

T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

KOLİSTİN DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONIAE KLİNİK
İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ
SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Hatice Dilara KARAKUŞ

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bülent DURDU

İSTANBUL - EKİM 2024

T.C.

BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

KOLİSTİN DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONIAE KLİNİK
İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ
SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Hatice Dilara KARAKUŞ

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bülent DURDU

İSTANBUL - EKİM 2024

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakóltesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Hatice Dilara KARAKUŞ, ilgili yönetmeliklerin belirlediğı gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik etkinliğinin incelenmesi” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Bülent DURDU
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Turan ASLAN
Prof. Dr. Yasemin AKKOYUNLU

Doç. Dr. Bülent DURDU

Savunma Tarihi : 22/10/2024

TEŞEKKÜR

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Rümeyza Kazancıoğlu'na ve Tıp Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Ramazan Özdemir'e asistanlık sürecinde bize sağlamış oldukları imkanlar için teşekkür ederim.

Sayın hocalarım; Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Turan ASLAN'a, tez danışmanım Doç. Dr. Bülent DURDU'ya, Prof. Dr. Yasemin AKKOYUNLU'ya, Doç. Dr. Gülay OKAY'a bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştıkları için asistanlık eğitimime sağladıkları katkılardan dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca her konuda bana yardımcı olan ve yol gösteren Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ'a teşekkür ederim.

Mutlu ve huzurlu çalışma ortamı sağlayan asistan arkadaşlarım Dr. Ayşe Betül USLU ERSÖZ'e, Dr. Nurgül ANDİÇ'e, Dr. Mehmet Emin ÖZMEN'e, Dr. Çağla BOZKURT'a, Dr. Adem Burak ÇEKİÇ'e, Dr. Rymejsa GURMANI'ye, Dr. Sibel YILDIZ'a, Dr. Sena Nur DOĞAN'a ve Dr. Fatma BOZDOĞAN'a teşekkür ederim.

Her zaman içten destekleri ile yanımda olan Doç. Dr. Bilge SÜMBÜL'e, Dr. Fatma Melike AKBACI'ya ve başta Esma KOÇ ve Derya FAZLI olmak üzere tüm Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ailesine şükranlarımı sunarım.

Tezimin deney aşamalarında tüm samimiyetleriyle destek veren ve emek gösteren Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Arş. Gör. Sercan KESKİN'e, Arş. Gör. Ömür Gözde DEMİRTAŞ'a ve Esmahan AVCI ALACAN'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her daim yanımda olan, sevgisini, ilgisini esirgemeyen ve bugünlere gelmemde büyük katkıları olan annem Züleyha KARAKUŞ, babam Ali KARAKUŞ ve ablam Ece Şeyma GÜZEL'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Hatice Dilara KARAKUŞ

BEYAN

“Kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik etkinliğinin incelenmesi” tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Hatice Dilara KARAKUŞ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
BEYAN	II
İÇİNDEKİLER	III
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	XI
SUMMARY	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	15
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesi	17
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
2.2.1. Taksonomi	18
2.2.2. Tarihçe	20
2.2.3. Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	20
2.2.4. Virülans Özellikleri	21
2.2.5. Epidemiyoloji	23
2.2.6. Klinik	25
2.2.7. Tedavi	29
2.3. <i>Klebsiella</i> Cinsi Bakterilerin Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler	29
2.3.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler	29
2.3.2. Florokinolon Grubu Antibiyotikler	37
2.3.3. Aminoglikozid Grubu Antibiyotikler	38
2.3.4. Polimiksin Grubu Antibiyotikler	40
2.3.5. Tetrasiklin Grubu Antibiyotikler	42
2.3.6. Fosfomisin	43
2.3.7. Trimetoprim-sulfametoksazol	44
2.4. Bakterilerde Antimikrobiyal İlaçlara Karşı Direnç Mekanizmaları	45
2.4.1. Doğal (İntrinsik) Direnç	46
2.4.2. Edinsel (Kazanılmış) Direnç	47
2.5. <i>Klebsiella</i> Cinsi Bakterilerin Tedavisinde Kullanılan Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	47
2.5.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	47
2.5.2. Florokinolon Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	55
2.5.3. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	56
2.5.4. Polimiksin Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	57
2.5.5. Tetrasiklin Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	58
2.5.6. Fosfomisine Direnç Mekanizmaları	59
2.5.7. Trimetoprim / Sulfametoksazol Direnç Mekanizmaları	60
2.6. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesinde Karbapenem Direnç Epidemiyolojisi	60
2.7. Karbapenemaz Üreten <i>Klebsiella spp.</i> 'de Tedavi Seçenekleri	65
2.8. Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkinliğinin Değerlendirilmesinde Kullanılan In Vitro Testler	69
2.8.1. Dama Tahtası (Checkerboard) Yöntemi	69
2.8.2. Zamana Bağlı Öldürme (Time-Kill) Yöntemi	73
2.8.3. Disk Difüzyon Yöntemi	73

2.8.4. E-test Yöntemi (Epsilometer Test)	74
3. Gereç ve yöntem	75
3.1. Çalışma Grubunun Belirlenmesi	75
3.2. Gereçler	75
3.2.1. Kullanılan Besiyerleri ve Malzemeler	75
3.2.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler.....	76
3.3. Yöntemler.....	77
3.3.1. Örneklerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	77
3.3.2. Örneklerin Saklanması	77
3.4. Direnç Genlerinin Belirlenmesi ve Analizi	78
3.4.1. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarının PZR Reaksiyonu için Hazırlanması	78
3.4.2. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarının Direnç Gen Tespiti için PZR Reaksiyonu ..	79
3.4.3. Agaroz Jel Elektforezi ve Amplifiye Genlerin Görselleştirilmesi	80
3.5. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi	81
3.5.1. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması	82
3.5.2. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması ve Porsiyonlanması	83
3.5.3. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Test Plaketlerinin Hazırlanması.....	84
3.5.4. Bakteri İnokulumu Hazırlanması	89
3.5.5. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Test Sonuçları Değerlendirilmesi	90
3.6. İstatistiksel Analiz	91
4. Bulgular.....	92
4.1. Klinik İzolatların Özellikleri	92
4.2. OXA-48, KPC ve NDM Genlerinin PZR ile Araştırılması.....	95
4.2.1. OXA-48, KPC ve NDM Genlerinin PZR Sonuçlarının Sekans Karşılaştırması	96
4.3. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi Sonuçları	104
4.3.1. Kolistin ile Seftazidim/Avibaktam Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları	104
4.3.2. Kolistin ile Trimetoprim-sulfametoksazol Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları.....	107
4.3.3. Kolistin ile Meropenem Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları	110
4.3.4. Kolistin ile Gentamisin Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları	113
4.3.5 Kolistin ile Tigesiklin Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları....	116
5. TARTIŞMA.....	125
5.1. Tezin Kısıtlılıkları	141
6. SONUÇ.....	142
7. KAYNAKLAR.....	143
EKLER.....	158
EK A: Etik Kurul Onayı.....	159
EK B: Desteklenmiş Proje Sözleşmesi	160

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Karbapenemaz Genleri için PZR Primerleri	78
Tablo 3.2. Uygun PZR Reaksiyonu Komponentleri ve Miktarları.....	79
Tablo 3.3. Rutin PZR Şartları.....	80
Tablo 3.4. K+S kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL).....	86
Tablo 3.5. K+B kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL)	87
Tablo 3.6. K+M kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL)	87
Tablo 3.7. K+G kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL)	88
Tablo 3.8. K+T kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL)	88
Tablo 4.1. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatların Genel Özellikleri.....	94
Tablo 4.2. 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi	105
Tablo 4.3. Kolistin ve Seftazidim-avibaktam MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.....	106
Tablo 4.4. 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi	109
Tablo 4.5. Kolistin ve Trimetoprim/sülfametoksazol MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu	109
Tablo 4.6. 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi	111
Tablo 4.7. Kolistin ve Meropenem MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.....	112
Tablo 4.8. 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi	114
Tablo 4.9. Kolistin ve Meropenem MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.....	115
Tablo 4.10. 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi	117
Tablo 4.11. Kolistin ve Tigesiklin MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.....	118
Tablo 4.12. Kombinasyonlara Göre Antibiyotik Etkileşimlerinin Dağılımı	120
Tablo 4.13. Suşlara Göre Antibiyotik Kombinasyonlarındaki Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksleri ve Etkileşim Türünün Dağılımı (n=21)...	121
Tablo 4.14. Sinerji Sonuçlarının Direnç Genlerine Göre Dağılımı.....	122
Tablo 4.15. Antibiyotik Kombinasyonlarının FIKI Değerleri Ortalaması	123
Tablo 4.16. Antibiyotik Kombinasyonlarının FIKI Değerlerinin Karşılaştırılması	123

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>K.pneumonia</i> 'nın Tam Genom Dizilimi Bazlı Filogenetik İlişkisi	19
Şekil 2.2. Seftazidim-avibaktam Kimyasal Yapısı	34
Şekil 2.3. Meropenem Kimyasal Yapısı	37
Şekil 2.4. Gentamisin Kimyasal Yapısı	39
Şekil 2.5. Polimiksin E (kolistin) Kimyasal Yapısı	41
Şekil 2.6. Tigesiklin Kimyasal Yapısı	43
Şekil 2.7. Trimetoprim-sulfametoksazol Kimyasal Yapısı	45
Şekil 2.8. Ambler Beta Laktamazların Sınıflandırılması	53
Şekil 2.9. Karbapenemlere Dirençli İnvaziv <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarının Ülke ve Bölgelere Göre Yüzdesi,2023 (AB/AEA'de Antimikrobiyal Direnç (EARS-Net)-Yıllık Epidemiyolojik Raporu)	62
Şekil 2.10. Dama Tahtası (Checkerboard) Mikrodilüyon Sinerji Yöntemi.....	72
Şekil 3.1. Etiketlenen Eppendorflar İçinde Muhafaza Edilen İzolatlar.....	77
Şekil 3.2. Thermalcyclers (Bio-Rad, USA)	80
Şekil 3.3. Agaroz Jel Elektroforez Cihazı (Bio-Rad, USA).....	81
Şekil 3.4. Antibiyotik Powder Örnekleri.....	82
Şekil 3.5. Katyon İlaveli Mueller Hinton Besiyeri.....	83
Şekil 3.6. Porsiyonlanmış Falkonlar	84
Şekil 3.7. 96 Kuyucuklu U Tabanlı Well Plate Örneği	84
Şekil 3.8. K+X Kombinasyonu İçin Mikroplate Düzeni (µl/dL)	86
Şekil 3.9. Dama Tahtası Yöntemiyle Çalışılmış Kolistin (K)-TMP/SXT(B) Kombinasyon Örneği	89
Şekil 3.10. <i>Klebsiella pneumonia</i> %5 KKA Besiyerindeki Taze Kültürü	90
Şekil 3.11. Cytation Imaging Multi Mode Reader 5 (Biotek, USA) Sonuç Örnekleri	90
Şekil 4.1. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı (n=21)	93
Şekil 4.2. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı (n=21)	93
Şekil 4.3. <i>bla</i> OXA-48 Geninin UV Işığı Altında Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri	95
Şekil 4.4. <i>bla</i> NDM Geninin UV Işığı Altında Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.....	95
Şekil 4.5. <i>bla</i> KPC Geninin UV Işığı Altında Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.....	96
Şekil 4.6. OXA-48 Geni Baz Dizilimi.....	96
Şekil 4.7. OXA-48 Dizi Analizi Sonucu Oluşan Grafiklerin SnapGene Viewer Yazılımı ile Görüntülenmesi.....	97
Şekil 4.8. OXA-48 Sanger Sekanslama Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması	97
Şekil 4.9. OXA-48 Sanger Sekanslama Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması	98
Şekil 4.10. OXA-48 Baz Dizilimi Eşleştirilmesi (Alignment).....	98
Şekil 4.11. NDM Geni Baz Dizilimi.....	99
Şekil 4.12. Dizi Analizi Sonucu Oluşan Grafiklerin SnapGene Viewer Yazılımı ile Görüntülenmesi.....	99
Şekil 4.13. NDM Sanger Sekans Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması	100
Şekil 4.14. NDM Sanger Sekans Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması	100

Şekil 4.15. NDM Baz Dizilimi Eşleştirilmesi (Alignment)	101
Şekil 4.16. KPC Geni Baz Dizilimi.....	101
Şekil 4.17. KPC Dizi Analizi Sonucu Oluşan Grafiklerin SnapGene Viewer Yazılımı ile Görüntülenmesi	102
Şekil 4.18. KPC Sanger Sekans Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması	102
Şekil 4.19. KPC Sanger Sekans Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması	103
Şekil 4.20. KPC Baz Dizilimi Eşleştirilmesi (Alignment)	103
Şekil 4.21. <i>K. pneumonia</i> İzolatlarında Direnç Genlerinin Dağılımı	104
Şekil 4.22. 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Seftazidim-avibaktam Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü.....	105
Şekil 4.23. 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Trimetoprim/sülfametoksazol Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü	109
Şekil 4.24. 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Meropenem Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü	111
Şekil 4.25. 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Gentamisin Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü	114
Şekil 4.26. 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Tigesiklin Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü	117

KISALTMALAR

KKK: Koyun Kanlı Agar

MALDI-TOF MS: Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu– Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight, Mass Spectrometry)

EMB: Eozin Metilen Mavisi (Eosin Methylene Blue)

WGS: Tüm Genom Dizilimi (Whole Genome Sequencing)

KpSC: Klebsiella pneumoniae tür kompleksi (K. pneumoniae species complex)

ONPG: O-nitrophenyl - beta-D-galactoside

LPS: Lipopolisakkarit

TLR 4: Toll Benzeri Reseptör 4 (Toll Like Receptor 4)

C1q: Kompleman 1q (Compleman 1q)

C3b: Kompleman 3b (Compleman 3b)

CDC: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention)

ECDC: Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control)

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

HvKP: Hipervirulan Klebsiella pneumoniae

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

TKP: Toplum Kökenli Pnömoni

ARDS: Akut Respiratuar Yetmezlik Sendromu (Acute Respiratory Distress Syndrome)

BT: Bilgisayarlı Tomografi

PBP: Penisilin Bağlayan Protein (Penicillin Binding Protein)

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MSSA: Metisilin Duyarlı Staphylococcus aureus (Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus)

MRSA: Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus)

VRSA: Vankomisin Dirençli Staphylococcus aureus (Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus)

VRE: Vankomisin Dirençli Enterokok (Vancomycin Resistant Enterococci)

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz

VIP: Ventilatör İlişkili Pnömoni

KPC: Klebsiella pneumoniae karbapenemaz (Klebsiella pneumoniae carbapenemase)

KNS: Koagülaz Negatif Stafilokok (Coagulase Negative Staphylococci)

GABA: γ -aminobutirikasit

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)

EUCAST: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

EDP: Koyun Kanlı Agar: Enerji Bağımlı Fazlar (Energy-Dependent Phases)

ATP: Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate)

IU: Uluslararası Ünite (International Unit)

PABA: Paraamino Benzoik Asit

OMP: Dış membran proteini (Outer Membrane Protein)

APH: Aminoglikozid Fosfotransferaz (Aminoglycoside Phosphotransferase)

AAC: Aminoglikozid Asetiltransferaz (Aminoglycoside Acetyltransferase)

ANT: Aminoglikozid Nükleotidiltransferaz (Aminoglycoside Nucleotidyltransferase)

DHPS: Dihidropteroat Sentetaz

DHFR: Dihidrofolat Redüktaz

MBL: Metallo Beta-Laktamaz

SBL: Serin Beta-Laktamaz

IMI: İmipenem Hidrolize Eden Beta-Laktamaz (Imipenem Hydrolyzing Beta-Lactamase)

NMC-A: A Sınıfı Non-Metallo Karbapenemaz (Class A Non-Metallo carbapenemase)

GES: Guyana Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (Guyana Extended Spectrum Beta Lactamase)

SME: *Serratia marcescens* Enzimi (*Serratia marcescens* enzymes)

NDM: Yeni Delhi Metallo Beta-Laktamazı (New Delhi Metallo Beta-Lactamase)

IMP: İmipenem Dirençli *Pseudomonas* (Imipenem Resistant *Pseudomonas*)

VIM: Verona İntegron Kodlu Metallo Beta-Laktamazı (Verona Integron Encoded Metallo-Beta-Lactamase)

OXA: Oksasilin Hidrolize Edici Karbapenemaz (Oxacillin Hydrolyzing Carbapenemase)

GLASS: Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System

FK: Farmakokinetik

FD: Farmakodinamik

KAMHB: Katyon Ayarlı Mueller-Hinton Broth

CFU: Koloni Oluşturan Birim (Colony Forming Unit)

ETA: Endotrakeal Aspirat

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

AST: Antibiyotik Duyarlılık Testi (Antibiotic Susceptibility Testing)

TBE: Tris/Borate/EDTA

IDSA: Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Infectious Diseases Society of USA)

ESCMID: Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)

KDE: Kan Dolaşımı Enfeksiyonu

HİP/HAP: Hastane İlişkili/Kaynaklı Pnömoni (Hospital Acquired Pneumonia)

VİP/VAP: Ventilatör İlişkili Pnömoni (Ventilator Associated Pneumonia)

ÜSE: Üriner Sistem Enfeksiyonu

TMP-SMX: Trimetoprim-Sulfametoksazol

dNTPs: Deoksinükleotid Trifosfat (Deoxynucleotide Triphosphate)

DMSO: Dimetil Sülfoksit

UV: Ultraviyole (Morötesi)

BİLSAB: Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü (Beykoz Institute of Life Sciences and Biotechnology)

BLAST: Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)

KOLİSTİN DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONIAE KLİNİK İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Giriş ve Amaç: Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonları dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son on yılda karbapenem dirençli Gram negatif bakterilerin prevelansında ve insidansında ciddi artışlar olmuştur. Antibiyotik dirençli türlerin başında gelen *Klebsiella pneumoniae*, tedavisi sınırlı ve zor, mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olmakla birlikte uzamış hastane yatışları, ek tedaviler, enfeksiyon kontrol önlemleri gibi maliyetler ile hem sağlık sistemleri hem de ulusal ekonomiler için yük oluşturmaktadır. Karbapenem direncinde çeşitli mekanizmalar rol oynasa da en önemlisi karbapenemaz genlerinin sentezidir. Direnç genlerinin tespiti hem yerel direnç paterninin belirlenmesinde hem de tedavi seçiminde oldukça önemlidir. Tedavi seçeneklerinin sınırlı olması klinisyenleri kolistin gibi ajanları tekrar tercih etmeye yöneltmiştir. Ancak zamanla kolistin direnci giderek artmış ve tedavi daha da karmaşık hale gelmiştir. Bu aşamada kombinasyon tedavilerinin sinerjistik etkilerinden faydalanılması gündeme gelmiştir. Çalışmamızda kolistin dahil çoklu ilaç dirençli *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında karbapenemaz direnç genlerinin ortaya konması ve antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Laboratuvarına Ocak 2021 ile Ocak 2024 tarihleri arasında Yoğun Bakım Üniteleri ve diğer kliniklerinden gönderilen, 18 yaş ve üzeri hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen kolistin ve karbapenem dahil çoklu antibiyotik dirençli 21 adet *K. pneumoniae* suşu çalışmamıza dahil edildi. Konvansiyonel PZR yöntemi kullanılarak suşlarda OXA-48, KPC ve NDM karbapenemaz genleri araştırıldı. Damatahtası (Checkerboard) sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kolistin ile tigesiklin, seftazidim/avibaktam, meropenem, gentamisin ve trimetoprim/sulfametoksazol antibiyotiklerinin kombinasyonlarının sinerjistik etkinliği değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 21 klinik izolatın %52,3'ü (n=11) erkek, %47,6'sı (n=10) kadın idi. Hastaların yaş ortalaması 75,6 ($\pm 14,4$) yıl olarak hesaplandı. Suşların tamamı (%100) OXA-48, 4'ü (%19) OXA-48 ve NDM, 1'i (%4,7) ise OXA-48 ve KPC birlikteliği açısından pozitif bulundu. Damatahtası yöntemi ile en fazla sinerji kolistin ile tigesiklin kombinasyonunda 17 (%80,9) suшта görüldü, kolistin ile seftazidim/avibaktam kombinasyonunda 11 suшта (%52,3), kolistin ile trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonunda 8 suшта (%38), kolistin ile meropenem kombinasyonunda 6 (%28,5) suшта ve kolistin ile gentamisin kombinasyonunda 4 (%19) suшта görüldü. Kolistin-Tigesiklin kombinasyonu FIKI ortalaması, Kolistin- Trimetoprim/Sülfametoksazol, Kolistin-Meropenem ve Kolistin-Gentamisin kombinasyonlarının FIKI ortalamalarına göre anlamlı derecede daha düşük bulundu (sırasıyla $p=0,003$; $p<0,001$; $p<0,001$). Additif etkileşim kolistin ile

meropenem kombinasyonunda 12 (%57,1) suşta, kolistin ile trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonunda 10 (%47,6) suşta, kolistin ile seftazidim/avibaktam kombinasyonunda 9 (%42,8) suşta, kolistin ile gentamisin kombinasyonunda 8 (%38) suşta ve kolistin ile tigesiklin kombinasyonunda 4 (%19) suşta saptandı. Antagonizma yalnızca kolistin ile gentamisin kombinasyonunda 1 suşta tespit edildi.

Sonuç: Ülkemize OXA-48'in hala baskın karbapenemaz enzimi olduğu görölmektedir. NDM ve KPC karbapenemazların yaygınlığı giderek artmaktadır. Kolistin ve karbapenem dahil çok ilaca dirençli *Klebsiella pneumonia* suşlarında kolistin-tigesiklin kombinasyonu in vitro olarak belirgin sinerjik etki göstermektedir. Bu suşların etken olduğu enfeksiyonlarda tedavi seçeneği olarak kullanılabilir. Ancak standart tedavi olarak önerilebilmesi için daha geniş bir suş yelpazesi ile ileri in vitro ve in vivo klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: *Klebsiella pneumonia*, damatahtası mikrodilüsyon, karbapenemaz, sinerji.

INVESTIGATION OF THE SYNERGISTIC EFFECTS OF ANTIBIOTIC COMBINATIONS AGAINST COLISTIN-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES

SUMMARY

Introduction: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections are a significant public health concern worldwide. In the last decade, there has been a substantial increase in the prevalence and incidence of carbapenem-resistant Gram negative bacteria. *Klebsiella pneumoniae*, one of the leading antibiotic-resistant species, causes infections that are difficult to treat, have limited therapeutic options and are associated with high mortality rates. These infections also pose a burden on healthcare systems and national economies due to prolonged hospital stays, additional treatments, and infection control measures. While various mechanisms contribute to carbapenem resistance, the most significant is the production of carbapenemase genes. Detecting resistance genes is essential for both determining local resistance patterns and guiding treatment decisions. Due to the limited treatment options, clinicians have been increasingly relying on agents like colistin. Treatment has become more difficult as a result of the rise in colistin resistance over time. In this context, utilizing the synergistic effects of combination therapies has gained importance. Our study aims to investigate the presence of carbapenemase resistance genes and evaluate the synergistic efficacy of antibiotic combinations, including colistin, against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates.

Materials and Methods: In total, 21 strains of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* that were resistant to carbapenems and colistin were included in our investigation. These strains were isolated from various clinical specimens obtained from patients aged 18 and older, admitted to Intensive Care Units and other clinics at Bezmialem Vakif University Hospital, between January 2021 and January 2024. Conventional PCR was used to investigate the presence of OXA-48, KPC, and NDM carbapenemase genes in the isolates. The synergistic effects of colistin in combination with tigecycline, ceftazidime/avibactam, meropenem, gentamicin, and trimethoprim/sulfamethoxazole were evaluated using the checkerboard broth microdilution method.

Results: Of the 21 clinical isolates included in the study, 52.3% (n=11) were from male patients, and 47.6% (n=10) were from female patients. The mean age of the patients was 75.6 ($\pm$ 14.4) years. All of the isolates (100%) tested positive for the blaOXA-48 gene, while 4 isolates (19%) were positive for both blaOXA-48 and blaNDM, and 1 isolate (4.7%) was positive for both blaOXA-48 and blaKPC. The checkerboard method revealed the highest synergy in the combination of colistin with tigecycline, observed in 17 isolates (80.9%). Synergy was also observed in 11 isolates (52.3%) with the combination of colistin and ceftazidime/avibactam, in 8 isolates (38%) with colistin and trimethoprim/sulfamethoxazole, in 6 isolates (28.5%) with colistin and meropenem, and in 4 isolates (19%) with colistin and gentamicin. The FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) mean value for the colistin-

tigecycline combination was significantly lower than the FICI values for the combinations of colistin with trimethoprim/sulfamethoxazole, meropenem, and gentamicin ($p=0.003$, $p<0.001$, and $p<0.001$, respectively).

Conclusion: In Türkiye, OXA-48 remains the predominant carbapenemase enzyme, while the prevalence of NDM and KPC carbapenemases is steadily increasing. The colistin-tigecycline combination demonstrated significant in vitro synergistic activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains, including those resistant to both colistin and carbapenems. This combination could be considered as a treatment option for infections caused by these strains. However, for it to be recommended as a standard treatment, further in vitro and in vivo clinical studies with a broader range of strains are needed.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Checkerboard microdilution, carbapenemase, Synergy



1. GİRİŞ VE AMAÇ

K. pneumoniae, *Enterobacteriaceae* ailesine ait Gram negatif, aerob veya fakültatif anaerob, hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü bir basildir. Sıklıkla insan nazofarinksinde, gastrointestinal sistemde ve daha az sıklıkla diğer bölgelerde kolonize olabilirler [1]. Komorbid hastalıklar veya immünomodülatör tedavilerin yol açtığı konakçı savunmasındaki bozulmaya bağlı toplum kökenli ve hastane kaynaklı pnömoni, ampiyem, bakteriyemi ve sepsis, üriner sistem enfeksiyonları, spontan bakteriyel peritonit, gastroenterit gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilirler.

Son yıllarda karbapenemler de dahil olmak üzere çoklu ilaca dirençli izolatların sıklığı dünyada giderek artmaktadır ve günümüzde antimikrobiyal direnç önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir [2]. 2023 yılında yayınlanan Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetim Ağı olarak da bilinen EARS-Net verilerine göre, 2020 yılında Avrupa birliği/Avrupa Ekonomik Alan (AB/AEA)'da antibiyotiklere dirençli bakterilere bağlı 800.000'den fazla enfeksiyon olduğu ve bu enfeksiyonların doğrudan sonucu olarak 35.000'den fazla kişinin öldüğü bildirilmektedir [3]. Gram negatif enterik patojenler arasında *K. pneumoniae* daha yüksek karbapenem direnci prevalansı göstermiştir [4]. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* (CRKp-KDKp) enfeksiyonlu hastalarda öncelikle etkili tedavinin uygulanmasındaki gecikmeden dolayı mortalite oranlarının %40-50 kadar yüksek olabileceği bildirilmiştir [5, 6].

Karbapenem direnci karbapenemaz enzimi üretimi, porin kaybı ve artmış effluks pompa fonksiyonuyla ilişkili olabilmektedir. Karbapenemaz enzimleri karbapenemler dahil tüm beta-laktamları hidrolize edebilmektedir. Karbapenemazları kodlayan genler genellikle plazmid, transpozon gibi aktarılabilir genetik elemanlar üzerinde yer almaktadır. Böylece suşlar arasında hızla yayılabilmekte ve ciddi salgınlara yol açabilmektedir. Bu nedenle karbapenem direncinin karbapenemazlar aracılığıyla olması, diğer mekanizmalara göre direncin yayılımı açısından çok daha büyük bir tehdit olarak kabul edilmektedir [7].

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)'dir. Türkiye'de KPC, NDM gen bölgelerinden kaynaklanan karbapenem direnci sporadik, OXA-48 gen bölgesi ise endemiktir [8] Antibiyotik direncini önlemede en kritik adımlardan biri direncin izlenmesidir. Ayrıca direncin belirlenmesi tedavide kullanılacak etkili antibiyotiklerin seçimi için de önemlidir. Moleküler yöntemler, karbapenemaz genlerinin hızlı ve kesin bir şekilde tanımlanması için oldukça duyarlı kabul edilmektedir.

Karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşları aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi diğer antibiyotik sınıflarına da çoğunlukla dirençli olduğundan tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Kolistin, seftazidim-avibaktam, tigesiklin ve fosfomisin gibi ajanlar tedavide kullanılabilir. Kolistin 1970'lerde yüksek toksisite profili nedeniyle büyük ölçüde terk edilmiş olmasına rağmen son çare antibiyotiklerinden biri olarak yeniden gündeme gelmiştir. Ancak son çalışmalarda *K. pneumoniae*'nın uzun süreli veya uygunsuz tedaviler nedeniyle kolistine dirençli hale geldiğine ilişkin raporlar dünya çapında endişe verici şekilde artmaktadır [9, 10]. Karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'nin etken olduğu enfeksiyonların tedavisindeki zorluklardan dolayı antibiyotikler kombinasyonlar şeklinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen tümü kolistin ve karbapenemler dahil çoklu ilaç dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenemaz direnç paterninin PZR yöntemiyle belirlenmesi ve kolistin-tigesiklin, kolistin-seftazidim/avibaktam, kolistin-meropenem, kolistin-trimetoprim/sülfametoksazol, kolistin-gentamisin kombinasyonlarının sinerjistik etkilerinin dama tahtası yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacteriaceae* Ailesi

Enterobacteriaceae ailesi, tıbbi önemi olan Gram negatif basiller içinde en büyük ve heterojen ailedir. Bu bakteriler bitkilerde, suda, toprakta, insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak mikrobiyotasında (normal bağırsak florası olarak) olmak üzere doğada çok çeşitli ortamlarda bulunabilmektedirler. Bağırsak florasında yer aldıklarından enterik bakteriler olarak adlandırılırlar ancak bu aileye ait bakterilerin bir kısmı florada bulunmamaktadır. *Salmonella* ve *Shigellae* insanlar için mutlak patojendir [11, 12]. Ayrıca özellikle sık sık hastaneye yatırılan veya bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, insan genitoüriner sistemini ve orofarenksini kolonize edebilmektedirler. Enterobacterales üyeleri neredeyse her organ sisteminde, hem toplum kaynaklı hem de nozokomiyal enfeksiyonlarda etken olabilmekte ve laboratuvara gönderilen herhangi bir örnekten izole edilebilmektedirler [13]. Klinik örneklerde en sık saptanan bakteriler bu grupta yer almaktadır [12]. Enterobacterales takımı filogenomik analizlerle yedi aileye (*Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* ve *Budviciaceae*) ayrılmıştır [14].

Enterobacteriaceae ailesi taksonomik olarak prokaryot canlılar içerisinde, Bakteriler alemine, Proteobakteriler filumuna, Gammaproteobakteriler sınıfına ve Enterobacterales takımına aittir [15]. Biyokimyasal özellikleri, antijenik yapıları, nükleik asit hibridizasyon ve DNA dizi analizlerine göre onlarca cins ile birçok tür/alt tür tanımlanmıştır. Her geçen gün bu büyük aileye yeni üyeler eklenebilmekte ya da genetik analizler sonucu mevcut türlerin isimleri değişebilmektedir [16, 17].

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler Gram negatif basil morfolojisinde, genellikle homojen boyanan, 1.0-6.0 µm boyunda, 0.3-1 µm eninde, spor oluşturmeyen, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerdir. Aside rezistan boyanmazlar. Genellikle peritriş flagellaları vasıtasıyla hareketlidirler, glukozu fermente ederler, nitratı nitrite indirgerler ve katalaz üretirler ancak oksidaz üretmezler. Sitokrom oksidaz enzimine sahip olmamaları, basit ve hızlı bir şekilde diğer birçok fermentatif ve non-fermentatif Gram negatif basilden ayrılmasını sağlar. Tüm üyeler, pepton veya et özütü agarda çoğalabilir, koyun kanlı agar (KKA) gibi seçici olmayan ve

MacConkey agar gibi seçici besiyerlerinde hızlı bir şekilde büyüyebilir. *Enterobacteriaceae* üyeleri koyun kanlı agarda mat gri, büyük, kuru veya mukoid koloniler oluşturur ve hemoliz oluşturma yetenekleri değişkenlik gösterebilir. *Klebsiella* gibi kapsüllü bazı üyeleri, besiyerinde karakteristik bir şekilde belirgin mukoid, ıslak, viskoz koloniler oluşturur. Mac Conkey agarda kırmızı renkli veya Eozin Metilen Mavisi (EMB) agarda yeşil refle veren koloni görünümü, bakterinin besiyerinde bulunan laktoz şekerini kullanarak ortamda asit oluşturma yeteneğinde olduğunu gösterir. Ayırt edilmeleri için geliştirilmiş bazı ticari kitler veya otomatize sistemler mevcuttur. Bununla birlikte kültür izolatlarının tanımlanması için MALDI-TOF MS (Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu–Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) kullanımı birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında geleneksel biyokimyasal panellerin yerini almıştır [11, 12, 17-19].

Enterobacteriaceae üyesi birçok bakteri insanda gastroenterit, enterokolit, üriner sistem enfeksiyonu, menenjit, bakteremi, sepsis, pnömoni, tifo, osteomyelit, yara yeri enfeksiyonu gibi çok sayıda önemli enfeksiyona neden olurlar [12]. İnsanlardaki tüm bakteriyemilerin 1/4 ile 1/3'ünden, idrar yolu enfeksiyonlarının %70' i ve bağırsak enfeksiyonlarının birçoğundan sorumludurlar. Bu aileden *Salmonella typhi*, *Shigella* gibi üyeler klinik örneklerden izole edildiğinde daima insan hastalığı ile ilişkilendirilir ve çeşitli toksin ve virülans faktörleri sentezleyebilmektedirler. *K. pneumoniae*, *E. coli*, gibi üyeler ise normal kommensal flora üyeleri olarak insan vücudunda bulunabilen fırsatçı enfeksiyon etkenleri olarak tanımlanmaktadırlar [17].

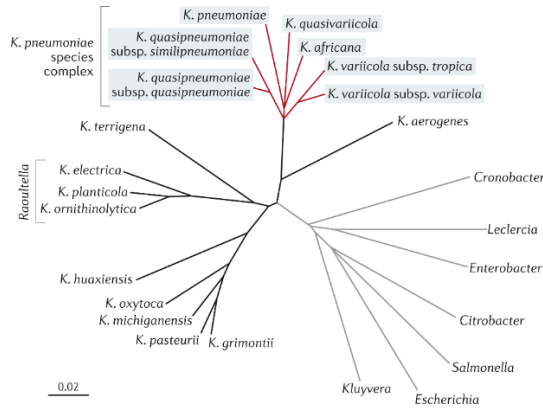
2.2. *Klebsiella pneumoniae*

2.2.1. Taksonomi

Klebsiella pneumoniae taksonomik olarak prokaryot canlılar içerisinde, Bakteriler alemine, Pseudomonadota filumuna, Gammaproteobacteria sınıfına, Enterobacterales takımına, *Enterobacteriaceae* ailesine, *Klebsiella/Raoultella* grubuna, *Klebsiellaeae* cinsine aittir [20]. Drancourt ve ark.'nın yaptığı çalışmada, 16S rRNA ve rpoB gen dizilerinin karşılaştırmalı analizi yapılarak, *Klebsiella* suşlarının filogenetik ilişkileri araştırılmış, sonuçta 9 *Klebsiella* türü tanımlanmıştır: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella trevisanii*,

Klebsiella terrigena, *Klebsiella oxytoca*. Bu türler de 3 kümeye ayrılmıştır: Küme I; *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* ve *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, Küme II; *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella trevisanii* ve *Klebsiella terrigena*'yı (Daha sonra *Raoultella* cinsi olarak adlandırılmıştır.), Küme III ise *Klebsiella oxytoca*'yı içermektedir [21]. İnsanda enfeksiyon yapan türler *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella granulomatis*'tir. *K. ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae*'nın karakteristik klinik belirtileri olan ve fermentasyon yapmayan alt türleri olarak düşünülmektedirler. Ancak spesifik enfeksiyonlardan izole edilmeleri nedeniyle kendi isimleriyle rapor edilmektedirler [22].

Tam genom dizilimi (WGS-Whole genome sequencing) ile, klinik ve araştırma laboratuvarlarında, biyokimyasal veya proteomik analizlerle *K. pneumoniae* olarak tanımlanmış izolatların önemli bir parçasının, aslında *K. pneumoniae* ile ortalama %95-96 nükleotid özdeşliğini paylaşan yakın akraba türlere ait olduğu açıklığa kavuşturulmuştur. Bu grubun resmi bir taksonomik tanımı yoktur ancak *K. pneumoniae* tür kompleksi (KpSC-*K. pneumoniae* species complex) olarak adlandırılmıştır ve diğer *Klebsiella* türleriyle yalnızca %90 ortalama nükleotid özdeşliğini paylaştıklarına dikkat çekilmiştir (Şekil 2.1). KpSC'ye ait olan yedi filogrup sınıflandırılmıştır: *K. pneumoniae* (Kp1), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *K. variicola* subsp. *variicola* (Kp3), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *K. variicola* subsp. *tropica* (Kp5), *K. quasivariicola* (Kp6) ve *K. africana* (Kp7). *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* ve *Klebsiella ornithinolytica*'ya, gyrB dizilerine dayalı olarak *Raoultella* cins adı verilmiştir, ancak bu, *Klebsiella*'yı monofiletik olmayan hale getirdiği için tartışılmaktadır [23, 24].



Şekil 2.1: *K.pneumonia*'nın Tam Genom Dizilimi Bazlı Filogenetik İlişkisi [23].

2.2.2. Tarihçe

Klebsiella cinsi, 1900'lerin sonunda yaşamış olan Alman mikrobiyolog olan Edwin Klebs'i (1834–1913) onurlandırmak adına Trevisan tarafından isimlendirilmiştir. Tanımlanan ilk *Klebsiella* türü rinoskloremalı bir hastadan izole edilen kapsüllü basildir ve bu mikroorganizma daha sonra “*Klebsiella rhinoscleromatis*” olarak adlandırılmıştır. Abel, ozeneası olan hastaların burun salgılarında “*Bacillus mucosus ozaenae*” isimli kapsüllü basil gözlemlemiş, bakteri daha sonra *Klebsiella* cinsine *K. ozaenea* olarak transfer edilmiştir. Alman patolog Carl Friedländer 1882 yılında ölümcül pnömoni etkeni olan bu Gram negatif bakteriyi tanımlamış olmasından dolayı uzun yıllar “Friedländer basili” olarak anılmıştır. Organizma daha sonra Schroeter tarafından “*Hyalococcus pneumoniae*” ve 1887 yılında Trevisan tarafından “*Klebsiella pneumoniae*” olarak adlandırılmıştır [25-29].

2.2.3. Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Klebsiella türleri doğada yaygın olarak toprak ve sularda bulunurlar. Aseptomatik olarak insan nazofarinksinde, gastrointestinal sistemde ve daha az sıklıkla diğer bölgelerde kolonize olabilirler [1]. *Klebsiella* cinsi bakteriler *Enterobacteriaceae* ailesinin genel karakter özelliklerini gösteren, bazen ikişer ikişer, bazen kısa zincirler oluşturan, 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm boyutlarında, Gram negatif, aerob veya fakültatif anaerob, hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü çomakçıklardır [1].

Genel kullanım besiyerlerinde rahatlıkla ürerler. Sıvı besiyerlerinde homojen, bulanık ve dipte mukoz bir çökelti oluştururlar. *K. pneumoniae* 'nın MacConkey agarda oluşturduğu koloniler büyük, mukoid, kırmızı-mor renkte, akıcı kolonilerdir. Bu görünüm laktoz fermentasyonunun ve fermantasyon sonucunda da asit üretildiğinin göstergesidir. Uygunsuz koşullarda S ve R kolonilerine dönüşebilirler. *K. pneumoniae* indol, ornitin ve oksidaz negatiftir. Voges-Proskauer, ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactoside), sitrat, üreaz pozitifdir, katalaz enzimine sahip olup, H₂O₂'yi su ve oksijene ayırıştırırlar. Lizini dekarboksile ederler ancak arjinin ve ornitini dekarboksile etmezler. Laktoz, süktroz, sorbitol şekerlerini fermante edebilirler. Kligler Iron Agarda yüzey ve dip kısımları asidik olduğundan sarı renkli görünür [30].

K. pneumoniae optimal olarak 37°C'de ve pH 7'de ürer. Isıya dayanaksız olup nemli ortamda 55°C'de 30 dakikada ölürler. Oda sıcaklığında tutulan kültürlerde

haftalarca, +4°C soğukta aylarca canlı kalırlar. Kapsülleri olması nedeniyle kuruluğa oldukça dirençlidir, cilt ve eşyalar üzerinde uzun süre kalarak çapraz enfeksiyonlara neden olabilirler. Özellikle kurumuş maddelerde aylarca canlı kalabilmektedirler. Üremeleri için kan, serum, asit sıvısı, glukoz gibi özel besin maddelerine gereksinim duymazlar [18, 22].

2.2.4. Virülans Özellikleri

2.2.4.1. Kapsül

K. pneumoniae'nin en önemli ve muhtemelen en kapsamlı şekilde incelenen virülans faktörü, besiyerinde mukoid koloni görünümüne neden olan, polisakkarit matriks yapısındaki kapsüldür. Ayrıca, hipervirülan *K. pneumoniae* suşları, tipik kapsülünkinden daha sağlam olan mukoviskoz bir ekzopolisakkarit tabakadan oluşan, “hipermukoviskoz” olarak da bilinen bir hiperkapsül üretmektedir [31]. Hipervirülan *K. pneumoniae* hipermukoviskozite fenotipi sıklıkla gençlerde piyojenik karaciğer apseleri, endoftalmi, osteomiyelit gibi ciddi enfeksiyonlardan sorumlu önemli bir patojendir. Bu patojenlerde karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç giderek artmaya başlamıştır [32].

Hücre yüzeyinde kalın bir kapsülün varlığı, hücreye bağlanmayı ve hücre içine internalizasyonu bloke ederek, *K. pneumoniae*'yi makrofajlar, nötrofiller, epitelyal hücreler ve dendritik hücrelerin opsonizasyon ve fagositozundan korur. Ayrıca erken inflamatuvar yanıtı baskılar, konakçıdan türetilen antimikrobiyal peptitlere karşı koruyucu bir kalkan oluşturur, dendritik hücre olgunlaşmasını bozabilir ve böylece proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltabilir [33].

