. *J Pediatr Urol*. 2017;13(5):495.e1-495.e6.
18. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):682-707.
19. Li D, Huang X, Rao H, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia mortality: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1157010.
20. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, et al. Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1317-1324.
21. Ku YH, Chuang YC, Chen CC, et al. *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance. *Sci Rep*. 2017;7(1):6634.

22. Chung CY, Wong ES, Liu CCH, Wong MOM, Li KKW. Clinical features and prognostic factors of *Klebsiella* endophthalmitis-10-year experience in an endemic region. *Eye (Lond)*. 2017;31(11):1569-1575.
23. Sridhar J, Flynn HW Jr, Kuriyan AE, Dubovy S, Miller D. Endophthalmitis caused by *Klebsiella* species. *Retina*. 2014;34(9):1875-1881.
24. Zhang H, Zhang G, Yang Y, et al. Antimicrobial resistance comparison of *Klebsiella pneumoniae* pathogens isolated from intra-abdominal and urinary tract infections in different organs, hospital departments and regions of China between 2014 and 2017. *J Microbiol Immunol Infect*. 2021;54(4):639-648.
25. Aminul P, Anwar S, Molla MMA, Miah MRA. Evaluation of antibiotic resistance patterns in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Bangladesh. *Biosafety and Health*. 2021;03(06):301-306.
26. Li Y, Kumar S, Zhang L, Wu H, Wu H. Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Open Med (Wars)*. 2023;18(1):20230707.
27. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-458.
28. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;60(3):470-82.
29. Aires-de-Sousa M, Ortiz de la Rosa JM, Gonçalves ML, Pereira AL, Nordmann P, Poirel L. Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Hospital, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(9):1632-8.
30. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*. 2020;8(1):13.
31. Bedenić B, Sardelić S. Carbapenemases. *Growing and Handling of Bacterial Cultures*. IntechOpen; 2019. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76282>
32. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(3):373-83.
33. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D β -Lactamases: Are They All Carbapenemases? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(4):2119.
34. Neidhöfer C, Buechler C, Neidhöfer G, et al. Global Distribution Patterns of Carbapenemase-Encoding Bacteria in a New Light: Clues on a Role for Ethnicity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:659753.
35. Effah CY, Drokow EK, Agboyibor C et al. Evaluation of the Therapeutic Outcomes of Antibiotic Regimen Against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12.
36. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist*. 2012;5:133-41.
37. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5873-84.
38. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. Metallo- β -Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(10):10.1128/aac.00397-20.
39. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Who, When, and How? *Virulence*. 2016;8(4):417-26.
40. Mohapatra S, Kumar A, Bir R, et al. Use of Ertapenem as a Marker for Detection of Carbapenem Resistance for *Enterobacteriaceae*. *J Clin of Diagn Res*. 2020; 14(12):DC05-DC08.
41. Haldorsen B, Giske CG, Hansen DS, et al. Performance of the EUCAST disc diffusion method and two MIC methods in detection of *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to meropenem: the NordicAST CPE study. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73(10):2738-47.
42. He Q, Chen W, Huang L, et al. Performance evaluation of three automated identification systems in detecting carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15: 40.
43. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(11):e01140-18.
44. Rabaan AA, Eljaaly K, Alhumaid S, et al. An Overview on Phenotypic and Genotypic Characterisation of Carbapenem-Resistant *Enterobacterales*. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(11):1675.