Hem klasik kapsül hem de hiperkapsül, K antijenleri olarak adlandırılan, en az 78 adet suşa özgü kapsüller polisakkaritten oluşmaktadır (K1, K2, K3 vb.) [34]. Dünya çapında K2, genellikle idrar veya balgam örneklerinden elde edilen insan klinik izolatlarının en yaygın kapsüller serotipidir [35]. K1 veya K2 kapsül serotiplerine sahip *K. pneumoniae* suşları, K1/K2 olmayan suşlara göre daha sıklıkla hipermukoviskozdur [36] ve K1/K2 izolatları farelere intraperitoneal olarak enjekte edildiğinde genellikle diğer izolatlardan daha öldürücü olduğu bulunmuştur [37].

2.2.4.2. Siderofor

Demir, DNA replikasyonu ve elektron transferi de dahil olmak üzere yaşam için gereken birçok metabolik süreç için kritik bir elementtir. Kolonizasyon ve enfeksiyon sırasında replikasyon için demire ihtiyaç duyduklarından patojenlerin, konakçı tarafından sıkı bir şekilde düzenlenen demiri elde etmek için rekabet etmeleri gerekir. Bunun için siderofor adı verilen düşük molekül ağırlıklı, yüksek afiniteli, demir tutucu moleküller salgılarlar [38]. *K. pneumoniae* suşları birkaç siderofor kodlar ve her bir sideroforun virülansa ifadesi ve katkısı farklılık gösterir. *K. pneumoniae* tarafından eksprese edilen başlıca sideroforlar: enterobactin, yersiniabactin, salmochelin ve aerobactin'dir. Bu sideroforların demire afinitesi en düşük aerobaktin ile en yüksek enterobaktin arasında değişmektedir [31]. Bu moleküller, *K. pneumoniae* tarafından enfeksiyon sırasında salgılanarak doku yıkımında ve bakterinin sistemik yayılımında görev almaktadırlar. Bakterilerin büyümesini indüklemesiyle enfeksiyonları ağırlaştırdıkları tahmin edilmektedir [39].

2.2.4.3. Pili (Fimbria)

Enfeksiyon oluşumu bakterinin konak hücrenin epitel yüzeyine tutunması ile başlar. Bu tutunma sürecinde önemli fonksiyon gören pililer (fimbria), bakteri yüzeyinden dışa doğru uzanan, proteinöz yapıda, tüy benzeri, yapışkan, uzun, esnek yapılardır. *K. pneumoniae*'nin başlıca pilileri: mannoza duyarlı tip 1 ve mannoza dirençli tip 3 fimbriyalardır [31]. Tip 1 pililer bakteri hücre yüzeyinde ince, iplik benzeri çıkıntılardır ve hem klinik hem de çevresel *K. pneumoniae* izolatlarının %90'ında eksprese edilerek daha çok idrar yolu enfeksiyonu süreçlerinde rol oynarlar. Tip 3 fimbrialar ise membrana bağlı, sarmal benzeri filamentlerdir ve daha sıklıkla tıbbi cihazlara bağlanma ve biyofilm oluşumu ile solunum yollarındaki enfeksiyon süreçlerinde adezyon faktörü olarak görev alırlar [31, 40]. Biyofilm yapısı ile bakteriler nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden, ultraviyoleten ve fagositozdan korunmakta, böylece *K. pneumoniae*'nin virulansına katkı sağlanmaktadır [41].

2.2.4.4. Lipopolisakkarit

Endotoksin olarak da bilinen LPS (lipopolisakkarit) tüm Gram negatif bakterilerin dış zarının önemli ve gerekli bir bileşenidir ve bakteriler için aynı zamanda

virölans faktörüdür. Bakteri türleri arasında farklılıklar olmasına rağmen LPS tipik olarak üç ana alt birimden oluşur: Lipid A, fosforile oligosakkarit yapıda çekirdek ve tekrarlanan oligosakkarit yan zincirlerinden oluşan O antijeni.

Bakteriyel LPS'nin lipit kısmı olan lipit A, bir model tanıma reseptörü olan TLR4 (Toll benzeri reseptör)'ün güçlü bir ligandıdır ve potansiyel olarak güçlü bir inflamasyon aktivatörüdür. TLR4 uyarımı, *K. pneumoniae* enfeksiyonunu temizleyen ve diğer dokulara yayılmasını kontrol eden hücresel yanıtların toplanmasına ve etkinleştirilmesine yardımcı olan sitokinlerin ve kemokinlerin üretimine yol açar. Bu nedenle *K. pneumoniae*, enfeksiyon sırasında daha az inflamatuvar hale getirmek için lipid A'yı değiştirebilir ve lipid A ayrıca katyonik antimikrobiyal peptitlerin bakterisidal etkisine karşı da koruma sağlayabilir [31].

LPS'nin en dışta yer alan alt birimi olan O-antijeni, konağın doğal bağışıklık sisteminin karşılaştığı ilk moleküldür ve patojenleri kompleman aracılı öldürmeye karşı korur. Bunu yaparken C1q (Kompleman 1q)'nın bakterilere bağlanmasını önleyerek kompleman yolunun daha sonraki aktivasyonunu engellediği gibi, hem bir opsonin hem de bakteri membranında por oluşturma sürecinin bir parçası olan C3b (Kompleman 3b) 'yi de bağlayarak membran atak kompleksi oluşumunu, dolayısıyla da bakteri hücre lizisini engeller. *K. pneumoniae* izolatlarında yalnızca 9 farklı O-antijen tipi tanımlanmıştır ve O1 en yaygın olanıdır [31, 42].

2.2.5. Epidemiyoloji

Klebsiella türleri doğada kanalizasyon, içme suyu, toprak, yüzey suları, endüstriyel atık suları ve bitki örtüsünde yer alır [43]. İnsanlar ve hayvanlarda ise sıklıkla üst solunum yolları ve bağırsaklar da dahil olmak üzere çeşitli mukozal yüzeylerde kolonileşir; kolonizasyon oranları, habitatlarına ve maruziyete bağlı olarak bireyler arasında büyük farklılıklar gösterir [44]. Ayakta tedavi gören alkolik hastalarda daha yüksek nazofarengeal taşıyıcılık oranları kaydedilmiştir [45]. Son araştırmalar, *Klebsiella* kolonizasyonunun prevalansının Asya'da %18,8 ila %87,7 ve Batı ülkelerinde %5 ila %35 arasında değiştiğini göstermiştir [46, 47]. Hastane dışı ortamlarda dışkı örneklerinde *Klebsiella*'nın taşıyıcılık oranı %5 ila %38 arasında iken, nazofarinkteki taşıyıcılık oranları %1 ila %6 arasında değişmektedir [45, 48]. Gram negatif bakteriler insan derisinde yeterli ve elverişli büyüme koşulları bulamadığından *Klebsiella* türleri deride nadiren bulunurlar ve genellikle floranın

geçici üyeleri olarak kabul edilirler [49, 50]. Hastanede yatan hastalarda ise nazofarenkste kolonizasyon oranlarının %19, yüz ve ellerde %42 ve gastrointestinal sistemde ise %77'ye kadar çıkabildiği rapor edilmiştir [48, 51]. Yüksek kolonizasyon oranları, hastanede kalış süresi ve özellikle geniş spektrumlu ve çoklu antibiyotik kullanımıyla ilişkili bulunmuştur [48, 51, 52].

Yaygın antibiyotik kullanımı aynı zamanda *K. pneumoniae*'da çoklu ilaç direncinin gelişmesinden de sorumludur. Gastrointestinal kolonizasyon, diğer bölgelere bulaşma ve enfeksiyon için önemli bir rezervuar görevi görür [44]. Gorrie ve ark.'nın yapmış oldukları bir çalışmada, genomik bir perspektiften bakıldığında, gastrointestinal mikrobiyotanın nozokomiyal *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının önemli bir kaynağı olduğu ve bu enfeksiyonların %80'inin kolonize olan suşlardan kaynaklandığı gösterilmiştir [53]. Kolonizasyondan enfeksiyona geçiş, temel olarak altta yatan hastalıkların veya immünomodülatör tedavilerin belirlediği, konakçı savunmasındaki bozulmaya bağlıdır [54, 55]. Özellikle diyabet, alkolizm, malignite, hepatobiliyer hastalık, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, glukokortikoid tedavisi, böbrek yetmezliği gibi komorbiditeleri olan bireylerde *Klebsiella*'ya bağlı enfeksiyonların arttığı gösterilmiştir [48, 56].

CDC (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi) ve ECDC (Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi) ile yapılan nokta prevalansı anketlerine göre pnömonilerin %11,4-11,8'inden, cerrahi alan enfeksiyonlarının %6-13,6'sından, idrar yolu enfeksiyonlarının %12-23,1'inden, dolaşım yolu enfeksiyonlarının %8-9,8'inden *K. pneumoniae* sorumludur. *K. pneumoniae* sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonlar arasında CDC 'ye göre üçüncü ve ECDC'ye göre beşinci sırada yer almıştır[57].

K. pneumoniae'nin Amerika Bölgesi'ndeki hastane kaynaklı pnömonilerin %20-30'unun etiyolojik ajanı olduğu ve hastane içi Gram negatif bakteriyemide izole edilen ilk üç etken arasında olduğu tahmin edilmektedir. Hastane ortamında *Klebsiella spp.* bulaşı ve nozokomiyal enfeksiyonların ana rezervuarları, hastaların gastrointestinal sistemi ve hastane personelinin elleridir [58]. *Klebsiella*'nın nozokomiyal yayılımını önlemek için birtakım önlemlerin alınması gerektiği unutulmamalıdır. Üriner kateterlerin, intravenöz trakeostomilerin ve yaraların yönetimi, ekipmanın bakımı ve iyi el yıkama uygulamalarına yönelik temel epidemiyolojik standartlara sıkı sıkıya bağlı kalmak, nozokomiyal

Klebsiella enfeksiyonlarının yayılmasını önlemeye yardımcı olmaktadır. Bir diğer önlem de antibiyotiklerin yanlış ve aşırı kullanımını önlemek için hastanede antibiyotik kullanımının düzenlenmesidir. Ayrıca nozokomiyal *Klebsiella* yayılımının önlenmesi için hastane içi enfeksiyon sürveyansı yapılması gereklidir [58].

2.2.6. Klinik

Klebsiella pneumonia klinik örneklerden sık izole edilmekte, toplum kökenli ve hastane kaynaklı pnömoni, ampiyem, bakteremi ve sepsis, üriner sistem enfeksiyonları, spontan bakteriyel peritonit, gastroenterit gibi primer enfeksiyonların yanı sıra, karaciğer ve dalak apsesi, menenjit, beyin apsesi, epidural apse, endoftalmi ve üveit, yara yeri enfeksiyonları ve nekrotizan fasiit, boyun ve psoas apseleri, prostat apsesi, osteomyelit ve pyojenik artrit gibi bir çok metastatik enfeksiyona da sebep olmaktadır. Metastatik enfeksiyonlardan, özellikle diyabetik hastalarda HvKP (hipervirülan *Klebsiella pneumoniae*) sorumlu tutulmuştur [59-66]. Pulmoner emboli gibi vasküler trombotik komplikasyonlar ve enfektif endokardit olguları da bildirilmiştir [66, 67].

Genel olarak *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında semptomlar spesifik değildir. Ateş, titreme, karın ağrısı, bulantı ve kusma gibi genel enfeksiyon belirtileri gözlemlenmektedir ancak HvKP'ye bağlı oluşan enfeksiyonlarda metastatik enfeksiyonun konumundan kaynaklanan spesifik belirtiler de gözlemlenmektedir.

2.2.6.1. Pulmoner enfeksiyonlar

K. pneumoniae'ya bağlı akciğer enfeksiyonları arasında nozokomiyal pnömoni, toplum kökenli pnömoni, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan hastalarda ikincil enfeksiyon, akciğer apsesi ve ampiyem yer almaktadır.

K. pneumoniae'nın etken olduğu toplum kaynaklı pnömoni özellikle Asya ülkelerinde daha siktir. Avrupa ve ABD'de ise daha çok alkoliklerde, ciddi KOAH'ı olanlarda ve diyabetik hastalarda görülmektedir [68]. *K. pneumoniae* nedenli toplum kökenli pnömoninin (TKP) klinik belirtileri öksürük, ateş, plöretik göğüs ağrısı, nefes darlığı, taşipne, balgam, fizik muayenede raller ve lökositozdur [69]. Pnömoni destrüktif seyretme eğiliminde olabilir, alveolar alanda geniş nekroz ve kanamalar yapabilir. Balgam kalın, mukoid, tuğla kırmızısı renginde veya "kuş üzümü jölesi" görünümünde olabilir. Ağır olgularda kronik kaviter hastalık, akciğer apsesi, alveolar

hemoraji ve hemoptizi görülebilir. *K. pneumoniae* pnömonisinde plörit tablosu sıklıkla görülmektedir (hastaların yaklaşık %80'inde plöritik ağrı şikayeti bulunur) [70]. Radyolojik görüntülemelerde nozokomiyal pnömoniden farklı olarak lobar pnömoni tutulumu görülür. Sağ üst lobun arka segmentinin tutulumuna yatkınlık vardır. Yoğun konsolidasyon nedeniyle fissürün aşağı doğru eğilmesi fissür işaretinin oluşmasına neden olabilir. Ancak *Klebsiella*'nın toplum kökenli pnömoni nedeni olarak ayrımı yalnızca radyografik bulgularla yapılamaz [69].

Erken ve uygun antimikrobiyal tedaviyle bile *K. pneumonia* etken olduğu TKP'nin mortalite oranları, özellikle bakteriyemi ile ilişkili durumlarda yüksektir [71]. Lobar pnömonili hastalarda ölümün en önemli sebepleri diğer loblara hızlı disseminasyon ve ARDS'ye (Akut Respiratuar Yetmezlik Sendromu [Acute Respiratory Distress Syndrome]) bağlı solunum yetmezliği olarak belirtilmiştir.

K. pneumoniae' ya bağlı nozokomiyal pnömoni genel olarak ateş, öksürük, sekresyonlarda artış ve lökositoz ile birlikte yeni gelişen pulmoner infiltrasyon şeklinde seyreder. Ventilatör desteği gerektiren veya yoğun bakım ünitesindeki hastalarda, üst solunum yollarının nozokomiyal kolonizasyonu yaygındır. Bu nedenle, pnömoninin başka belirti ve semptomları olmayan böyle bir hastanın balgamından *K. pneumoniae* izolasyonu, enfeksiyon göstergesi olmayabilir. Nozokomiyal *K. pneumoniae* akciğer enfeksiyonları genellikle bronkopnömoni veya bronşit olarak ortaya çıkar [69]. Çoğunluğu hastane kaynaklı olan 198 akut *K. pneumoniae* pnömonisi vakasından oluşan bir seride, en yaygın BT bulguları buzlu cam opasiteleri (%100), alveoler konsolidasyon (%91), intralobar retiküler opasiteler (% 86) ve plevral efüzyonlar (%53) şeklinde saptanmıştır [72]. Nozokomiyal vakalardaki *Klebsiella* izolatlarının çoklu ilaca dirençli olma olasılığı daha yüksektir.

KOAH tanılı hastalarda görülen sekonder enfeksiyonların klinik bulguları KOAH alevlenmesine benzer. Özellikle Çin ve Tayvan'da *K. pneumonia* ve diğer Gram negatif basiller sıklıkla izole edilmektedir [73].

K. pneumonia akciğer apsesinin nadir bir etkenidir, en sık izole edilen mikroorganizmalar dış eti florasını oluşturan anaerob bakterilerdir. Ancak Tayvan'da 1995'ten 2003'e kadar akciğer apsesi nedeniyle hastaneye yatırılan 90 yetişkinin retrospektif değerlendirildiği bir çalışmada, olguların çoğunlukla *K. pneumonia* (%21) enfeksiyonuna bağlı ve altta yatan diyabet ile ilişkili olduğu bulunmuştur [74].

2.2.6.2. Bakteremi

K. pneumoniae, Gram negatif basillerin neden olduğu bakteremilerin nispeten yaygın bir nedenidir ve toplumdan edinilen enfeksiyonlardan ziyade nozokomiyal enfeksiyonlarda daha siktir.

Kanada'da, *K. pneumoniae* ilişkili bakteremi tespit edilen 640 olgunun retrospektif incelemesinde vakaların %70'inin nozokomiyal, %30'unun toplum kökenli olduğu ve en sık primer odakların biliyer ve genitoüriner sistem olduğu görülmüştür. Solid organ nakli, kronik karaciğer hastalığı, diyaliz ve malignite varlığı en önemli risk faktörleri olarak bulunmuştur [55].

Bakteremili hastaların yüzde 30 ila 47'sinde birincil enfeksiyon kaynağı belirlenememektedir [54, 55, 75]. Bu durumun toplum kökenli enfeksiyonlara göre nozokomiyal enfeksiyonlarda ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir. Toplumdan edinilmiş ve kökeni belirsiz *K. pneumoniae* bakteremisi olan ve uygun antibiyoterapiye rağmen ateşi devam eden hastalarda, Doğu Asya primer karaciğer apsesinin akılda tutulması ve ultrasonografi veya bilgisayarlı tomografi ile batin görüntülemesi yapılması önerilmektedir [69].

K. pneumoniae nozokomiyal kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu ve enfektif endokarditte ise daha nadiren etken olarak karşımıza çıkar. Bu nedenle, *K. pneumoniae* bakteriyemisi olan hastalarda, transtorasik ve/veya transözofageal ekokardiyografi ile enfektif endokardit değerlendirmesi yalnızca tanıdan klinik olarak şüphelenildiğinde veya yüksek riskli hastalarda (Örneğin; önemli veya yeni kalp üfürümü, protez kalp kapağı vb.) yapılmalıdır [69].

2.2.6.3. Genitoüriner sistem enfeksiyonları

K. pneumoniae, *E. coli*'den daha az olmakla birlikte hem alt hem de üst üriner sistem enfeksiyonlarına sıklıkla neden olabilmektedir. Literatürde sistit, piyelonefrit, renal ve perinefritik apse, prostatit ve periprostatik apse gibi klinik tablolar bildirilmiştir. *K. pneumoniae* aynı zamanda öncelikle diyabetli hastalarda ortaya çıkan ve üriner obstrüksiyon ile ilişkili olabilen amfizematöz idrar yolu enfeksiyonlarına da neden olabilmektedir [76, 77].

Renal apse formasyonu, genellikle kortikal apse ile sonuçlanan hematojen yayılımla veya daha az sıklıkla mesaneden asendan yolla meydana gelmektedir.

Tayvan’da 24 hasta üzerinde yapılan retrospektif bir incelemede; diyabet, ürolitiazis ve immünsüpresyonun majör risk faktörleri olduğu bulunmuştur [78].

K. pneumoniae genellikle prostatit ve prostat apsesinin nadir görülen bir nedenidir ve prostat enfeksiyonunun en şiddetli biçimleri amfizematöz prostatit ve prostat apsesidir. Risk faktörleri arasında diyabet ve kronik alkolizm yer alır ve bu nadir komplikasyonlara ilişkin raporların çoğu Doğu Asya'dan gelmektedir [79-81].

2.2.6.4. İntraabdominal enfeksiyonlar

K. pneumoniae, karaciğer ve dalak apsesi, spontan bakteriyal peritonit gibi batin içi enfeksiyonlarda etken olabilmektedir. *K. pneumoniae*’nın sıklıkla etken olduğu piyojenik karaciğer apseleri genellikle altta yatan hepatobiliyer patoloji ve kolanjit ile ilişkilidir ve polimikrobiyaldir [69]. Ayrı bir klinik sendrom olan *K. pneumoniae*’ye bağlı primer karaciğer apsesinde altta yatan hepatobiliyer hastalık yoktur ve özellikle Tayvan’da önemli bir toplum kökenli enfeksiyon olarak kabul edilmiştir. Sıklıkla hipermukoviskozite gösterir ve hipervirulan fenotip ile ilişkilidir. Genellikle apse monomikrobiyaldir, katı, ince duvarlı, zor aspire edilen ve bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülemelerinde karaciğerin yalnızca bir lobunu kapsayan tek, multiloküle, periferik kontrastlanmayan bir apse olma eğilimindedir. Ayrıca hepatik ve portal venöz sistemin septik tromboembolileriyle ilişkilendirilmiştir [69, 82].

K. pneumoniae, iki vaka serisinde dalak apsesi vakalarının yüzde 10 ila 16’sında rapor edilmiştir [83, 84]. Sıklıkla eş zamanlı karaciğer apsesi saptanması, metastatik enfeksiyon varlığını düşündürmektedir. Bilinen siroz hastalığı olan asitli hastalarda spontan bakteriyal peritonit etkeni olarak *E.coli*’den sonra ikinci sıklıkla izole edilmektedir [85].

2.2.6.5 Menenjit ve beyin apsesi

K. pneumoniae, nozokomiyal menenjitin nispeten yaygın bir nedenidir ve nöroşirürjik operasyon nozokomiyal menenjit için ana risk faktörüdür. *K. pneumoniae* gibi Gram negatif mikroorganizmalara bağlı beyin cerrahisi sonrası menenjit olasılığı, Gram pozitif patojenlere yönelik profilaksi uygulandığında artmıştır [86].

K. pneumoniae’ya bağlı toplum kaynaklı menenjit ve beyin apsesinin nadir bir etkenidir. Hollanda’daki 696 bakteriyal menenjit vakasının gözden geçirildiği bir

çalışmada yalnızca birinde *K. pneumoniae*'nin etken olduğu görülmüştür [87]. Menenjit ve beyin absesine Doğu Asya'da, özellikle Tayvan'da, primer karaciğer absesinin metastatik komplikasyonu olarak nispeten daha sık karşılaşılmaktadır [69].

2.2.6.6. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

K. pneumoniae, fatal seyredebilecek nekrotizan fasiite ve miyozite kadar ilerleyebilen şiddetli selülit tablosuna yol açabilmektedir. Batı ülkelerinde nadir olmakla birlikte özellikle Tayvan'da daha yaygın görülmektedir [69].

Derin boyun boşluğu enfeksiyonlarında esas olarak anaeroblar ve streptokoklar etken olmakla birlikte *K. pneumoniae* özellikle Tayvan'da etyolojide önemli bir yer tutmaktadır. Tayvan'da yapılan, baş ve boyundaki fasyal enfeksiyonu olan 100 toplum kökenli olgunun incelendiği bir çalışmada, *K. pneumoniae* (%48) en yaygın patojen olarak tespit edilmiştir [88].

2.2.6.7. Diğer enfeksiyonlar

Endoftalmi, psoas absesi, spinal-epidural apseler, vertebral osteomyelit, spondilodiskit, septik artrit, pürülan perikardit, mikotik anevrizma *K. pneumoniae*'nin nadiren etken olduğu enfeksiyonlardır. Sıklıkla karaciğer absesi gibi bir odaktan metastatik yayılımla ortaya çıkmaktadır [69]

2.2.7. Tedavi

K. pneumoniae 'ların neden olduğu enfeksiyonlar klinikte önemli morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Tedavi planlanmasında diğer faktörler yanında enfeksiyonun kaynağı, enfeksiyonun ciddiyeti ve bakterinin duyarlılık profili göz önünde bulundurulmalıdır. Antibiyoterapi seçiminde giderek artan direnç faktörü oldukça önemlidir. Bunun yanında enfeksiyon odağının kontrolü (Örneğin; doku apse drenajı) ve gerekli durumlarda (Örneğin; endoftalmide sistemik tedavinin yanı sıra intravitreal antibiyoterapi ve vitrektomi vb.) ek tedaviler de uygulanması düşünülmelidir.

2.3. Klebsiella Cinsi Bakterilerin Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

2.3.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler

Beta-laktam grubu antibiyotikler bakteri sitoplazmik membranında bulunan ve hücre duvarında peptidoglikan sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinleri

(PBP) hedef alan, bakterisidal kemoterapötiklerdir. PBP, hücre duvarı sentez basamaklarından olan transpeptidasyonda görevli serin proteaz derivativesi bir enzimdir. Sonuçta peptidoglikan sentezi inhibe edilir, hücre duvarı sentezi yapılamayan bakteri lizise uğrar ve ölür. Beta-laktam antibiyotikler, 4 atomlu beta-laktam halkası ve bu halkaya eklenmiş ikinci bir halka ve çeşitli yan zincirler ile, farklı etkinlik ve moleköl yapısında beş gruba ayrılmaktadır; penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, beta-laktamaz inhibitörleri, monobaktamlar [89].

2.3.1.1. Penisilinler

İlk kez 1928’de Alexander Fleming tarafından *Penicillium notatum* adındaki bir mantarın, stafilokoklarda lizise neden olan antibakteriyel bir madde salgıladığı farkedilmiş ve bu maddeye penisilin adı verilmiştir. Daha sonra 1940’lı yıllarda saflaştırılarak klinik kullanıma girmiştir.

Penisilinlerde beta laktam ana halkaya ek tiazolidin halkası kaynaşmış durumdadır. Amino-açıl yan zincirindeki değişiklikler penisilinler arasındaki yapısal ve antibakteriyel farklılıkları belirler [89].

Penisilinler 5 grupta incelenmektedir:

1. Doğal penisilinler
2. Penisilinaza dirençli (antistafilokoksik) penisilinler
3. Amino penisilinler
4. Karboksipenisilinler
5. Üreidopenisilinler

Klasik doğal penisilinler; penisilin G ve penisilin V (fenoksimetilpenisilin)’dir. Bu penisilin grubunun Gram negatif enterik bakterilere etkisi yoktur.

Stafilokokların ise %90’ından fazlası salgıladıkları penisilinaz enzimi ile penisilinleri inaktive eder. Antistafilokoksik penisilinler, penisilinaz enzimine dayanıklı olan tek penisilin grubudur. Bu grupta metisilin, nafsilin, oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin yer almaktadır [89].

Aminopenisilinler grubunda ampisilin, amoksisilin ve bakampisilin bulunmaktadır. [90]. Penisilinın etki spektrumuna ilaveten *E.coli*, *P.mirabilis*, *Salmonella* ve *Shigella* türleri gibi bazı Gram negatif bakterilere etki ederler ancak

Klebsiella, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* türlerinin çoğu penisilinlerin bu sınıfına dirençlidir [90]. Beta-laktamazlara karşı duyarlıdır [89].

Karboksipenisilinlerin hücre duvarı geçirgenlikleri artmış olduğundan Gram negatif bakterilere daha etkindir. Bu grupta tikarsilin ve karbenisilin bulunmaktadır. Antipseudomonal etkinlerinin yanında *P.vulgaris*, *Enterobacter*, *Providencia* türleri gibi Gram negatif enterik bakterilere de etkindir [89]. Ancak, günümüzde oldukça yüksek direnç oranları ve yine yüksek oranlarda tuz içermesi nedeniyle kullanımdan kaldırılmışlardır [91].

Üreidopenisilinler antipseudomonal penisilinler veya geniş spektrumlu penisilinler olarak da adlandırılırlar. Bu grupta bulunan antibiyotikler azlosilin, mezlosilin ve piperasilin olup, bunlar ampisilinin semisentetik türevleridir. Primer etkinlikleri *Klebsiella pneumoniae* gibi Gram negatif bakteriler ve özellikle *P.aeruginosa*’dır [89].

2.3.1.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler yapı ve etki mekanizmaları olarak penisilinlere benzemekle birlikte penisilinaza dirençli antibiyotiklerdir. Bu direnci oluşturan, penisilinlerden farklı olarak sahip oldukları dihidrothiazin halkasıdır. Diğer yandan penisilinler gibi PBP’ye bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eder ve bakterisidal etki gösterirler.

Sefalosporinler beş kuşakta incelenmektedir [89];

Birinci kuşak sefalosporinler: Sefalotin, sefazolin, sefalekssin, sefadroksil bu grupta yer almaktadır. İlk keşfedilen ve Gram pozitif bakterilere daha etkin olan sefalosporinlerdir [89]. Streptokoklara, metisiline duyarlı *S.aureus* ve *S.epidermidis*’e çok etkilidirler [92].

İkinci kuşak sefalosporinler: Sefuroksim, sefoksitin, sefaklor, sefotetan, sefprozil, lorakarbef bu grupta yer almaktadır. Gram pozitif koklara karşı etkinlikleri, birinci kuşak sefaloporinlere göre daha azdır, ancak bazı Gram negatif basillere ve anaeroplara karşı daha etkindirler. *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* gibi solunum yolu patojenlerine çok iyi etkinlik gösterirler. Toplum kökenli pnömoniler, bakteriyel kaynaklı üst solunum yolu enfeksiyonları, sinüzit, otit, yumuşak doku enfeksiyonları, komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonları, intraabdominal ve jinekolojik enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilmektedirler [89].

Üçüncü kuşak sefalosporinler: Sefotaksim, sefoperazon, seftriakson, seftazidim, sefiksım, sefpodoksım, sefdibuten, sefdinir, seftolozan bu grupta yer almaktadır. Gram negatif basillere (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.* ve *Serratia spp.*) ve *Neisseria* türlerine etkinlikleri ikinci kuşak sefalosporinlere göre daha fazladır. Pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, akut bakteriyel menenjit, peritonit ve batin içi/pelvik enfeksiyonlarda genellikle anaerobik bir ajanla kombine şekilde kullanılmaktadırlar [89].

Dördüncü kuşak sefalosporinler: Sefepim, sefpirom bu grupta yer almaktadır. Yan zincirinde meydana gelen değişiklik ile Gram negatif bakterilere penetrasyonu daha iyi olan, antipsödomonal etkinlikte antibiyotiklerdir. Gram negatif bakterilere karşı etkisi 3. kuşak sefalosporinlere benzerdir ancak Gram pozitif bakterilere etkinlikleri daha iyidir. Gram negatif enterik basillere üçüncü kuşak sefalosporinlerden daha etkilidirler [89].

Beşinci kuşak sefalosporinler: Seftobiprol, seftarolin bu grupta yer almaktadır. Gram negatif basillere karşı etkinlikleri 3. kuşak sefalosporinlere benzerdir [89]. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve penisilin dirençli pnömokoklara etkinlikleri belirgindir. Seftarolin MRSA'ya, penisilin dirençli pnömokoklara, vankomisine dirençli *S. aureus*'a (VRSA), koagülaz negatif stafilokoklara (KNS) ve vankomisin dirençli enterokoklara (VRE) karşı aktiftir. Antipseudomonal etkinliği yoktur [93].

Seftabiprol MRSA'ya, penisilin dirençli pnömokoklara, VRSA'ya ve KNS'lere karşı aktiftir. Antipseudomonal etkinliği olmasına rağmen seftazidim dirençli *P. aeruginosa*'ya karşı iyi değildir. Seftazidim duyarlı ve GSBL (Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz) üretmeyen *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Proteus mirabilis*'e karşı etkinliği iyi iken, GSBL üreten suşlara karşı aktivitesi azalmıştır [94].

2.3.1.3. Beta-laktamaz inhibitörleri

Bu grupta yer alan klavulanat, sulbaktam, tazobaktam, avibaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri, beta-laktamaz enzimlerinin aktif bölgesine geri dönüşümsüz olarak bağlanarak bu enzimleri inhibe etmektedirler. Tek başına antibakteriyel etkileri zayıftır. Ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin, seftolozan, seftazidim ile aynı preperat içinde birleştirilmesi ile beta-laktamaz inhibitörlü kombine moleküller

geliştirilmiştir. Bu kombinasyonlar genellikle *Klebsiella* türlerinin ve *E.coli*'nin plazmid kökenli beta-laktamazlarını inhibe etmektedir [95].

Ampisilin-sulbaktam: Sulbaktam kimyasal olarak 6-desaminopenisilin sulfon olarak adlandırılan yarı sentetik bir bileşiktir. PBP2'ye bağlanarak inhibisyona yol açar [95]. Ampisilin-sulbaktam 2:1 oranında ampisilin ve sulbaktam içerir. Metisilin sensitif *S. aureus* (MSSA) ve beta-laktamaz üreten *H. influenza*, *B. fragilis*, bazı *Enterobacteriaceae* üyelerine etkinlik gösterir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlarda kullanımı mevcuttur. *Enterobacteriaceae*'da artan direnç nedeniyle batın içi enfeksiyonlarda kullanımı azalmıştır [96].

Sefoperazon-sulbaktam: Sefoperazon-sulbaktamın 1:1 ve 2:1 oranlarında kombinasyon formları bulunmaktadır. Geniş etki spektrumuna sahip olduğundan nozokomiyal enfeksiyonlarda tercih edilirler.

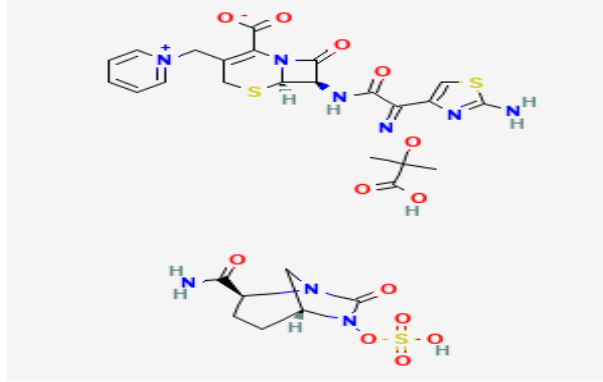
Piperasilin-tazobaktam: Gram pozitif ve Gram negatif aerobik ve anaerobik bakterileri içeren geniş bir antibakteriyel aktivite spektrumuna sahiptir. GSBL üreten *Enterobacteriaceae*'ya karşı in vitro aktivitesi mevcuttur [97].

Seftolozan-tazobaktam: Çoklu ilaca dirençli suşlar dahil olmak üzere şu anda en aktif antipseudomonal ajanlardan biridir. Tazobaktam, birçok geniş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae*'ya karşı ek aktivite sağlar. Seftolozan-tazobaktamın, komplike idrar yolu enfeksiyonu, komplike batın içi enfeksiyonlar ve nozokomiyal/ventilatör ilişkili bakteriyel pnömoni (VIP) için kullanımı resmi olarak onaylanmıştır.

Seftazidim-avibaktam: Seftazidim antipseudomonal etkinliği ön planda olan, aminotiazolil grubu yarı sentetik 3. kuşak sefalosporindir (Şekil 2.2). Diğer 3.kuşak sefalosporinlerden farklı olarak methoksiamino grup yerine α -karbon dimetil asetik asit içerir. Bu molekül *Pseudomonas* türlerine karşı artmış aktivite sağlarken *Enterobacteriaceae* üyelerine karşı etkinliğini azaltır [98].

Avibaktam (eski adıyla NXL104, AVE1330A) 2011 yılında patent almış, kendi başına antimikrobiyal etkinliği olmayan, semi-sentetik, beta laktam olmayan bir beta-laktamaz inhibitörüdür. Kimyasal yapısı beta-laktamlara oldukça benzer. Esas olarak Ambler sınıf A (KPC [*Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz], GSBL), sınıf C ve daha az ölçüde bazı sınıf D (OXA-48) beta-laktamazlara etkinlik gösterir. Metallo-beta-

laktamazlara (NDM, VIM, IMP, VEB, PER vb.) ve anaeroblara etkinliği yoktur [98-100].



Şekil 2.2: Seftazidim-avibaktam Kimyasal Yapısı.

Seftazidim-avibaktam, KPC karbapenemaz üreten suşlara karşı etkinliği olan ilk beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonudur [98]. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'yı içeren geniş Gram negatif etkinliği mevcuttur.

Seftazidim-avibaktam 2 gram seftazidim, 0,5 gram avibaktam içeren 4:1 oranında formüle edilmiştir ve dozu, normal renal fonksiyona sahip erişkin bireyler için günde 3 kez 8 saat ara ile 2,5 g (2 g seftazidim ve 0,5 g avibaktam) şeklindedir [99]. Doğrusal bir farmakokinetik sergiler hem seftazidim hem de avibaktam esas olarak böbreklerden elimine edilir, vücutta metabolize olmaz, böbrek yetmezliğinde doz ayarlaması gerekir.

Seftazidim-avibaktam 2015 yılında, 18 yaş ve üzeri hastalarda *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *C. freundii*, *Proteus spp.* ve *P. Aeruginosa*'nın etken olduğu komplike üriner sistem enfeksiyonları ve intraabdominal enfeksiyonlar için (metronidazol ile kombinasyon şeklinde), 2018 yılında hastane kökenli ve ventilatör ilişkili pnömoni enfeksiyonları için FDA tarafından kullanım onayı almıştır [98].

Meropenem-vaborbaktam: Vaborbaktam yüksek serin proteaz afinitesinden dolayı meropeneme eklendiğinde KPC üreten suşlara karşı etkinliği artırmaktadır. Ancak vaborbaktam, Ambler sınıf B karbapenemazlarına (metallo-beta-laktamazlar) karşı çok az aktiviteye sahiptir veya hiç aktivite göstermemektedir. Daha spesifik olarak, çeşitli A sınıfı karbapenemazları (KPC2, KPC-3, KPC-4, BKC-1, FRI-1 ve SME-2),

A sınıfı GSBL'leri (CTXM, SHV ve TEM) ve C sınıfı sefalosporinazları inhibe eder [101].

İmipenem-silastatin-relebaktam: Relebaktam Ambler sınıf A ve C beta-laktamazları kovalent ve geri dönüşümlü bağlanarak inhibe eden, KPC ve GSBL üreten suşlara karşı etkili bir beta-laktamaz inhibitörüdür. OXA 48'lere daha az etkilidir ve MBL'lere karşı etkinliği yoktur. Relebaktam eklenmesiyle, imipenemin karbapenemaz üreten bakterilere karşı etkinliğinin 16 kattan fazla arttığı gösterilmiştir [102].

2.3.1.4. Monobaktamlar

Monosiklik yapıda çekirdeği ile diğer beta-laktam antibiyotiklerden farklılık gösteren antibiyotiklerdir. Aztreonam yalnızca Gram negatif bakterilere etkilidir. Etki spektrumunda *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* gibi sık rastlanan Gram negatif patojenler yer almaktadır [89, 90].

2.3.1.5. Karbapenemler

Karbapenemler toprakta bulunan bir mikroorganizma olan *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamisin türevi antibiyotiklerdir. Ertapenem, imipenem, meropenem ve doripenem ABD'de klinik kullanım için onay almış 4 karbapenemdir. Karbapenemler 1.pozisyonda sülfür yerine karbon atomu olması ve beş üyeli tiazolidin halkasındaki C2 ve C3 arasında çift bağ bulunması ile penisilinlerden ayrılırlar (Şekil 2.3) [89]. Yan zincirlerindeki farklı trans konfigürasyonundan dolayı karbapenemlerin pek çoğu beta-laktamaz enzimine dayanıklıdır. Karbapenemler başta PBP2 olmak üzere PBP1A, PBP1B, PBP4, PBP5 ve daha az olarak PBP3'e kovalan olarak bağlanarak bakteri peptidoglikan sentezini inhibe eder, böylece hücre duvarı yapımını engellerler [95]. Karbapenemler, bakteri membranına güçlü penetrasyonu, PBP'ye yüksek afinitesi ve birçok beta-laktamaza (GSBL ve AmpC dahil) karşı stabilitesi ile Gram pozitif/negatif, aerob ve anaerob bakterilere karşı tüm antibiyotikler içinde en geniş etki spektrumuna sahiptir. Tüm karbapenemler benzer antimikrobiyal spektruma sahiptir. Gram pozitif bakterilerden streptokoklara, pnömokoklara, stafilokoklara (metisiline duyarlı olanlar) karşı çok etkilidirler. Genel olarak imipenemin Gram pozitif, meropenem ve doripenemin Gram negatif etkinliği daha iyidir. Non-fermenter Gram negatiflere ve anaeroblara etkilidirler [89, 95].

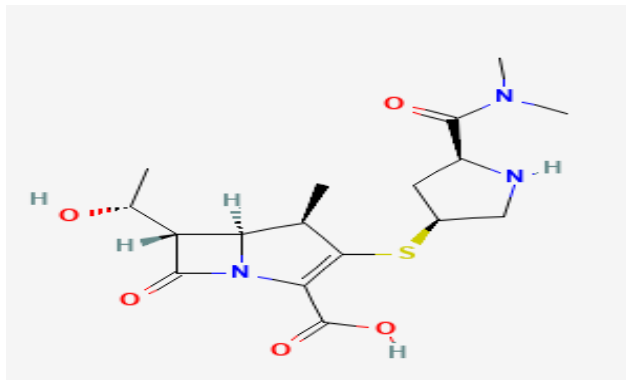
Karbapenemler bakteriyemi, nozokomiyal pnömoni, intraabdominal enfeksiyonlar, komplike üriner sistem enfeksiyonu, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları, obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlar gibi çok sayıda enfeksiyonun tedavisinde kullanılırlar [89].

Genel olarak karbapenemler iyi tolere edilir. En sık yan etkiler; bulantı, kusma, ishal, döküntü, baş ağrısı ve flebittir. Tüm karbapenemler nöbete neden olabilir ve imipenem ile daha sık görülmektedir. Penisilin allerjisi olan kişilerde karbapenem aşırı duyarlılık reaksiyonu %0-11 arasında olduğu düşünülmektedir. Reaksiyonlar genellikle makülopapüler döküntü şeklindedir. *Clostridioides difficile* ilişkili kolit, koagülasyon bozuklukları, nefrotoksisite, hepatotoksisite gibi ciddi yan etkiler nadirdir [89].

İmipenem-silastatin: Klinik kullanıma sunulan karbapenemlerin ilkidir [103]. Memelilerde böbrek dihidropeptidazı (DHP-1) ile indirgendiğinden bu enzimin seçici antagonisti olan silastatin ile birlikte kullanılmalıdır. *Enterobacteriaceae* ailesine etkilidir [89].

Ertapenem: Uzun yarı ömrü sayesinde tek doz kullanım imkanı vardır. Birkaç anaerobik organizma da dahil olmak üzere birçok Gram pozitif ve *Klebsiella pneumoniae* dahil Gram negatif bakteriye karşı aktiftir ancak *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* gibi non-fermantatif mikroorganizmalara karşı etkisizdir [104].

Meropenem: Yetişkin ve çocuklarda kullanım onayı almış, geniş spektrumlu antipsödomonal bir antibiyotiktir.



Şekil 2.3: Meropenem Kimyasal Yapısı.

Böbrek fonksiyonları normal olan kişilerde 8 saatte bir, 1 gr intravenöz kullanımı mevcuttur. Maksimum günde 3 kez 2 gr şeklinde kullanılabilir. İntravenöz bolus veya infüzyon olarak uygulamaya uygun olması avantajdır [89].

Meropenem, GSBL ve AmpC üreten *Enterobacteriaceae* dahil olmak üzere Gram pozitif ve Gram negatif patojenlere karşı geniş bir in vitro aktivite spektrumuna sahiptir.

Septisemi, febril nötropeni, komplike batın içi enfeksiyonlar, komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, komplike idrar yolu enfeksiyonu, bakteriyel menenjit, nozokomiyal pnömoni, obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlar için kullanım onayı almıştır [105]. BOS'a (beyin omurilik sıvısı) iyi penetre olur ve nöbetleri tetikleme eğilimi düşüktür. Bu nedenle bakteriyel menenjit tedavisi için diğer karbapenemlere göre daha uygundur [106].

Meropenem genellikle iyi tolere edilmektedir. Meropenemle en sık ilişkili yan etkiler; ishal, döküntü, bulantı, kusma ve enjeksiyon bölgesinde inflamasyondur. Bildirilen advers olaylar arasında baş ve karın ağrısı, oral kandidiyaz ve hafif pruritus yer almaktadır [106].

2.3.2. Florokinolon Grubu Antibiyotikler

Kinolon türevleri 1 numaralı pozisyonda nitrojen içeren ikili halka, dördüncü pozisyonda karbonil ve karboksil grubu içerirler. Molekülün 6 numaralı pozisyona flor atomunun eklenmesi ile ilaç etkinliği bariz artırılmıştır. Klinik kullanımda olan kinolonlar; siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, gemifloksasin, ofloksasindir [89].

Kinolon grubu antibiyotikler DNA replikasyonunda görev alan DNA giraz (topoizomerez-2) ve topoizomerez-4 enzimlerini inhibe ederler. Her iki enzim de bakteri hücresinde başarılı bir DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için esastır [107]. Çoğu Gram negatif bakteride DNA giraz hedef bölgesi üzerinden etki oluşturulmaktadır. Böylece hücre ölümüne neden olarak bakterisidal etki gösterdiklerini söylemek mümkündür. Ayrıca, porinler aracılığıyla kolayca bakteri içine nüfuz ettiklerinden, hücre içi patojenlere karşı da etkilidirler [89].

Solunum yolu enfeksiyonlarından sorumlu *H. influenza* ve *M. catarrhalis*'e oldukça etkilidirler. Solunum yolu kinolonları olarak adlandırılan levofloksasin,

moksifloksasin, gemifloksasin pnömokoklara etki gösterirler. Atipik bakteriler olan *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureoplasma spp.* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Kinolonların enterik Gram negatif bakterilere etkileri birbirlerine benzerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'ya etkinlik açısından siprofloksasin ön plana çıkmaktadır.

Kinolon kullanımında görülebilecek yan etkiler; bulantı, kusma, iştahsızlık, ishal, cilt döküntüleri, kıkırdak hasarı ve artropati, tendon hasarı ve rüptürü, kardiyomiyopatidir [89].

2.3.3. Aminoglikozid Grubu Antibiyotikler

Aminoglikozidler 1944 yılında *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi toprak bakterilerinden elde edilen doğal veya yarı sentetik antibiyotiklerdir. Genellikle santral yerleşen “hexose” çekirdeğe yani “aminocyclitol” halkaya 2 veya daha fazla amino şekerin glikozid bağlarıyla bağlanmasından oluşmuştur (Şekil 2.4). Bu grupta streptomisin, kanamisin, gentamisin, netilmisin, neomisin, paramomisin, spektinomisin bulunmaktadır [89, 107].

Aminoglikozidler bakteriyel ribozomların 30S ünitesinin 16S rRNA alt birimine geri dönüşümsüz şekilde bağlanarak antimikrobiyal etki gösterirler. Böylece hem mRNA kodonlarındaki hem de tRNA antikodonlarındaki bilginin ribozomlarda yanlış okunması sağlanarak protein sentezi inhibe edilir. Protein sentezini inhibe eden diğer antibiyotikler bakteriyostatik olarak etki gösterdikleri halde aminoglikozidlerin bakterisidal etkili olmaları olasılıkla geri dönüşümsüz bağlanma ve hücre membranı etkileşimi ile açıklanmaktadır [89, 107]. Aminoglikozidlerin antibakteriyal aktivitesinde konsantrasyona bağlı öldürme, post antibiyotik etki ve diğer ilaçlarla sinerjizm önemli rol oynamaktadır [89].

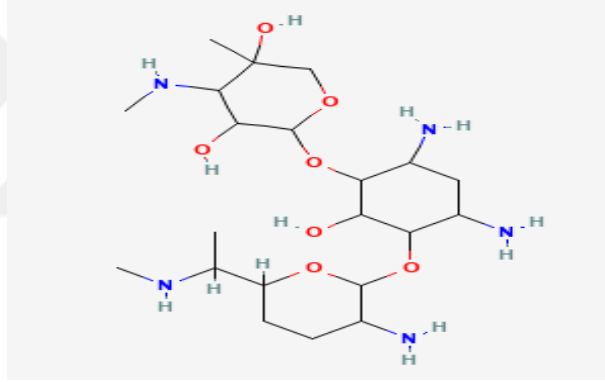
Başlıca etki spektrumları enterik Gram negatif basiller (*E. coli*, *Serratia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* vb.) ile *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerini kapsamaktadır. Gram pozitif bakterilere etkinlikleri oldukça sınırlıdır. Anaerob etkinlikleri yoktur [89].

Aminoglikozidler genellikle (üriner sistem enfeksiyonları hariç) bir beta laktam antibiyotik veya vankomisin ile kombine kullanılırlar. Kombinasyon tedavisinin bakteriyel enfeksiyonlarda etki mekanizması; beta-laktam antibiyotikler

tarafından bakteriyel hücre duvarının kırılması ve böylece gentamisin ribozomal hedefe erişebileceği bakteriyel sitoplazmaya girmesine izin vermesi şeklinde açıklanır [108]. Başlıca endikasyonları; hastane kaynaklı pnömoni, bakteremi, komplike ürogenital enfeksiyonlar, bakteriyel endokardit, daha az olarak intraabdominal enfeksiyonlar, malign otitis externa, septik artrit ve osteomyelit [89].

En önemli yan etkileri; ototoksisite, nefrotoksisite ve nörotoksisitedir [89, 107].

Gentamisin: Aerobik Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı bakterisidal aktivite sergileyen aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir. Bakteriyel septisemi, menenjit, idrar yolu enfeksiyonları, gastrointestinal sistem (peritonit dahil) ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi çeşitli klinik uygulamaları vardır. Bakteriyel endokardit, enterokokal bakteriyemi ve diğer ciddi enfeksiyonlarda beta-laktam grubu antibiyotiklerle kombinasyon şeklinde kullanımı bulunmaktadır [108].



Şekil 2.4: Gentamisin Kimyasal Yapısı.

Gentamisin karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'ya karşı etkinliği en iyi olan aminoglikoziddir. İdrarda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmeleri sayesinde, aminoglikozidler karbapenem dirençli *K. pneumoniae* etken olduğu üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde uygun bir seçenek olarak görülmektedir.

Gentamisinin kulak çınlaması, işitme kaybı, bulantı, kusma, denge bozukluğu ve vertigo, hafif proteinüri, glomerüler filtrasyon hızının azalması, nöromusküler blokaj gibi yan etkileri bulunmaktadır [108].

2.3.4. Polimiksin Grubu Antibiyotikler

Polimiksinler ilk olarak 1947 yılında *Bacillus polymyxa* ve *Bacillus colistinus* suşlarının ürünlerinden elde edilen siklik katyonik polipeptit deterjan özellikte ilaçlardır (Şekil 2.5). 1950-1980 yılları arasında kullanılmış olan ancak nefrotoksik yan etkiler nedeniyle terk edilen polimiksinler son yıllarda giderek artış gösteren dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar ve bu alanda kullanılabilecek antibiyotiklerin sınırlı olması nedeniyle yeniden tercih edilmeye başlanmıştır.

Polimiksinler kimyasal olarak beş farklı bileşik (polimiksin A-E) içermektedirler. Klinik pratikte sadece polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmaktadır [89].

Polimiksinler Gram negatif bakterilerin dış hücre duvarında bulunan anyonik yapıdaki lipopolisakkarit ve fosfolipitlere bağlanarak bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerdir. Doza bağımlı ve post antibiyotik etkileri vardır [89].

P. aeruginosa, *K. pneumonia*, *A. baumannii* gibi çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı etkilidir. Menenjit, ventilatör ilişkili pnömoni, bakteremi, cerrahi alan ve üriner sistem enfeksiyonları, batın içi enfeksiyonlar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında kullanılabilmektedir [89].

En önemli yan etkileri nörotoksisite ve nefrotoksisitedir. Bunların dışında nadir olarak cilt döküntüleri, kaşıntı, ilaç reaksiyonu ve gastrointestinal yan etkilere de neden olabilmektedir [89].

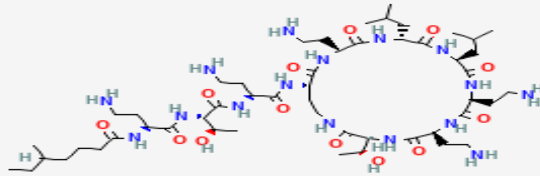
Polimiksin B: Kimyasal yapısı polimiksin E'nin (kolistin) yapısına çok benzemektedir. Bununla birlikte, polimiksin B parenteral olarak aktif formda, kolistin ise bir ön ilaç olarak uygulandığından, her iki polimiksin arasında potansiyel olarak klinik ve mikrobiyolojik sonuçları belirleyebilecek önemli farmakokinetik farklılıklar vardır [109].

Klebsiella pneumoniae dahil çoklu ilaca dirençli Gram negatif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. İntratekal-intraventriküler olarak menenjit/ventrikülit tedavisinde de kullanımı vardır [89].

Polimiksin E (Kolistin): Katyonik bir peptit olan kolistinin etki mekanizması anyonik yapıdaki dış membran lipopolisakkaritlerine bağlanmak, divalen katyonlar olan kalsiyum ve magnezyumun yerlerini değiştirmek böylece membran stabilitesinin

bozularak permeabilite artışı sonucu bakteri ölümüne yol açmaktadır. Ayrıca lipopolisakkaritlerin Lipid A kısmına bağlanarak endotoksin etkisini bloke ederler. Hızlı konsantrasyon bağımlı bakterisidal etkinlikleri bulunmaktadır [89].

Kolistin ilk Gram negatif etkinliği olan antibiyotiklerden biridir. Kolistinin kolistimetat sodyum (kolistin metan sülfat, pentasodyum kolistimetansülfat, kolistin sülfonil metat) ve kolistin sülfat olmak üzere iki farklı ticari formu mevcuttur. Kolistimetat sodyum, kolistin sülfata göre hem etkinliği hem de toksisitesi daha az olan bir moleküldür. Ülkemizde bulunan formu kolistimetat sodyumdur ve bu formülün antibakteriyel aktivitesi için hidrolize edilmesi gerekmektedir. Klinik pratikte parenteral olarak sodyum kolistin metanosülfat olarak kullanılmakta ve bu ön ilaç kolistine dönüşerek etki göstermektedir [89, 107].



Şekil 2.5: Polimiksin E (kolistin) Kimyasal Yapısı.

Günümüzde özellikle *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Enterobacteriaceae* ailesinden *E.coli*, *K. pneumonia*, *E.aerogenes* gibi dirençli, aerob, Gram negatif bakterilerin etken olduğu kan dolaşımı enfeksiyonları ve ventilatör ilişkili pnömoni başta olmak üzere çeşitli enfeksiyonlarda kullanılmaktadır [89, 107].

Kolistin proksimal renal tübüler hasara yol açarak nefrotoksisiteye neden olabilmektedir. Kolistin kullanımına bağlı nörotoksisite nadir de olsa görülebilmektedir. Allerjik reaksiyonlar ve *C. difficile*'ye bağlı ishal de diğer karşılaşılabilen yan etkilerdendir [89, 107].

2.3.5. Tetrasiklin Grubu Antibiyotikler

İlk tetrasiklin 1948'de *Streptomyces aureofaciens* 'ten elde edilmiştir. Daha sonra yarı sentetik metasiklin, doksisiklin ve minosiklinler kullanıma girmiştir. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin ana yapısında dört halkalı hidronaftasen çekirdeği bulunur. Tetrasiklin analogları bu çekirdek yapının çeşitli pozisyonlarındaki farklılıklara göre birbirlerinden ayırt edilirler [89].

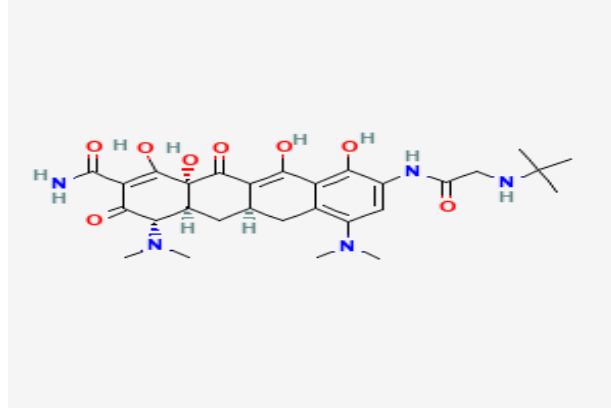
Tetrasiklinler terapötik dozlarda bakteriyostatik etki gösterirler. Bakteri hücrelerinde ribozomal 30S subünite reversibl olarak bağlanırlar ve aminoasit tRNA'nın, mRNA-ribozom kompleksine bağlanmasını engellerler. Böylece uzayan peptid zincirine yeni aminoasit eklenemez ve bakteri hücrelerinde protein sentezi inhibe olur.

Gram pozitif ve negatif, aerob ve anaerob mikroorganizmalar ile spiroket, klamidy, mikoplazma türlerini kapsayan geniş bir etki spektrumuna sahiptirler. Bruselloz, kolera, klamidiyal enfeksiyonlar (psittakoz, trahom, pelvik inflamatuvar hastalık, non gonokoksik üretrit), leptospiroz, *Borrelia* ve *Rickettsia* enfeksiyonlarında ilk seçenektir. *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Proteus* suşları da tetrasiklin dirençlidir [89].

Tetrasiklin grubu antibiyotik kullananlarda bulantı, kusma, anoreksi ve ishal en sık görülen yan etkilerdir. Oral ve vajinal kandidal enfeksiyonlar görülebilir. *Clostridium difficile* 'ye bağlı psödomembranöz kolit tablosu görülebilir. Diş ve kemiklerdeki kalsiyuma bağlanıp kahverengi lekenlenme meydana gelebilir. Hepatotoksisite, nefrotoksisite, hipersensitivite reaksiyonları, vertigo, nötropeni ve hemolitik anemi ise karşılaşılan diğer yan etkilerdir [89].

Tigesiklin: Yapısal olarak tetrasiklinlere benzeyen tigesiklin, glisilsiklin sınıfı bir antibiyotiktir. Dört halkalı karbosiklik iskelete sahiptir ve D-9 pozisyonunda modifiye glikamido grubu bulundurur (Şekil 2.6). Tigesiklin, geri dönüşümlü olarak 30S ribozomal alt birimine bağlanır ve protein sentezini inhibe eder.

Effluks pompalarından etkilenmediği için tetrasiklinlerden daha geniş etki spektrumuna sahiptir. Bağlanma noktası tetrasiklinlerden farklı olduğundan Tet (M) proteininden etkilenmez ve tetrasiklinlerden beş kat daha güçlü olarak bağlanır [89].



Şekil 2.6: Tigesiklin Kimyasal Yapısı.

Gram pozitif ve negatif aerop mikroorganizmalara, MRSA, VRE ve GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türlerine karşı ekilidir. Özellikle karbapenemaz üreten *Klebsiella* türlerine karşı da etkinliği vardır. Anaeroblara ve atipik bakterilere karşı etkilidir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia türleri*, *Morganella morganii* ve *Proteus* türlerine, sahip oldukları doğal direnç nedeniyle etkili değildir.

FDA tarafından 2005 yılında 18 yaş üstü kişilerde komplike yumuşak doku enfeksiyonları ve intraabdominal enfeksiyonlarda kullanım onayı almıştır. 2008 yılında ise toplum kökenli bakteriyel pnömoni tedavisinde kullanılmak için de onay almıştır. Günümüzde hastane kökenli pnömoniler, diyabetik ayak enfeksiyonları, çoklu ilaca dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda etkili bir seçenektir.

Tigesiklin ilişkili en sık yan etki bulantı ve kusmadır. Pankreatit, Steven-Johnson dahil allerjik reaksiyonlar, renal, hepatik, hematolojik yan etkiler nadiren de olsa bildirilmiştir [89].

2.3.6. Fosfomisin

Fosfomisin, 1969'da keşfedilen fosfoenolpirüvat analogu antibiyotimikrobiyal ajandır [110]. Fosfomisin, bakteri hücre duvarı sentezinde görevli sitoplazmik bir enzim olan (UDP)-NAG enol pirüvil transferaz (MurA) enzimine geri dönüşümsüz olarak bağlanarak enzimi inaktive eder. Böylece bakteriyel hücre duvarı biyosentezinin ilk sitoplazmik adımı olan peptidoglikan öncüsü UDP *N*-asetilmuramik asidin oluşumunu engelleyerek hücresel bütünlüğün bozulmasına ve bakterinin ozmotik olarak parçalanmasına neden olur [89]. Ayrıca

bakteri fimbrialarının sentezini ve hareket yeteneklerini azaltarak üropatojenlerin üriner sistem epitelyumuna ve idrar kateterlerinin iç yüzeyine yapışmasını ve kolonizasyonunu engelleyerek antiadeziv etki oluşturabilmektedir [89, 110].

Fosfomisin antibakteriyel spektrumu geniştir. Gram pozitif ve negatif mikroorganizmalara ek olarak anaerob etkinliği de mevcuttur. *S. aureus*, *S. pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter* türleri ile *E. coli* gibi patojenlerin çoğuna karşı hızlı bakterisidal aktiviteye sahiptir. Karbapenem dirençli *Klebsiella* türlerine karşı da aktiviteleri vardır.

Üriner sistem enfeksiyonları, yumuşak doku ve diyabetik ayak enfeksiyonları, pnömoni, ampiyem ve pulmoner apseler, menenjit ve ventrikülit, endoftalmit, otitis media, sinüzit, endokardit gibi enfeksiyonlarda kullanılabilmektedir [89].

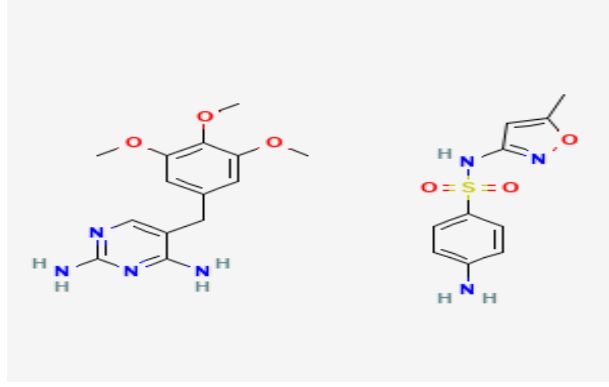
Fosfomisin genellikle iyi tolere edilen bir antibiyotiktir ve ilaca bağlı yan etkiler düşük oranlarda gözlenmektedir [111]. Oral fosfomisin tremetamin sonrası en sık görülen yan etkiler; ishal, bulantı ve gastrointestinal rahatsızlıklardır. Güçsüzlük, baş dönmesi, baş ağrısı, deride döküntü, kızarıklık ve vajinit, bakteriyel veya fungal süperenfeksiyonlar daha nadir yan etkilerdir. Fosfomisin parenteral yol ile uygulandığında en sık döküntü, gastrointestinal rahatsızlıklar, periferik flebit ve hipokalemi yan etkileri görülmektedir. IV fosfomisin 1 gramında, 0.32 g sodyum bulunur, buna bağlı hipernatremi görülebilmektedir. Fosfomisin ayrıca geçici nötropeni, trombositopeni, eozinofili, bilirubin ve karaciğer enzimlerinde artışa neden olabilmektedir [110, 111].

2.3.7. Trimetoprim-sulfametoksazol

Sulfonamidler bakteriyel folik asit sentezi için gerekli olan ve yapı olarak paraamino benzoik asite (PABA) benzeyen sulfanilamidden türetilmektedir (Şekil 2.7).

Sulfametoksazol kısa-orta etkili sulfonamidlerdendir. PABA ile yalancı substrat gibi etkileşerek tetrahidropteroik asit sentetaz enzimini kompetitif olarak inhibe eder ve böylece folik asit sentezini birinci basamakta engellerler [89].

Trimetoprim ise 2,4-diamino-5-(trimetoksibenzil) primidindir (Şekil 2.7). Trimetoprim, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek folik asit sentezini engellemektedir.



Şekil 2.7: Trimetoprim-sulfametoksazol Kimyasal Yapısı.

Trimetoprim ve sulfametoksazolun kombinasyonu (TMP-SMX, kotrimoksazol) sinerjik etki göstermektedir. Her iki molekül bakteriyostatik olmasına karşın, kombinasyon şeklinde kullanıldığında iki ardışık enzimi bloke ederek bakterisidal etki göstermektedir [112].

S. aureus, *S. pyogenes*, *S. pneumonia*, *Moraxella catarrhalis*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *B. pseudomallei*, *N. gonorrhoeae*, *Y. enterocolitica*, *Stenotrophomonas maltophilia* izolatlarına in vitro etkilidir.

Üriner sistem enfeksiyonları, prostatit, kronik bronşit akut alevlenmeleri ve metisiline dirençli stafilokok deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında etkindir.

En sık görülen yan etkileri lökopeni, trombositopeni, akut hemolitik anemi, bulantı, kusma, döküntü, kristalüri, nefrotoksisite ve ateştir [112].

2.4. Bakterilerde Antimikrobiyal İlaçlara Karşı Direnç Mekanizmaları

Direnç, bir bakterinin antimikrobiyallerin öldürücü ya da üremeyi engelleyici etkisinden korunabilme kapasitesidir. Direnç antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu toplumda ve hastane ortamında önemli bir sorun haline gelmiştir. Bakterilerde direnç değişik nedenlerden kaynaklanabilmektedir ve bu mekanizmaların bilinmesi tedaviye yön göstermenin yanı sıra yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine de temel

oluşturmaktadır [113]. Bakterilerin antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç mekanizmaları 4 ana başlık altında toplanabilir [113]:

1. Hücredeki antimikrobiyal ilaç miktarının azaltılması
 - a. Dış membran geçirgenliğinin azaltılması
 - b. İç membrandan geçişin engellenmesi
 - c. Aktif atım (effluks) pompası
2. İlacın hedefinde değişiklik
 - a. Mutasyon
 - b. Enzimatik değişikliği
3. Enzim sentezi ile ilaç inaktivasyonu
4. Antimikrobiyal ilaçtan etkilenmeyen farklı bir metabolik yol kullanılması

Mikroorganizmalar bu mekanizmalardan bir veya birkaçını aynı anda kullanarak farklı grup antibiyotiklere dirençli hale gelebilmektedir. Çoklu ilaç direnci farklı şekillerde gözlenebilmektedir:

Çoklu İlaça Dirençli (MDR-Multidrug Resistant): Üç veya daha fazla antibiyotik grubunda en az birer ilaca direnç vardır. (Örneğin; aminoglikozidler, florokinolonlar, sefalosporinler, karbapenemler vs).

İlaçlara Aşırı Dirençli (XDR- Extremely Drug Resistant): Bir veya iki grup dışında hemen hemen tüm gruplarda en az bir ilaca direnç vardır.

Tam Dirençli (PDR-Pandrug Resistant): Tüm antibiyotik gruplarına direnç vardır.

Birlikte Direnç (Co-resistance): Farklı direnç mekanizmaları birlikte bulunmaktadır.

Çapraz Direnç (Cross-resistance): Aynı grup antibiyotiklere direnç oluşturan farklı direnç genleri bir arada bulunmaktadır. (Örneğin; aminoglikozidlerde amikasin, gentamisin, tobramisine direnç)

Pleiotropik Direnç (Pleiotropic Resistance): Aynı genetik olaya bağlı olarak farklı antibiyotik gruplarını etkileyen bir direnç mekanizmasının bulunmasıdır. (Örneğin; atım pompası ekspresyonunda artış).

2.4.1. Doğal (İntrinsik) Direnç

Bir mikroorganizmanın yapısı nedeniyle antibiyotiklere karşı dirençli oluşu doğal (yapısal, intrinsik, içsel) direnç olarak tanımlanmaktadır ve bir türün tüm üyeleri

için söz konusudur [113]. Bu mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşınamaları veya ilacın yapısal özeliğinden dolayı hedefine ulaşamamasının sonucu olarak doğal direnç görülmektedir. Örneğin; *Klebsiella*'lar aminopenisilinlere (ampisilin, amoksisilin) ve karboksipenisilinlere (karbenisilin, tikarsilin) doğal dirençlidir.

2.4.2. Edinsel (Kazanılmış) Direnç

Edinsel direnç mikroorganizmanın genetik yapısındaki değişiklikler ile olmaktadır. Kromozomal mutasyonlar ya da plazmidler, transpozon ve integron gibi hareket edebilen genler aracılığıyla direnç genlerinin aktarımı ile gerçekleşmektedir [113].

Kromozomal direnç: Kromozomal edinsel direnç, kromozomda bir spontan mutasyon oluşması sonucu ortaya çıkmaktadır. DNA replikasyonu sırasında her gende 10^{-9} ila 10^{-10} sıklığında rastgele baz değişikliği olmakta, kopyalama sırasındaki hatalar belirli genlerin kısmen veya tamamen delesyonuna neden olabilmektedir [114]. Böylece ilacın hedefinde değişiklik olabilir, ilaç inaktivasyonu sağlanabilir ve atım pompa sistemlerinin ekspresyonu artıp azalabilir, porin ve aktif taşıyıcılar kaybedilebilir veya aktive edilebilir.

Ekstrakromozomal direnç: Ekstrakromozomal edinsel direnç aktarılan plazmid, transpozon ve integron adı verilen genetik elemanlara bağlıdır. Plazmidler kromozomdan bağımsız olarak replike olan kromozom dışı genetik elemanlardır. Bazı plazmidler dar bir konak dağılımı gösterirken, bazıları farklı türler arasında geçiş yapabilmektedir. Plazmidler alıcı suşların kromozomuna da girebilmekte, bu şekilde taşıdıkları genetik bilginin dayanıklılığını artırabilmektedirler [113].

2.5. *Klebsiella* Cinsi Bakterilerin Tedavisinde Kullanılan Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

2.5.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Tüm beta-laktam antibiyotikler bakteri hücre duvar sentezini bozarak bakterisidal etki göstermektedir. Bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç 3 yolla gelişebilmektedir:

1. PBP'lerde oluşan değişiklikler ile antibiyotiğin hedefine bağlanmasının engellenmesi
2. Dış membran proteinlerinin (OMP) ekspresyonunda azalma veya atım pompaları ile ilacın hücre içine girişinin önlenmesi
3. Beta-laktamaz enzimleri ile antibiyotik inaktive edilmesi

Gram negatif bakterilerde direnç her üç mekanizma ile oluşabilirken, Gram pozitif mikroorganizmalarda dış membran olmadığından direnç sadece enzim ve PBP'lerdeki değişimlere bağlı olabilmektedir [113].

2.5.1.1 Penisilin bağlayan protein (PBP)'lerde oluşan değişiklikler

Penisilin Bağlayan Protein (PBP)'lerde oluşan değişiklikler 3 farklı mekanizma ile gelişebilmektedir:

- a. PBP'nin aşırı sentezi
- b. Beta laktam antibiyotiklere düşük affinite gösteren yeni PBP'lerin edinilmesi,
- c. Duyarlı bir PBP'nin daha dirençliler ile rekombinasyon yapılması
- d. PBP'lerdeki nokta mutasyonları ile beta-laktam antibiyotiklere afinitenin azalması

2.5.1.2. Dış membran proteinlerinin (OMP) ekspresyonunda azalma ve atım pompaları

Gram negatif bakterilerde bulunan OMP'nin içerdiği protein yapıdaki porların sayıları ve özellikleri ile antibiyotiğin özellikleri (yük, çözünürlük, büyüklük) hücre içine giriş hızını belirlemektedir. Porin kaybına yol açan mutasyonlar beta laktam antibiyotikler, aminoglikozidler ve karbapenemlerde tedavi sırasında bildirilmiştir [113].

Antimikrobiyallerin bakteri hücresinden atımı, bakterilerin hücre içi yoğunluğunu azaltmak için kullandıkları enerji bağımlı bir mekanizmadır. Son yıllarda birçok bakteride çoklu antibiyotik direncinden sorumlu olan, plazmid veya kromozom kontrolünde çeşitli atım pompaları tanımlanmıştır [113].

2.5.1.3. Beta-laktamaz enzimleri

Beta-laktam antibiyotiklere karşı klinikte en sık gözlenen direnç, beta-laktamaz enzimlerinin sentezi ile olmaktadır. Beta-laktamazlar beta-laktam

halkasındaki siklik amid bağlarını parçalayarak beta-laktam antibiyotiklerin etkisini inaktive etmektedir. Beta-laktamazlar; Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Gram negatif bakterilerde beta-laktamazlar dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz enzimlerini kodlayan genler kromozom, plazmid veya transpozonlarda yer almaktadır. Beta-laktamaz genleri birçok direnç determinantı taşıyan intergronlarda yer alır, transpozonlar yoluyla değişik bakteri türleri arasında çoklu ilaç direncinin yayılmasında rol oynar.

Beta-laktamazlar yapısal Ambler sınıflamasında amino asit yapılarına göre A'dan D'ye kadar dört moleküler sınıfa ayrılmaktadır. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasında ise fonksiyon ve yapılarına göre sınıflandırılmaktadır [113].

Ambler Sınıflaması: Ambler sınıflamasına göre beta-laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört sınıfta toplanmakta ve her sınıflandırmadaki beta-laktamazlar farklı mekanizmalar aracılığıyla çalışmaktadır (Şekil 2.8). Karbapenemaz enzimleri Ambler sınıfları A, B ve D olarak kategorize edilmektedir.

Sınıf A beta laktamazlar (karbapenemazlar): Bağlanma bölgelerinde serin amino asidine sahip olup penisilinleri, sefalosporinleri, karbapenemleri ve aztreonamı hidrolize etme yetenekleriyle karakterizedirler. Bu enzimlerin çoğu plazmidlerle taşınmaktadır [115].

En yaygın A sınıfı karbapenemazlar arasında *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC), imipenem hidrolize eden beta-laktamaz (IMI), A sınıfı non-metallo karbapenemaz (NMC-A), Guyana genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (GES) ve *Serratia marcescens* enzimi (SME) bulunmaktadır. Bu enzimler kromozomal olarak kodlanmış (SME, SHV-38), plazmid kodlanmış (KPC) veya her ikisi de (IMI) olabilmektedir [115, 116].

KPC-1, 1996'da Kuzey Carolina'daki bir *K. pneumoniae* izolatından izole edilmiştir. SME-1 ile %45 özdeş bulunmuştur, sadece karbapenemleri değil aynı zamanda penisilinleri, sefalosporinleri ve monobaktamları da hidrolize etmiştir ve meropenem için en yüksek afiniteyi göstermiştir. Kısa bir süre sonra, KPC-2 ve KPC-3 taşıyan *K. pneumoniae* salgınları New York şehrinden tanımlanmıştır. Hem KPC-2 hem de KPC-3, klonal genişleme ve yatay gen transferi sonucunda ABD'nin doğu kesimlerinde izole edilmeye devam etmiş ve diğer *Enterobacteriaceae* cinslerine

yayılmıştır. Birkaç yıl içinde, KPC üreten suşlar küresel hale gelmiş ve Kuzey ve Güney Amerika, Orta Doğu, Yunanistan, İtalya ve Çin'den raporlar gelmeye devam etmiştir. Şimdiye kadar 20'den fazla farklı KPC varyantı tanımlanmış olsa da KPC-2 ve KPC-3 en yaygın olanlar olarak kalmaya devam etmektedir.

Sınıf B beta laktamazlar (karbapenemazlar): Bu grup, metallo beta laktamaz (MBL) yapıları ile tanımlanmakta ve bağlanma bölgesinde çinko içeren amino asitler bulunmaktadır [115]. Sınıf B karbapenemazların çoğu aztreonam hariç tüm beta-laktamları hidrolize etmektedir. Aktiviteleri EDTA tarafından inhibe edilebilir ancak klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam veya avibaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilemez [117].

Bu grup karbapenemazlar genellikle plazmit vektörlerinde ve diğer taşınabilir elementlerde bulmakta ve bu da bakteriler arasında hızla yayılmasına olanak tanımaktadır. Bu grupta yer alan enzimler arasında NDM (Yeni Delhi metallo-laktamaz), IMP (İmipenem dirençli *Pseudomonas*) ve VIM (Verona integron kodlu metallo beta-laktamazı) bulunmaktadır [115]. Çoğunlukla bu enzimler ilk tanımlandıkları yere göre adlandırılır.

İlk edinilen MBL olan IMP-1, 1990'larda Japonya'da *P. aeruginosa* ve *Serratia marcescens* klinik izolatlarından rapor edilmiştir [116, 118]. İlk VIM enzimi ise 1997'de *P. aeruginosa*'da bulunmuş olup o zamandan beri 69'dan fazla varyant tanımlanmıştır.

Günümüzde ise *Enterobacteriaceae* ve *Acinetobacter baumannii*'deki en yaygın MBL olan NDM ilk olarak İsveç'te, daha önce Yeni Delhi'de hastaneye kaldırılmış Hintli bir hastadan alınan *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarında tanımlanmıştır. O zamandan beri yirmi dokuz NDM varyantı tanımlanmıştır. Diğer birkaç karbapenemaz geninin aksine, bla_{NDM-1} geni tek bir klonla değil, klonal olmayan ilişkili izolatlar ve türlerle ilişkilidir ve çoğunlukla *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de, daha az ölçüde ise diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde tanımlanmıştır. NDM-1 üreten suşların karbapenemlere karşı direnç seviyesi değişebilir. NDM-1 genini taşıyan plazmitler çeşitlidir ve çok sayıda direnç genini barındırarak çoklu ilaç direnci (MDR) veya tam ilaç direnci (PDR) kaynağı olabilmektedirler. Birçok NDM-1 üreticisi tigesikline, kolistine ve daha az ölçüde de fosfomisine duyarlı kalabilmektedir [119].

Diğer karbapenemazlarla karşılaştırıldığında, NDM-1 dünya çapında halk sağlığı için oldukça endişe verici olan birkaç özelliğe sahiptir. Bu özellikler şunlardır [119]:

- 1) NDM-1 geninin tek bir türde değil, birçok ilişkisiz türde bulunması ve yayılması (özellikle Hint yarımadasında)
- 2) Tipik bir hastane patojeni olan *K. pneumoniae* ve aynı zamanda açık ara en önemli toplumdan edinilmiş insan patojeni olan *E. coli* tarafından da sık edinilmesi
- 3) Rezervuarın büyüklüğü

NDM-1 üreten suşlar yakın zamanda Yeni Delhi'deki musluk ve çevre suyunda, birçok Gram negatif tür arasında tanımlanmıştır [119, 120].

Sınıf C beta-laktamazlar (AmpC sefalosporinazlar): Kromozomal AmpC geni tarafından kodlanan, bu nedenle AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılan ve *Salmonella* spp. haricinde tüm Gram negatif basillerde bulunabilen beta-laktamazlardır ve esas olarak sefalosporinaz niteliğinde olmakla birlikte penisilin, oksiminosefalosporinler, sefamisinler (sefoksitin ve sefotetan) ve değişken olarak da aztreonama karşı dirençten sorumludurlar [121].

AmpC enzimleri sefalosporinazlar, klavulanik asit gibi diğer beta laktamaz inhibitörleri tarafından önemli ölçüde inhibe edilemezler. AmpC enzimleri bulaşıcı plazmidler üzerinde taşınabilmektedir. Ayrıca *E. cloacae* ve *S. marcescens* gibi birçok *Enterobacteriaceae*'nin ve *P. aeruginosa* gibi birkaç enterobakteriyel olmayan organizmanın kromozomu tarafından kodlanabilmektedirler. Bu gibi durumlarda, antibiyotikler tarafından indüklenebilmekte veya mutasyonla yüksek seviyelerde eksprese edilebilmektedirler [121]. Plazmit ile taşınan CMY-2, ACT-1 ve DHA-1 tipi AmpC enzimleri *Enterobacteriaceae* ailesinin porin eksikliği olan klinik izolatlarında karbapenem direncinin ortaya çıkmasını teşvik edebilmektedir [122].

Sınıf D beta-laktamazlar (karbapenemazlar-oksasilinazlar): Oksasilin hidrolize edici karbapenemaz (OXA) enzimleri, D sınıfı karbapenemazları oluşturmaktadır. D sınıfı karbapenemazlar bağlanma bölgelerinde bir serin amino asit içermektedir. Oksasilin, metisilin ve kloksasilin gibi izoksazolilpenisilinleri klasik penisilinlerden çok daha hızlı hidrolize ettikleri ve birinci nesil sefalosporinlere karşı nispeten daha az etkili oldukları için oksasilinazlar olarak da adlandırılmışlardır [121]. Karbapenemlere karşı hidrolize edici aktivitelerinin azalması, geniş spektrumlu

sefalosporinlere karşı aktivitelerinin olmaması ve eski beta-laktamaz inhibitörleri (Örneğin; klavulanik asit, tazobaktam veya sulbaktam) tarafından inhibe edilmemeleri nedeniyle A sınıfı karbapenemazlardan farklıdırlar. Ancak birçoğu avibaktam tarafından inhibe edilir. Bu genler genetik olarak GSBL (Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz) genlerine benzerdir, bu nedenle moleküler testlerde diğer GSBL üreticilerinden ayırt edilmeleri zordur [115].

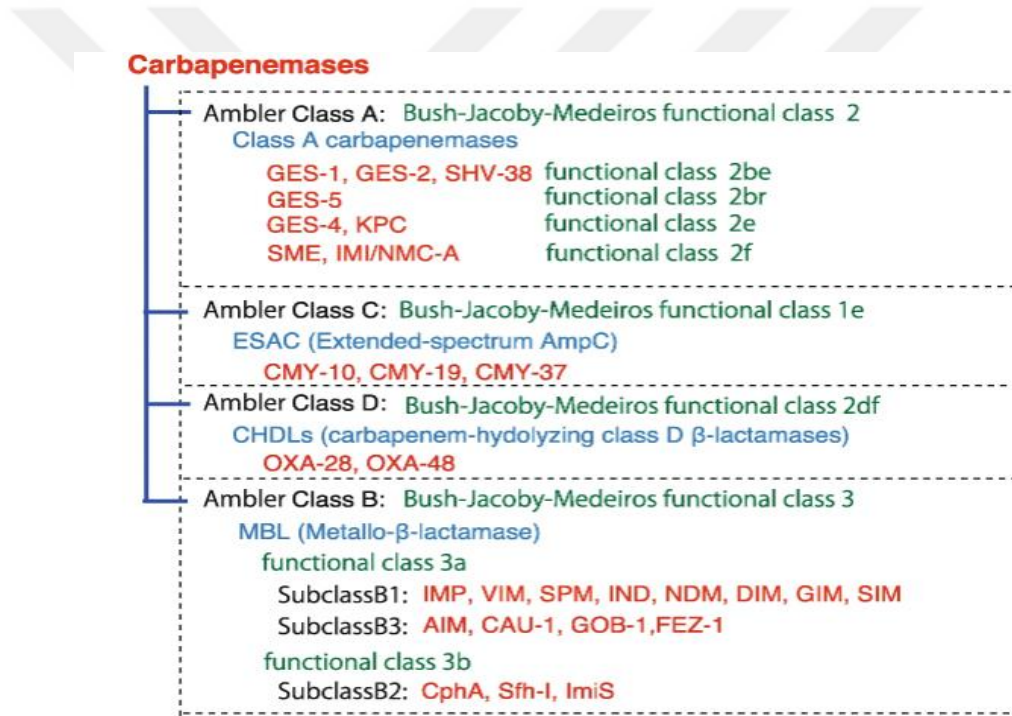
Günümüzde karbapenem hidrolize edici aktiviteye sahip OXA enzimleri arasında OXA-23 benzeri, OXA-24/40 benzeri, OXA-48 benzeri, OXA-58 benzeri, OXA-143 benzeri ve OXA-235 grupları yer almaktadır [121].

OXA-48 ilk olarak Türkiye'den bir *K. pneumoniae* suşundan izole edilmiştir [123]. OXA-48 benzeri enzimler özellikle *Enterobacteriaceae* ile ilişkilidir ve muhtemelen son on yılda karbapenem direncindeki en endişe verici gelişmelerden biri olmakla birlikte insidansı hala küresel olarak artmaktadır. OXA-48 enzimi karbapenemlere karşı düşük seviyede hidrolitik aktiviteye sahiptir, imipeneme karşı meropeneme göre çok daha fazla aktivite göstermektedir ve karbapenemlerin MİK'lerinde yalnızca hafif artışlara neden olmaktadır [124]. Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere karşı çok zayıf aktiviteye sahiptir, seftazidim ve sefepimi önemli ölçüde hidrolize etmez, ancak zar geçirgenliğinin artması ile birlikte karbapenemlere karşı yüksek seviyede dirence yol açabilmektedir. OXA-48 yalnızca penisilin ve dar spektrumlu sefalosporinleri önemli ölçüde hidrolize etmektedir. Ancak, bla_{OXA-48} genlerine sahip enterik Gram negatif bakteriler, ESBL veya AmpC enzimlerini veya her ikisini kodlayan genleri birlikte barındırabilmekte; bu da aztreonam, geniş spektrumlu sefalosporinler ve karbapenemlere karşı direnç kazanmalarını sağlayabilmektedir [125]. OXA-48 şu anda yalnızca *K. pneumoniae*'da değil, aynı zamanda diğer *Enterobacteriaceae*'da da yaygındır.

Türkiye'nin en yüksek OXA-48 epidemiyolojik seviyesine sahip olduğu bildirilmektedir ve diğer önemli rezervuarlar Hindistan, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkeleriyle bağlantılıdır. OXA-48 üreten suşlar Fransa, Almanya, Hollanda, İtalya, Belçika, İngiltere, İrlanda, Slovenya, İsviçre ve İspanya dahil olmak üzere çeşitli Avrupa ülkelerinde sporadik olarak belgelenmiştir [126]. Avrupa'da "kıtalararası yayılma" tanımlanmıştır ve bazı ülkelerde endemik hale gelmiştir. OXA-48 benzeri enzim üreten suşların yayılmasını kontrol etme konusundaki bir diğer endişe, diğer D

sınıfı karbapenemazlar gibi metal iyon şelatlayıcıları veya klavulanat tarafından inhibe edilmediklerinden, laboratuvar tanınmalarına katkıda bulunabilecek fenotipik testlerin olmamasıdır [121].