45. Bassetti M, Peghin M. How to manage KPC infections. *Ther Adv Infect Dis*. 2020;7: 1-12.
46. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012;11: 32.
47. Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol*. 2019;10: 80.
48. Rojas LJ, Salim M, Cober E, et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clin Infect Dis*. 2017;64(6):711-8.
49. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(2):321-347.
50. Bassetti M, McGovern PC, Wenisch C, et al. Clinical response and mortality in tigecycline complicated intra-abdominal infection and complicated skin and soft-tissue infection trials. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;46(3):346-50.
51. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2018;78(6):675-92.
52. Wang Y, Wang J, Wang R, Cai Y. Resistance to ceftazidime–avibactam and underlying mechanisms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020; 22:18-27.
53. Bhowmick T, Weinstein MP. Microbiology of Meropenem-Vaborbactam: A Novel Carbapenem Beta-Lactamase Inhibitor Combination for Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Infections. *Infect Dis Ther*. 2020;9(4):757-67.
54. Mauri C, Maraolo AE, Di Bella S, Luzzaro F, Principe L. The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of In Vitro Studies and Clinical Cases. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(8):1012.
55. McCreary EK, Heil EL, Tamma PD. New Perspectives on Antimicrobial Agents: Cefiderocol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(8):e02171-20.
56. Zou X, Jin S, Chen L et al. Antibacterial Activity of Eravacycline Against Carbapenem-Resistant Gram-Negative Isolates in China: An in vitro Study. *Infect Drug Resist*. 2023;16: 2271-9.
57. Jacobs MR, Good CE, Hujer AM, et al. Study of the In Vitro Activity of Plazomicin against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(5):e00012-20.
58. Yang TY, Hsieh YJ, Kao LT, et al. Activities of imipenem-relebactam combination against carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae* in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2022;55(1): 86-94.
59. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-9.
60. Tenover FC. Antibiotic Susceptibility Testing. Schaechter M, (ed). 3rd ed. *Encyclopedia of Microbiology (Oxford):Academic Press*; 2009. p. 67-77.
61. Evangelista, A.T., Karlowsky, J.A. Automated and Manual Systems for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria. In *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2016; pp. 414–432
62. Tängdén T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):149-53.
63. Karki R, Lamichhane S, Basnet BB, Dahal A, Awal BK, Mishra SK. In vitro Antimicrobial Synergy Testing of Extensively Drug-Resistant Clinical Isolates at an Organ Transplant Center in Nepal. *Infect Drug Resist*. 2021;14: 1669-77.
64. Soltani R, Khalili H, Shafiee F. Double-disk synergy test for detection of synergistic effect between antibiotics against nosocomial strains of staphylococcus aureus. *J Res Pharm Pract*. 2012;1(1):21-24.
65. Okoliegbe IN, Hijazi K, Cooper K, Ironside C, Gould IM. Antimicrobial Synergy Testing: Comparing the Tobramycin and Ceftazidime Gradient Diffusion Methodology Used in Assessing Synergy in Cystic Fibrosis-Derived Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(8):967.
66. Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, et al. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54(11): 4678-83.

67. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints. (Erişim Tarihi: 24 Ekim 2023)
68. Wayne, PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2020.
69. EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clin Microbiol Infect. 2000 Sep;6(9):509-15.
70. Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. s. pp: 5.12.1-5.12.23.
71. Spagnolo AM, Orlando P, Panatto D, Perdelli F, Cristina ML. An overview of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control measures. Reviews and Research in Medical Microbiology. 2014;25(1):7.
72. Jacobs DM, Safir MC, Huang D, Minhaj F, Parker A, Rao GG. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):76.
73. Hoşbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Bedir O, Gümral R, Albay A. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarına Karşı Seftazidim-avibaktam ve Kolistinin In Vitro Etkinliği. Mikrobiyol Bul. 2022;56(2):218-29.
74. Mermutluoğlu Ç, Çiftçi EZ, Özcan N, Dayan S. Investigation of Antibiotic Susceptibilities in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Clinical Samples: A Four-Year Analysis in a Comprehensive Healthcare Facility. Van Med J. 2023;30(4):374-81.
75. Isler B, Vatansever C, Özer B, et al. Comparison of ceftazidime-avibactam susceptibility testing methods against OXA-48-like carrying *Klebsiella* blood stream isolates. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2022;104(1):115745.
76. Şenol G, Demirel M, Gündüz A, Atay T, Biçmen C, Yıldırım S. Ceftazidime-Avibactam Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained from Intensive Care Patients. Journal of Izmir Chest Hospital 2023;37(2):84-88.
77. Arıcı N, Kansak N, Adaleti R ve ark. Ventilator İlişkili Pnömoni Etkeni Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Seftazidim-Avibaktamın In Vitro Etkinliği. ANKEM Derg. 2023;37(2):57-64
78. Kempf M, Arhin FF, Stone G, Utt E. Ceftazidime-avibactam activity against Gram-negative respiratory isolates collected between 2018 and 2019. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2022;31: 239-47.
79. Han R, Yang X, Yang Y, et al. Assessment of Ceftazidime-Avibactam 30/20-µg Disk, Etest versus Broth Microdilution Results When Tested against Enterobacterales Clinical Isolates. Microbiol Spectr. 10(1):e01092-21.
80. Zarakolu P, Eser ÖK, Otlu B, et al. In-vitro activity of fosfomycin against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates and frequency of OXA-48, NDM, KPC, VIM, IMP types of carbapenemases in the carbapenem-resistant groups. Journal of Chemotherapy. 2022;34(4):235-40.
81. Süzük Yıldız S, Kaşkatepe B, Şimşek H, Sarıgül FM. High rate of colistin and fosfomycin resistance among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Turkey. Acta Microbiol Immunol Hung. 2019;66(1):103-12.
82. Altinkanat Gelmez G, Can B, Ertürk Sengel B, Korten V, Soyletir G. Determination of fosfomycin susceptibility in carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains isolated prior to clinical use of the intravenous formulation in Turkey. Marmara Medical Journal. 2021;34(2):127-31.
83. Telli M. *Klebsiella pneumoniae* Klinik Suşlarında, 2012-2020 Yılları Arasında Karbapenem Direnç Oranlarındaki Değişimin ve Direnç Genlerinin Araştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(2):95-102.
84. Çakar A, Akyön Y, Gür D, et al. [Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2014 in Turkey]. Mikrobiyol Bul. 2016;50(1):21-33.
85. Kutlu HH, Us E, Tekeli A. Bir Üniversite Hastanesinde 2010-2014 Yılları Arasında İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Türlerinin Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması ve Moleküler Epidemiyolojisinin Belirlenmesi. Mikrobiyol Bul. 2018;52(1):1-12.
86. Özyazici G, Özkaya E, Kaya H, et al. Investigation of blaKPC Gene by PCR in Carbapenem Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Turkey. Mediterr J Infect Microb Antimicrob. 2019; 8: 3.