OXA-48'in birkaç varyantı tanımlanmıştır. Sırasıyla OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-204, OXA-162, OXA-163 ve OXA-244 bu gruptaki en yaygın enzimlerdir [127]. OXA-48 benzeri enzimler üreten *Enterobacteriaceae*'nin farklı ekosistemlerde hızla yayılması ve bu organizmalar için sadece hastanelerde değil aynı zamanda toplumda, hayvanlar arasında ve çevrede de rezervuar sayısının artması göz önüne alındığında, tıp camiası bu organizmaların oluşturduğu tehditlere karşı uyanık olmalıdır. Tespit yöntemleri, yayılımlarını azaltmak için optimize edilmelidir [121].



Şekil 2.8: Ambler Beta Laktamazların Sınıflandırılması [128].

Bush, Jacoby ve Mederios sınıflaması: Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından ilk olarak 1995 yılında geliştirilmiş olup substrat profilleri, beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılık gibi biyokimyasal özellikler esas alınarak yapılan fonksiyonel bir sınıflamadır [129].

- 1) **Grup 1:** Bu grup enzimler Ambler sınıf C'ye ait sefalosporinazlar'dır. Benzilpenisilinden daha çok sefalosporinler üzerinde aktiftirler, genellikle klavulanik asit, sulbaktam gibi beta laktamazlar tarafından inhibisyona

dirençlidirler ve sefoksitin gibi sefamisinler üzerinde aktiftirler, buna karşın aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler, karbapenemlere karşı da duyarlıdırlar. Kromozomal AmpC enzimleri ile plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 beta-laktamazları da bu grupta yer almaktadır [130]. Amp C tipi beta-laktamazlar çok miktarda üretildiklerinde ve beta-laktamazların hücre içinde birikmesine engel olacak bir başka mekanizma (aktif pompa, porin mutasyonu) mevcut ise başta ertapenem olmak üzere karbapenem direncine neden olabilmektedirler [113].

- 2) **Grup 2:** Fonksiyonel grup 2 beta-laktamazlara Ambler sınıf A ve D dahil olup, öncelikle son 20 yılda GSBL'lerin artan tanımlanması nedeniyle en büyük beta-laktamaz grubunu temsil etmektedirler.

Yeni alt grup 2df beta-laktamazlar, karbapenem hidrolize edici aktivitelere sahip OXA enzimleridir. En sık *Acinetobacter baumannii*'de görülürler ve genellikle kromozomda bulunan genler tarafından üretilirler, plazmid kaynaklı OXA-23 ve OXA-48 enzimleri *Enterobacteriaceae*'da tanımlanmıştır. 2df enzimleri amino asit homolojilerine göre dokuz kümeye ayrılmıştır. Karakterize edilmiş OXA karbapenemazları, karbapenemler için zayıf hidrolitik aktiviteye sahiptir ve imipenem, meropenemden daha hızlı ve daha verimli bir şekilde hidrolize olmaktadır. Üreten organizmalar genellikle karbapenemlere karşı oldukça dirençli olsa da, bu enzimleri üreten *E.coli* transformantları veya transkonjugantları genellikle karbapenemlere duyarlıdır [130].

2f alt grubunu Ambler sınıf A'dan gelen serin karbapenemazlar oluşturmaktadır. KPC ve bazı GES enzimleri plazmid kodlu alt grup 2f beta-laktamazlarıdır. Özellikle KPC karbapenemazları hastanelerde çok ilaca dirençli Gram negatif bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu büyük salgınlara ilişkilendirilmiştir ve bunların yayılımı artık dünya çapında görülmektedir [130].

- 3) **Grup 3:** Bu grupta yer alan MBL'ler aktif bölgede bir çinko iyonuna ihtiyaç duymaları nedeniyle diğer beta-laktamazlardan yapısal olarak farklıdırlar. Serin beta-laktamazların aksine, MBL'lerin monobaktamlara

karşı zayıf afinitesi ve hidrolitik yeteneği vardır ve klavulanik asit veya tazobaktam tarafından inhibe edilmezler. MBL'ler aktarılabılır elementlerde görünmeye başladığında, daha karışık hale gelmiştir ve çeşitli konaklarda evrimsel baskılara maruz kalarak benzersiz varyantlar oluşturmuşlardır [130].

1995 işlevsel sınıflandırmasına daha önce dahil edilen Grup 4 beta-laktamazlar mevcut şemada çıkarılmıştır. Bu enzimler henüz tam olarak karakterize edilmediğinden, daha fazla kategorileştirme denenmemiştir [130].

2.5.2. Florokinolon Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Kromozomal Direnç: Florokinolon grubu antibiyotiklere kromozomal direnç 3 yol ile olmaktadır [113].

- 1. Hedef Enzimde Değişiklik:** Klinikte en sık gözlenen florokinolon direnci topoizomeraaz enzimindeki değişiklikler ile gelişmektedir. Bu değişiklikler enzimleri kodlayan genlerde oluşan spontan nokta mutasyonlarına bağlıdır. DNA giraz ve topoizomeraaz IV'ün amino ucundaki “kinolon direncini belirleyen bölge (QRDR)” adı verilen bir bölgede alt birim genlerinde oluşan mutasyonlar sonucu enzimin bağlandığı bölgede değişim olmakta böylece enzim-DNA kompleksinin ilaca afinitesi azalmaktadır. Florokinolonlara karşı oluşan direnç bu gruba ait tüm antibiyotikleri etkilemektedir. Bu nedenle, bir florokinolona karşı dirence neden olan bir mutasyon, her zaman bu grubun başka bir üyesine direnç oluşturmaya da mutlaka MİK'lerin yükselmesine neden olacaktır [113].
- 2. Hücre İçerisindeki Antibiyotik Düzeyinin Azalması:** Florokinolonlar Gram negatif bakterilerde hücre içine dış membranlardaki porinlerden veya fosfolipit tabakadan difüzyon yolu ile giriş yapmaktadır. Mutasyonlar yoluyla belirli porinlerin kaybı florokinolonlara karşı duyarlılığı etkilese de tek başına direnç oluşması için yeterli değildir.
- 3. Atım Pompası:** Çoklu atım sistemleri farklı kimyasal yapıdaki ilaçları dışarı pompalamaktadır. Atım pompası başka bir direnç mekanizması yok ise tek başına düşük düzeyde dirence yol açmaktadır.

Plazmit Kaynaklı Direnç: Plazmit aracılı kinolon direncinin varlığı ilk kez 1998 yılında Martinez ve ark. tarafından Alabama Üniversitesi'ndeki bir hastanın idrar

örneğinden izole edilen siprofloksasine dirençli *K. pneumoniae* suşunda gösterilmiştir. Kinolonlara dirençte yeni bir dönem açan bu çalışmada suşta pMG252 plazmidi saptanmış ve bu plazmidin klonlanması sonucu, 218 aminoasitten oluşan tekrarlayan pentapeptit ailesine ait bir proteini kodlayan ve qnr (qnrA1) ismi verilen gen bölgesinin plazmit aracılı kinolon direncine neden olduğu belirlenmiştir. Daha sonra qnrB, qnrC, qnrD, qnrS genleri tanımlanmıştır. Qnr proteini tek başına düşük düzey kinolon direncine neden olmasına rağmen, kromozomal farklı mekanizmaların birlikteliği ile yüksek düzey kinolon direncine yol açabilmektedir [131]. Qnr geninin GSBL sentezleyen Gram negatif bakterilerde daha sık olduğu gözlenmektedir [113].

2.5.3. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Gram pozitif ve negatif bakterilerde aminoglikozidlere karşı direnç ribozomal hedeflerde değişiklik, antibiyotiğin hücreden atımı ve enzimatik yollarla olabilmektedir.

Ribozomal direnç: *Enterobacteriaceae* ailesi ve non-fermenter Gram negatif bakterilerde ribozomal antibiyotik direnci, ribozomun 16S rRNA alt biriminin enzimler yoluyla metilasyonuna bağlıdır. Bu enzimler genellikle rmt geni ve ilişkili genlerin (rmtB, rmtC, armA) kontrolündedir ve plazmit üzerinde bulunmaktadır. Parenteral aminoglikozidlere karşı son yıllarda yayılan küresel dirençte bu mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir. Streptomisine karşı dirençte 30S alt birimindeki S12 proteininin mutasyonu rol oynamaktadır ve bu direnç türü özellikle enterokoklarda oldukça önemlidir [113].

Permeabiliteye bağlı direnç ve atım mekanizması: Membran geçirgenliğinin azalması ile oluşan direnç en sık *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında görülmektedir. Direnç düzeyi yüksek olmamasına rağmen tüm aminoglikozidlere karşı çapraz direnç oluşmaktadır. Son yıllarda bazı Gram negatiflerde aminoglikozidlere karşı dirençte atım pompalarının etkili olduğu gösterilmiştir [113].

Enzimatik değişiklikler ile oluşan direnç: Aminoglikozidlere karşı kazanılan dirençte en önemli mekanizma, bu antibiyotiklerin amino ya da hidroksil gruplarının enzimatik olarak değiştirilmesidir. Değişim sonucunda aminoglikozid molekülü ribozomlara iyi bağlanamadığından direnç gelişmektedir. Aminoglikozid molekülünü değiştiren 3 enzim ailesi: aminoglikozid fosfotransferazlar (APH), aminoglikozid

asetiltransferazlar (AAC) ve aminoglikozid nükleotidiltransferazlar (ANT)'dır. Aminoglikozid değiştiren enzimlerin birçoğu plazmid kontrolünde sentezlenmekte ve bu enzimlerin sentezinden sorumlu genler transpozonlarda taşınabilmektedir. Bu transpozonlar aynı zamanda farklı grup antibiyotiklere de direnç oluşturduğundan, farklı grup antibiyotiklerin kullanımı da aminoglikozidlerde direncin artışına yol açabilmektedir [113].

2.5.4. Polimiksin Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Kolistine karşı değişik mekanizmalar ile direnç gelişimi görülür. *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Neisseria spp.* ve Gram pozitif bakteriler hücre duvar yapıları nedeniyle polimiksinlere doğal dirençlidir. Polimiksin direncinde başlıca mekanizma lipopolisakkarit yapısındaki değişiklikler sonucu bakteri dış membran yapısında bozulmadır. *E. coli*, *Salmonella enterica*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'da pmrC veya pmrF operonlarının aktivasyonu ile fosfoetanolamin veya L-amino-arabinozun kimyasal bağlanması yoluyla lipid A'nın modifiye edilerek net lipopolisakkarit yükü azaltılabilmektedir. Düzenleyici lokuslar olan pmrA ve phoP'deki değişikliklerin de *Enterobacteriaceae*'daki polimiksin direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *Neisseria meningitidis*, *A. baumannii* ve *Yersinia spp.*'de atım pompaları yoluyla, *K. pneumoniae*'da ise kapsül polisakkaritinin aşırı sentezi sonucu direnç bildirilmiştir. *K. pneumoniae*'da polimiksin direncini açıklamayı amaçlayan önemli sayıda çalışma yapılmıştır. *K. pneumoniae*'deki lipopolisakkaritlerin yapısal değişikliklerinde phoP/phoQ ve pmrA/pmrB genlerindeki mutasyonların rol oynadığı gösterilmiştir [132, 133].

Çok yakın zamana kadar kolistin direncinin kromozomal olarak kodlandığı ve yalnızca dikey geçişe izin verdiği düşünülüyordu. 2015 yılının sonlarında, polimiksin direncine yol açan bir fosfoetanolamin transferazı kodlayan plazmid kaynaklı bir mcr-1 geni ilk olarak hayvan kökenli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında tanımlanmıştır. Bunu 2016'da başka bir plazmid aracılı kolistin direnç geni olan mcr-2 izlemiştir [134]. Bu da kolistin direncinin yatay geçişine neden olmakta ve lipopolisakkarit yapıdaki hücre membranının anyonik yükünü değiştirerek kolistinin bağlanmasına engel olmaktadır [132].

Birleşik Krallık'ta NDM-1 üreten karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae*'nin %10'unda transfer edilebilir kolistin direnci tespit edilmiştir

[135]. İtalya'da, KPC üreten *K. pneumoniae* suşları arasında kolistin direnci oranı 2013 yılında %57 saptanmıştır [136]. Bu önemli bulguların ardından, birçok uluslararası ekip mevcut bakteri koleksiyonlarında bu yeni geni aramaya başlamıştır. Ocak 2016'da mcr-1 pozitif suşlar Malezya, Fransa, Portekiz, Lao, ABD, Tayland, Cezayir, Almanya, İsviçre, Japonya, Belçika, Vietnam, Hollanda, İspanya ve Danimarka dahil olmak üzere yaklaşık 19 farklı ülkede bulunmuştur [133]. Günümüzde mcr-1 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* ve *P. aeruginosa*'da tespit edilmiştir. Mcr-1 üreten çoklu ilaca dirençli ve özellikle de karbapenemaz üreten izolatlar rapor edilmiştir. Tanımlanan ilk izolat, İsviçre'de herhangi bir yurtdışı seyahat öyküsü olmayan bir hastadan elde edilen VIM-1 üreten bir *E. coli*'dir. Bu izolat yalnızca amikasin, fosfomisin ve tigesikline duyarlı kalmıştır [137]. İtalya ve Yunanistan'da KPC üreten ve karbapeneme dirençli *K. pneumonia* izolatlarında da mcr-1 geni bulunmuştur [133].

Genel olarak, bu tür çoklu ilaca dirençli enterobakteriyel izolatların ortaya çıkması, bu önemli sorunun önemini vurgulamakta ve daha fazla yayılmayı önlemek için özen gösterilmesi gerektiğinin altını çizmektedir. Bununla birlikte, son çalışmalar mcr üreten izolatların görülme sıklığının birçok ülkede nispeten düşük kaldığını ortaya koymuştur [133].

2.5.5. Tetrasiklin Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Bakterilerde tetrasiklin direnci 3 yolla gerçekleşmektedir [113]:

1. Sitoplazma membranında bulunan proteinler aracılığı ile ilacın enerji bağımlı olarak hücre dışına pompalanması (atım-effluks)
2. Ribozomal koruyucu proteinler
3. İlacın enzimatik olarak inaktivasyonu

İlk 2 mekanizma direnç oluşumunda en önemli olanlardır. Direnç çoğunlukla tet determinantlarının alınması ile oluşmaktadır. Büyük klinik öneme sahip tetrasiklin direnç mekanizmaları major facilitator superfamily (MFS) effluks pompalarını (tetA, tetB, tetC, tetD ve tetE) ve ribozomal koruma proteinlerini (tet(M), tet(O), tet(Q)) içerir. Bu genler hem Gram pozitif hem Gram negatif mikroorganizmalarda bulunabilmektedir. Tetrasiklinlere direnç determinantlarının çoğu plazmid veya transpozonlarda bulunmaktadır [113, 138].

Tigesiklin direnci: Tigesiklin minosiklinin 9-t-butilglükamido derivativesidir ve geniş spektrumlu antibakteriyel aktivitesi diğer tetrasiklinlere direnç oluşturan atım pompası ve ribozomal koruma mekanizmalarından etkilenmemesine bağlıdır [113]. *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *M. morganii* tigesikline doğal direnç gösterir. Tigesikline karşı direnç *acrAB-TolC*, *OqxAB* ve *kpgABC* effluks sistemlerinin up-regülasyonunu içerir. Bu yapısal ve düzenleyici genlerdeki mutasyonlar, effluks pompalarının sayılarının artması yoluyla tigesikline direnç kazandırır [138].

2.5.6. Fosfomisine Direnç Mekanizmaları

Kimyasal yapısı ve etkilediği bölgenin farklılığı nedeniyle fosfomisinin diğer antibakteriyel ajanlar ile arasında çapraz direnç yoktur ya da çok nadir gelişmektedir [111]. Fosfomisine karşı doğal ve edinsel direnç söz konusudur ve fosfomisine direnç kazandıran birkaç mekanizma tanımlanmıştır. Direnç mekanizmaları, çoğunlukla kromozomal kaynaklı veya ender olarak da plazmid aracılıdır [110, 111].

Edinsel dirençte fosfomisinin bakteri içine girmesini sağlayan alım sistemlerindeki mutasyonlar rol oynamaktadır. Kromozomal mutasyonların çoğu, ilacın hücre içine taşınmasını sağlayan bakteriyel proteinleri kodlayan yapısal ve düzenleyici genlerde olmaktadır. Bu mutasyonlar, bakterilerde iki temel transport mekanizması olan L-alfa-gliserofosfat ve heksoz fosfat sistemlerinin bozulmasına yol açarak fosfomisinin, bakteri hücresi içine geçişini azaltmakta ve hedef bölgeye ulaşmasını engellemektedir. *CyaA* ve *ptsI* genlerindeki mutasyonlar daha düşük cAMP seviyelerine ve fosfomisin taşıyıcılarının down-regülasyonuna neden olarak pilus biyosentezinde ve epitel hücrelere adhezyon yeteneğinde azalma ile ilişkilendirilmiştir [110, 111].

Plazmidle kodlanmış glutatyon S-transferaz enzimleri olan *FosA* ve *FosB*, fosfomisin direncinde rol oynar. 1988'de ilk tanımlanan *FosA*, glutatyon ve fosfomisin arasındaki reaksiyonu inaktive eden bir metaloenzimdir, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas spp.* üyeleri arasında oldukça yaygın olarak bildirilmektedir. Tedavi süresince antibiyotiklere direncin en sık geliştiği patojenler arasında *Klebsiella* türleri örnek olarak verilebilir. Kumar ve ark. fosfomisine doğal dirençli çevresel bir *Vibrio fischeri* izolatından yeni bir *murA* geni tanımlamışlardır [139]. *MurA*'daki mutasyonlar, enolpiruvil transferazın fosfomisine karşı daha düşük afinitesine neden olmaktadır [110, 111, 140]

2.5.7. Trimetoprim / Sulfametoksazol Direnç Mekanizmaları

Sulfonamidlere direnç: Kromozom veya plazmidlerce kodlanabilmektedir, çoğunlukla direnç genleri plazmidlerde bulunan integronlarda yer almaktadır. Kromozomal “dhps” genlerindeki mutasyonlar birçok türde bildirilmiştir. Gram negatif bakterilerde en sık gözlenen direnç mekanizması sulfonamidlerin düşük afinite gösterdiği, sul I veya sul II genleri tarafından kodlanan farklı bir dihidropteroat sentetaz (DHPS) sentezlemesidir [113]. Hem *sul I* hem de *sul II*, sulfonamid dirençli Gram negatif enterik bakteriler arasında hemen hemen aynı sıklıkta bulunur. Dikkat çekici bir şekilde, yeni DHPS enzimleri, substrat ve inhibitör arasındaki yakın yapısal benzerliğine rağmen, sulfonamidlere karşı belirgin duyarsızlık gösterirken p-aminobenzoik asit (PABA) substratına normal bağlanma gösterir [141].

Trimetoprime direnç: *Enterobacteriaceae*'da yüksek düzeyli trimetoprim direnci esas olarak dihidrofolat redüktazın plazmid veya transpozon kaynaklı trimetoprim direnci kazanmasından kaynaklanır. Bu trimetoprime dirençte en sık mekanizmadır. Şimdiye kadar 30'dan fazla farklı trimetoprim direncine aracılık eden dihidrofolat redüktaz (*dfr*) geni tanımlanmıştır. Bunlar günümüzde yapılarına göre *dfrA* ve *dfrB* olarak adlandırılan iki ana tipe ayrılmaktadır [142]. Ayrıca dihidrofolat redüktaz (DHFR)'ın aşırı sentezine veya permeabilitede azalmaya yol açan kromozomal mutasyonlar oluşabilmesine karşın bunlar klinikte nadir görülmektedir [113].

2.6. Enterobacteriaceae Ailesinde Karbapenem Direnç Epidemiyolojisi

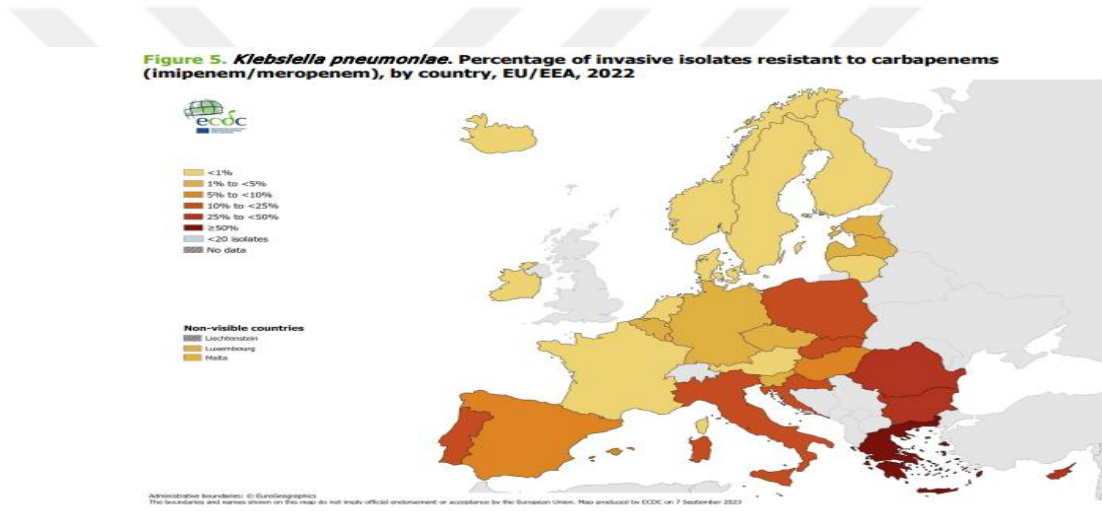
Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (KRE) enfeksiyonları dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son on yılda karbapenem dirençli Gram negatif bakterilerin prevelansında ve insidansında ciddi artışlar olmuştur [143]. İnsanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde antimikrobiyallerin yanlış ve aşırı kullanımı, ilaca dirençli patojenlerin gelişmesinde başlıca etkindir. Karbapenem dirençli Gram negatif bakteriler yüksek oranda bulaşıcıdır bu nedenle sağlık kuruluşlarında salgınlara neden olabilmektedir. Gastrointestinal kanalda kolonize olabildiklerinden çapraz bulaşlar da meydana gelebilmektedir. 2022 yılında yayınlanan bir meta analiz KDKp kolonizasyonunun yaygınlığının dünya çapında %0,13 ila %22 arasında değiştiğini ve

toplam yaygınlığının %5,43 olduğunu, KDKp kolonizasyonunun insidansının ise %2 ila %73 arasında değiştiğini ve toplam insidansının %22,3 olduğunu göstermiştir [144]

Murray ve ark.'nın çalışmasında antimikrobiyal direncin 2019 yılında 1,27 milyon küresel ölümden doğrudan sorumlu olduğu 4.95 milyon ölüme ise katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir [145]. Küresel antimikrobiyal direnç ve kullanım gözetim sistemi (GLASS- Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System) 2021 raporuna göre, 2019 yılında 70 ülkede ve bölgede laboratuvar onaylı 3.106.602 hastada antibiyotik direnci görülmüştür [146]. SENTRY Antimikrobiyal Gözetim Programı'nda, 1997 ile 2016 yılları arasındaki süreçte dünya genelinde 42 ülkedeki 199 hastaneden toplanan 178.825 *Enterobacteriaceae* izolatının duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Çoklu ilaç direnci (MDR) oranlarının genel olarak %7,3'ten %15,3'e, karbapenem direncinin ise %0,6'dan %2,9'a önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir [147]. 2023 ECDC'nin raporlarına göre 2021 yılı verilerine bakıldığında, Avrupa'da karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının yaygınlığı ve direnci ciddi bir artış göstermiştir.

Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKp), dünya genelinde ciddi bir sağlık tehdidi haline gelmiştir ve tedavi edilmesi zor olan enfeksiyonların başlıca nedenlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Tüm dünyadan karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatları bildirilmektedir. SENTRY Antimikrobiyal Gözetim Programı karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'yı karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* artışının ana itici gücü olarak belirtmiştir (CRE izolatların %71,1) [147]. ECDC'ye veri sağlayan ülkelerin %33'ü *K. pneumoniae*'de %25 veya daha yüksek direnç yüzdeleri bildirmiştir. Avrupa Bölgesi'nin güney ve doğu bölgelerinde *K. pneumoniae*'de üçüncü kuşak sefalosporin ve karbapenem direncinde daha yüksek oranlar belirtilmiştir [148]. Küresel antimikrobiyal direnç ve kullanım gözetim sistemi (GLASS- Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System) 2022 raporunda 87 ülke tarafından sağlanan veriler değerlendirildiğinde 2020 yılında *Klebsiella pneumoniae*'nin hastane enfeksiyonları açısından özellikle tehlike oluşturduğu ve direnç oranlarının %50'nin üzerinde olduğu belirtilmektedir [149]. Özellikle yüksek prevalansa sahip ülkeler arasında İtalya, Romanya ve Yunanistan, İsrail, ABD, Kuzey Afrika ve Hindistan alt kıtası bulunmaktadır.

İlk kez tüm Avrupa Birliği/Avrupa Ekonomik Alanı (AB/AEA) ülkelerinin Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetim Ağı'na (EARS-Net) veri sağladığı “Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)- Annual epidemiological report for 2022” 17 Kasım 2023 tarihinde yayınlanmıştır (Şekil 2.9). Rapora göre 2018-2022 döneminde, AB'de karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* ile kan dolaşımı enfeksiyonlarının tahmini insidansı, 100.000 kişi başına 1.87'den 3.26 vakaya yükselerek önemli bir artış eğilimi göstermiştir. 2020'de karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'ya bağlı ölümlerin tahmini sayısı 4.076 olarak belirlenmiştir. Veriler, halk sağlığı tehdidine etkin bir şekilde yanıt vermek için sürekli yakın takip ve daha büyük çabaların gerekliliğini vurgulamaktadır [3].



Şekil 2.9: Karbapenemlere Dirençli İnvaziv *K. pneumoniae* İzolatlarının Ülke Ve Bölgelere Göre Yüzdesi, 2023 (AB/AEA’de Antimikrobiyal Direnç (EARS-Net)-Yıllık Epidemiyolojik Raporu) [3].

Ülkemizden bildirilen yayınlara bakıldığında Durdu ve ark.’nın 2012-2016 yılları arasında hastane kaynaklı *Klebsiella pneumonia* kan dolaşımı enfeksiyonlarını değerlendirdikleri retrospektif çalışmada 190 hasta değerlendirilmiş ve karbapenem direnci %43,2 olarak, mortalite oranı %47,9 bulunmuştur [150]. 2015-2016 yılları arasında toplanan 127 *K. pneumonia* izolatı dahil edildiği bir çalışmada karbapenem direnç oranı % 35 bulunmuştur [151]. Yeşilbağ ve ark.’nın çalışmasında 2017-2020 yılları arasında YBÜ’de takip edilen hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnci %52,6 olarak saptanmıştır [152].

KDKp neden olduğu enfeksiyonlar yoğun bakım ünitesi (YBÜ), solid organ nakli, hematolojik malignite ve kök hücre nakli hastaları gibi yüksek riskli immün yetmezliği olan popölasyonlarda özellikle kötü seyretmektedir. Durdu ve ark.'nın çalışmasında sepsis, septik şok, yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) takip, meropenem direnci, böbrek yetmezliği, pnömoniye sekonder kan dolaşımı enfeksiyonu, santral venöz kateter, idrar sondası ve mekanik ventilatör gibi invaziv aletlerin kullanımı, kolostomi, transfüzyon ve hemodiyaliz varlığında mortalitenin anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir [150].

2020 yılında birçok KDKp izolatu kolistin, tigesikline ve bir veya daha fazla aminoglikozide karşı duyarlı olmaya devam etmekle birlikte bazıları bu ilaçlara bile dirençlidir. Dahası dirençli suşlara karşı geliştirilmekte olan yalnızca birkaç ilaç bulunmaktadır. KDKp izolatlarının moleküler epidemiyolojisi, potansiyel tedavi seçeneklerini belirleyebildiği için önemlidir. Karbapenem direncine başlıca 3 karbapenemaz aracılık etmektedir: KPC, NDM ve OXA-48.

İlk kez 1990'ların sonlarında Amerika Birleşik Devletleri'nin Kuzey Carolina eyaletindeki bir *K. pneumoniae* izolatından bildirilen KPC günümüzde tüm karbapenemazların en yaygın olanıdır [143, 153, 154]. KPC üreten *K. pneumoniae* o zamandan beri Amerika Birleşik Devletleri'nde yayılmıştır ve ABD hastanelerinde hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *Klebsiella spp.* izolatları arasında karbapenem direncinin genel yaygınlığı 2009 ile 2010 yılları arasında yaklaşık %12 bulunmuştur. ABD'den sonra birçok ülkeden salgınlar ve sporadik vakalar bildirilmiştir [155]. KPC'nin endemik olduğu diğer ülkeler ise İsrail, İtalya, Yunanistan ve Polonya'dır [156]. Ülkemiz için ise ilk olarak 2012 yılında Labarca ve ark. Romanya'daki bir hastaneden İstanbul'a sevk edilen 80 yaşındaki bir kadın hastanın trakeal aspirat sıvısı kültüründen imipenem, meropenem, ertapenem ve hatta kolistine dirençli KPC-2 pozitif *K. pneumoniae* izolatını tespit etmişlerdir [157]. Daha sonra Türkiye'den KPC üreten iki *K. pneumonia* izolatu daha bildirilmiştir [158].

Metallo-beta-laktamazlar çoğunlukla VIM, IMP ve NDM-1 tipindedir. IMP tipi beta-laktamazlar, tanımlanan ilk edinilmiş MBL'lerdir ve Japonya'da tespit edilmiştir. Tayvan, Singapur, Kore, Hong Kong, Çin, Brezilya ve Kolombiya'da da görölmüştür. Günümüzde tüm dünyada yaygın olup Japonya ve Tayvan'da endemiktir [143]. İtalya, 1997 yılında VIM-4 üreten *K. pneumoniae* bildiren ilk Akdeniz ülkesi olmuştur. VIM

üreten *K. pneumoniae*, son yıllarda birkaç vaka ve salgının bildirildiği Yunanistan hariç, diğer Akdeniz ülkelerinde belirgin bir yayılmaya uğramamıştır. Son olarak Fransa, İspanya, Fas, Mısır, Cezayir ve Tunus'ta saptanmıştır [156]. Ülkemizde ilk kez VIM-5 tipi metallo-beta-laktamaz üretimi 2004 yılında kardiyovasküler operasyon geçirmiş 53 yaşındaki bir hastanın solunum örneğinden izole edilen *P. aeruginosa*'da gösterilmiştir [159]. Daha sonra 2007 yılında ülkemizde ilk defa MDR *K. pneumoniae* klinik izolatta VIM-1 metallo-beta-laktamaz enzimi saptanmıştır [160]. NDM-1 enzimi 2008'de İsveç'te, daha önceden Hindistan'ın başkenti New Delhi'de yatarak tedavi görmüş bir hastanın idrar örneğinden izole edilen *K. pneumoniae* suşundan ve aynı hastanın dışkılarından izole edilen *E. coli* suşundan elde edilmiştir [161]. Sonraki birkaç yıl içinde hızla Hindistan alt kıtasına yayılmıştır ve uluslararası seyahatler, dünya çapında hızla yayılmasında etkili olmuştur. Akdeniz bölgesindeki birçok ülkeden (Fransa, İtalya, İspanya, Fas, Tunus ve Mısır) NDM-1 üreten *K. pneumoniae* suşlarının neden olduğu tek veya sporadik hastane salgınları bildirilmiştir. Türkiye'de ilk olarak, 2011 yılında Irak kökenli bir lösemi hastasının kan kültürü örneğinden izole edilen *K. pneumoniae* suşunda bildirilmiştir [162]. NDM üreten *K. pneumoniae*'nin küresel yayılımının, özellikle neonatal sepsis yükünün yüksek olduğu düşük gelirli ülkelerde, neonatal ölüm oranları üzerinde de ciddi bir etkisi vardır. NDM pozitif *K. pneumoniae* ile kolonize gebelerde anneden bebeğe transfer üzerinde durulmuş, Türkiye'de bir yenidoğan yoğun bakım ünitesinde NDM-1 üreten *K. pneumoniae*'nin yayıldığı bildirilmiştir [158, 163]. NDM-1 oldukça hızlı yayılmakta ve tüm dünya için oldukça önemli bir tehdit unsuru haline gelmektedir [156].

OXA-48 ilk olarak Eylül 2001'de Türkiye'de, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde idrar yolu enfeksiyonu tanısıyla takip edilen 54 yaşında bir erkeğin idrar örneğinden izole edilen *K. pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir [123]. OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* suşlarının neden olduğu hastane salgınları ülkenin başlıca şehirlerinde bildirilmiş ve 2015 yılında OXA-48 üreten *K. pneumoniae* Türkiye'de endemik olarak kabul edilmiştir. OXA-48 üreten izolatlar Orta Doğu, Kuzey Afrika ve Avrupa'ya yayılmış, Fransa, İspanya, Lübnan, İsrail, Tunus ve Fas dahil olmak üzere birçok Akdeniz ülkesinden hastane salgınları bildirilmiştir. Bununla birlikte OXA-48 ve diğer karbapenemazların birlikte olduğu *K. pneumoniae* izolatları Avustralya (OXA-48/ NDM-1), Fas (OXA-48/NDM-1), İsviçre (OXA-

48/NDM-1) gibi ülkelerde saptanmıştır [163]. Türkiye’den Şanlıurfa’da OXA-48/NDM-1 pozitif *K. pneumoniae* izolatu bildirilmiştir [164].

Dirençli izolatların yayılımının önüne geçilmesi için bir takım enfeksiyon kontrol önlemleri alınmalıdır. 12 Nisan 2024 yılında tekrar düzenlenen, CDC’nin karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (KRE) kontrol rehberinde önerilen stratejiler arasında akut bakım ortamlarında izolasyon ve temas önlemleri alınması, el hijyeni, kişisel koruyucu ekipman ve çevre temizliği gibi temel enfeksiyon kontrol uygulamaları, santral venöz kateter, üriner kateter gibi invaziv aletlerin kullanımının azaltılması, sağlık personeline bu politikalara uymanın öneminin hatırlatılması, antibiyotiklerin uygun şekilde reçete edilmesi ve kullanılması gibi öneriler yer almaktadır. Endoskopların sökülmesine, temizlenmesine ve dezenfekte edilmesine, kötü tasarlanmış lavaboların ve tuvaletlerin değiştirilmesine dikkat edilmesi de önem arz edebilmektedir [165]. Yüksek riskli hastaların rektal kolonizasyonun tespiti amaçlı yapılacak taramalar önemli bir enfeksiyon kontrol yöntemi olarak önerilmiştir.

Karbapenem dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının sürveyans ile izlenmesi etkin enfeksiyon kontrol önlemleri alınması ve hastalara erken dönemde doğru antimikrobiyal tedavi başlanması için yol gösterici olmaktadır. Sağlıklı epidemiyolojik veriler için DSÖ’nün sürveyans önerilerine uyulması gerekmektedir. Dünya genelinde direnç ve direnç genlerinin epidemiyolojisinin bilinmesi antibiyotik direncini önleme yönetiminde de önemlidir [143].

2.7. Karbapenemaz Üreten *Klebsiella spp.*’de Tedavi Seçenekleri

Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*. (KDKp) enfeksiyonu olan hastalar için tedavi seçenekleri olgu sunumları, olgu serileri, retrospektif ve gözlemsel çalışmalara dayanmakta olup değerlendirilen bakteriyemi odakları heterojen ve hastaların klinik durumlarının ağırlığı da farklılıklar göstermektedir [166]. Optimal tedavi belirtilmemekle birlikte bu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla üç temel tedavi stratejisi kullanılmaktadır [167]:

1. Daha yüksek farmakokinetik maruziyet sağlayan, standart antibiyotiklerin artırılmış dozlarda kullanımı (optimal farmakokinetik/farmakodinamik (FK/FD) hedeflerine ulaşabilmek amaçlanır),
2. Henüz direnç oluşmamış yeni ve standart dışı antibiyotiklerin kullanımı,

3. Antibiyotiklerin kombinasyon tedavisinin kullanımı.

İlk seçenek, direnci yenmek için daha yüksek dozlarda birinci basamak antibiyotikleri (yani meropenem, florokinolon, aminoglikozid) uygulamaktır. Bununla birlikte, bazı KDKp izolatları birinci basamak ajanlara karşı o kadar yüksek minimal inhibitör konsantrasyonları sergiler ki, etkinlik için gereken farmakokinetik/farmakodinamik (PK/PD) düzeyine ulaşmak için yüksek toksisiteye ulaşan aşırı dozlar gerekebilmektedir [167].

İkinci seçenek, henüz direncin gelişmediği Gram negatif aktiviteye sahip ikinci basamak kolistin, tigesiklin, gentamisin, fosfomisin gibi antibiyotiklerin kullanımını içerir. Ne yazık ki, birçok ikinci basamak ajan birinci basamak ilaçtan çok daha toksiktir veya KDKp'nin en çok ortaya çıkma olasılığının olduğu idrar, kan dolaşımı ve akciğer gibi anatomik bölgelerde aktivitelerini sınırlandıran önemli farmakokinetik eksikliklere sahiptir. Ayrıca, ikinci basamak antimikrobiyallerin tümü, monoterapi olarak kullanıldığında tedavi sırasında hızla direnç oluşumuna eğilimlidir [168]. Yeni nesil ajanların (seftazidim-avibaktam, sefidierokol, meropenem-vaborbaktam, imipenem-relebaktam, plazomisin ve eravasiklin gibi) sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir ancak bu tür ajanların çoğu genellikle dünya çapında mevcut değildir [166].

Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (ESCMID)'nin Nisan 2022'de yayınlamış olduğu çoklu ilaca dirençli Gram negatif basillerin neden olduğu enfeksiyonların yönetimine ilişkin rehberinde; karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'nin etken olduğu ciddi enfeksiyonlarda in vitro aktif ise meropenem-vaborbaktam ve seftazidim-avibaktam, metallo- β -laktamaz taşıyan suşlara bağlı ciddi enfeksiyonları olan ve/veya seftazidim-avibaktam ve meropenem-vaborbaktam dahil olmak üzere tüm diğer antibiyotiklere dirençli hastalarda sefidierokol, ciddi olmayan enfeksiyonları olan hastalarda ise bireysel bazda ve enfeksiyon kaynağına göre in vitro aktif ajanlar arasından seçilen eski bir antibiyotik kullanımı önerilmektedir. Ciddi olmayan komplike üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE) olan hastalarda tigesiklin yerine plazomisin dahil aminoglikozidler önerilirken, tigesiklinin kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE) ve hastane ilişkili (HİP/HAP)-ventilatör ilişkili pnömonide (VİP/VAP) kullanılmaması, pnömonide gerekirse yüksek doz kullanılması önerilmektedir [169].

Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA)'nin Ağustos 2024'te yayınladığı antimikrobiyal dirençli Gram negatif enfeksiyonların tedavisine ilişkin rehberde ise; komplike olmayan sistitte nitrofurantoin, TMP-SMX, siprofloksasin/levofloksasin tercih edilebilirken aminoglikozid (tek doz), oral fosfomisin (sadece *E. coli* için), kolistin, seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam imipenem-silastatin-relebaktam veya sefidrokol alternatif tedavi seçenekleri olarak önerilmiştir. Komplike üriner sistem enfeksiyonlarında ise, duyarlılık gösterilirse TMP-SMX, siprofloksasin/levofloksasin tercih edilen tedavi seçenekleri olup seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam, imipenem-silastatin-relebaktam, sefidrokol veya aminoglikozidler de önerilmektedir. Üriner sistem haricinde gelişen enfeksiyonlarda; karbapenemaz üretmeyen ve meropenem/imipeneme duyarlılık gösteren (MİK ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$) ancak ertapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* için, uzun infüzyonlu meropenem veya imipenem-silastatin kullanımı önerilirken, karbapenemaz üretmeyen ve herhangi bir karbapeneme duyarlılık göstermeyen suşların neden olduğu enfeksiyonlarda, seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam ve imipenem-silastatin-relebaktam önerilen tedavi seçenekleridir. Üriner sistem haricinde gelişen ve KPC üreten karbapenem dirençli suşların etken olduğu enfeksiyonlarda meropenem-vaborbaktam, seftazidim-avibaktam ve imipenem silastatin-relebaktam önerilmekte, sefidrokol alternatif seçenek olarak kalmaktadır. NDM veya başka bir MBL üretimi saptanan suşlarda aztreonam veya sefidrokol ile birlikte seftazidim-avibaktam kombinasyonu önerilen tedavi seçenekleridir. OXA-48 üretimi durumunda ise seftazidim-avibaktam, alternatif olarak da sefidrokol önerilmektedir. Rehberde polimiksin B ve kolistin, bu enfeksiyonların tedavisi için önerilmemekle birlikte kolistin, komplike olmayan sistit için alternatif bir ajan olarak yer almaktadır [170].

Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisi için üçüncü strateji ise birinci ve/veya ikinci basamak antibiyotiklerin kombinasyonudur çünkü her ne kadar ilk seçenek olarak yeni beta laktamaz/beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları ve sefidrokol önerilse de yeni ilaçlara ulaşamadığı, direnç geliştiği veya ilacın tolere edilemediği durumlarda, mevcut antibiyotiklerle tedavi tek seçenek olarak kalabilmektedir. Böyle durumlarda tercih edilebilen kombinasyon tedavisi ile antibiyotikler arasındaki sinerjik etkileşimlerin yüksek antibiyotik dozlarına olan ihtiyacı azaltması, geniş bir spektrum elde edilmesi, direnç oluşumunun baskılanması

ve monoterapilerin farmakokinetik zayıflıklarının üstesinden gelinerek daha güçlü bakteriyostatik ve bakterisidal etki elde edilmesi amaçlanmaktadır [167].

Karbapenem dirençli Gram negatif bakterilerle oluşan şiddetli enfeksiyonları tedavi etmek için hasta ve patojene özgü faktörler her durumda bireysel olarak değerlendirilerek mümkün olduğunca in vitro etkili olduğu gösterilen iki veya daha fazla antibiyotiğin, etki spektrumu, etki yeri, endikasyon ve kontrendikasyonlar dikkate alınarak kullanılması önerilmektedir [171]. ESCMID rehberinde, şiddetli olmayan veya düşük riskli enfeksiyonu olan hastalarda, in vitro aktif eski ilaçlardan, bireysel bazda ve enfeksiyon kaynağına göre seçilen monoterapinin kullanımı, MBL taşıyan ve/veya yeni antibiyotik monoterapilerine dirençli ciddi enfeksiyonları olan hastalarda ise aztreonam ve seftazidim-avibaktam kombinasyon tedavisi, sadece polimiksinlere, aminoglikozidlere, tigesiklin veya fosfomisine in vitro duyarlı olan şiddetli enfeksiyonları olan hastalar için veya yeni ilaçlara ulaşamaması durumunda ise, in vitro aktif birden fazla ilaçla tedavi önerilmekle birlikte kombinasyon seçeneği belirtmemiştir. Klinisyenlerin, meropenem MİK değeri ≤ 8 mg/L olmadığı sürece karbapenem bazlı kombinasyon tedavisinden kaçınmalarını önerilirken yeni ajanlar kullanılamıyorsa kombinasyon tedavisinin bir parçası olarak yüksek dozda uzun infüzyon meropenem kullanılabileceği belirtilmektedir [169]. IDSA rehberinde ise kombinasyon antibiyotik tedavisi (beta-laktam ajanının bir aminoglikozid, florokinolon, tetrasiklin veya polimiksin ile kombinasyon halinde kullanılması), yeni beta-laktam ajana duyarlılık gösterildiği takdirde Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için önerilmemektedir [170]. Literatürde antibiyotik kombinasyonu alan veya monoterapi alan KRE enfeksiyonu olan hastaların sonuçlarının incelendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Çalışmalarda 'kombinasyon tedavisi'nin tanımları oldukça değişken olması, değişken in vitro aktiviteye sahip farklı antibiyotik ile farklı dozajlar ve sürelerden oluşan iyi belirtilmemiş tedavi şemaları içermesi, küçük örneklem büyüklükleri nedeniyle sonuçlar oldukça değişken olabilmektedir.

Çok sayıda bilim insanı ilaç dirençli patojenlerle mücadele etmek için antimikrobiyal peptitler, ilaç yeniden kullanımı, antivirülans ilaçları, aşılama ve faj terapisini içeren çeşitli yönler üzerinde çalışmaktadır.

2.8. Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkinliğinin Değerlendirilmesinde Kullanılan In Vitro Testler

Antibiyotik kombinasyonlarının etkisini saptamak için kullanılan testlere ‘in vitro sinerji testleri’ denilmektedir. Antibiyotiklerin kombine kullanımlarında in vitro olarak; additif, sinerjik, indiferans (tanımlanmayan) veya antagonistik etkileşim görülebilmektedir [172].

Additif etki; kombine edilen antibiyotiklerin etkisi, antibiyotiklerin tek başına kullanıldıklarında oluşan etkilerin toplamına eşittir. Kısmi sinerjiyi gösterir.

Sinerjik etki; kombine edilen antibiyotiklerin etkisi, antibiyotiklerin tek başına kullanıldıklarında oluşan etkilerin toplamından fazladır.

Antagonistik etki; kombine edilen antibiyotiklerin etkisi, antibiyotiklerin tek başına kullanıldıklarında oluşan etkilerin toplamından daha azdır.

İndiferans etki; kombine edilen antibiyotiklerin etkisi, kombinasyondaki en güçlü ajanın tek başına sergilediği etkinliğe neredeyse eşittir. Antibiyotikler birbiriyle etkileşim göstermez.

Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini ölçen testler 4 başlık altında sıralanır:

- 1) Dilüsyon yöntemleri
 - a) Mikrodilüsyon
 - b) Makrodilüsyon
 - c) Agar dilüsyon
- 2) Zamana bağlı öldürme yöntemi (Time-kill)
- 3) Disk difüzyon yöntemi
- 4) Etest (Epsilometer) yöntemi

Bu yöntemler her zaman aynı sonuçları vermezler ve hangi yöntemin en güvenilir olduğunu belirlemek zordur. Sinerjiyi belirlemek için belirlenmiş bir altın standart test bulunmamaktadır [173].

2.8.1. Dama Tahtası (Checkerboard) Yöntemi

Dama tahtası yöntemi antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkisini ölçmede en sık kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin kolay anlaşılabilir bir mantığı vardır ve

sonuçları yorumlamak için kullanılan matematiksel hesaplamalar zor değildir. Bu nedenle özellikle mikrodilüsyon yöntemine alışkın klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, hazır bulunan ekipmanlar kullanılarak rahatlıkla uygulanabilir. Mikrodilüsyon, makrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemi olmak üzere üç farklı şekilde uygulanabilir [174].

2.8.1.1 Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntemde her suş ve test edilecek antibiyotik kombinasyonu için bir tane olmak üzere 96 kuyucuklu ve U-tabanlı steril polistiren mikropalakalar kullanılır. Sinerji testi için antibiyotik stok solüsyonları hazırlanır ve buradan ayrı tüplerde çift kat seri dilüsyonlar yapılır. Kombinasyon denenecek her kuyucuk sıra veya sütununda istenen son konsantrasyon için, tüpte bu konsantrasyonun iki katı bulunmalıdır. Çünkü her iki antibiyotik eşit miktarlarda aynı kuyucukta bulunacak ve birbirini bir kat dilüe edecektir. İlk antibiyotik solüsyonu yukarıdan aşağı, diğeri ise soldan sağa doğru seri olarak dilüe edilir. (Her mikropalak panelinde ilk yatay sıra (A2-A12) ve ilk dikey sütun (B1-H1) kuyucukları tek antibiyotiklerin (a ve b antibiyotikleri) MİK'lerinin belirlenmesi için kullanılır. Diğer kuyucuklar ise a + b kombinasyonlarını içerecektir. Yine mikropalağın ayrı bir bölgesinde, antibiyotikler için MİK değerlerini saptamak üzere 2 ayrı sütun kullanılır. Kombinasyonda kullanılacak her bir antibiyotik için belirlenmiş olan veya beklenen MİK değerinin en az 3-4 dilüsyon altından, en az 2 (tercihen 8) dilüsyon üstü kullanılır. Test için, koyun kanlı agar gibi non-selektif bir besiyerinde subkültürü yapılan izolatların taze kültürü kullanılır. İzolatları inoküle etmek için KAMHB (Mg^{+2} :10-12,5 mg/L, Ca^{+2} :20-25 mg/L destekli-Kasyon Ayarlı Mueller-Hinton Buyyon) veya steril %8.5 tuzlu su kullanılır. Daha sonra inokulum aşamasına geçilir. 0.5 McFarland bulanıklığında ($1,5 \times 10^8$ cfu (Colony Forming Unit) /ml) bakteri süspansiyonu hazırlanır. 1:30 oranında dilüe edilip (5×10^6 cfu/mL) buradan sterilite kontrol kuyucuğu dışındaki her kuyucuğa 10 µL (5×10^4 cfu) inoküle edilir. Böylece, her bir kuyucuktaki 100 µL antibiyotik kombinasyonu solüsyonu içindeki bakteri sayısı 5×10^4 cfu/100 µL veya 5×10^5 cfu/mL olur. Bakteri süspansiyonunda MHB kullanılmışsa, antibiyotik dilüsyonlarının yine MHB ile yapılması tercih edilmelidir. Her deneyde bir kuyucuk (A1) antibiyotiksiz bırakılır ve üreme kontrolü olarak değerlendirilir. Test okunurken bu kuyucukta yoğun bulanıklık görülmelidir. Bir kuyucuk ise (H12) yalnız besiyeri içerir ve besiyeri sterilite kontrolü

olarak kullanılır. İnkübasyon süresi sonunda bu kuyucukta üreme olmaması beklenir. Testin kalite kontrolü için, uygun ATCC suşlarıyla, aynı antibiyotik stok solüsyonları ve sulandırımalarla, fakat ayrı bir mikroplakta MİK deneyi yürütülür (Şekil 2.10) [174].

Kalite kontrol suşlarının MİK değerleri standart MİK değerleriyle uyumluysa ve inokulum saflık kontrolü, üreme kontrolü, besiyeri sterilite kontrolü ve inokulum yoğunluk sonuçları beklendiği gibi ise test geçerli kabul edilir ve mikroplak okunur. Öncelikle antibiyotiklerin tek başlarına MİK değerleri okunarak belirlenir. Ardından kombinasyon kuyucukları okunur her sıra ve sütunda üreme olan kuyucuklar pozitif kabul edilerek kayıt formunda işaretlenir, hiç üreme görülmeyenler boş bırakılır. Kombinasyon çalışmasının sonuçlarını yorumlayabilmek için ilk olarak her iki antibiyotiğin ayrı ayrı fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) ve fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu indeksi (FİKİ) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmalıdır:

$$FİK_a = \frac{\text{a antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{a antibiyotiğinin tek başına MİK değeri}}$$

$$FİK_b = \frac{\text{b antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{b antibiyotiğinin tek başına MİK değeri}}$$

$$FİK \text{ indeksi } (\sum FİK) = FİK_a + FİK_b$$

$$\sum FİK;$$

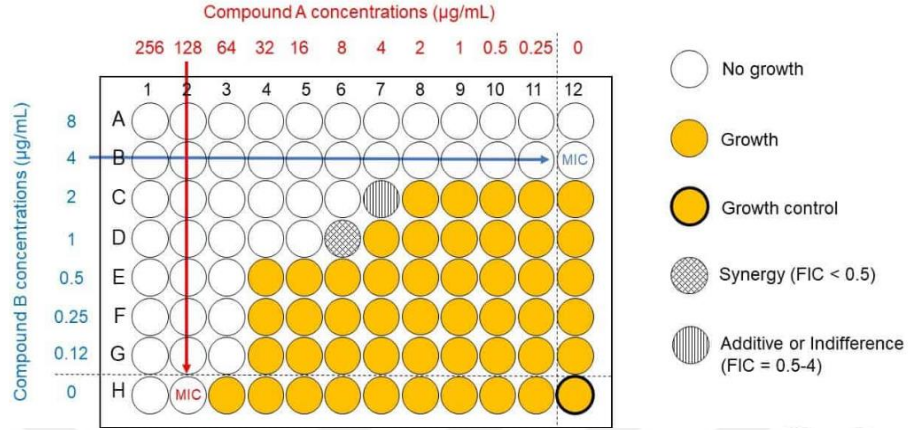
$$\leq 0.5 \text{ ise sinerjistik,}$$

$$0.5 < \leq 1 \text{ ise additif,}$$

$$1 < < 4 \text{ ise indiferan,}$$

$$\geq 4 \text{ ise antagonistik etki şeklinde yorum yapılabilir [175, 176].}$$

Elde edilen sonuçlar MİK'in katları olarak şematize edilip, izobologram adı verilen ve logaritmik verileri aritmetik skalaya dönüştüren diyagramlarla da gösterilebilir [174].



Şekil 2.10: Dama Tahtası (Checkerboard) Mikrodilüsyon Sinerji Yönetimi.

2.8.1.2. Makrodilüsyon Yöntemi

Mikrodilüsyondaki kuyucukların yerine burada deney tüpleriyle çalışılmaktadır. Mikrodilüsyon yöntemindeki tüm çalışma basamakları burada da geçerlidir. Bu nedenle her tüpte bulunması gereken miktar 0.25'er mL her iki antibiyotik solüsyonu ve 0.5 mL bakteri süspansiyonu olmak üzere toplam 1 mL'dir. Öte yandan 'makro' hacimlerle çalışıldığından mikrodilüsyon için kullanılan panelin tümünü makrodilüsyon yöntemiyle yürütmek zordur. Genellikle kısıtlı panel hazırlanır ve $1/2$ MİK, MİK ve $2 \times$ MİK değerleriyle çalışılır. Antibiyotik stok solüsyonları her test tüpünde istenen son konsantrasyonun 4 katı olmalıdır. Test değerlendirmesi mikrodilüsyon yöntemi ile aynı şekilde yapılır [174].

2.8.1.3. Agar Dilüsyon Yöntemi

Az sayıda antibiyotik kombinasyonu ve çok sayıda bakteri suşuyla çalışılması gereken durumlarda tercih edilebilir. Klasik agar dilüsyon yöntemi izlenir. Her bir antibiyotik solüsyonu petrideki 20 mL agar ile dilüe olacağı için stok solüsyonlar istenen son konsantrasyonun 20 katı yoğunlukta hazırlanır. Agara eklenen her bir antibiyotik solüsyonu miktarı petrideki agar miktarının en çok %5'i kadardır. Agar

yüzeyine 10^4 cfu bakteri içerecek spot ekimleri yapılır. Değerlendirmeler aynı şekilde yapılır [174].

2.8.2. Zamana Bağlı Öldürme (Time-Kill) Yönetimi

Time kill sinerji testi, kombinasyonda en aktif olan ajanın tek başına oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısı ile kombine edildiklerinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının karşılaştırıldığı bir yöntemdir [175]. Time kill yöntemi sadece sinerji için bilgi sağlamaz aynı zamanda bakterisidal aktivite ve bakteri üremesinin seyri hakkında da bilgi sağlamaktadır [173].

Bu testte en az 10 mL katyon destekli MHB içeren tüplerde veya küçük balonlarda sinerji testi yürütülür. Bakteri inokulumu 5×10^5 cfu/mL'dir. 0., 4., 8., 24. saatlerde kanlı agar plaklarına farklı antibiyotik dilüsyonu içeren her tüp veya balondan 25 µL kadar bir miktar damlatılır. Plakların 24 saat inkübasyonu sonunda oluşmuş bakteri kolonileri sayılıp cfu/mL değerleri bulunur. Antibiyotiğin zaman içindeki öldürme etkisinden söz edebilmek için koloni sayısında 24 saatte %99.9 yani 10^3 kat ($3 \log_{10}$) azalma görülmelidir. Denenen iki antibiyotiğin sinerjist etkisinden söz etmek içinse önce kombinasyondaki antibiyotiklerin daha aktif olanının koloni sayıları kaydedilir. Bu değerlere oranla, kombinasyonun 24 saatlik koloni sayılarında ≥ 100 kat ($2 \log_{10}$) düşüş varsa sinerjiyi, ≥ 100 kat artış antagonizmi, < 10 kat artış veya azalış ise additif veya indiferan etkiyi gösterir [174].

Time kill yönteminin sınırlı antimikrobiyal konsantrasyonlarının test edilmesi, test edilecek mikroorganizma miktarının standardize olmaması ve antimikrobiyal konsantrasyonun hazırlanmasının yoğun ve zaman alıcı olması gibi dezavantajları bulunmaktadır [175].

2.8.3. Disk Difüzyon Yöntemi

0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu petriye yayılıp kombinasyon etkisi araştırılan iki antibiyotiğin diskleri yan yana yerleştirilir. Aralarındaki merkezden merkeze uzaklık, her iki disk etrafındaki inhibisyon zon yarıçapları toplamına eşit veya biraz üstünde olmalıdır. 16-18 saat $35-37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonunda değerlendirilir [174].

2.8.4. E-test Yöntemi (Epsilometer Test)

E-test, kantitatif bir yöntemdir, pratik ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanıma çok uygundur. E-test, dilüsyon ve difüzyon testlerinin kombinasyonudur. E-test kullanılarak elde edilen MİK değerleri birçok antibiyotik ve bakterinin agar veya broth dilüsyon ile elde edilen MİK değerleriyle korelasyon göstermektedir [174].

E-test 5 mm x 60 mm ebatlarında, ince ve por içermeyen plastik şeritler şeklindedir. Şeridin bir yüzü MİK değerlerinin okunduğu ve µg/ml cinsinden kalibre edilmiş gradientten oluşur. En üst kısmında antibiyotiği tanımlayan, iki ya da üç harfli kod bulunmaktadır. Antibiyotik kodunun yazılı olduğu uç, en yüksek konsantrasyonu; diğer uç ise en düşük konsantrasyonu gösterir. E-test şeritlerinin diğer yüzünde ise belirlenen antibiyotik konsantrasyonları ile kaplı yüzey bulunmaktadır. Bakteri inokule edilmiş E-test yerleştirilen plaklarda inkübasyon süresi sonunda, elips şeklinde bakteri inhibisyon zonu oluşur. MİK değeri elipsin şerit ile kesiştiği noktadan µg/mL cinsinden okunur. Böylece MİK değerleri ayrı ayrı saptanıp, fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonları (FİK) hesaplanarak, sinerjizm açısından değerlendirme yapılır [174].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 13 Mart 2024 tarihinde 2024/86 karar numarası ile alınan Etik Kurul onayı doğrultusunda yapılmıştır (Ek A).

Çalışmamız finansal olarak Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 20240611 numaralı proje ile desteklenmiştir (Ek B).

Çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak tamamlanmıştır.

3.1. Çalışma Grubunun Belirlenmesi

Çalışmamızda Ocak 2021 ile Ocak 2024 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Laboratuvarına Yoğun Bakım Üniteleri, Göğüs Hastalıkları, Enfeksiyon Hastalıkları, İç Hastalıkları ve Üroloji kliniklerinden gönderilen, 18 yaş ve üzeri hastaların kan, endotrakeal aspirat (ETA), balgam, yara ve idrar örneklerinden izole edilen 60 adet *K. pneumoniae* suşu değerlendirilmeye alınmıştır. Bu suşlardan kolistin başta olmak üzere karbapenem, sefalosporin, aminoglikozid, florokinolon, trimetoprim/sulfametoksazol, piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerine dirençli 21 adet *K. pneumoniae* suşu seçilerek dahil edilmiştir. Çalışmaya her hastadan yalnızca bir izolat dahil edilmiş olup aynı hastaya ait mükerrer suşlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan Besiyerleri ve Malzemeler

- 1) %5 KKA (Koyun Kanlı Agar) ve EMB (Eosin Methylene Blue) (Aklab Group Laboratuvar San. Ve Tic. Ltd.Şti.)
- 2) KAMHB (Oxoid™)
- 3) Kolistimetat Sodyum (Vem İlaç San. Ve Tic. A.Ş.)
- 4) Seftazidim/avibaktam (Pfizer Pfl İlaçları A.Ş.)
- 5) Trimetoprim/sulfametoksazol (Deva Holding A.Ş.)
- 6) Tigesiklin (Centurion İlaç Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi)

- 7) Meropenem (Menarini Sağlık ve İlaç Sanayi Ticaret A.Ş.)
- 8) Gentamisin (Bilim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.)
- 9) %0,9 Steril Serum Fizyolojik
- 10) Steril Distile Su
- 11) Stok Besiyeri (Skin Milk)
- 12) PZR Primerleri (Sentebiolab[®], Ankara, Türkiye)
- 13) PZR komponentleri (Hedef DNA template'leri, DNA polimeraz, tampon sıvı vs)

3.2.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

- 1) Etüv
- 2) Otoklav
- 3) Buzdolabı (-20 °C ve -80 °C) (Thermo Scientific, USA)
- 4) Hassas terazi
- 5) Vortex
- 6) McFarland Cihazı (BD)
- 7) VITEK MS[®] ve VITEK 2[®] compact (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa)
- 8) Konvansiyonel PCR (Bio-Rad, USA)
- 9) Agaroz jel elektroforez cihazı (Bio-Rad, USA)
- 10) Cytation Imaging Multi Mode Reader 5 (BioTek, USA)
- 11) Thermalcycler (Bio-Rad, USA)
- 12) Mikrodalga fırın
- 13) 96 Well EDGE Cell Culture Plates (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.)
- 14) Steril plastik öze (10 µl)
- 15) Ayarlanabilir otomatik pipet (100-1000µl)
- 16) Ayarlanabilir otomatik pipet (1-10µl)
- 17) Steril falkon tüpleri (50 ml)
- 18) Cam Erlenmayer (250 ml, 500 ml)
- 19) Steril Eppendorf tüpleri (2 ml)
- 20) Steril enjektör (10ml, 50ml)
- 21) Steril cam pipet (5ml, 10ml, 25 ml)
- 22) Steril eküvyon
- 23) Pipet uçları
- 24) Jel dökme tepsi ve taraklar

3.3. Yöntemler

3.3.1. Örneklerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına kabulü yapılan klinik örnekler, laboratuvar tanı algoritmasına uygun olarak %5 koyun kanlı agar (KKA) ve EMB (Eozin metilen mavisi) besiyerlerine ekildi. Örnek türüne uygun olarak besiyerleri $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası besiyerlerinde saf koloni halinde üreyen bakterilerin koloni morfolojisi, Gram boyanma özelliği, katalaz, oksidaz ve diğer biyokimyasal özellikleri değerlendirilip ön tanımlaması yapıldı. İzolatların tür düzeyinde tayini VITEK MS[®] (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile, antibiyotik duyarlılıkları ise VITEK 2[®] compact (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemiyle, AST (antibiotic susceptibility testing) N423 ve N420 kartları kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlanan antibiyotik duyarlılık raporları EUCAST v.14.0 kriterleri ve uzman kuralları baz alınarak değerlendirilmiştir. Kolistin MİK değerleri ise Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) önerileri doğrultusunda Broth mikrodilüsyon testi ile belirlenmiş ve dirençleri doğrulanmıştır.

3.3.2. Örneklerin Saklanması

İzolatlar çalışma gününe kadar stok besiyeri (skin milk) eklenen eppendorflara pasajlanarak, derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır (Şekil 3.1). PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu [PCR]) ile genetik analizi yapıldıktan sonra derin dondurucuda (-80°C), dama tahtası (Checkerboard) sinerji testi yapılana kadar muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1: Etiketlenen Eppendorflar İçinde Muhafaza Edilen İzolatlar

3.4. Direnç Genlerinin Belirlenmesi ve Analizi

Bu tez çalışmasında çoklu antibiyotik direncine sahip 21 *K. pneumoniae* izolatının karbapenemaz aktivitesinden sorumlu majör genlerinin (OXA-48, NDM ve KPC) belirlenmesinde konvansiyonel PZR tekniği kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalar için Bezmialem Vakıf Üniversitesi BİLSAB (Beykoz Institute of Life Sciences and Biotechnology at Bezmialem Vakıf University) Laboratuvarında “in house” üretilen RTX Proofreading özellikteki DNA Polimeraz enzimi kullanılmıştır. Gerekli olan primerler Sentebiolab® (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Genlerin baz sıralamaları tablo 3.1’de verilmiştir [178].

Tablo 3.1. Karbapenemaz Genleri için PZR Primerleri [178].

Karbapenemaz Genleri	5'-3' Sekans
<i>bla_{KPC}</i>	(F) CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG (R) CTTGTCATCCTTGTTAGGCG
<i>bla_{OXA-48}</i>	(F) GCGTGGTTAAGGATGAACAC (R) CATCAAGTTCAACCCAACCG
<i>bla_{NDM}</i>	(F) GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC (R) CGGAATGGCTCATCACGATC

(F): Forward (R): Revers

3.4.1. *K. pneumoniae* İzolatlarının PZR Reaksiyonu için Hazırlanması

K. pneumoniae izolatlarından PZR’da template (şablon) olarak kullanılması için genetik materyallerin sıvı ortama aktarılması gerekmektedir. Bunun için izolatlardan yaklaşık 10 µL alınarak 7500 g’de 3 dk. santrifüj edildi ve pellet kısmı toplandı. Pellet üzerine 300-500 µL steril double distile su ilave edilerek ısı bloğunda 10 dk. kaynatıldı ardından oda sıcaklığında soğumaya bırakılan süspansiyon 12.000 g’de 5 dk. santrifüj edildi. Pellete dokunulmadan süspansiyon steril pipet ucu ile alınıp, steril eppendorf tüpüne aktarılaraq toplanan süpernatantın 1-2 µL’si PZR reaksiyonu için kalıp (template) DNA olarak kullanıldı.

3.4.2. *K. pneumoniae* İzolatlarının Direnç Genleri Tespiti için PZR Reaksiyonu

Tüm PZR reaksiyonlarının 25 µl son hacimde gerçekleştirilmesi planlandı. Bu plana uygun olarak üretici firmanın PZR reaksiyonu için önerdiği protokol takip edildi. Yüksek doğrulukta sentez yapan Phusion® High-Fidelity PZR Kit (NEB, İngiltere) kullanıldı.

Bu protokole göre komponentlerden kurulacak reaksiyon şu şekilde planlandı (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. Uygun PZR Reaksiyonu Komponentleri ve Miktarları.

KOMPONENT	25 µl REAKSİYON	50 µl REAKSİYON	FİNAL KONSANTRASYON
Füzyon DNA Polimeraz	0.25 µl	0.5 µl	1.0 ünite
5X Füzyon HF veya GC Tampon	5 µl	10 µl	1X
10 µM Forward Primer	1.25 µl	2.5 µl	0.5 µM
10 µM Reverse Primer	1.25 µl	2.5 µl	0.5 µM
10 mM dNTPs (deoksinükleotid trifosfat)	0.5 µl	1 µl	200 µM
Template DNA	değişken	değişken	<250 ng
DMSO (dimetil sülfoksit) (opsiyonel)	(0.75 µl)	(1.5 µl)	3%
Nükleaz içermeyen su	25 µl	50 µl	

Reaksiyon yavaşça karıştırılıp mikrosantrifüjde döndürüldükten sonra termal döngüleyiciye (thermalcycler) konulmak üzere hazırlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Thermalcyler (Bio-Rad, USA).

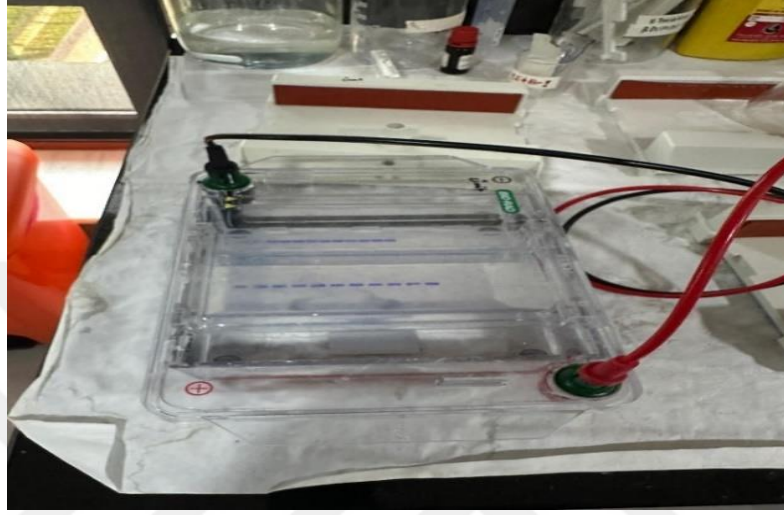
Tablo 3.3. Rutin PZR Şartları.

DÖNGÜ ADIMI	DÖNGÜLER	SICAKLIK	ZAMAN
Başlangıç Denatürasyon	1	98°C	30 saniye
Denatürasyon	30	98°C	5-10 saniye
Bağlanma		45-72°C	10-30 saniye
Uzaman		72°C	15-30 saniye/kb
Final Uzatma	1	72°C	5–10 saniye
Bekleme	1	4°C	∞

3.4.3. Agaroz Jel Elektroföresi ve Amplifiye Genlerin Görselleştirilmesi

PZR reaksiyonları tamamlandıktan sonra, elde edilen örnekler agaroz jel elektroföresi ile yürütüldü (Şekil 3.3). Amplifiye genin büyüklüğü anlaşılabilmesi için yürütme referans DNA markeri ile birlikte başlatıldı. İlk olarak %1 lik Agaroz 1X TBE (Tris/Borate/EDTA) Buffer ile eritildi. Bu agaroz eritilip soğutulurken “Etidyüm

Bromür” ilave edildikten sonra uygun taraklı kalıba döküldü. “Loading Dye” ile karıştırılan örnekler bu tarakların oluşturduğu kuyucuklara yüklendi. Daha sonra PZR ürünleri etidyum bromür içeren %1’lik agaroz jel elektroforezinde 100 V’da 40 dk yürütüldü ve UV (Ultraviyole) ışığı altında görüntülenerek DNA ladder bantları ile karşılaştırılacak genlerin varlığı tespit edildi.



Şekil 3.3: Agaroz Jel Elektroforez Cihazı (Bio-Rad, USA).

Son olarak pozitif olarak değerlendirilen bantlardan birkaç örnek seçilerek DNA dizi analizleri gerçekleştirilmesi ve PZR’nın doğruluğu tespit edilmesi amacıyla öncelikle PZR örnekleri temizlendi. Daha sonra temizlenen örnekler, Sanger Sekanlanmasına gönderildi. Elde edilen sekans sonuçları NCBI-BLASTn üzerinden doğrulandı.

3.5. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi

Çalışmanın laboratuvar aşaması Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü (Beykoz Institute of Life Sciences and Biotechnology- BİLSAB), MZD Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada suşların;

1. Kolistimetat Sodyum (K) (Vem İlaç San. Ve Tic. A.Ş.)
2. Seftazidim/avibaktam (S) (Pfizer Pfe İlaçları A. Ş.)
3. Trimetoprim/sülfametoksazol (B) (Deva Holding A.Ş.)
4. Tigesiklin (T) (Centurion İlaç Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi)

5. Meropenem (M) (Menarini Sağlık ve İlaç Sanayi Ticaret A.Ş.)

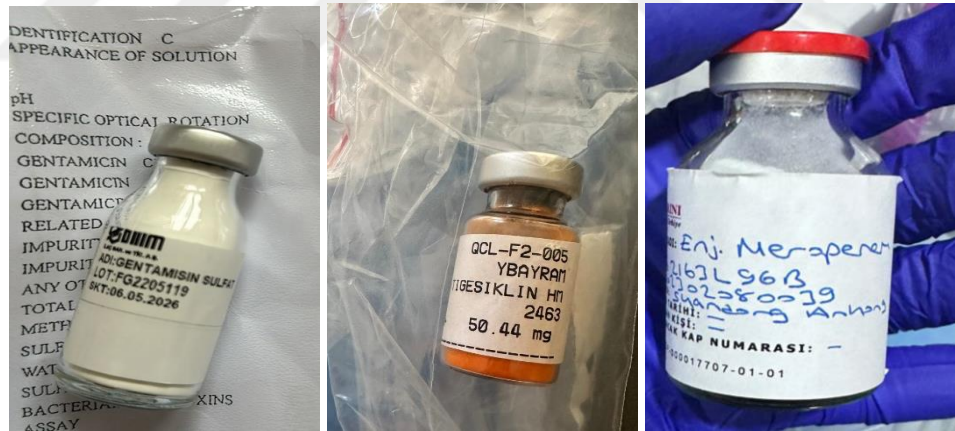
6. Gentamisin (G) (Bilim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.)

antibiyotiklerine olan duyarlılıklarının belirlenmesi ve kolistimetat sodyum ile seftazidim/avibaktam, trimetoprim/sülfametoksazol, tigesiklin, meropenem ve gentamisin kombinasyonları arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesinde in vitro olarak checkerboard (dama tahtası) sinerji testi yöntemi kullanılmıştır.

Kombinasyonlar şu şekilde oluşturulmuştur:

1. Kolistimetat Sodyum + Seftazidim/avibaktam (K+S)
2. Kolistimetat Sodyum + Trimetoprim/sülfametoksazol (K+B)
3. Kolistimetat Sodyum + Tigesiklin (K+T)
4. Kolistimetat Sodyum + Meropenem (K+M)
5. Kolistimetat Sodyum + Gentamisin (K+G)

Kolistimetat Sodyum, gentamisin, meropenem, tigesiklin, trimetoprim/sulfametoksazol ve seftazidim/avibaktam powder'ları ilgili üretici firmalarla iletişime geçilerek temin edilmiştir (Şekil 3.4)



Şekil 3.4: Antibiyotik Powder Örnekleri

3.5.1. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması ve porsiyonlanması amacıyla Dehidrate Katyon Ayarlı (20-25 mg/L Ca^{++} ve 10-12,5 mg/L Mg^{++} içeren) Mueller Hinton Broth (KAMHB) (Oxoid™) üretici firmanın önerisi ile 22 gr tartılarak 1000 ml distile su ile balon joje'de çözdürüldü, balon joje 121 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilerek antibiyotik stok solüsyonlarının

hazırlanması ve porsiyonlanması amacıyla kullanılmak üzere hazır hale getirildi. Hazırlanan besiyeri +4°C’de saklandı.



Şekil 3.5: Katyon İlaveli Mueller Hinton Besiyeri.

3.5.2. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması ve Porsiyonlanması

Çalışmada kullanılmak üzere ulaşılmak istenen konsantrasyonlar belirlendikten sonra bu konsantrasyonu elde etmek için uygun olan çözücü hacimleri hesaplandı. Test edilecek her bir antibiyotik için uygun çözücü firma önerileri doğrultusunda distile su olarak belirlendi. Çözücü hacmini belirlemek için:

Hacim(ml) = Ağırlık (mg) X Potens (µg/mg) / Konsantrasyon (µg/ml) formülü kullanıldı.

Antibiyotik tozları darası alınmış olan steril kaplar kullanılarak hassas terazide tartıldı. Çözücü ile eklenerek homojen oluncaya kadar karıştırıldı.

Stok antibiyotikler ve KAMHB hazırlandıktan sonra plaklarde kullanılacak tüm konsantrasyonlar uygun miktarlarda KAMHB ile seyreltilerek belirlenen MİK’te ikişer kat dilüe olacak şekilde sekiz farklı konsantrasyonda falkon tüplerine porsiyonlandı (Şekil 3.6).

- Kolistin dilüsyon aralığı: 0,5-64 µg/ml
- Seftazidim/avibaktam dilüsyon aralığı: 0,25-32 µg/ml
- Trimetoprim/sülfametoksazol dilüsyon aralığı: 32-4096 µg/ml

- Tigesiklin dilüsyon aralığı: 0,125-16 µg/ml
- Meropenem dilüsyon aralığı: 2-256 µg/ml
- Gentamisin dilüsyon aralığı: 32-4096 µg/ml olarak belirlendi.



Şekil 3.6: Porsiyonlanmış Falkonlar.

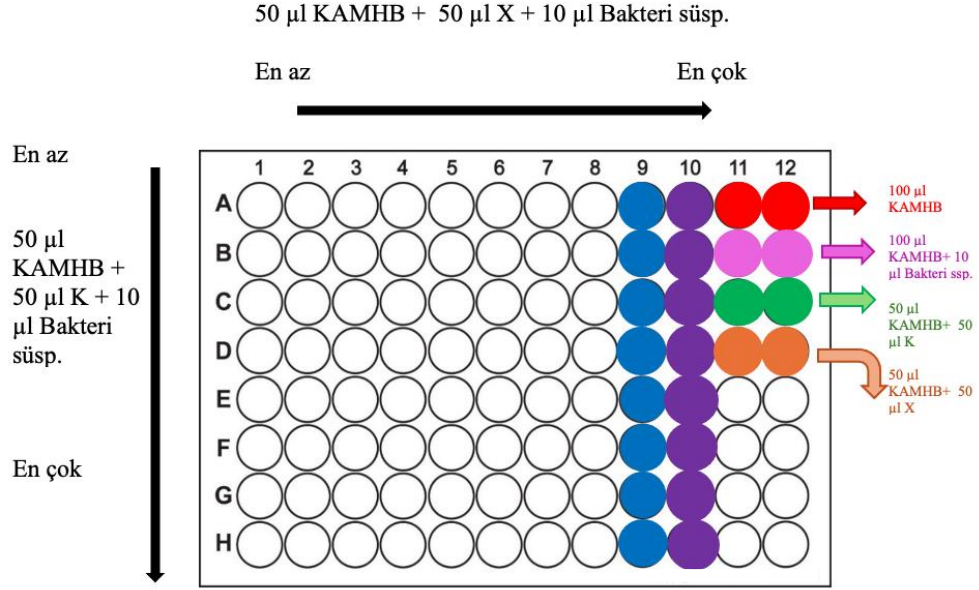
3.5.3. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Test Platelerinin Hazırlanması

Çalışmada her izolata 5 ayrı kombinasyon için 5 ayrı steril steril, 96 (8x12) kuyucuklu ve her kuyucuğun hacmi 0,2 ml olan, U tabanlı, kapaklı standart well plateler (ELISA plateleri) kullanıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: 96 Kuyucuklu U Tabanlı Well Plate Örneği.

- A kuyucuğundan H kuyucuğuna kadar artan konsantrasyonlarda 0,5-64 µg/ml MİK aralığında 50 µl kolistin sodyum, 50 µl KAMHB konuldu.
- 1.Sütundan 8. Sütuna kadar artan konsantrasyonlarda ve belirlenen MİK aralıklarında 50 µl test edilecek diğer antibiyotik, 50 µl KAMHB konuldu. Böylece kombinasyon kuyucuklarına değişen konsantrasyonlarda 50 µl kolistin sodyum, 50 µl kombinasyon antibiyotiği ve 50 µl KAMHB konulmuş oldu.
- 9. Sütuna yukarıdan aşağıya artan konsantrasyonlarda 50 µl kolistin sodyum ve 50 µl KAMHB konularak suşun kolistin duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmesi sağlandı. 10. Sütuna ise yukarıdan aşağıya artan konsantrasyonlarda 50 µl test edilecek diğer antibiyotik ve 50 µl KAMHB konularak suşun bu antibiyotiğe duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmesi sağlandı.
- A11 ve A12'ye sadece 100 µl KAMHB konularak besiyeri sterilite kontrolü, B11 ve B12'ye 100 µl KAMHB ve 10 µl bakteri süspansiyonu eklenerek de üreme kontrolü sağlandı. D11 ve D12'ye 50 µl kolistin sodyum ve 50 µl KAMHB, C11 ve C12'ye ise 50 µl test edilecek diğer antibiyotik ve 50 µl KAMHB konuldu ancak bakteri süspansiyonu eklenmedi. Böylece antibiyotikler kontaminasyon açısından test edildi.
- Seçilen 21 adet suş için bu panel, 8 kanallı pipetler kullanılarak tekrarlandı. 21 izolatın beş farklı antibiyotik kombinasyonunu içeren çalışmada 105 adet plak değerlendirildi.
- Her bir mikroplak kurumayı engellemek için inkübasyon sırasında steril plastik bir kapakla kapatıldı.



Şekil 3.8: K+X kombinasyonu için mikrolate düzeni (µl/dL).

Tablo 3.4: K+S kombinasyonu için mikrolate düzeni (µl/dL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 0,5 + S 0,25	K 0,5 + S 0,5	K 0,5 + S 1	K 0,5 + S 2	K 0,5 + S 4	K 0,5 + S 8	K 0,5 + S 16	K 0,5 + S 32	K 0,5	S 0,25	Besiyeri Sterilite Kontrol	Besiyeri Sterilite Kontrol
B	K 1 + S 0,25	K 1 + S 0,5	K 1 + S 1	K 1 + S 2	K 1 + S 4	K 1 + S 8	K 1 + S 16	K 1 + S 32	K 1	S 0,5	Üreme Kontrol	Üreme Kontrol
C	K 2 + S 0,25	K 2 + S 0,5	K 2 + S 1	K 2 + S 2	K 2 + S 4	K 2 + S 8	K 2 + S 16	K 2 + S 32	K 2	S 1	Kolistin Sterilite Kontrol	Kolistin Sterilite Kontrol
D	K 4 + S 0,25	K 4 + S 0,5	K 4 + S 1	K 4 + S 2	K 4 + S 4	K 4 + S 8	K 4 + S 16	K 4 + S 32	K 4	S 2	Antibiyotik (S) Sterilite Kontrol	Antibiyotik (S) Sterilite Kontrol
E	K 8 + S 0,25	K 8 + S 0,5	K 8 + S 1	K 8 + S 2	K 8 + S 4	K 8 + S 8	K 8 + S 16	K 8 + S 32	K 8	S 4		
F	K 16 + S 0,25	K 16 + S 0,5	K 16 + S 1	K 16 + S 2	K 16 + S 4	K 16 + S 8	K 16 + S 16	K 16 + S 32	K 16	S 8		
G	K 32 + S 0,25	K 32 + S 0,5	K 32 + S 1	K 32 + S 2	K 32 + S 4	K 32 + S 8	K 32 + S 16	K 32 + S 32	K 32	S 16		
H	K 64 + S 0,25	K 64 + S 0,5	K 64 + S 1	K 64 + S 2	K 64 + S 4	K 64 + S 8	K 64 + S 16	K 64 + S 32	K 64	S 32		

K: Kolistin, S: Seftazidim/avibaktam

Tablo 3.5: K+B kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 0,5 + B 32	K 0,5 + B 64	K 0,5 + B 128	K 0,5 + B 256	K 0,5 + B 512	K 0,5 + B 1024	K 0,5 + B 2048	K 0,5 + B 4096			Besiye Sterilite Kontrol	Besiye Sterilite Kontrol
B	K 1 + B 32	K 1 + B 64	K 1 + B 128	K 1 + B 256	K 1 + B 512	K 1 + B 1024	K 1 + B 2048	K 1 + B 4096			Üreme Kontrol	Üreme Kontrol
C	K 2 + B 32	K 2 + B 64	K 2 + B 128	K 2 + B 256	K 2 + B 512	K 2 + B 1024	K 2 + B 2048	K 2 + B 4096			Kolistin Sterilite Kontrol	Kolistin Sterilite Kontrol
D	K 4 + B 32	K 4 + B 64	K 4 + B 128	K 4 + B 256	K 4 + B 512	K 4 + B 1024	K 4 + B 2048	K 4 + B 4096			Antibiyotik (B) Sterilite Kontrol	Antibiyotik (B) Sterilite Kontrol
E	K 8 + B 32	K 8 + B 64	K 8 + B 128	K 8 + B 256	K 8 + B 512	K 8 + B 1024	K 8 + B 2048	K 8 + B 4096				
F	K 16 + B 32	K 16 + B 64	K 16 + B 128	K 16 + B 256	K 16 + B 512	K 16 + B 1024	K 16 + B 2048	K 16 + B 4096				
G	K 32 + B 32	K 32 + B 64	K 32 + B 128	K 32 + B 256	K 32 + B 512	K 32 + B 1024	K 32 + B 2048	K 32 + B 4096				
H	K 64 + B 32	K 64 + B 64	K 64 + B 128	K 64 + B 256	K 64 + B 512	K 64 + B 1024	K 64 + B 2048	K 64 + B 4096				

K: Kolistin, B: Trimetoprim/sülfametoksazol

Tablo 3.6: K+M kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 0,5 + M 2	K 0,5 + M 4	K 0,5 + M 8	K 0,5 + M 16	K 0,5 + M 32	K 0,5 + M 64	K 0,5 + M 128	K 0,5 + M 256			Besiye Sterilite Kontrol	Besiye Sterilite Kontrol
B	K 1 + M 2	K 1 + M 4	K 1 + M 8	K 1 + M 16	K 1 + M 32	K 1 + M 64	K 1 + M 128	K 1 + M 256			Üreme Kontrol	Üreme Kontrol
C	K 2 + M 2	K 2 + M 4	K 2 + M 8	K 2 + M 16	K 2 + M 32	K 2 + M 64	K 2 + M 128	K 2 + M 256			Kolistin Sterilite Kontrol	Kolistin Sterilite Kontrol
D	K 4 + M 2	K 4 + M 4	K 4 + M 8	K 4 + M 16	K 4 + M 32	K 4 + M 64	K 4 + M 128	K 4 + M 256			Antibiyotik (M) Sterilite Kontrol	Antibiyotik (M) Sterilite Kontrol
E	K 8 + M 2	K 8 + M 4	K 8 + M 8	K 8 + M 16	K 8 + M 32	K 8 + M 64	K 8 + M 128	K 8 + M 256				
F	K 16 + M 2	K 16 + M 4	K 16 + M 8	K 16 + M 16	K 16 + M 32	K 16 + M 64	K 16 + M 128	K 16 + M 256				
G	K 32 + M 2	K 32 + M 4	K 32 + M 8	K 32 + M 16	K 32 + M 32	K 32 + M 64	K 32 + M 128	K 32 + M 256				
H	K 64 + M 2	K 64 + M 4	K 64 + M 8	K 64 + M 16	K 64 + M 32	K 64 + M 64	K 64 + M 128	K 64 + M 256				

K: Kolistin, M: Meropenem

Tablo 3.7: K+G kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL)

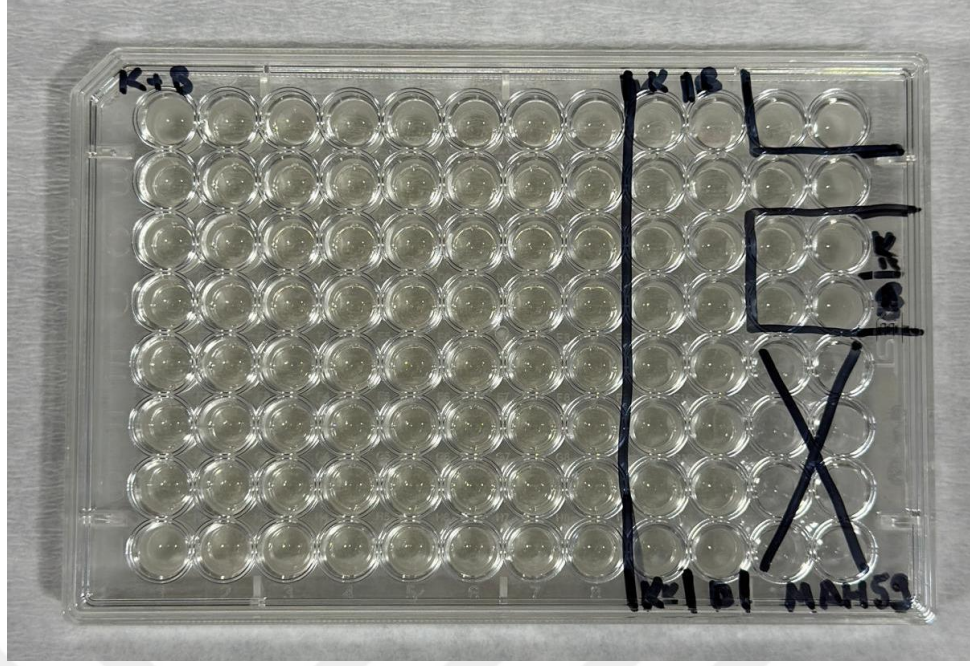
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 0,5 + G 32	K 0,5 + G 64	K 0,5 + G 128	K 0,5 + G 256	K 0,5 + G 512	K 0,5 + G 1024	K 0,5 + G 2048	K 0,5 + G 4096			Besiyeri Sterilite Kontrol	Besiyeri Sterilite Kontrol
B	K 1 + G 32	K 1 + G 64	K 1 + G 128	K 1 + G 256	K 1 + G 512	K 1 + G 1024	K 1 + G 2048	K 1 + G 4096	K 1	G 64	Üreme Kontrol	Üreme Kontrol
C	K 2 + G 32	K 2 + G 64	K 2 + G 128	K 2 + G 256	K 2 + G 512	K 2 + G 1024	K 2 + G 2048	K 2 + G 4096	K 2	G 128	Kolistin Sterilite Kontrol	Kolistin Sterilite Kontrol
D	K 4 + G 32	K 4 + G 64	K 4 + G 128	K 4 + G 256	K 4 + G 512	K 4 + G 1024	K 4 + G 2048	K 4 + G 4096	K 4	G 256	Antibiyotik (G) Sterilite Kontrol	Antibiyotik (G) Sterilite Kontrol
E	K 8 + G 32	K 8 + G 64	K 8 + G 128	K 8 + G 256	K 8 + G 512	K 8 + G 1024	K 8 + G 2048	K 8 + G 4096	K 8	G 512		
F	K 16 + G 32	K 16 + G 64	K 16 + G 128	K 16 + G 256	K 16 + G 512	K 16 + G 1024	K 16 + G 2048	K 16 + G 4096	K 16	G 1024		
G	K 32 + G 32	K 32 + G 64	K 32 + G 128	K 32 + G 256	K 32 + G 512	K 32 + G 1024	K 32 + G 2048	K 32 + G 4096	K 32	G 2048		
H	K 64 + G 32	K 64 + G 64	K 64 + G 128	K 64 + G 256	K 64 + G 512	K 64 + G 1024	K 64 + G 2048	K 64 + G 4096	K 64	G 4096		

K: Kolistin, G: Gentamisin

Tablo 3.8: K+T kombinasyonu için mikropate düzeni (µl/dL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 0,5 + T 0,125	K 0,5 + T 0,25	K 0,5 + T 0,5	K 0,5 + T 1	K 0,5 + T 2	K 0,5 + T 4	K 0,5 + T 8	K 0,5 + T 16			Besiyeri Sterilite Kontrol	Besiyeri Sterilite Kontrol
B	K 1 + T 0,125	K 1 + T 0,25	K 1 + T 0,5	K 1 + T 1	K 1 + T 2	K 1 + T 4	K 1 + T 8	K 1 + T 16	K 1	T 0,25	Üreme Kontrol	Üreme Kontrol
C	K 2 + T 0,125	K 2 + T 0,25	K 2 + T 0,5	K 2 + T 1	K 2 + T 2	K 2 + T 4	K 2 + T 8	K 2 + T 16	K 2	T 0,5	Kolistin Sterilite Kontrol	Kolistin Sterilite Kontrol
D	K 4 + T 0,125	K 4 + T 0,25	K 4 + T 0,5	K 4 + T 1	K 4 + T 2	K 4 + T 4	K 4 + T 8	K 4 + T 16	K 4	T 1	Antibiyotik (T) Sterilite Kontrol	Antibiyotik (T) Sterilite Kontrol
E	K 8 + T 0,125	K 8 + T 0,25	K 8 + T 0,5	K 8 + T 1	K 8 + T 2	K 8 + T 4	K 8 + T 8	K 8 + T 16	K 8	T 2		
F	K 16 + T 0,125	K 16 + T 0,25	K 16 + T 0,5	K 16 + T 1	K 16 + T 2	K 16 + T 4	K 16 + T 8	K 16 + T 16	K 16	T 4		
G	K 32 + T 0,125	K 32 + T 0,25	K 32 + T 0,5	K 32 + T 1	K 32 + T 2	K 32 + T 4	K 32 + T 8	K 32 + T 16	K 32	T 8		
H	K 64 + T 0,125	K 64 + T 0,25	K 64 + T 0,5	K 64 + T 1	K 64 + T 2	K 64 + T 4	K 64 + T 8	K 64 + T 16	K 64	T 16		

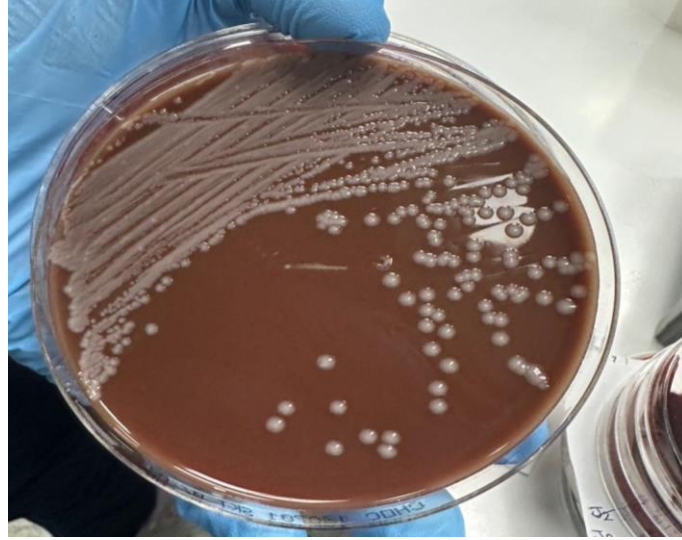
K: Kolistin, T: Tigesiklin



Şekil 3.9: Dama Tahtası Yöntemiyle Çalışılmış Kolistin (K)-TMP/SXT (B) Kombinasyon Örneği

3.5.4. Bakteri İnokulumu Hazırlanması

Derin dondurucudan (-80°C) çıkarılan *K. pneumoniae* izolatlarının oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra %5 koyun kanlı agar besiyerlerine 0,001 ml kalibreli steril öze ile örnek alınarak tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapıldı. Aerobik ortamda, normal atmosferde 37°C de 18-20 saat inkübe edildi. Taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen uygun bakteri kolonilerinden 3-5 adet steril pamuklu eküvyon çubuğu ile alınıp steril %0.9 NaCl solüsyonunda, 0.5 McFarland (10^8 CFU/mL) değerinde standart bakteri yoğunluğunda süspanse edildi. Bu süspansiyondan SF ile 1/20-1/30 oranında dilüsyon yapılarak son konsantrasyon 5×10^6 cfu/ml olacak şekilde ayarlandı. Süspansiyonun 15 dakika içinde plaklara inokülasyonu yapıldı. Üreme kontrol ve sterilite kontrol kuyucukları hariç tüm kuyucuklara bu süspansiyondan 10 μl eklendi. Ekim yapılan plaklar $18-24$ saat $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de ve aerop ortamda inkübe edildi.



Şekil 3.10: *Klebsiella pneumoniae* %5 KKA Besiyerindeki Taze Kültürü

3.5.5. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Test Sonuçları Değerlendirilmesi

İki farklı araştırmacı tarafından, 16-20 saat 35-37°C’de inkübasyondan sonra plaklar değerlendirildi. Değerlendirmeler göz ile yapıldıktan sonra Cytation Imaging Multi Mode Reader 5 (BioTek, USA) cihazı ile de yapılarak kantitatif sonuçlar alınması sağlandı.

		0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	K	X			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	K+S
0,5	A	+	+	+	+	ADD	-	-	-	+	+	-	-	NC (BESİYERİ)
1	B	+	+	SIN	SIN	-	-	-	-	+	+	+	+	PK (BESİYERİ+BAKTERİ)
2	C	+	+	SIN	-	-	-	-	-	+	+	-	-	K, ANTİBİYOTİK KONTROL
4	D	+	+	ADD	-	-	-	-	-	+	+	-	-	X, ANTİBİYOTİK KONTROL
8	E	IND	IND	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
16	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
64	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		32	64	128	256	512	1024	2048	4096					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	K+B
0,5	A	+	+	+	+	+	+	+	IND	+	+	-	-	800
1	B	+	+	+	+	+	+	+	IND	+	+	+	+	800
2	C	+	+	+	+	+	+	+	IND	+	+	-	-	800
4	D	+	+	+	+	+	+	+	IND	+	+	-	-	800
8	E	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND	-	-	+	-	-	800
16	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	800
32	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	800
64	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	800
		2	4	8	16	32	64	128	256					

Şekil 3.11: Cytation Imaging Multi Mode Reader 5 (Biotek, USA) Sonuç Örnekleri.

İlk olarak üreme ve sterilitte kuyucukları değerlendirilerek kayıt altına alındı. Daha sonra plaklarda kolistin ve kombinasyon antibiyotiğin tek başlarına MİK değerleri belirlendi. Mikroplaklarda üreme olmayan tüm kuyucuklar incelenip

kaydedildi. Üreme olmayan kuyucuklardaki antibiyotiklerin kombinasyondaki etkileşimlerini incelemek için Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) ve Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksi (FİKİ) hesaplandı. Mikroplak incelemesinde en düşük FİKİ hesaplanarak, antibiyotiklerin birbiri ile etkileşimleri belirlenerek kayıt edildi [179].

Örneğin; Kolistin X ilacı ile kombinasyonu:

FİK (Kolistin) = Kombinasyondaki Kolistin MİK değeri / Tek başına Kolistin MİK değeri

FİK (X ilacı) = Kombinasyondaki X ilacı MİK değeri / Tek başına X ilacı MİK değeri

FİKİ (Fractional inhibitory concentration index) = FİK (Kolistin) + FİK (X ilacı)

Sonuçlar sinerjik, additif, indifferan, antagonist olarak değerlendirildi [175]:

Σ FİK indeksi $\leq 0,5$: sinerji

Σ FİK indeksi $>0,5$ ve ≤ 1 : additif

Σ FİK indeksi >1 ve $4 \leq$: indiferan (etkisiz)

Σ FİK indeksi >4 : antagonizma

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki nicel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistiksel ortalama, standart sapma, medyan, 1. ve 3. Çeyreklikler olarak, nitel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro wilk testi ile değerlendirilmiştir. Grupların FİKİ ortalamaları bakımından karşılaştırmasında Kruskal Wallis testinden, ikili karşılaştırmalarda Dunn testinden yararlanılmıştır. Nitel değişkenler arasındaki ilişkilerin değerlendirilemesinde Fisher Freeman Halton testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak alınmış olup hesaplamalarda SPSS (Statistical Package for the Social Sciences -Version 28) paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

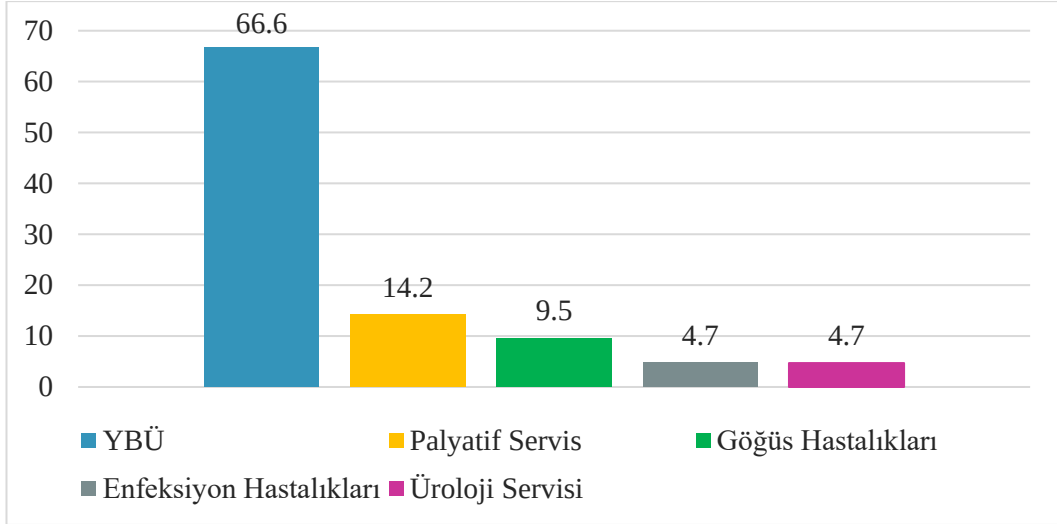
4.1. Klinik İzolatların Özellikleri

Ocak 2021 ile Ocak 2024 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve *K. pneumoniae* olarak tanımlanan 60 adet suş değerlendirildi. VITEK 2® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) otomatize sistemiyle karbapenem, sefalosporin, aminoglikozid, florokinolon, trimetoprim/sulfametoksazol, piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerine ve Broth mikrodilüsyon testi ile de kolistine dirençli olduğu tespit edilen 21 adet *K. pneumoniae* suşu çalışmaya dahil edildi.

Dahil edilen izolatlarda öncelikle karbapenemaz aktivitesinden sorumlu majör genler (OXA-48, NDM ve KPC) konvansiyonel PZR tekniği ile belirlendi. Daha sonra kolistimetat sodyum ile seftazidim/avibaktam, trimetoprim/sülfametoksazol, tigesiklin, meropenem ve gentamisin kombinasyonları arasındaki etkileşimler in vitro olarak checkerboard (dama tahtası) sinerji testi yöntemi ile değerlendirildi.

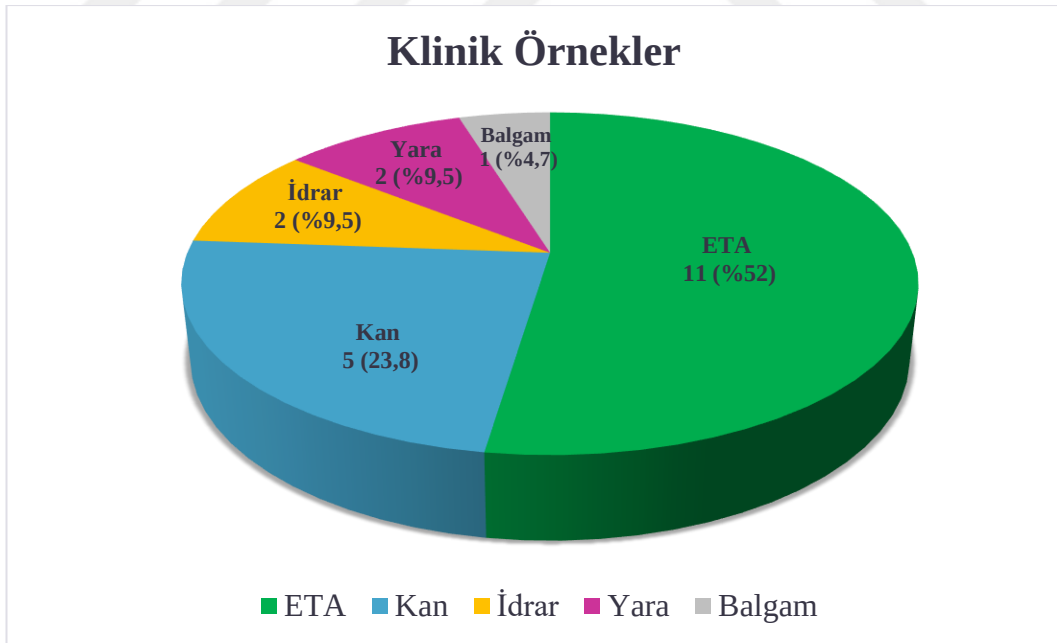
Çalışmaya dahil edilen 21 klinik izolatın tamamı erişkin hasta grubundan (18 yaş üzeri) olup 11'inin (% 52,3) erkek, 10'unun (%47,6) kadın hastadan izole edildiği tespit edildi. Hastaların yaş ortalaması $75,6 \pm 14,4$ (yıl) olarak hesaplandı.

Örneklerin alındığı tarihte hastaların bulundukları klinikler değerlendirildiğinde sırasıyla 14'ünün (% 66,6) Yoğun Bakım Ünitesinde, 3'ünün (%14,2) Palyatif Serviste, 2'sinin Göğüs Hastalıkları Servisinde (%9,5), 1'inin Enfeksiyon Hastalıkları Servisinde (%4,7) ve 1'inin de (%4,7) Üroloji Servisinde yatmakta olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Çalışmaya Dahil Edilen İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı (n=21)

İzolatların 11'inin (%52,3) derin trakeal aspirat, 5'inin (%23,8) kan, 2'sinin (%9,5) idrar, 2'sinin (%9,5) yara ve 1'inin de balgam (%4,7) örneğinden izole edildiği saptandı (Şekil 4.2).



ETA: Endotrakeal aspirat

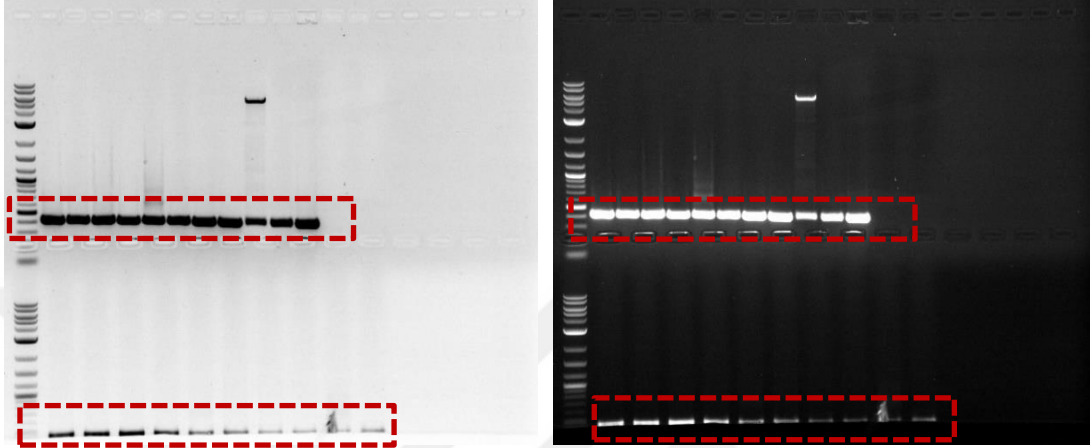
Şekil 4.2: Çalışmaya Dahil Edilen İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı (n=21)

Tablo 4.1: Çalışmaya Dahil Edilen İzolatların Genel Özellikleri

Suş no.	Bölüm	Klinik Materyal	Tarih
Kp1	Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	30/09/2022
Kp4	Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal Aspirat	23/09/2022
Kp5	Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	21/09/2022
Kp9	Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal Aspirat	07/04/2023
Kp14	Göğüs Hastalıkları Servisi	Trakeal Aspirat	14/12/2022
Kp22	Palyatif Servis	Trakeal Aspirat	28/03/2023
Kp36	Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal Aspirat	07/06/2022
Kp39	Göğüs Hastalıkları Servisi	Trakeal Aspirat	03/05/2022
Kp41	Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	01/04/2022
Kp44	Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	20/03/2022
Kp47	Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	17/12/2021
Kp49	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	Balgam	20/11/2023
Kp51	Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal Aspirat	18/12/2023
Kp53	Palyatif Servis	Yara	18/12/2023
Kp54	Üroloji Servis	İdrar	02/01/2024
Kp55	Palyatif Servis	İdrar	11/01/2024
Kp56	Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal Aspirat	01/01/2024
Kp57	Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal Aspirat	08/01/2024
Kp58	Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal Aspirat	07/01/2024
Kp59	Yoğun Bakım Ünitesi	Yara	11/01/2024
Kp60	Yoğun Bakım Ünitesi	Trakeal Aspirat	15/01/2024

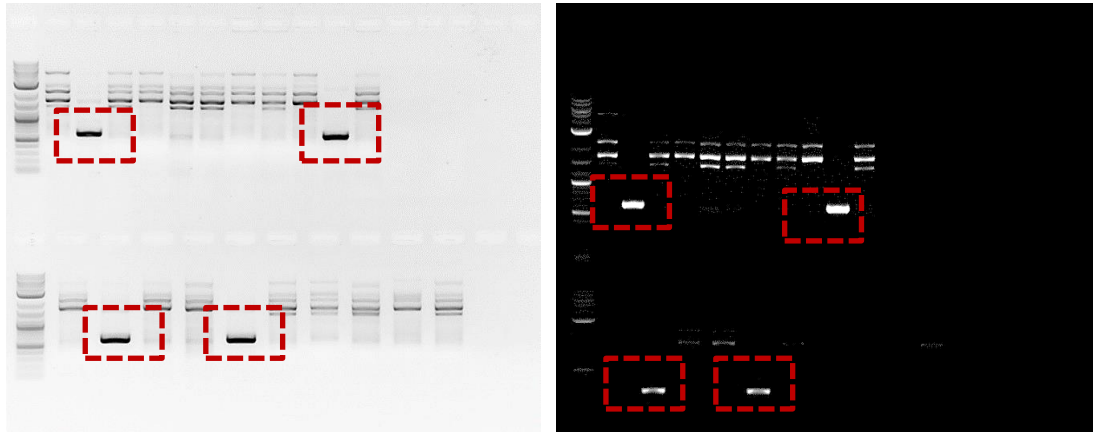
4.2. OXA-48, KPC ve NDM Genlerinin PZR ile Araştırılması

21 *K. pneumoniae* izolatında *blaOXA48* genine uyumlu primer çiftleri kullanılarak yapılan konvansiyonel PZR sonucunda tüm *K. pneumoniae* izolatlarında (%100) *blaOXA-48* genine ait 400-500 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: *blaOXA-48* Geninin UV Işığı Altında Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.

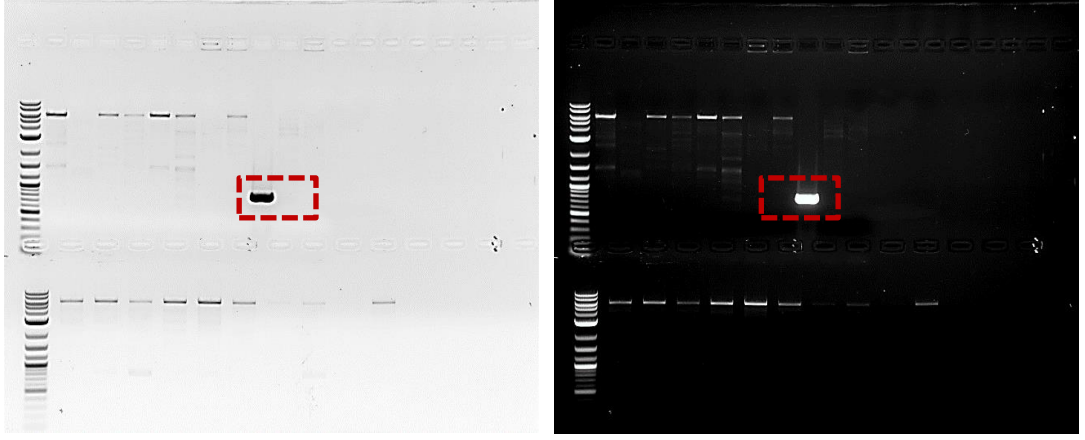
21 *K. pneumoniae* izolatında *blaNDM* genine uyumlu primer çiftleri kullanılarak yapılan konvansiyonel PZR sonucunda 4 adet (%19) *K. pneumoniae* izolatında (Kp4, Kp44, Kp51 ve Kp55) *blaNDM* genine ait 500-1000 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edildi (Şekil 4.4)



Şekil 4.4: *blaNDM* Geninin UV Işığı Altında Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.

21 *K. pneumoniae* izolatında *blaKPC* genine uyumlu primer çiftleri kullanılarak yapılan konvansiyonel PZR sonucunda 1 adet (%4,7) *K. pneumoniae*

izolatında (Kp41) *blaKPC* genine ait 500-1000 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edildi (Şekil 4.5).



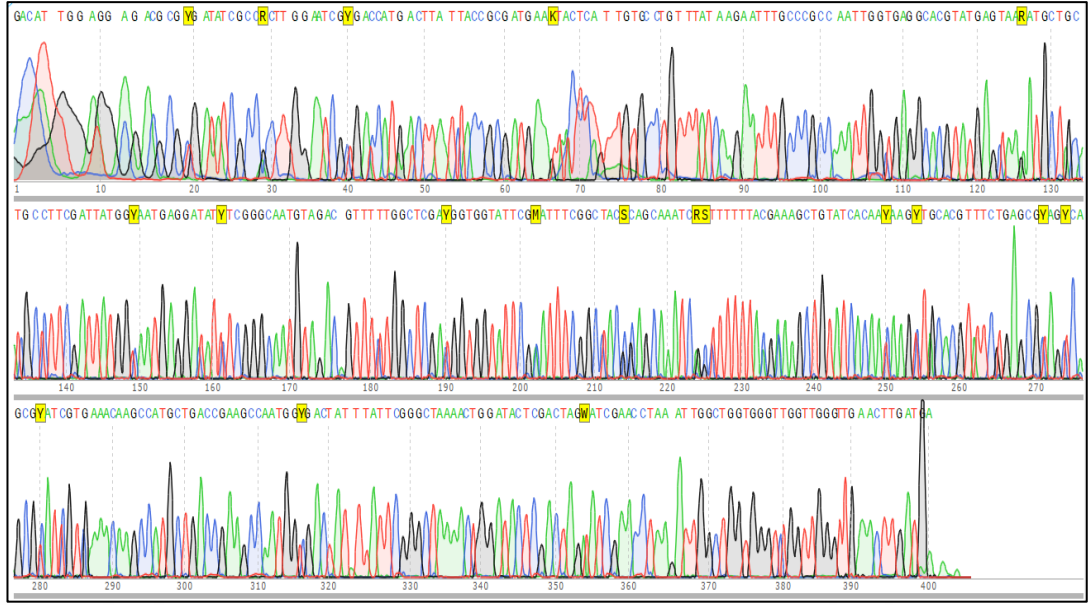
Şekil 4.5: *blaKPC* Geninin UV Işığı Altında Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.

Son olarak pozitif olarak değerlendirilen bantlardan birkaç örnek seçilerek DNA dizi analizleri gerçekleştirildi. PZR'nın doğruluğu tespit edilmesi amacıyla PZR bant pürifikasyonu yapıldı. Temizlenen örnekler, Sanger Sekanslamasına gönderildi. Elde edilen veriler SnapGeneViewer ile görüntülendi. NCBI-BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) arama aracı ile homoloji ve alignment (hizalama) bakılarak biyolojik diziler arasındaki benzerlik bölgeleri veri tabanlarıyla karşılaştırıldı.

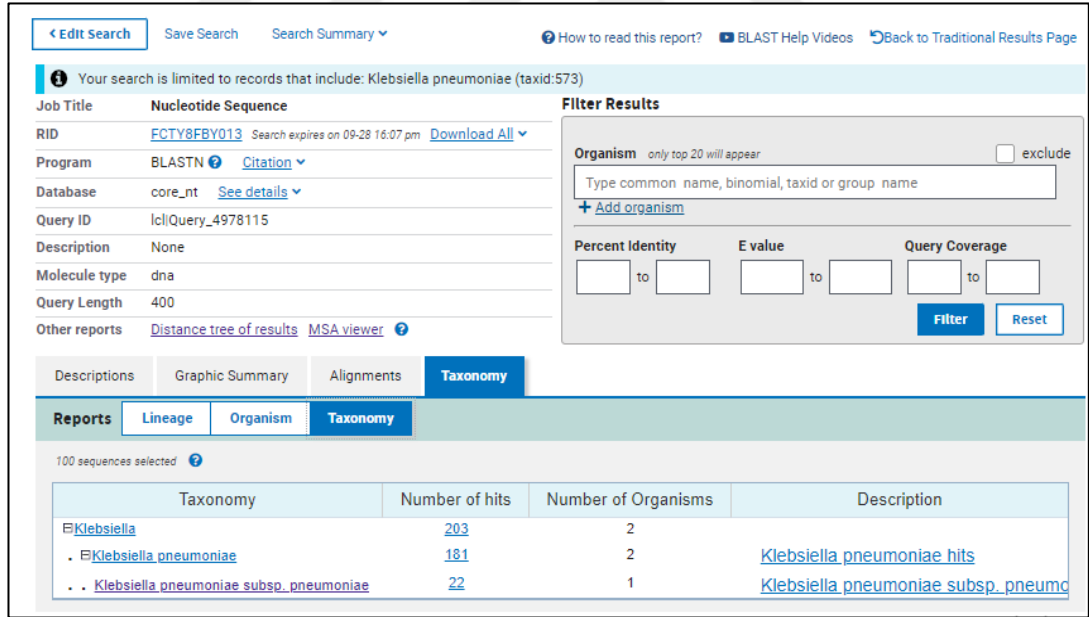
4.2.1. *blaOXA-48*, *blaKPC* ve *blaNDM* Genlerinin PZR Sonuçlarının Sekans Karşılaştırması

```
GACATTGGAGGAGACGCGYGATATCGCCRCCTTGGAATCGYGACCATGACTTATTACC
GCGATGAAKTACTCATTGTGCCTGTTTATAAGAATTTGCCCGCCAATTGGTGAGGCAC
GTATGAGTAARATGCTGCTGCCTTCGATTATGGYAATGAGGATATYTCGGGCAATGTA
GACGTTTTTTGGCTCGAYGGTGGTATTCGMATTTTCGGCTACSCAGCAAATCRSTTTTTT
ACGAAAGCTGTATCACAAYAAGYTGCACGTTTCTGAGCGYAGYCAGCGYATCGTGA
AACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGYGACTATTTATTCGGGCTAAAACTGGATA
CTCGACTAGWATCGAACCTAAATTGGCTGGTGGGTTGGTTGGGTTGAACTTGATGA
```

Şekil 4.6: OXA-48 Geni Baz Dizilimi.



Şekil 4.7: OXA-48 Dizi Analizi Sonucu Oluşan Grafiklerin SnapGene Viewer Yazılımı ile Görüntülenmesi.



Şekil 4.8: OXA-48 Sanger Sekanslama Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması.

Job Title Nucleotide Sequence

RID [FCTY8FBY013](#) Search expires on 09-28 16:07 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database core_nt [See details](#)

Query ID lclQuery_4978115

Description None

Molecule type dna

Query Length 400

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) Show

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Klebsiella pneumoniae strain P3_O1 plasmid pP3_O1, complete sequence	Klebsiella pneu...	595	595	97%	1e-188	92.44%	87585	MT635909.1
Klebsiella pneumoniae strain ARTLOXA2_OXA-48 family class D beta-lactamase (blaOXA) gene, partial cds	Klebsiella pneu...	595	595	97%	1e-188	92.44%	647	OM368082.1
Klebsiella pneumoniae strain R1M1_C018199 plasmid pR1M1_C018199_5, complete sequence	Klebsiella pneu...	595	595	97%	1e-188	92.44%	6141	CP068846.1
Klebsiella pneumoniae strain 07B20CPO011 plasmid p07B20011_D_OXA, complete sequence	Klebsiella pneu...	595	595	97%	1e-188	92.44%	6141	FP320270.1
Klebsiella pneumoniae strain 03A20CPO001A plasmid p03A20001A_C_OXA, complete sequence	Klebsiella pneu...	595	595	97%	1e-188	92.44%	6141	FP320257.1
Klebsiella pneumoniae strain R1M1_C019888 plasmid pR1M1_C019888_3, complete sequence	Klebsiella pneu...	595	595	97%	1e-188	92.44%	50402	CP088958.1
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain FF28-002PS2 plasmid ColKp3-IncX3, complete sequence	Klebsiella pneu...	595	595	97%	1e-188	92.44%	52824	CP138787.1
Klebsiella pneumoniae strain 11A17CRGN003A plasmid p11A17003A_D_OXA, complete sequence	Klebsiella pneu...	595	595	97%	1e-188	92.44%	6141	FP320280.1

Şekil 4.9: OXA-48 Sanger Sekanslama Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması.

Klebsiella pneumoniae strain ARTLOXA2_OXA-48 family class D beta-lactamase (blaOXA) gene, partial cds

Sequence ID: [OM368082.1](#) Length: 647 Number of Matches: 1

Range 1: 206 to 602 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
595 bits(322)	1e-168	367/397(92%)	8/397(2%)	Plus/Plus
Query 12	AGACGCGATATCGCCCTTGAATCGYGACCATGACTT-ATTACCGCATGAAGTACT	70		
Sbjct 206	AGACGCGTATATCGCCGCTTGAATCGTGACCATGACTTAATTACCGCATGAAGTACT	265		
Query 71	CA-TTGTGCTGTTTAT-AAGAAATTTGCCCGCC-AATTGGTGAGGCACGTATGAGTAARA	127		
Sbjct 266	CAGTTGTGCTGTTTATCAAGAAATTTGCCCGCCAAATTTGGTGAGGCACGTATGAGTAAAA	325		
Query 128	TGCTGC-TGCCCTTCGATTATGGYAATGAGGATATYTCGGGCAATGTAGAC-GTTTTTGGC	185		
Sbjct 326	TGCTGCACGCTTCGATTATGGCAATGAGGATATCTCGGGCAATGTAGACAGTTTTTGGC	385		
Query 186	TCGAYGGTGGTATTTCGATTTCGGCTACSCAGCAAATCRSTTTTTTACGAAAGCTGTATC	245		
Sbjct 386	TCGATGGTGGTATTTCGATTTCGGCTACCCAGCAAATCGCTTTTTTACGCAAGCTGTATC	445		
Query 246	ACAAYAAGYTGCACGTTTCTGAGCGYAGYACGCGYATCGTGAAACAAGCCATGCTGACCG	305		
Sbjct 446	ACAACAAGCTGCACGTTTCTGAGCGTAGTCAGCGCATCGTGAAACAAGCCATGCTGACCG	505		
Query 306	AAGCCAATGGYGACTAT-TTATTTCGGGCTAAAACTGGATATCGACTAGWATCGAACCTA	364		
Sbjct 506	AAGCCAATGGCGACTATATTATTTCGGGCTAAAACTGGGATATCGACTAGTATCGAACCTA	565		
Query 365	A-ATTGGCTGGTGGGTTGGTTGGGTTGAACCTTGATGA	400		
Sbjct 566	AGATTGGCTGGTGGGTTGGTTGGGTTGAACCTTGATGA	602		

Şekil 4.10: OXA-48 Baz Dizilimi Eşleştirilmesi (Alignment).

AGCWGTAKTCTGGCAGCACACTTCCTATCTCGACATGCCGGGTTTCGGGGCAGTCGCT
TCCAACGGTTTGWTCGTCAGGGATGGCGGCCGCGTGCTGGTGGTCGATACCGCCTGGA
CCGATGACCAGACCGCCCAGATCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCGGT
CGCGCTGGCGGTGGTGACTCACGCGCATCAGGACAAGATGGGCGGTATGGACGCGCT
GCATGCGGCGGGGATTGCGACTTATGCCAATGCGTTGTGGAACCAGCTTGCCCCGCAA
GAGGGGATGGTTGCGGCGCAACACAGCCTGACTTTCGCCGCCAATGGCTGGGTGCAA
CCAGCAACCGCGCCCAACTTTGGCCCGCTCAAGGTATTTTACCCCGGCCCGGCCACA
CCAGTGACAATATACCGTTGGGATCGACGGCACCGACATCGCTTTTGGTGGCTGCCTG
ATCAAGGACAGCAAGGCCAAGTCGCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCAC
TACGCCGCGTCAGCGCGCGCTTTGGTGCGGCGTTCCCCAAGGCCAGCATGATCGTGA

Şekil 4.11: NDM Geni Baz Dizilimi.



Şekil 4.12: Dizi Analizi Sonucu Oluşan Grafiklerin SnapGene Viewer Yazılımı ile Görüntülenmesi.

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Information Your search is limited to records that include: *Klebsiella pneumoniae* (taxid:573)

Job Title Nucleotide Sequence

RID [FCUHREAT016](#) Search expires on 09-28 16:17 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database core_nt [See details](#)

Query ID lclQuery_6664895

Description None

Molecule type dna

Query Length 593

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions **Graphic Summary** **Alignments** **Taxonomy**

Reports **Lineage** **Organism** **Taxonomy**

100 sequences selected

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
☐ Klebsiella	131	2	
☐ Klebsiella pneumoniae	120	2	Klebsiella pneumoniae hits
☐ Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae	11	1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumo

Şekil 4.13: NDM Sanger Sekanslama Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması.

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Information Your search is limited to records that include: *Klebsiella pneumoniae* (taxid:573)

Job Title Nucleotide Sequence

RID [FCUHREAT016](#) Search expires on 09-28 16:17 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database core_nt [See details](#)

Query ID lclQuery_6664895

Description None

Molecule type dna

Query Length 593

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions **Graphic Summary** **Alignments** **Taxonomy**

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100 [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Klebsiella pneumoniae strain K2-R2 plasmid New Delhi metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM1) gene, blaNDM1	Klebsiella pneu...	1066	1066	97%	0.0	99.66%	581	MH818328.1
☒ Klebsiella pneumoniae strain St-2 NDM family beta-lactamase (blaNDM1) gene, partial cds	Klebsiella pneu...	1064	1064	98%	0.0	99.49%	611	QP596917.1
☒ Klebsiella pneumoniae HA6 blaNDM1 gene for metallo-beta-lactamase NDM, partial cds	Klebsiella pneu...	1064	1064	98%	0.0	99.49%	599	LC512054.1

Şekil 4.14: NDM Sanger Sekanslama Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması.

Klebsiella pneumoniae strain K2-R2 plasmid New Delhi metallo-beta-lactamase NDM-1 (blaNDM) gene, blaNDM-1 allele, partial cds
Sequence ID: [MH818328.1](#) Length: 581 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 581 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1066 bits(577)	0.0	579/581(99%)	0/581(0%)	Plus/Plus
Query 12	GGCAGCACACTTCCTATCTCGACATGCCGGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGGTTTGW	71		
Sbjct 1	GGCAGCACACTTCCTATCTCGACATGCCGGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGGTTTGA	60		
Query 72	TCGTCAAGGATGGCGCCGCGTGGTGGTGCATACCGCTGGACGATGACGACCG	131		
Sbjct 61	TCGTCAAGGATGGCGCCGCGTGGTGGTGCATACCGCTGGACGATGACGACCG	120		
Query 132	CCCAGATCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCGGTCGCGCTGGCGGTGGTGA	191		
Sbjct 121	CCCAGATCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCGGTCGCGCTGGCGGTGGTGA	180		
Query 192	CTCACGCGCATCAGGACAAGATGGGCGGTATGGACGCGTGCATGCCGGCGGGATTGCGA	251		
Sbjct 181	CTCACGCGCATCAGGACAAGATGGGCGGTATGGACGCGTGCATGCCGGCGGGATTGCGA	240		
Query 252	CTTATGCCAATGCGTTGTGGAACAGCTTGCCCCGAAGAGGGGATGGTTGCGGCGCAAC	311		
Sbjct 241	CTTATGCCAATGCGTTGTGGAACAGCTTGCCCCGAAGAGGGGATGGTTGCGGCGCAAC	300		
Query 312	ACAGCCTGACTTTCGCCGCAATGGCTGGTGCAGCAACCCGCCCAACTTTGGCC	371		
Sbjct 301	ACAGCCTGACTTTCGCCGCAATGGCTGGTGCAGCAACCCGCCCAACTTTGGCC	360		
Query 372	CGCTCAAGGTATTTACCCCGGCCCGGCACACAGTGACAATATCACGTTGGGATCG	431		
Sbjct 361	CGCTCAAGGTATTTACCCCGGCCCGGCACACAGTGACAATATCACGTTGGGATCG	420		
Query 432	ACGGCACCGACATCGCTTTGGTGGTGCCTGATCAAGGACAGCAAGGCCAAGTCGCTCG	491		
Sbjct 421	ACGGCACCGACATCGCTTTGGTGGTGCCTGATCAAGGACAGCAAGGCCAAGTCGCTCG	480		
Query 492	GCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTACGCCGCTGAGCGCGCGTTTGGTGCGG	551		
Sbjct 481	GCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTACGCCGCTGAGCGCGCGTTTGGTGCGG	540		
Query 552	CGTCCCCCAAGGCCAGCATGATCGTGATGAGCCATTCCGA	592		
Sbjct 541	CGTCCCCCAAGGCCAGCATGATCGTGATGAGCCATTCCGA	581		

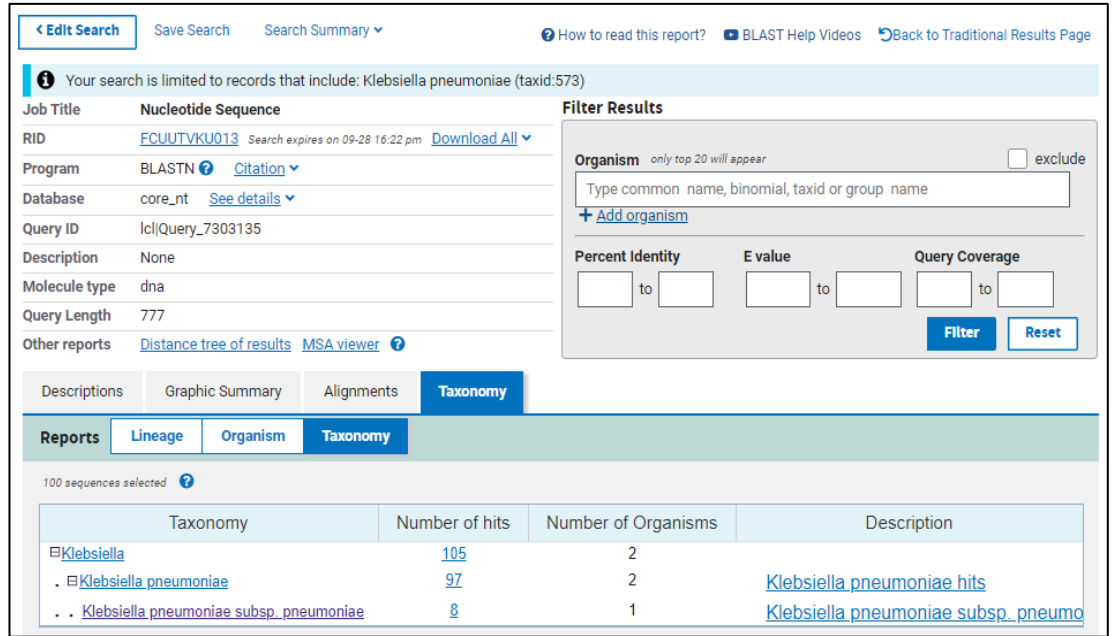
Şekil 4.15: NDM Baz Dizilimi Eşleştirilmesi (Alignment).

GGKKCKGCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCATTCGCT
AAACTCGAACAGGMYTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTCAG
GCGCAACTGTAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCCTGTGCAGCTCATTCAAGGG
CTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCMGCAGCAGGCCGGCTTGCTGGACACA
CCMTCCGTTACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCACCCATCTCGGAAAAATATCT
GACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCGCCGTGCAATACAGTGATAAC
GCCGCCSCCMATTTGTTGCTGAAGGAGTTGGGCGGCCCGGCCGGGCTGACGGCCTTCA
TGCGCTCTATCGGCGATACCAGTTCCGTCTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTC
CGCCATCCCAGGCGATGCGCGCGATACCTCATCGCCGCGCGCCGTGACGGAAAGCTTA
CAAAAAGTGAACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGAGCGGCAGCAGTTTGTGATT
GGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGGCGGTGCCGGCAGACT
GGGCAGTCGGAGACAAAACCGGAACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAAATGACTATG
CCGTCTGCTGGCCCACTGGGCGCGCACCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCCGGGCGCCT
AAAGGGRRRAWKRRRAMAAARGAA

Şekil 4.16: KPC Geni Baz Dizilimi.



Şekil 4.17: KPC Dizi Analizi Sonucu Oluşan Grafiklerin SnapGene Viewer Yazılımı ile Görüntülenmesi.



Şekil 4.18: KPC Sanger Sekanslama Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması.

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Your search is limited to records that include: *Klebsiella pneumoniae* (taxid:573)

Job Title Nucleotide Sequence

RID [FCUUTVKU013](#) Search expires on 09-28 16:22 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database core_nt [See details](#)

Query ID lcl|Query_7303135

Description None

Molecule type dna

Query Length 777

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100 [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Klebsiella pneumoniae strain KP_NORM_BLD_2012_85408_plasmid pKPNB_2012_85408.3, complete sequ...	Klebsiella pneu...	1358	1358	96%	0.0	99.07%	10974	CP154080.1
☒	Klebsiella pneumoniae strain K235_plasmid pK235_KPC, complete sequence	Klebsiella pneu...	1358	1358	96%	0.0	99.07%	120730	MK312248.1
☒	Klebsiella pneumoniae strain R1VM_C015451 plasmid pR1VM_C015451.1	Klebsiella pneu...	1358	1358	96%	0.0	99.07%	114360	MT580078.1

Şekil 4.19: KPC Sanger Sekanslama Sonuçlarının BLASTn ile Doğrulanması.

Klebsiella pneumoniae strain K235 plasmid pK235_KPC, complete sequence
Sequence ID: [MK312248.1](#) Length: 120730 Number of Matches: 1

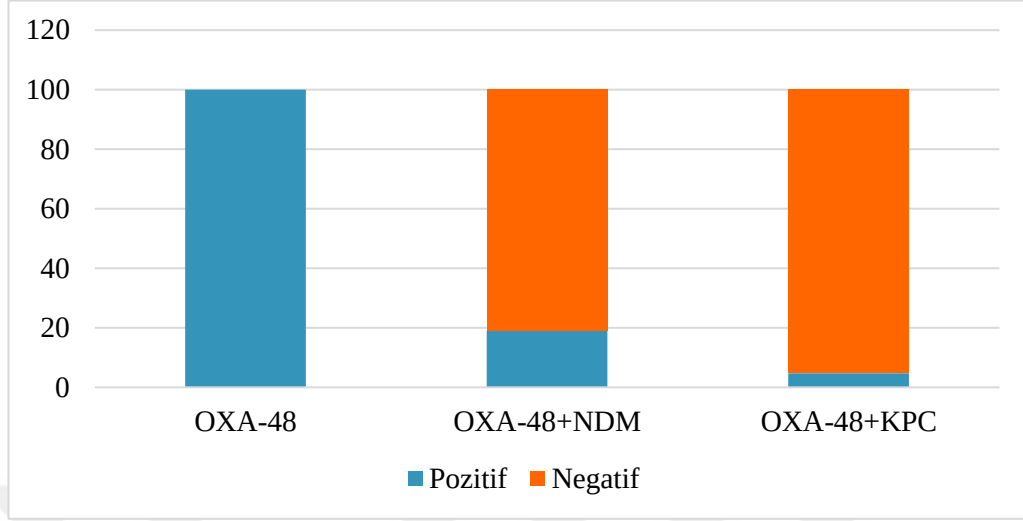
Range 1: 51882 to 52630 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1358 bits (735)	0.0	742/749 (99%)	0/749 (0%)	Plus/Plus
Query 8	GCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCAATTCGCTAAACTCGAA	67		
Sbjct 51882	GCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCAATTCGCTAAACTCGAA	51941		
Query 68	CAGGMYTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTCAGGCGCAACTGTA	127		
Sbjct 51942	CAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTCAGGCGCAACTGTA	52001		
Query 128	AGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCACTGTGCAGCTCATTCAAGGGCTTTCTTGCTGCC	187		
Sbjct 52002	AGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCACTGTGCAGCTCATTCAAGGGCTTTCTTGCTGCC	52061		
Query 188	GCTGTGCTGGCTCGCAGCCMGAGCAGGCCGGCTTGTGTGGACACACCCMTCCGTTACGGC	247		
Sbjct 52062	GCTGTGCTGGCTCGCAGCCMGAGCAGGCCGGCTTGTGTGGACACACCCMTCCGTTACGGC	52121		
Query 248	AAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCACCCATCTCGGAAAAATATCTGACAAACAGGCATGACG	307		
Sbjct 52122	AAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCACCCATCTCGGAAAAATATCTGACAAACAGGCATGACG	52181		
Query 308	GTGGCGGAGCTGTCCGCGGCGCGCTGCAATACAGTGATAACGCCGCCSCCMATTTGTTG	367		
Sbjct 52182	GTGGCGGAGCTGTCCGCGGCGCGCTGCAATACAGTGATAACGCCGCCSCCMATTTGTTG	52241		
Query 368	CTGAAGGAGTTGGGCGGCGCGGCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACC	427		
Sbjct 52242	CTGAAGGAGTTGGGCGGCGCGGCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACC	52301		
Query 428	ACGTTCCGTCTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAAGCTCCGCCATCCAGGCGATGCGCGC	487		
Sbjct 52302	ACGTTCCGTCTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAAGCTCCGCCATCCAGGCGATGCGCGC	52361		
Query 488	GATACCTCATCGCCGCGCGCGTACGGAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCA	547		
Sbjct 52362	GATACCTCATCGCCGCGCGCGTACGGAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCA	52421		
Query 548	CTGGCTGCGCCGAGCGGCGAGCTTTGTTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAAC	607		
Sbjct 52422	CTGGCTGCGCCGAGCGGCGAGCTTTGTTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAAC	52481		
Query 608	CACCGCATCCGCGCGGCGGTGCCGGCAGACTGGGCACTCGGAGACAAAAACGGAACTGC	667		
Sbjct 52482	CACCGCATCCGCGCGGCGGTGCCGGCAGACTGGGCACTCGGAGACAAAAACGGAACTGC	52541		

Şekil 4.20: KPC Baz Dizilimi Eşleştirilmesi (Alignment).

Sonuçlar değerlendirildiğinde sisteme girilen türler ile benzerlik görülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda kullanılan 21 izolatın direnç genlerinin dağılımı şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.21: *K. pneumoniae* İzolatlarında Direnç Genlerinin Dağılımı.

4.3. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 21 adet kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşuna karşı kolistin kolistimetat sodyum ile seftazidim/avibaktam, trimetoprim/sülfametoksazol, tigesiklin, meropenem ve gentamisin antibiyotikleri arasındaki kombinasyonlarda antibiyotiklerin tek başlarına MİK değerleri, kombinasyon içerisindeki MİK değerleri, FİK indeksleri (FİKİ) ve in vitro etkileşimin sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir. Örnek olarak 56 nolu suşun kolistin ve kombinasyon antibiyotiğine ait mikropalak görünümü, dama tahtası testinin değerlendirilmesi, MİK($\mu\text{g/ml}$), FİK, kombinasyonun $\Sigma\text{FİK}$ sonuçları ve yorumu ayrıca gösterilmiştir.

4.3.1. Kolistin ile Seftazidim/Avibaktam Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları

K. pneumoniae izolatlarında kolistin ve seftazidim-avibaktam dama tahtası yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntem ile kombine edilen antibiyotiklerin MİK değerleri, elde edilen MİK değerlerine göre FİK değerleri ve FİK indeksi değerleri hesaplandı. Yorumlama yapılırken üreme olmayan ve en düşük FİKİ'ye sahip olan kuyucuk göz önüne alındı.



Şekil 4.22: 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Seftazidim-avibaktam Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü.

Tablo 4.2: 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					IND				K 0,5	S 0,25	BK	BK
B					IND				K 1	S 0,5	ÜK	ÜK
C					IND				K 2	S 1	AK	AK
D				ADD					K 4	S 2	AK	AK
E				ADD					K 8	S 4		
F			SIN						K 16	S 8		
G				ADD					K 32	S 16		
H	IND	IND	IND						K 64	S 32		

(Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucukları, boyanmamış kuyucuklar üreme olmayan kuyucukları göstermektedir. K: Kolistin S: Seftazidim-avibaktam ÜK: üreme kontrol kuyucuğu, BK: besiyeri kontrol kuyucuğu, AK: antibiyotik kontrol kuyucuğu, ADD: additif, IND: İndiferans, SIN: Sinerji)

Tablo 4.3: Kolistin ve Seftazidim-avibaktam MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.

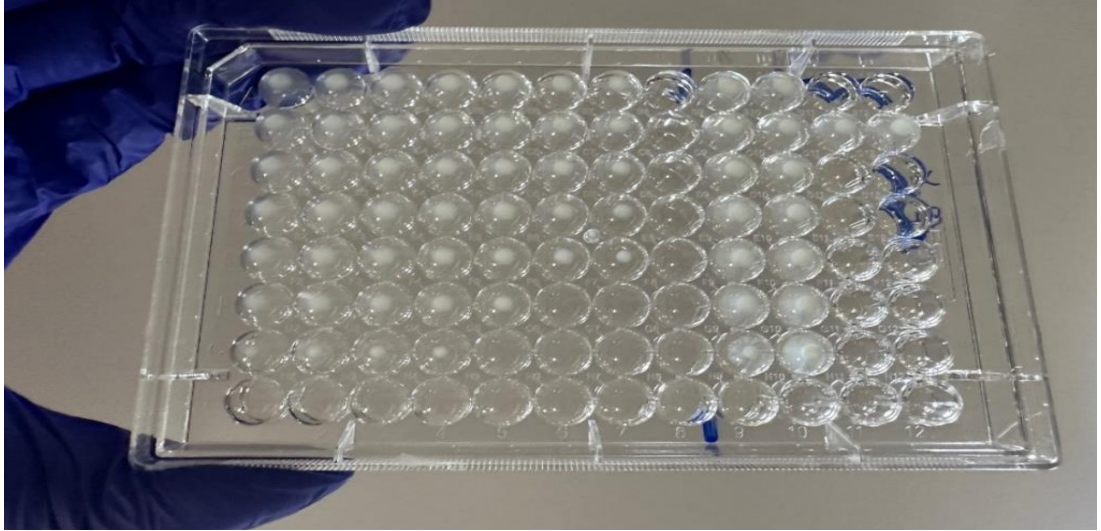
Suş no.	Antimikrobiyaller	MİK Değerleri		FİK Değerleri		Sonuç
		K S	Kombinasyon	FİK	FİKİ (ΣFİK)	
Kp1	Kolistin	16	4	0,25	0,375	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	1	0,125		
Kp4	Kolistin	16	8	0,5	0,562	Additif
	Seftazidim-avibaktam	8	0,5	0,0625		
Kp5	Kolistin	16	2	0,125	0,25	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	1	0,125		
Kp9	Kolistin	32	4	0,125	0,25	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	1	0,125		
Kp14	Kolistin	8	1	0,125	0,25	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	1	0,125		
Kp22	Kolistin	4	1	0,25	0,5	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	2	0,25		
Kp36	Kolistin	32	4	0,125	0,375	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	2	0,25		
Kp39	Kolistin	16	1	0,0625	0,562	Additif
	Seftazidim-avibaktam	4	2	0,5		
Kp41	Kolistin	16	4	0,25	0,5	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	2	0,25		
Kp44	Kolistin	64	32	0,5	0,75	Additif
	Seftazidim-avibaktam	32	8	0,25		
Kp47	Kolistin	32	8	0,25	0,75	Additif
	Seftazidim-avibaktam	4	2	0,5		
Kp49	Kolistin	4	2	0,5	0,75	Additif
	Seftazidim-avibaktam	4	1	0,25		
Kp51	Kolistin	64	0,5	0,0078	1,0078	İndiferans
	Seftazidim-avibaktam	32	32	1		

Kp53	Kolistin	32	4	0,125	0,625	Additif
	Seftazidim-avibaktam	8	4	0,5		
Kp54	Kolistin	64	4	0,0625	0,312	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	2	0,25		
Kp55	Kolistin	64	32	0,5	1	Additif
	Seftazidim-avibaktam	32	16	0,5		
Kp56	Kolistin	64	16	0,25	0,5	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	4	1	0,25		
Kp57	Kolistin	64	4	0,0625	0,562	Additif
	Seftazidim-avibaktam	4	2	0,5		
Kp58	Kolistin	64	4	0,0625	0,312	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	8	2	0,25		
Kp59	Kolistin	4	2	0,5	0,625	Additif
	Seftazidim-avibaktam	2	0.25	0,125		
Kp60	Kolistin	32	8	0,25	0,5	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	4	1	0,25		

Kolistin ile seftazidim/avibaktamın sinerjistik aktivitesine bakıldığında suşların 11'inde (%52,3) sinerjizm, 9'unda (%42,8) additif etki, 1'inde (%4,7) ise indifferans etkileşim bulunmuştur.

4.3.2. Kolistin ile Trimetoprim-sulfametoksazol Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları

K. pneumoniae izolatlarında kolistin ve trimetoprim-sulfametoksazol dama tahtası yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntem ile kombine edilen antibiyotiklerin MİK değerleri, elde edilen MİK değerlerine göre FİK değerleri ve FİK indeksi değerleri hesaplandı.



Şekil 4.23: 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Trimetoprim/sülfametoksazol Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü.

Tablo 4.4: 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A								IND	K 0,5	B 32	BK	BK
B								IND	K 1	B 64	ÜK	ÜK
C								IND	K 2	B 128	AK	AK
D								IND	K 4	B 256	AK	AK
E								IND	K 8	B 512		
F						SIN	ADD		K 16	B 1024		
G					ADD				K 32	B 2048		
H	IND	IND	IND	IND					K 64	B 4096		

(Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucukları, boyanmamış kuyucuklar üreme olmayan kuyucukları göstermektedir. K: Kolistin B: Trimetoprim/Sülfametoksazol ÜK: üreme kontrol kuyucuğu, BK: besiyeri kontrol kuyucuğu, AK: antibiyotik kontrol kuyucuğu, ADD: additif, IND: İndiferans, SIN: Sinerji)

Tablo 4.5: Kolistin ve Trimetoprim/sülfametoksazol MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.

Suş no.	Antimikrobiyaller	MİK Değerleri		FİK Değerleri		
		K B	Kombinasyon	FİK	FİKİ (ΣFİK)	Sonuç
Kp1	Kolistin	8	4	0,5	1	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	2048	0,5		
Kp4	Kolistin	16	8	0,5	0,562	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	256	0,0625		
Kp5	Kolistin	8	8	1	1,0078	İndiferans
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	32	0,0078		
Kp9	Kolistin	32	4	0,125	0,625	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	2048	0,5		
Kp14	Kolistin	8	8	1	1,0078	İndiferans
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	32	0,0078		
Kp22	Kolistin	4	2	0,5	1	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	2048	0,5		
Kp36	Kolistin	32	16	0,5	1	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	2048	0,5		
Kp39	Kolistin	32	16	0,5	0,531	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	128	0,0312		
Kp41	Kolistin	32	0,5	0,015	1,015	İndiferans
	Trimetoprim/sülfametoksazol	1024	1024	1		
Kp44	Kolistin	64	16	0,25	0,375	Sinerjizm
	Trimetoprim/sülfametoksazol	1024	128	0,125		
Kp47	Kolistin	32	4	0,125	0,625	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	2048	1024	0,5		
Kp49	Kolistin	4	2	0,5	1	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	1024	0,5		
Kp51	Kolistin	64	4	0,0625	0,562	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	2048	0,5		

Kp53	Kolistin	32	8	0,25	0,5	Sinerjizm
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	1024	0,25		
Kp54	Kolistin	64	16	0,25	0,5	Sinerjizm
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	1024	0,25		
Kp55	Kolistin	64	8	0,125	0,187	Sinerjizm
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	256	0,0625		
Kp56	Kolistin	64	16	0,25	0,5	Sinerjizm
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	1024	0,25		
Kp57	Kolistin	64	32	0,5	1	Additif
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	2048	0,5		
Kp58	Kolistin	64	8	0,125	0,25	Sinerjizm
	Seftazidim-avibaktam	2048	256	0,125		
Kp59	Kolistin	4	0,5	0,125	0,375	Sinerjizm
	Trimetoprim/sülfametoksazol	4096	1024	0,25		
Kp60	Kolistin	32	4	0,125	0,375	Sinerjizm
	Trimetoprim/sülfametoksazol	2048	512	0,25		

Kolistin ile trimetoprim/sülfametoksazolun sinerjistik aktivitesine bakıldığında suşların 10'unda (%47,6) additif etki, 8'inde (%38) sinerjizm, 3'ünde (%14,2) ise indiferans etkileşim bulunmuştur.

4.3.3. Kolistin ile Meropenem Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları

K. pneumoniae izolatlarında kolistin ve meropenem dama tahtası yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntem ile kombine edilen antibiyotiklerin MİK değerleri, elde edilen MİK değerlerine göre FİK değerleri ve FİK indeksi değerleri hesaplandı.



Şekil 4.24: 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Meropenem Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü.

Tablo 4.6: 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi.

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

(Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucukları, boyanmamış kuyucuklar üreme olmayan kuyucukları göstermektedir. K: Kolistin M: Meropenem ÜK: üreme kontrol kuyucuğu, BK: besiyeri kontrol kuyucuğu, AK: antibiyotik kontrol kuyucuğu, ADD: additif, IND: İndiferans, SIN: Sinerji)

Tablo 4.7: Kolistin ve Meropenem MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.

Suş no.	Antimikrobiyaller	MİK Değerleri		FİK Değerleri		Sonuç
		K M	Kombinasyon	FİK	FİKİ (ΣFİK)	
Kp1	Kolistin	16	2	0,125	0,625	Additif
	Meropenem	128	64	0,5		
Kp4	Kolistin	16	8	0,5	1,5	İndiferans
	Meropenem	128	128	1		
Kp5	Kolistin	16	8	0,5	1	Additif
	Meropenem	128	64	0,5		
Kp9	Kolistin	16	2	0,125	0,625	Additif
	Meropenem	128	64	0,5		
Kp14	Kolistin	8	1	0,125	0,375	Sinerjizm
	Meropenem	128	32	0,25		
Kp22	Kolistin	4	1	0,25	0,375	Sinerjizm
	Meropenem	64	8	0,125		
Kp36	Kolistin	16	4	0,25	0,75	Additif
	Meropenem	128	64	0,5		
Kp39	Kolistin	32	4	0,125	0,625	Additif
	Meropenem	64	32	0,5		
Kp41	Kolistin	32	8	0,25	0,375	Sinerjizm
	Meropenem	256	32	0,125		
Kp44	Kolistin	64	0,5	0,0078	1,0078	İndiferans
	Meropenem	128	128	1		
Kp47	Kolistin	32	8	0,25	0,75	Additif
	Meropenem	64	32	0,5		
Kp49	Kolistin	4	0,5	0,125	0,375	Sinerjizm
	Meropenem	64	16	0,25		

Kp51	Kolistin	64	64	1	1,0078	İndiferans
	Meropenem	256	2	0,0078		
Kp53	Kolistin	64	16	0,25	0,75	Additif
	Meropenem	64	32	0,5		
Kp54	Kolistin	64	4	0,0625	0,5620	Additif
	Meropenem	64	32	0,5		
Kp55	Kolistin	64	32	0,5	1	Additif
	Meropenem	256	128	0,5		
Kp56	Kolistin	64	4	0,0625	0,562	Additif
	Meropenem	128	64	0,5		
Kp57	Kolistin	64	16	0,25	0,75	Additif
	Meropenem	128	64	0,5		
Kp58	Kolistin	64	4	0,0625	0,562	Additif
	Meropenem	64	32	0,5		
Kp59	Kolistin	4	0,5	0,125	0,375	Sinerjizm
	Meropenem	64	16	0,25		
Kp60	Kolistin	32	8	0,25	0,5	Sinerjizm
	Meropenem	128	32	0,25		

Kolistin ile meropenem sinerjistik aktivitesine bakıldığında suşların 12'sinde (%57,1) additif etki, 6'sında (%28,5) sinerjizm, 3'ünde(%14,2) ise indiferans etkileşim bulunmuştur.

4.3.4. Kolistin ile Gentamisin Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları

K. pneumoniae izolatlarında kolistin ve gentamisin dama tahtası yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntem ile kombine edilen antibiyotiklerin MİK değerleri, elde edilen MİK değerlerine göre FİK değerleri ve FİK indeksi değerleri hesaplandı.



Şekil 4.25: 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Gentamisin Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü.

Tablo 4.8: 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A								IND	K 0,5	G 32	BK	BK
B								IND	K 1	G 64	ÜK	ÜK
C								IND	K 2	G 128	AK	AK
D								IND	K 4	G 256	AK	AK
E								IND	K 8	G 512		
F	SIN							IND	K 16	G 1024		
G		ADD	ADD					IND	K 32	G 2048		
H				IND	IND	IND	IND		K 64	G 4096		

Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucukları, boyanmamış kuyucuklar üreme olmayan kuyucukları göstermektedir. K: Kolistin G: Gentamisin ÜK: üreme kontrol kuyucuğu, BK: besiyeri kontrol kuyucuğu, AK: antibiyotik kontrol kuyucuğu, ADD: additif, IND: İndiferans, SIN: Sinerji)

Tablo 4.9: Kolistin ve Gentamisin MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.

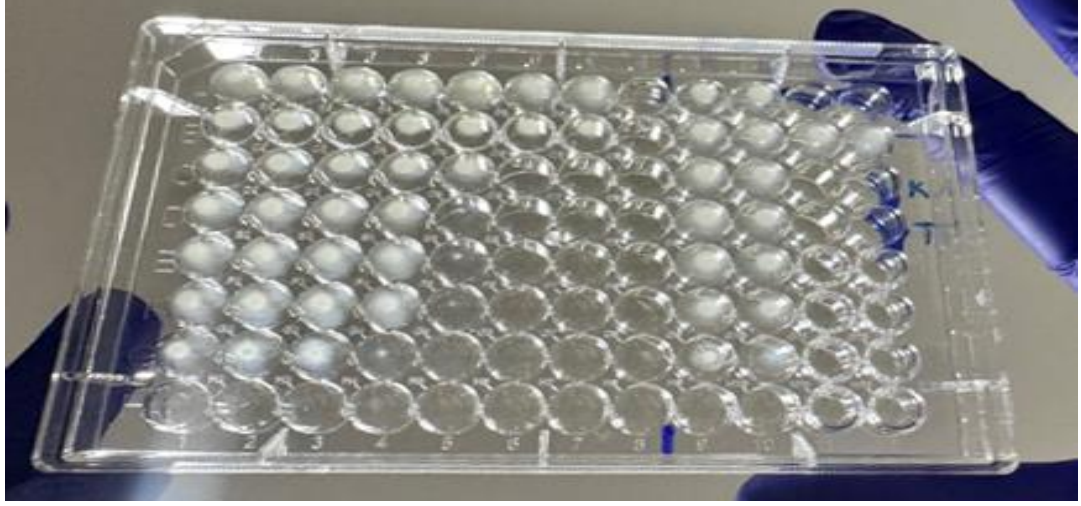
Suş no.	Antimikrobiyaller	MİK Değerleri		FİK Değerleri		
		K G	Kombinasyon	FİK	FİKİ (ΣFİK)	Sonuç
Kp1	Kolistin	8	4	0,5	1	Additif
	Gentamisin	4096	2048	0,5		
Kp4	Kolistin	16	4	0,25	0,5	Sinerjizm
	Gentamisin	256	64	0,25		
Kp5	Kolistin	8	8	1	1,0078	İndiferans
	Gentamisin	4096	32	0,0078		
Kp9	Kolistin	16	8	0,5	0,515	Additif
	Gentamisin	4096	64	0,015		
Kp14	Kolistin	8	4	0,5	0,75	Additif
	Gentamisin	4096	1024	0,25		
Kp22	Kolistin	4	4	1	1,0078	İndiferans
	Gentamisin	4096	32	0,0078		
Kp36	Kolistin	16	16	1	1,0078	İndiferans
	Gentamisin	4096	32	0,0078		
Kp39	Kolistin	32	32	1	1,0078	İndiferans
	Gentamisin	4096	32	0,0078		
Kp41	Kolistin	32	0,5	0,015	1,015	İndiferans
	Gentamisin	1024	1024	1		
Kp44	Kolistin	64	32	0,5	1	Additif
	Gentamisin	1024	512	0,5		
Kp47	Kolistin	32	8	0,25	0,375	Sinerjizm
	Gentamisin	256	32	0,125		
Kp49	Kolistin	4	2	0,5	1	Additif
	Gentamisin	256	128	0,5		
Kp51	Kolistin	64	64	1	9	Antagonizma
	Gentamisin	512	4096	8		

Kp53	Kolistin	64	32	0,5	0,5078	Additif
	Gentamisin	4096	32	0,0078		
Kp54	Kolistin	64	8	0,125	0,25	Sinerjizm
	Gentamisin	4096	512	0,125		
Kp55	Kolistin	64	32	0,5	0,625	Additif
	Gentamisin	1024	128	0,125		
Kp56	Kolistin	64	16	0,25	0,257	Sinerjizm
	Gentamisin	4096	32	0,0078		
Kp57	Kolistin	64	64	1	1,0078	İndiferans
	Gentamisin	4096	32	0,0078		
Kp58	Kolistin	64	0,5	0,0078	1,0078	İndiferans
	Gentamisin	1024	1024	1		
Kp59	Kolistin	4	2	0,5	0,625	Additif
	Gentamisin	256	32	0,125		
Kp60	Kolistin	16	16	1	1,0078	İndiferans
	Gentamisin	4096	32	0,0078		

Kolistin ile gentamisin sinerjistik aktivitesine bakıldığında suşların 8'inde (%38) additif etki, 8'inde (%38) indiferans, 4'ünde (%19) sinerjizm ve 1'inde (%4,7) ise antagonist etkileşim bulunmuştur.

4.3.5 Kolistin ile Tigesiklin Dama Tahtası (Checkerboard) Testi Sonuçları

K. pneumoniae izolatlarında kolistin ve gentamisin dama tahtası yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntem ile kombine edilen antibiyotiklerin MİK değerleri, elde edilen MİK değerlerine göre FİK değerleri ve FİK indeksi değerleri hesaplandı.



Şekil 4.26: 56 Nolu İzolatın Kolistin ve Tigesiklin Dama Tahtası Testinin Mikroplak Görünümü.

Tablo 4.10: 56 Nolu İzolata Ait Dama Tahtası Testinin Değerlendirilmesi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A								IND	K 0,5	T 0,125	BK	BK
B								IND	K 1	T 0,25	ÜK	ÜK
C						SIN	ADD		K 2	T 0,5	AK	AK
D					SIN				K 4	T 1	AK	AK
E					SIN				K 8	T 2		
F					SIN				K 16	T 4		
G				ADD					K 32	T 8		
H	IND	IND	IND						K 64	T 16		

(Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucukları, boyanmamış kuyucuklar üreme olmayan kuyucukları göstermektedir. K: Kolistin T: Tigesiklin ÜK: üreme kontrol kuyucuğu, BK: besiyeri kontrol kuyucuğu, AK: antibiyotik kontrol kuyucuğu, ADD: additif, IND: İndiferans, SIN: Sinerji)

Tablo 4.11: Kolistin ve Tigesiklin MİK, FİK, ΣFİK Sonuçları ve Kombinasyonun Yorumu.

Suş no.	Antimikrobiyaller	MİK Değerleri		FİK Değerleri		
		K T	Kombinasyon	FİK	FİKİ (ΣFİK)	Sonuç
Kp1	Kolistin	8	0,5	0,0625	0,562	Additif
	Tigesiklin	1	0,5	0,5		
Kp4	Kolistin	16	0,5	0,031	0,156	Sinerjizm
	Tigesiklin	4	0,5	0,125		
Kp5	Kolistin	8	1	0,125	0,375	Sinerjizm
	Tigesiklin	2	0,5	0,25		
Kp9	Kolistin	16	1	0,0625	0,312	Sinerjizm
	Tigesiklin	2	0,5	0,25		
Kp14	Kolistin	8	2	0,25	0,375	Sinerjizm
	Tigesiklin	8	1	0,125		
Kp22	Kolistin	4	1	0,25	0,312	Sinerjizm
	Tigesiklin	8	0,5	0,0625		
Kp36	Kolistin	16	4	0,25	0,5	Sinerjizm
	Tigesiklin	8	2	0,25		
Kp39	Kolistin	32	4	0,125	0,375	Sinerjizm
	Tigesiklin	16	4	0,25		
Kp41	Kolistin	32	8	0,25	0,5	Sinerjizm
	Tigesiklin	4	1	0,25		
Kp44	Kolistin	64	32	0,5	1	Additif
	Tigesiklin	4	2	0,5		
Kp47	Kolistin	32	4	0,125	0,625	Additif
	Tigesiklin	2	1	0,5		
Kp49	Kolistin	4	1	0,25	0,5	Sinerjizm
	Tigesiklin	4	1	0,25		
Kp51	Kolistin	64	8	0,125	0,375	Sinerjizm
	Tigesiklin	8	2	0,25		

Kp53	Kolistin	32	4	0,125	0,375	Sinerjizm
	Tigesiklin	16	4	0,25		
Kp54	Kolistin	64	4	0,0625	0,312	Sinerjizm
	Tigesiklin	8	2	0,25		
Kp55	Kolistin	64	32	0,5	0,75	Additif
	Tigesiklin	4	1	0,25		
Kp56	Kolistin	64	4	0,0625	0,187	Sinerjizm
	Tigesiklin	16	2	0,125		
Kp57	Kolistin	64	2	0,031	0,281	Sinerjizm
	Tigesiklin	16	4	0,25		
Kp58	Kolistin	64	2	0,031	0,281	Sinerjizm
	Tigesiklin	8	2	0,25		
Kp59	Kolistin	4	0,5	0,125	0,25	Sinerjizm
	Tigesiklin	8	1	0,125		
Kp60	Kolistin	32	4	0,125	0,25	Sinerjizm
	Tigesiklin	8	1	0,125		

Kolistin ile tigesiklin sinerjistik aktivitesine bakıldığında suşların 17'sinde (%80,9) sinerjizm ve 4'ünde (%19) additif etki bulunmuştur.

Dama tahtası sinerji testinde, en fazla sinerji kolistin ile tigesiklin kombinasyonunda 17 (%80,9) suшта görölürken, kolistin ile seftazidim/avibaktam kombinasyonunda 11 suшта (%52,3), kolistin ile trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonunda 8 suшта (%38), kolistin ile meropenem kombinasyonunda 6 (%28,5) suшта ve kolistin ile gentamisin kombinasyonunda 4 (%19) suшта göröldü. Additif etkileşim kolistin ile meropenem kombinasyonunda 12 (%57,1) suшта, kolistin ile trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonunda 10 (%47,6) suшта, kolistin ile seftazidim/avibaktam kombinasyonunda 9 (%42,8) suшта, kolistin ile gentamisin kombinasyonunda 8 (%38) suшта ve kolistin ile tigesiklin kombinasyonunda 4 (%19) suшта saptandı. Kolistin ile tigesiklin kombinasyonunda hiç indiferans etki görölmezken, kolistin ile gentamisin kombinasyonunda 8 (%38) suшта, kolistin ile meropenem kombinasyonunda 3 (%14,2) suшта, kolistin ile trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonunda 3 (%14,2) suшта ve kolistin ile

seftazidim/avibaktam kombinasyonunda 1 (%4,7) sušta indiferans etki görüldü. Antagonizma yalnızca kolistin ile gentamisin kombinasyonunda 1 sušta tespit edildi. Antibiyotik kombinasyonlarındaki FİKİ değerleri ve etkileşim türünün suşlara göre dağılımı tablo 4.13'de, kombinasyonlara göre antibiyotik etkileşimlerinin sayısal dağılımı ve yüzdeleri tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12: Kombinasyonlara Göre Antibiyotik Etkileşimlerinin Dağılımı.

İlaç Kombinasyonu	Sinerjizm n (%)	Additif n (%)	İndiferans n (%)	Antagonizma n (%)
K+S	11 (%52,3)	9 (%42,8)	1 (%4,7)	0
K+B	8 (%38)	10 (%47,6)	3 (%14,2)	0
K+M	6 (%28,5)	12 (%57,1)	3 (%14,2)	0
K+G	4 (%19)	8 (%38)	8 (%38)	1 (%4,7)
K+T	17 (%80,9)	4 (%19)	0	0

K: Kolistin, S:Seftazidim/avibaktam, B:Trimetoprim/sulfametoksazol, M:Meropenem,

G: Gentamisin, T:Tigesiklin

Tablo 4.13: Suşlara Göre Antibiyotik Kombinasyonlarındaki Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksleri ve Etkileşim Türünün Dağılımı (n=21).

Suş	Kolistin-Seftazidim/Avibaktam		Kolistin-Trimetoprim/Sülfametoksazol		Kolistin-Tigesiklin		Kolistin-Meropenem		Kolistin-Gentamisin	
	FİKİ	Sonuç	FİKİ	Sonuç	FİKİ	Sonuç	FİKİ	Sonuç	FİKİ	Sonuç
Kp1	0,375	Sin	1	Add	0,562	Add	0,625	Add	1	Add
Kp4	0,562	Add	0,562	Add	0,156	Sin	1,5	İnd	0,5	Sin
Kp5	0,25	Sin	1,0078	İnd	0,375	Sin	1	Add	1,0078	İnd
Kp9	0,25	Sin	0,625	Add	0,312	Sin	0,625	Add	0,515	Add
Kp14	0,25	Sin	1,0078	İnd	0,375	Sin	0,375	Sin	0,75	Add
Kp22	0,5	Sin	1	Add	0,312	Sin	0,375	Sin	1,0078	İnd
Kp36	0,375	Sin	1	Add	0,5	Sin	0,75	Add	1,0078	İnd
Kp39	0,562	Add	0,531	Add	0,375	Sin	0,625	Add	1,0078	İnd
Kp41	0,5	Sin	1,015	İnd	0,5	Sin	0,375	Sin	1,015	İnd
Kp44	0,75	Add	0,375	Sin	1	Add	1,0078	İnd	1	Add
Kp47	0,75	Add	0,625	Add	0,625	Add	0,75	Add	0,375	Sin
Kp49	0,75	Add	1	Add	0,5	Sin	0,375	Sin	1	Add
Kp51	1,0078	İnd	0,562	Add	0,375	Sin	1,0078	İnd	9	Ant
Kp53	0,625	Add	0,5	Sin	0,375	Sin	0,75	Add	0,5078	Add
Kp54	0,312	Sin	0,5	Sin	0,312	Sin	0,5620	Add	0,25	Sin
Kp55	1	Add	0,187	Sin	0,75	Add	1	Add	0,625	Add
Kp56	0,5	Sin	0,5	Sin	0,187	Sin	0,562	Add	0,257	Sin
Kp57	0,562	Add	1	Add	0,281	Sin	0,75	Add	1,0078	İnd
Kp58	0,312	Sin	0,25	Sin	0,281	Sin	0,562	Add	1,0078	İnd
Kp59	0,625	Add	0,375	Sin	0,25	Sin	0,375	Sin	0,625	Add
Kp60	0,5	Sin	0,375	Sin	0,25	Sin	0,5	Sin	1,0078	İnd

FİKİ: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi

Sin: Sinerji, Add: Additivite, Ind: Indiferans, Ant: Antagonizma

Tablo 4.14: Sinerji Sonuçlarının Direnç Genlerine Göre Dağılımı.

		OXA-48 n (%)	OXA-48+ NDM n (%)	OXA-48+ KPC n (%)	TOPLAM n (%)
K+S	Sinerjizm	10 (%62,5)	-	1 (%100)	11 (%52,3)
	Additif	6 (%37,5)	3 (%75)	-	9 (%42,8)
	İndiferans	-	1 (%25)	-	1 (%4,7)
	Antagonizma	-	-	-	-
K+B	Sinerjizm	6 (%37,5)	2 (%50)	-	8 (%38)
	Additif	8 (%50)	2 (%50)	-	10 (%47,6)
	İndiferans	2 (%12,5)	-	1 (%100)	3 (%14,2)
	Antagonizma	-	-	-	-
K+M	Sinerjizm	5 (%31,25)	-	1 (%100)	6 (%28,5)
	Additif	11 (%68,25)	1 (%25)	-	12 (%57,1)
	İndiferans	-	3 (%75)	-	3 (%14,2)
	Antagonizma	-	-	-	-
K+G	Sinerjizm	3 (%18,75)	1 (%25)	-	4 (%19)
	Additif	6 (%37,5)	2 (%50)	-	8 (%38)
	İndiferans	7 (%43,75)	-	1 (%100)	8 (%38)
	Antagonizma	-	1 (%25)	-	1 (%4,7)
K+T	Sinerjizm	14 (%87,5)	2 (%50)	1 (%100)	17 (%80,9)
	Additif	2 (%12,5)	2 (%50)	-	4 (%19)
	İndiferans	-	-	-	-
	Antagonizma	-	-	-	-

Gruplar arasında FIKI ortalamaları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,001$). Kolistin-Tigesiklin kombinasyonu FIKI ortalaması, Kolistin-Trimetoprim/Sülfametoksazol, Kolistin-Meropenem ve Kolistin-Gentamisin kombinasyonlarının FIKI ortalamalarına göre anlamlı derecede daha düşük bulundu (sırasıyla $p=0,003$; $p<0,001$; $p<0,001$). Kolistin-Gentamisin kombinasyonunun FIKI ortalaması, Kolistin- Seftazidim/avibaktam kombinasyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,005$). Diğer gruplar arasında FIKI ortalamaları bakımından anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 4.15, Tablo 4.16).

Tablo 4.15. Antibiyotik Kombinasyonlarının FIKI Değerleri Ortalaması.

Kombinasyon	Ortalama FIKI	Standart Sapma	Medyan	<i>p</i>
K+S	0,538943	0,2231293	0,500000	<0,001
K+B	0,666552	0,2911749	0,562000	
K+T	0,412048	0,1988599	0,375000	
K+M	0,688171	0,2879822	0,625000	
K+G	1,165448	1,8166209	1,000000	

K:Kolistin, S:Seftazidim/avibaktam, B:Trimetoprim/sulfametoksazol, M:Meropenem, G:Gentamisin, T:Tigesiklin, FİKİ: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi

Tablo 4.16. Antibiyotik Kombinasyonlarının FIKI Değerlerinin Karşılaştırılması.

Kombinasyonlar	<i>p</i>
K+T / K+S	,087
K+T / K+B	,003*
K+T / K+M	<,001*
K+T / K+G	<,001*
K+S / K+B	,202
K+S / K+M	,098
K+S / K+G	,005*

*: İstatistiksel olarak anlamlı

Fisher freeman halton testi ile değeriendirildiğinde sinerjik ve additif olan gruplar ile indiferansiyel ve antagonist olan gruplar arasında, grup dağılımları bakımından anlamlı fark gözlendi ($p<0,05$). Sinerjik ve additif olanların Kolistin-Tigesiklin kombinasyonunda bulunma oranı, indiferansiye ve antagonist olanların ise Kolistin-Gentamisin kombinasyonunda olma oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,001$).



5. TARTIŞMA

Son yıllarda karbapenemler de dahil olmak üzere çoklu ilaca dirençli izolatların sıklığı dünyada giderek artmaktadır ve günümüzde antimikrobiyal direnç önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir [2]. 2023 yılında yayınlanan Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetim Ağı olarak da bilinen EARS-Net verilerine göre, 2020 yılında Avrupa Birliği/Avrupa Ekonomik Alanı (AB/AEA)'da antibiyotiklere dirençli bakterilere bağlı 800.000'den fazla enfeksiyon olduğu ve bu enfeksiyonların doğrudan sonucu olarak 35.000'den fazla kişinin öldüğü bildirilmektedir [3].

Gram negatif patojenler arasında *K. pneumoniae*, *Enterobacteriaceae* izolatlarına kıyasla daha yüksek karbapenem direnci prevalansı göstermiştir [4]. Dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonların yaygınlığı, özellikle yoğun bakım ünitelerinde son on yılda artmıştır. KDKp enfeksiyonlu hastalarda öncelikle etkili tedavinin uygulanmasındaki gecikmeden dolayı ölüm oranlarının %40-50 kadar yüksek olabileceği bildirilmiştir [5, 6]. KDKp'da çoklu antimikrobiyal direnç gelişimi tedavi başarısızlığına neden olmakta ve ciddi mortalite/morbiditeyle birlikte ekstra tedaviler, enfeksiyon kontrol önlemleri, hastanelerde uzun kalış süreleri gibi ek maliyetler nedeniyle sağlık sistemleri için ciddi bir ekonomik yüke yol açmaktadır. Bu nedenle KDKp'nin küresel yaygınlığı son yıllarda önemli ölçüde ilgi görmüştür ve farklı bölgelerdeki çok sayıda çalışma bu konuya ışık tutmuştur [5].

Karbapenem direnci karbapenemaz üretimi, porin kaybı ve artmış eflüks pompa fonksiyonuyla ilişkili olabilir. Karbapenemazları kodlayan genler genellikle plazmid ve integron gibi mobil genetik elemanlar üzerindedir ve suşlar arasında kolaylıkla yayılabilir. Karbapenem direncinin karbapenemazlar aracılığıyla olması, diğer mekanizmalara göre direncin yayılımı açısından çok daha büyük bir tehdit olarak kabul edilmektedir [7].

Antibiyotik direncini önlemede en kritik adımlardan biri direncin izlenmesidir. Yerel, bölgesel ve küresel izleme, antibiyotik direncinin yayılmasının daha net anlaşılmasını sağlamaktadır. Ek olarak, seftazidim-avibaktam ve meropenem-vaborbaktam gibi yeni antimikrobiyal ajanlar, KPC ve OXA-48 üreten *Enterobacteriaceae*'ya karşı etkiliyken, metallo-beta-laktamazlara karşı etkili

değildir. Bu nedenle, karbapenemaz tipinin belirlenmesi sadece epidemiyolojik amaçlar için değil aynı zamanda tedavide kullanılacak etkili antibiyotiklerin seçimi için de önemlidir.

KPC, NDM ve OXA-48 benzeri karbapenemazların üretimi, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* klinik izolatları arasında en yaygın direnç mekanizmalarıdır [180]. Ülkemizde KPC, NDM gen bölgelerinden kaynaklanan karbapenem direnci sporadik, OXA-48 ise endemiktir [8]. Avrupa Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* Araştırması (EuSCAPE) projesinin bir parçası olarak Türkiye'nin farklı bölgelerindeki karbapenemazların dağılımını inceleyen çok merkezli bir çalışmada Türkiye'de en sık tespit edilen karbapenemaz tipinin OXA-48, ikinci sıklıkta da NDM olduğu bildirilmiştir [181]. Moleküler yöntemler, karbapenemaz genlerinin hızlı ve kesin bir şekilde tanımlanması için oldukça duyarlı kabul edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızın birincil amacı olarak hastanemizde yatan hastalardan izole edilen kolistin ve karbapenemler dahil çoklu ilaç dirençli 21 adet *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatında konvansiyonal PZR yöntemi ile KPC, NDM ve OXA-48 karbapenemaz gen analizi gerçekleştirmeyi amaçladık.

OXA-48 enzimi ilk olarak 2001 yılında Türkiye'de İstanbul'da izole edilen bir KDKp izolatından tanımlanmış ve daha sonra OXA-48 üreten *K. pneumoniae* salgınları Türkiye'den birçok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. OXA-48 zamanla Kuzey Afrika ve Akdeniz bölgesi ülkelerinde endemik hale gelmiş ve ardından Güney Asya ve Avrupa ülkeleri de dahil olmak üzere dünyanın birçok yerine yayılmıştır [182, 183]. OXA-48 karbapenemaz belirlenmesi en zor tip olup özellikle endemik bölgelerde doğru tanı çok önemlidir [184]. Türkiye'den fenotipik ve genotipik yöntemler kullanarak karbapenem dirençli 67 adet *K. pneumoniae* suşunda karbapenemaz üretimini tespit etmeyi amaçlayan bir çalışmada izolatların 59'u (%88,1) OXA-48, 16'sı (%23,9) IMP ve beşi (%7,5) NDM pozitif bulunmuştur ve OXA-48 geninin *K. pneumoniae* izolatlarında en yaygın gen olduğu tespit edilmiştir [154]. İstanbul Tıp Fakültesi'nden bildirilen bir çalışmada da yine *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında OXA-48 karbapenemaz geni baskın bulunmuştur [185]. Çetinkol ve ark.'nın bir çalışmasında karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*'de baskın karbapenemaz geninin OXA-48 olduğu belirtilmiştir [186]. Ülkemizden plevral effüzyon örneklerinden izole edilen suşların değerlendirildiği bir çalışmada 16 (%8,8) *Klebsiella pneumoniae* suşunu içeren 22 bakteri izole edilmiş ve antibiyotik direnç

genlerinin analizinde OXA-48 geni en yüksek oranda belirlenmiştir [187]. Kutlu ve ark.'nın nöroloji yoğun bakım ünitesi ve diğer bölümlerden izole edilen MDR *K. pneumoniae* ST395'e bağlı bir salgını bildirdikleri ve suşların karakterizasyonunu açıkladıkları bir çalışmada, değerlendirilen tüm suşlar beta-laktamaz genlerinden (blaCTX-M, blaTEM, blaSHV) en az biriyle birlikte OXA-48 için pozitif olarak saptanmıştır [10]. 50 adet *Klebsiella pneumoniae* izolatının dahil edildiği bir başka çalışmada da izolatların %86'sında (n=43/50) OXA-48 tespit edilmiş ve baskın gen olarak belirtilmiştir [188]. Arabacı ve ark.'nın yapmış oldukları bir araştırmada 57 adet karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKp) izolatında OXA-48 için %82,45 (n=47) oranında pozitiflik tespit edilmiştir [189]. Ülkemizde karbapenemlere dirençli 60 adet *K. pneumoniae* suşunun değerlendirildiği bir başka çalışmada izolatlarda çoğunlukla OXA-48 geni saptandığı bildirilmiştir [190]. Özger ve ark.'nın toplam 318 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatı dahil ettikleri bir çalışmada ise izolatların çoğu (n=290, %91,2) *K. pneumoniae* olarak tanımlanmış ve en sık görülen karbapenemaz tipi ise OXA-48 (n=82, %27,6) olarak belirlenmiştir [191]. Hazırolan ve ark.'nın 93 adet karbapenem ve kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatının moleküler karakterizasyonunu açıkladıkları bir çalışmada tüm izolatların OXA-48 geni taşıdığını göstermişlerdir [192]. Çalışmamızda 21 *Klebsiella pneumoniae* izolatının tamamında baskın gen OXA-48 (%100) olarak tespit edilmiştir. Türkiye'de karbapenemaz tiplerinin dağılımını araştıran çalışmalar değerlendirildiğinde, OXA-48 pozitifliğinin yüksek olduğu görülmektedir ve çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular literatürle uyumlu olup Türkiye'de *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48'in hala baskın karbapenemaz olduğunu göstermektedir [193].

NDM ilk olarak 2009 yılında Hindistan'da tedavi edilen İsveçli bir hastadan alınan bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır [161]. O zamandan beri Birleşik Krallık, Hindistan, Pakistan ve Bangladeş dahil olmak üzere birçok ülkede ve çok sayıda izolatta, çoğunlukla *Escherichia coli* ve *K. pneumoniae*'da bildirilmiştir [126]. Dünya'da NDM ve OXA-48'i birlikte üreten ilk *K. pneumoniae* suşu Fas'ta yaşlı bir erkeğin idrar örneğinden izole edilmiştir [194]. Ülkemizde OXA-48 ve NDM birlikte üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatı 2015 yılında Türkiye ile Suriye arasındaki sınır kenti Şanlıurfa'daki bir hastanede tespit edilmiştir [164]. Bu birlikteliğin Türkiye'de sanıldığından daha yaygın olabileceği düşünülmektedir. 2015 yılında hastanemizden bildirilen bir çalışmada 37 *K. pneumoniae* suşunda karbapenemaz genleri araştırılmış

ve 32'sinin (%86) OXA-48 ve 7'sinin (%19) NDM-1 taşıdığı, 2 suşta ise OXA-48+NDM pozitifliği olduğu (%5,4) saptanmıştır. Yazarlar Türkiye'den ilk kez karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da NDM-1 (%19) karbapenemazın yüksek prevalansını bildirdiklerini vurgulamışlardır [195]. Türkiye'deki bir başka üçüncü basamak hastaneden 2012-2014 yılları arasında toplanan KDKp suşlarının dahil edildiği bir uzmanlık tezinde araştırmacılar, toplam 70 suştan 4'ünün (%5,7) hem OXA-48 hem de NDM tipi metallo-beta-laktamlar için pozitif olduğunu bulmuştur [196]. Can ve ark.'nın kolistin dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonu tanısı almış toplam 115 hastayı değerlendirdikleri çok merkezli, prospektif bir kohort çalışmasında izolatların 93'ünde (%81) OXA-48 ve 22'sinde (%19) NDM geni saptanmıştır [197]. Karbapenem dirençli 54 *K. pneumoniae* suşunun değerlendirildiği bir başka çalışmada ise suşların 33'ünde OXA-48, 19'unda OXA-48+NDM ve 2'sinde NDM tespit edilmiştir [198]. Güdücüoğlu ve ark.'nın bildirdikleri pan-ilaç dirençli (PDR) *Klebsiella pneumoniae* klonundan kaynaklanan bir hastane salgınında 9 suştan 7'sinde OXA-48 ve NDM birlikteliği görülmüştür [196]. Arıcı ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 28 KDKp izolatı değerlendirilmiş ve karbapenemaz genleri multipleks PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak izolatların %85,7'sinde OXA-48 geni, %10,7'sinde OXA-48 + NDM geni ve %3,6'sında NDM geni tespit edilmiştir [182]. Türkiye'den başka bir çalışmada karbapenem ve kolistin dirençli 38 *K. pneumoniae* klinik izolatı değerlendirilmiş ve %58'inin sadece OXA-48, %34'ünün ise hem OXA-48 hem de NDM ve %5'inin sadece NDM için pozitif olduğu bulunmuştur [199]. Ulu ve ark.'nın Çukurova Üniversitesi'nde yaptıkları bir çalışmada fenotipik olarak karbapenemlere dirençli olduğu belirlenen 98 *K. pneumoniae* suşu, multipleks PZR ile genotipik olarak taranmış ve en sık tespit edilen karbapenemaz geni OXA-48 (%74,5) olarak belirlenmiştir. 8 izolatta (%8,2) ise hem OXA-48 hem de NDM genlerinin birlikteliği gösterilmiştir [200]. Alp ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 137 hastadan KDKp izole edilmiş ve en sık direnç geni %91,5 oranında OXA-48 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, KDKp izolatlarının %4,3'ünün NDM-1 ve %1'inin ise hem NDM-1 hem de OXA-48 ürettiği tespit edilmiştir [201]. Duman ve ark.'nın yapmış olduğu bir başka çalışmada ise 21 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşu değerlendirilmiş, 9'unun NDM-1 ve OXA-48'i birlikte ürettiği, 11 suşun OXA-48 ve 1 suşun ise NDM-1 ürettiği bulunmuştur [202]. Çeşitli klinik örneklerden elde edilen *K. pneumoniae* izolatlarının kapsüler genotiplerinin antibiyotik duyarlılığı ve beta-

laktamaz genleriyle olası ilişkisini araştırmayı amaçlayan bir çalışmada ise OXA-48 pozitifliği %68,4 olarak tespit edilirken, OXA-48 ile NDM-1'in birlikteliği ise %7,9 olarak belirlenmiştir [203]. Yüksek ve ark.'nın Türkiye'de mikroorganizmalar arasındaki klonal etkileşimlerin araştırdığı bir çalışmada, karbapenem ve kolistin dirençli toplam 38 *K. pneumoniae* klinik izolatu araştırmaya dahil edilmiş ve izolatların büyük çoğunluğunun (%58) sadece OXA-48, %34'ünün hem OXA-48 hem de NDM ve %5'inin sadece NDM için pozitif olduğu tespit edilmiştir [199]. Çalışmamızda OXA-48+NDM birlikteliği %19 bulunmuş olup literatür değerlendirildiğinde sonuçların çalışmamızla örtüştüğü görülmekte ve tüm bu veriler Türkiye'de endemik olarak bulunan OXA-48'e ek olarak OXA-48 ve NDM'nin birlikte görülme sıklığının da endemik seviyelere ulaşmaya başladığını düşündürmektedir.

K. pneumoniae karbapenemaz (KPC) geni dünyada ilk defa 1996 yılında Amerika'da ortaya çıkmış ve daha sonra hızla dünya genelinde yayılmıştır. KPC artık Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Latin Amerika'daki *Enterobacteriaceae* arasında en yaygın karbapenemaz olmuştur. İtalya, Yunanistan, Orta Doğu ve Çin'de artan KPC sayıları bildirilmektedir [204]. Dünyada en sık görülen karbapenemaz olan KPC'nin ülkemizde giderek yaygınlaştığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Türkiye'de karbapenemaz epidemiyolojisini araştırmanın amaçlandığı bir çalışmada 10 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşu değerlendirilmiş ve karbapenemaz üreten izolatlarda karbapenemaz tipleri en yüksek oranda OXA-48 (%52,2) daha sonra sırasıyla KPC (%16,1), NDM-1 (%15), OXA-48 + NDM-1 (%12,6), KPC + NDM-1 (%2,8) ve VIM (%0,5) ve OXA-48+VIM (%0,5) olarak bulunmuştur [205]. Başka bir çalışmada 32 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da antibiyotik direnç ve virülans genleri PZR ile taranmış; OXA-48 (%40,6), KPC (%40,6), TEM (%31,2), NDM (%18,8) olarak belirlenmiştir [206]. Türkiye'den 150 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının karbapenemaz direnç genlerinin değerlendirildiği bir çalışmada OXA-48 %71,3, KPC %16,7, NDM geni %4,7, OXA-48 ve KPC birlikteliği %6,7, OXA-48 ve NDM birlikteliği %0,6 oranında tespit edilmiştir [207]. Kafa ve ark.'nın *K. pneumoniae* suşlarının antibiyotik direnci, virülansla ilişkili genler ve biyofilm oluşturma özellikleri üzerine yapmış oldukları bir çalışmada OXA-48 %70, KPC %19, NDM %49, OXA-48+NDM +KPC %12, OXA48+NDM %26, OXA-48+KPC ise %4 oranında tespit edilmiştir [208]. Genç ve ark.'nın 100 adet *K. pneumoniae* izolatının direnç genlerini multipleks PZR

yöntemiyle gösterdikleri bir çalışmada 95 izolatın en az bir karbapenemaz geni taşındığı, bunların %81'inin OXA-48 , %38.9'unun NDM , %9.47'sinin KPC ve %1.05 VIM olduğu tespit edilmiştir. Bir izolat OXA-48+KPC ve iki izolat KPC+NDM'yi taşımaktaydı. Yazarlar çalışmanın, KDKp izolatlarında bu iki genin (KPC+ NDM ve OXA-48+KPC) birlikte üretimine ilişkin ilk rapor olduğunu vurgulamışlardır [209]. Benzer bir çalışmada 42 KDKp izolatının 34'ü (%81) sadece OXA-48 pozitif, 5'i (%11,9) OXA-48+NDM ve 3'ü (%7,1) OXA-48+KPC pozitif saptanmıştır [210]. Araştırmamızda OXA-48+KPC geni 21 *Klebsiella pneumonia* izolatından yalnızca 1'inde (%4,7) tespit edilmiştir. Bu oran literatüre göre düşük kalmakla birlikte hasta sayısının az olması ile açıklanabilir. Hastane veritabanından ve hasta yakınıyla yapılan telefon görüşmesinden elde edilen bilgilere göre suşun izole edildiği hasta özelliklerine bakıldığında, hastanın 93 yaşında kadın olduğu, aslen Erzincan ilinde doğduğu ancak 30 yıldan uzun zamandır İstanbul'da ikamet ettiği, hastaneye yatışından önceki son 6 ayda herhangi bir yurtdışı seyahati olmadığı en son 35 yıl önce İngiltere'ye ziyareti olduğu ancak o zaman herhangi bir sağlık bakımından yararlanmadığı öğrenildi. Ayrıca hastanın 2 aydan uzun süredir yoğun bakım ünitesinde takip edildiği ve tekrarlayan kan dolaşımı enfeksiyonu ve pnömoniler nedeniyle geniş spektrumlu, çoklu antibiyoterapi kullanımı olduğu, çok ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae* 'nın etken olduğu kan dolaşımı enfeksiyonu nedeniyle hayatını kaybettiği bilgisine ulaşıldı. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatür ile desteklendiğinde ülkemiz için KPC üreten *K.pneumoniae* izolatlarındaki artışın dikkat çekici olduğunu düşünüyoruz.

Karbapenemaz direnç genleri birlikteliğine baktığımızda çalışma verilerimize göre, literatürle uyumlu olarak, birden fazla karbapenemaz geni (OXA 48+NDM ve OXA-48+ KPC) taşıyan *K. pneumoniae* suş oranının fazla olması (%23,8) dikkat çekicidir. KDKp suşların etken olduğu enfeksiyonlarda tedavi düzenlenirken birden fazla karbapenemaz direnç geni içeren suşların varlığının göz önünde bulundurulması gerekmektedir. KDKp suşlara karşı yeni ve en güçlü ilaçlardan biri seftazidim/avibaktam gibi görünse de özellikle NDM içeren miks karbapenemaz üreten suşlarda dikkatli olunması gerekmektedir.

K.pneumoniae enfeksiyonlarının tedavisi genellikle sefalosporinler (sefotaksim ve seftriakson), beta-laktamlar/beta-laktamaz inhibitörleri ve karbapenemler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerle başlar. Özellikle hastane

kaynaklı *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında karbapenemlerin sık kullanılmasına paralel olarak karbapenem direnci hızla artmıştır. KDKp suşlar tedavi seçeneklerini sınırlayan çoklu ilaç direnci nedeniyle bugün dünya çapında önemli bir sorun haline gelmiştir [211]. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde seftazidim-avibaktam, polimiksin, tigesiklin ve fosfomisin gibi ajanlar kullanılabilir. 1970'lerde yüksek toksisite profilleri nedeniyle büyük ölçüde terk edilen kolistin gibi katyonik antimikrobiyal peptitler (polimiksinler) ile tedavi son çare antibiyotiklerinden biri olarak yeniden gündeme gelmiştir. Ancak son çalışmalarda *K. pneumoniae* 'nın uzun süreli veya uygunsuz tedaviler nedeniyle kolistine dirençli hale geldiğine ilişkin raporlar dünya çapında endişe verici şekilde artmaktadır. Özellikle lipopolisakkarit modifikasyonu ile ilişkili plazmit aracılı ve kromozomal aracılı kolistin direnci giderek daha fazla bildirilmektedir [9, 10].

Karbapenemaz üreten ve kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşları beta-laktam antibiyotiklere ek olarak aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi diğer antibiyotik sınıflarına da çoğunlukla dirençli olduğundan tedavi seçenekleri çok sınırlıdır. KDKp ve diğer karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün antibiyotik dirençli bakterilere karşı yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesi için öncelik listesinde, "Öncelik 1 (kritik)" olarak sınıflandırılmıştır [212]. Yeni ve etkili antimikrobiyal ajanlar bulmak dirençli bakterilerle mücadele için nihai strateji gibi görünse de bunların araştırılması, bulunması ve geliştirilmesi çok fazla kaynak ve zaman gerektirir. Öte yandan yeni geliştirilen ajanlar her ülke ve bölgede bulunmayabilir. İlaça dirençli izolatlar karşı etkili terapötik ajanların kıtlığı, klinisyenleri bu durumla başa çıkmak için alternatif, daha verimli ve daha uygulanabilir bir yaklaşıma yöneltmiş ve tedavide sinerjik etkiler için mevcut antimikrobiyallerin kombinasyonlarının kullanımına teşvik etmiştir. Ayrıca kombinasyon tedavileri çok hedefli bir yaklaşımla klinik tedavinin spektrumu genişletilerek mikrobiyal çoğalmayı engellemenin yanı sıra, bakteriyel klirensi hızlandırmakta, antibiyotiklerin toksisitesini azaltabilmekte ve farklı etki mekanizmalarından yararlanarak potansiyel olarak direncin ortaya çıkmasını engelleyebilmekte veya geciktirebilmektedir [213]. Literatürde karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarının tedavisinde kombinasyon tedavilerinin önemli bir rol oynadığını bildiren yayınlar mevcuttur [2]. Bir çalışmada monoterapi alan ve hiç

tedavi almayan hastalar arasında mortalite oranlarında anlamlı bir fark olmadığı vurgulanmış, kombinasyon tedavisinin mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir [214]. Bununla birlikte kombinasyon tedavilerinde klinik kanıtlar sınırlıdır ve antibakteriyel aktiviteyi optimize etmek için hangi antibiyotiklerin birleştirilmesi gerektiği konusunda bilgi sağlamak için daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç vardır. Sinerji testleri, MDR ve PDR *K. pneumoniae*'ya bağlı enfeksiyonlar için en iyi antimikrobiyal kombinasyonun seçilmesinde yararlı olabilir. Bu nedenle biz de çalışmamızın ikincil amacı olarak hastanemizde klinik örneklerden izole etmiş olduğumuz tümü (%100) çoklu ilaç dirençli (kolistin, meropenem, seftriakson, seftazidim, sefepim, amikasin, gentamisin, siprofloksasin, amoksisilin/klavulonat, trimetoprim/sulfametoksazol, piperasilin/tazobaktam) *Klebsiella pneumoniae* suşlarında, antibiyotik duyarlılıklarını ve bunların tedavisinde seçenek oluşturabilecek antibiyotik kombinasyonlarını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamıza 21 adet kolistin ve karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatı dahil edilmiş olup bu izolatların çoğunluğu (%66,6) Yoğun Bakım Ünitesinden izole edilmiştir. İzolatların klinik örneklerle göre dağılımı incelendiğinde en sık derin trakeal aspirat (%52,3) ve kandan (%23,8) izole edildikleri belirlenmiştir. İzolatların tamamının yatan hastalardan elde edilmesi organizmaların hastane patojeni olduğunu göstermektedir. Ülkemizden ve dünyadan KDKp suşları ile yapılan çalışmalara bakıldığında örnekler çalışmamızla benzer şekilde en sık yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiş, kan ve solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir [199, 215, 216]. Çalışmamızda hastaların yaş ortalaması $75,6 \pm 14,4$ (yıl) olarak hesaplanmıştır. Literatürde benzer şekilde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının özellikle yaşlı bireylerde daha sık görüldüğü bilgisine ulaşılmıştır [217, 218].

Kombinasyon tedavilerinin farklı sinerjik etkilerinin olması yeni kombinasyon tedavi alternatiflerinin araştırılmasına yol açmış ve bu konuda çok sayıda çalışma bildirilmiştir. Özellikle kolistin ile kombinasyonlarda sinerjistik aktivitenin gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur [219]. Bu sonuçlar, kolistinin diğer antimikrobiyallerle kombinasyonlarının kolistine dirençli suşlara karşı aktivite gösterebileceğini düşündürmektedir. Biz de araştırmamızda kolistin ile çeşitli antibiyotiklerin kombinasyonlarının (kolistin-seftazidim/avibaktam, kolistin-trimetoprim/sülfametoksazol, kolistin-tigesiklin, kolistin-meropenem ve kolistin-

gentamisin) in vitro sinerjik etkinliğini Checkerboard (Dama tahtası) ile değerlendirdik.

Tigesiklin, karbapenem dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde en yaygın kullanılan antibiyotik seçeneklerinden biridir. Ancak, kritik hastalardaki kan dolaşımı enfeksiyonlarının tedavisinde yeterli serum düzeylerine ulaşamadığından genellikle önerilmemektedir. Bu nedenle tigesiklin, dirençli *Enterobacteriaceae* 'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla diğer ilaçlarla kombinasyon şeklinde kullanılabilir [220]. Sinerjinin kesin mekanizması bilinmemekle birlikte kolistin burada bakteriyel dış zarın geçirgenliğini artırarak tigesiklin gibi hücre içi aktif ilaçların zardan nüfuz etmesine izin verdiği düşünülmektedir. Çalışmamızda en fazla sinerji kolistin ile tigesiklin kombinasyonunda 17 (%80,9) suşta görüldü. Additif etkileşim 4 (%19) suşta saptandı. Kolistin ile tigesiklin kombinasyonunda hiç indifferans etki ve antagonizma görülmedi. Ayrıca kolistin-tigesiklin kombinasyonunda FIKI ortalaması, kolistin-trimetoprim/sülfametoksazol, kolistin-meropenem ve kolistin-gentamisin kombinasyonlarının FIKI ortalamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p=0,003$; $p<0,001$; $p<0,001$). Literatürde kolistin ve tigesiklin kombinasyonunun sinerjistik etkinliğini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Huang ve ark. *Klebsiella pneumonia* izolatlarında time kill yöntemi ile kolistin-tigesiklin kombinasyonunun sinerjistik etkilerini araştırmışlardır. En yüksek sinerji (%81,8) gösteren kombinasyon grubu, sırasıyla $1/2 \times \text{MİK}$ ve $1/4 \times \text{MİK}$ konsantrasyonlarında 8 izolatta sinerji ve 6 izolatta bakterisidal aktivite gösteren kolistin ve tigesiklin kombinasyonu olarak bulunmuştur. Ayrıca bu kombinasyon hem ESBL üreten hem de karbapenem dirençli suşlar için 24 saat boyunca bakterisidal aktiviteyi (%90,9) sürdürebilmiştir [221]. Betts ve ark. duyarlı ve dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinde kolistin-tigesiklin kombinasyonunun etkinliğini dama tahtası, time-kill ve *Galleria mellonella* hayvan modellemesi yöntemleri ile değerlendirmişlerdir. Kombinasyon toplamda 15 suşun 7'sine (47%) karşı sinerjik, *K. pneumoniae* suşlarının ise 5'inden 3'ünde (%60) sinerjik bulunmuştur. Karbapenem dirençli 3 *K. pneumoniae* suşunun 2'sinde sinerji gözlenmiştir. Hayvan modelinde kolistin-tigesiklin kombinasyonu larvalarda yüksek sağkalımı sağlamış, in vivo incelenen tüm izolatlara karşı monoterapiden önemli ölçüde daha etkili olduğu bulunmuştur ($p < 0,01$) [222]. Bu veriler çalışmamızı destekler niteliktedir. Literatüre bakıldığında Elemam ve ark.'nın

yürüttüğü ve polimiksin B ile dizayn ettikleri çalışmada kombinasyonun hem polimiksin B hem de tigesiklin MİK'lerini azalttığı, tigesiklinin polimiksin B ile birlikte tedavi için etkili bir seçenek olabileceği sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte tüm izolatların kolistine de dirençli olduğu görülmüştür. Yazarlar polimiksin B ve E'nin (kolistin) benzer etki şekillerine, aktivite spektrumlarına, direnç mekanizmalarına ve klinik kullanımlarına sahip olduğunu vurgulamışlardır. Bu nedenle polimiksin b ile gözlenen sinerji kolistin ile de ortaya çıkabilirse de, bunun henüz kanıtlanmamış olduğunu belirtmişlerdir [216].

Demiraslan ve ark. farelerde OXA-48 üreten *Klebsiella pneumonia* suşu ile oluşturdukları sepsis modelinde kolistin ve tigesiklin kombinasyonunun etkisini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada kolistin ve tigesiklin kombinasyon tedavisi kolistin veya tigesiklin monoterapisine üstün bulunmamıştır [223]. Albur ve ark. NDM-1 üreten *Enterobacteriaceae*'ya karşı tigesiklin ve kolistin kombinasyonunun time-kill yöntemine göre test edilen konsantrasyonlarda herhangi bir bakterisidal fayda sağlamadığını göstermişlerdir [224]. Bizim çalışmamızda OXA-48+NDM üreten suşlarda bu oran %50 sinerji, %50 additivite şeklinde bulunmuştur. Pournaras ve ark. time-kill yöntemi ile tigesiklin ve kolistin kombinasyonunu KPC üreten 8 klinik suşa (4 *K. pneumoniae* , 2 *Escherichia coli* , 1 *Enterobacter cloacae* ve 1 *Serratia marcescens*) karşı test etmişlerdir. Bu çalışmada tigesiklin + kolistin, çoğu zaman aralığında ve konsantrasyonda tüm suşlara karşı bakterisidal ve tüm suşlara karşı 24 saate kadar 4x MİK'te sinerjik bulunmuştur [225]. Çalışmamızda bu araştırmayla benzer şekilde 1 OXA-48+KPC üreten suшта kolistin-tigesiklin kombinasyonunda sinerji saptanmıştır.

Literatürde nispeten az sayıda kolistin-tigesiklin kombinasyonunu araştıran çalışmaya ulaşabildik. Bu durum bakteriyostatik ve bakterisidal ilaçların kombinasyonunda antagonizma endişesinden kaynaklanıyor olabilir. Ancak terapötik seçeneklerin çok sınırlı olduğu durumlarda, sıra dışı ve geleneksel olmayan kombinasyonların tercih edilmesinin faydalı olabileceğini ve kolistin ile tigesiklin kombinasyonunun çok ilaca dirençli *Enterobacteriaceae*'da karbapenemlerin aşırı kullanımını önleyebileceğini düşünüyoruz. Tigesiklin-kolistin kombinasyonunda elde ettiğimiz yüksek sinerji oranı KDKp suşlara karşı klinisyenler için iyi bir alternatif seçenek olabilir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 21 adet çoklu ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile suşların %85,7'si seftazidim-avibaktama duyarlı olarak saptandı. Kocaeli'den bildirilen retrospektif bir çalışmada 2017-2021 tarihleri arasında toplanan karbapenem dirençli 709 *Klebsiella pneumonia* izolatında seftazidim/avibaktamın duyarlılık oranı %77,5 olarak bulunmuştur [226]. 2022 yılında YBÜ'den izole edilen *Klebsiella pneumonia* suşlarının değerlendirildiği bir başka çalışmada suşların %95,7'si (132/138) seftazidim/avibaktama duyarlı bulunmuştur [227]. 2023 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise 37 *K. pneumoniae* izolatının 31'i (%83,7) seftazidim/avibaktama duyarlı bulunmuştur [228]. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerin literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Dikkat çekici bir şekilde NDM üreten 3 suшта seftazidim/avibaktam direnci saptanırken 1 suşun duyarlı olduğu görüldü. Literatüre bakıldığında bir çalışmada fare uyluk enfeksiyonu modelinde NDM metallo-beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae*'ya karşı seftazidim-avibaktam etkinliği incelenmiştir. Seftazidim-avibaktam rejimi beş NDM üreten suşa karşı da in vivo aktivite göstermiştir. [229]. NDM üreten izolatlara karşı seftazidim-avibaktamın beklenmedik in vivo aktivitesinin kesin mekanizmasının belirsizdir ancak bu fenomenin daha iyi anlaşılması için ileri araştırmalar gerekmektedir.

Literatürde kolistin-seftazidim/avibaktam kombinasyonunun sinerjistik etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar mevcuttur. Seftazidim-avibaktam 2015 yılında FDA tarafından klinik kullanım için onaylanan Sınıf A (blaKPC, blaGSBL), sınıf C (blaAmpC), sınıf D (blaOXA) beta-laktamazlara sahip izolatlara karşı in vitro ve in vivo aktivite gösteren ve KRE enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan nispeten yeni bir antibiyotiktir. Polimiksinler ise dış hücre zarına hasar vererek etki gösteren bir bakterisidal ilaç sınıfıdır. Kolistin-seftazidim/avibaktam kombinasyonu seftazidim-avibaktam gibi ilaçların transpeptidaz enzimlerine ve diğer hücresel hedeflere daha etkili bir şekilde ulaşmasını sağlayabilmektedir [230].

Çalışmamızda nispeten yeni bir antibiyotik olan seftazidim/avibaktamın kombinasyon halinde kullanımını araştırma fırsatı bulduk. Tüm suşlara bakıldığında kolistin ile seftazidim/avibaktam kombinasyonunda çoğunlukla sinerjik ve additif etki

saptanmıştır. (21 KDKp izolatının 11'inde [%52,3] sinerji, 9'unda [%42,8] additif etki, 1'inde [%4,7] indifferans etki). Hiçbir suşta antagonizma saptanmamıştır.

2024 yılında Çin'den bildirilen bir çalışmada 59 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı kolistin dahil çeşitli antibiyotiklerin seftazidim-avibaktam ile kombinasyonlarının sinerjistik etkinliği dama tahtası yöntemi ile belirlenmiştir. KPC üreten suşlarda (n=22) kolistin-seftazidim/avibaktam kombinasyonunda suşların tamamı, karbapenemaz üretmeyen suşlarda (n=11) suşların tamamı, NDM üreten suşların (n=14) tamamı ilgisiz (irrelevant) bulunmuş olup IMP üreten suşların (n=12) 10 tanesi ilgisiz ve 2 tanesi sinerjik bulunmuştur. Ancak bu çalışmada FIKI $\leq 0,5$ sinerjik, $0,5 < \text{FIKI} \leq 4$ ilgisiz (irrelevant) ve $\text{FIKI} > 4$ antagonistik olarak baz alınmıştır. Additif/kısmi sinerji bu nedenle daha az tespit edilmiş olabilir [5]. Ülkemizde Köle ve ark. 42 KDKp izolatında seftazidim/avibaktam, meropenem ve kolistin antibiyotiklerinin in vitro etkileşimlerini dama tahtası ve time-kill yöntemleri ile değerlendirmiştir. İzolatların seftazidim/avibaktam ve kolistin kombinasyonunda %97,6'sında sinerjik etki tespit etmişlerdir. Bu sinerji oranı verilerimize göre yüksek kalmaktadır [210].

Öte yandan çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon ile 18 suş seftazidim/avibaktam duyarlı bulunmuştur. Bu suşların kolistin-seftazidim/avibaktam kombinasyonunda 11'i (%61,1) sinerjik, 7'si (%38,8) ise additif bulunmuştur. Tüzemen ve ark.'nın bir çalışmasında dama tahtası agar dilüsyon yöntemiyle bakılan kolistin ve seftazidim/avibaktam kombinasyonunun sonuçları incelendiğinde her iki antibiyotiğe de dirençli suşların %33,3'ünde sinerjistik etki buna karşılık, seftazidim/avibaktama duyarlı ve kolistine dirençli suşların %95,3'ünde sinerjistik etkiler gözlenmiştir [231]. Çalışmamızda bu alt grupta suşların seftazidim-avibaktam duyarlı olması sonuçları etkilemiş olabilir.

Sonuçlar direnç paternleriyle birlikte değerlendirildiğinde kolistin ve seftazidim/avibaktam kombinasyonunda sadece OXA-48 pozitif olan 16 suşun 10'unda (%62,5) ve OXA-48+ KPC pozitif olan 1 suşta (%100) sinerjizm saptanırken, OXA-48+NDM pozitiflerde %75 additivite, %25 indifferan etkileşim saptanmıştır. OXA-48+NDM grubunda sinerjizm saptanmama sebebinin seftazidim-avibaktamın metallo-beta-laktamazlara karşı etki göstermemesinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Literatüre bakıldığında Köle ve ark.'nın çalışmasında OXA-48+NDM pozitif suşlarda

kolistin ve seftazidim/avibaktam kombinasyonunun in vitro olarak sinerjizm gösterme potansiyelinin yüksek olduğu vurgulanmıştır [210]. Kara ve ark.'nın time-kill yöntemi kullanarak yaptıkları bir çalışmada seftazidim/avibaktamın kolistin kombinasyonu ile anlamlı sinerjistik etkileşim 1xMIC'te 3/4 *K. pneumoniae* suşu için gösterilmiştir ve suşların tamamı OXA-48 karbapenemaz için pozitif saptanmıştır [232]. Çin'den bildirilen bir araştırmada 4 adet OXA-48 üreten *K. pneumoniae* suşunda seftazidim/avibaktam-kolistin kombinasyonu time kill yöntemi ile değerlendirilmiş, 3/4 suşta 1xMIC'te anlamlı sinerji tespit edilmiştir. Yazarlar kolistine dirençli izolatın (KP-1) da bu grupta olduğunu belirtmiş ve kolistine dirençli suşların tedavisinde kombinasyonların önemli etkileri olabileceğini vurgulamıştır [220]. KPC-3 üreten 4 adet çoklu ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae*'ya karşı time kill metodu kullanarak seftazidim/avibaktam ve kolistin arasındaki zaman içindeki etkileşimi karakterize eden bir başka çalışmada sonuçlar kombinasyonun potansiyel faydasını desteklemektedir [233]. Çalışmamızda OXA-48+KPC üreten suşta da benzer şekilde sinerji saptanmıştır. Seftazidim/avibaktam-kolistin kombinasyonunda sinerjik ve additif etkiler birlikte değerlendirildiğinde dirençli KDKp enfeksiyonlarında tedavi seçeneği olarak düşünülebilir.

Çok ilaca dirençli *Klebsiella pneumonia* suşlarında kolistin ve meropenem kombinasyonları sıklıkla tercih edilmektedir ve literatürde in-vitro sinerjistik etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda meropenem ve kolistin kombinasyonunda sinerji 6 (%28,5) suşta, indiferas etki 3 (%14,2) suşta görülürken hiçbir suşta antagonizma saptanmamıştır. Araştırmamızda tüm kombinasyonlarda additif etkileşim en yüksek kolistin ile meropenem kombinasyonunda, 12 (%57,1) suşta bulunmuştur. Zusman ve ark. tarafından 39 yayın ve 15 konferans bildirisinin dahil edildiği bir meta-analizde, time kill metodu ile *Klebsiella pneumoniae* için %44 (95% CI, %30 ila %59) oranında sinerji gösterilmiştir ve antagonizma düşük oranda görülmüştür [234]. Adaleti ve ark. meropenem ve kolistin kombinasyonunda 10 adet *K. pneumoniae* için %10 sinerji %20 parsiyel sinerji, %60'ında indiferas etkileşim saptamışlardır. Bu çalışmada değerlendirilen suşların tamamının bizim çalışmamızla benzer şekilde meropenem ve kolistin dirençli olduğu ancak sinerji ve additif etkileşim oranlarımızın daha yüksek olduğu görülmektedir [235]. Köle ve ark. 42 *K. pneumoniae* izolatında meropenem ve kolistin kombinasyonunu dama tahtası yöntemi ile değerlendirdikleri çalışmada %50 sinerji bildirmişlerdir [210] Erdem ve

ark. ise 10 *K. pneumoniae* izolatu üzerinde meropenem ve kolistin kombinasyonu ile yaptıkları çalışmada dama tahtası yöntemine göre 7/10 ve zamana bağlı öldürme aktivitesinde 10/10 oranında sinerji elde etmişlerdir [236]. Bir başka çalışmada meropenem ve kolistin kombinasyonunun *Klebsiella pneumoniae* üzerindeki etkisi dama tahtası yöntemi ile değerlendirildiğinde 25 izolatu 14'ü sinerji gösterirken (%56) 11 izolatta additif/ilgisizlik sonuçları görüldü (%44). Ancak bu çalışmada $FICI \leq 0,5$ sinerjik, $0,5 < FICI \leq 4$ additif veya indiferans ve $FICI > 4$ antagonistik olarak baz alınmıştır. Additif/indiferans etkileşim bu nedenle daha fazla oranda edilmiş olabilir [237]. İran'dan bildirilen bir çalışmada KDKp olgularından alınan 21 izolat meropenem ve kolistin için istatistiksel olarak anlamlı sinerji potansiyeli göstermiştir [238].

Çalışmamızda meropenem-kolistin kombinasyonu için OXA-48+NDM pozitif 4 suşun 3'ünde (%75) indiferansiyel etkileşim, 1'inde (%25) ise additif etkileşim saptanmıştır. Erdem ve ark. 7 adet OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* izolatında dama tahtası testi ile izolatların %86'sında meropenem-kolistin kombinasyonunda sinerjizm gördüklerini bildirmişlerdir. OXA-48+NDM-1 pozitif bir izolatta dama tahtası ve zamana bağlı öldürme testinde meropenem-kolistin arasında sinerjizm tespit etmişlerdir [236]. Köle ve ark. dama tahtası yöntemi ile değerlendirdikleri meropenem+kolistin kombinasyonunda OXA-48+NDM pozitif 5 suşun 3'ünde (%60) sinerji, 1'inde (%20) additif, 1'inde (%20) ise indiferansiyel etkileşim saptamışlardır. OXA-48+KPC pozitif 3 suşun 2'sinde (%66) sinerji, 1'inde (%33) ise additif etki bulmuşlardır [210]. Krishnappa ve ark. 105 *Klebsiella pneumonia* izolatını kolistin ve meropenem sinerjisi açısından test etmiş ve genel olarak, izolatların %34'ünde (105'te 36) sinerji gözlenmiştir. Kolistine duyarlı 100 izolatu 35'inde (%35) ve kolistine dirençli 5 izolatu 1'inde (%20) sinerji gösterilmiştir. Kolistin dirençli gruptaki sinerji oranları çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Direnç gen dağılımına bakıldığında ise NDM-1 90 izolatta (%86) en yüksek oranda, OXA-48 ise 46 izolatta (%44) tespit edilmiştir [239]. Laishram ve ark.'nın meropenem ve kolistin kombinasyonunun dama tahtası testi ile değerlendirdikleri ve karbapenemaz üretimi ile ilişkilendirdikleri bir çalışmada çalışmamızla benzer şekilde 50 *Klebsiella pneumonia* suşunun 14'ünde (%28) sinerji saptamışlardır. NDM üretimi kolistin ile meropenem kombinasyonunun sinerjisi ile daha iyi bir korelasyon göstermiştir (%68.8) [240]. Brennan-Krohn ve ark.'nın çalışmasında tıpkı çalışmamızda olduğu gibi NDM pozitif *Klebsiella*

pneumonia izolatlarında dama tahtası ile meropenem ve kolistin kombinasyonunda sinerji saptanmadığı bildirilmiştir [241].

Elde etmiş olduğumuz verilerle