87. Okalin ŞŞ, Sarı Kaygısız AN, Ergon MC, Öktem İMA. Investigation of Carbapenemase Genes in Carbapenem Resistant *Enterobacterales* Isolates: First KPC Report From Dokuz Eylül University Hospital. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2021;51(4):375-81.
88. Celikbilek N, Unaldi O, Kirca F, Gozalan A, Acikgoz ZC, Durmaz R. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Species Isolated From a Tertiary Hospital, Ankara, Turkey. Jundishapur J Microbiol. 2017;10(10); e14341.
89. Lau MY, Teng FE, Chua KH, et al. Molecular Characterization of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Malaysia Hospital. Pathogens. 2021;10(3): 279.
90. Taha MS, Hagra MM, Shalaby MM, et al. Genotypic Characterization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from an Egyptian University Hospital. Pathogens. 2023;12(1): 121.
91. Budak S, Aktaş Z, Oncul O, et al. Detection of OXA-51 Carbapenemase Gene in *Klebsiella pneumoniae*: A Case Report and a New Dimension on Carbapenemase Resistance. J Mol Genet Med 2013;7: 2.
92. Hazırolan G, Karagöz A. Emergence of carbapenemase-producing and colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 high-risk clone in Turkey. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 2020; 67(4): 216-21.
93. Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir ŞŞ, Hoşgör Limoncu M. [Comparison of phenotypic methods and polymerase chain reaction for the detection of carbapenemase production in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates]. Mikrobiyol Bul. 2017; 51(3): 269-76.
94. Alkan Bilik Ö, Bayraktar M, Özcan N, Gül K, Akpolat N. Dissemination of blaOXA-48 like, blaNDM, blaKPC, blaIMP-1, blaVIM genes among carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in Southeastern Turkey: first report of *Klebsiella pneumoniae* co-producing blaOXA-48-like, blaVIM and blaIMP-1 genes. Reviews and Research in Medical Microbiology. 2021;32(4):205.
95. Gaibani P, Lewis RE, Volpe SL, et al. In vitro interaction of ceftazidime–avibactam in combination with different antimicrobials against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. International Journal of Infectious Diseases. 2017;65: 1-3.
96. Köle M, Sesli Çetin E, Şirin MC, Cicioğlu Arıdoğan B. Seftazidim-Avibaktam, Meropenem ve Kolistinin Tek Başına ve İkili Kombinasyonlarının Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Suşlarına Karşı In Vitro Etkinliğinin Araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2022; 56(2): 230-50.
97. Nath S, Moussavi F, Abraham D, Landman D, Quale J. In vitro and in vivo activity of single and dual antimicrobial agents against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2018;73(2): 431-6.
98. Ramos JR, Lletí MS. Fosfomycin in infections caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens. Revista Española de Quimioterapia. 2019; 32(Suppl 1): 45.
99. Uzun N. *Klebsiella Pneumoniae* Klinik İzolatlarında Agar Dilüsyon Yöntemi İle İntravenöz Fosfomisin Direncinin Saptanması ve Meropenem, İmipenem, Amikasin Antibiyotikleri ile Sinerjistik Etkisinin Araştırılması [Tıpta Uzmanlık Tezi]. T.C. Dicle Üniversitesi; 2022. <https://acikerisim.dicle.edu.tr/>. (Erişim Tarihi: 23.10.2023)
100. Temoçin F, Şensoy L, Kuruoğlu T, Atilla A, Tanyel E. Eski bir molekül, yeni bir ilaç; intravenöz Fosfomisin'in klinik kullanımdaki yeri. Pam Tıp Derg. 2022; 15(1): 95-100.
101. Önal U, Tüzemen NÜ, Kaya PK ve ark. Evaluation of the combination treatments with intravenous fosfomycin for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Rev Assoc Med Bras. 2023;69: e20230727.
102. Adaleti R, Nakipoğlu Y, Arıcı N, et al. [Evaluation of In vitro Efficacy of Meropenem/Colistin and Meropenem/Fosfomycin Combinations on Multidrug Resistant Gram-Negative Bacilli]. Mikrobiyol Bul. 2023; 57(3): 365-77.
103. Romanelli F, De Robertis A, Carone G, Dalfino L, Stufano M, Del Prete R, et al. In Vitro Activity of Ceftazidime/Avibactam Alone and in Combination With Fosfomycin and Carbapenems Against KPC-producing *Klebsiella Pneumoniae*. New Microbiol. 2020; 43(3): 136-8.

EKLER

EK-1 BENZERLİK RAPORU

Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli
Klebsiella pneumoniae Suşlarında Antibiyotik
Kombinasyonlarının İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 12	% 4	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 1
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	pdffox.com İnternet Kaynağı	% 1
6	acikerisim.dicle.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
7	www.floradergisi.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1

EK-2: ETİK KURUL ONAYI

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64) KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 11.10.2023

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli Klebsiella Pneumoniae Suşlarında Antibiyotik Kombinasyonlarının İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Doktor Erkin Cad. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	

BASVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof Dr Mücahide Esra Koçoğlu- Dr Büşra Güneysu Yazar				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi				
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI					
	DESTEKLEYİCİ					
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐			
		FAZ 2	☐			
		FAZ 3	☐			
FAZ 4		☐				
Gözlemsel ilaç çalışması		☐				
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐				
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐				
İlaç dışı klinik araştırma	☒					
Retrospektif	☐					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	İLAN	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐				
DİĞER:	☐					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2023/0677	Tarih: 11.10.2023				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmış etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.					

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 11.10.2023

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli Klebsiella Pneumoniae Suşlarında Antibiyotik Kombinasyonlarının İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
Başkanın Unvanı / Adı / Soyadı:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER	Tıbbi Farmakoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Aytekin OĞUZ	İç Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Işıl MARAL	Halk Sağlığı Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Asif Yıldırım	Üroloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Süleyman Daşdağ	Biyofizik	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Derya Büyükkayhan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Asiye KANBAY	Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Sıdika Şeyma ÖZKANLI	Tıbbi Patoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Hacer Hicran Mutlu	Aile Hekimliği	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr Öğretim Üyesi Ergül Demirçivi	Kadın Hastalıkları ve Doğum	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Avukat Mahmut ÇELİK	Avukat	Çelik Hukuk Bürosu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Saliha Şahin	İşçi		E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi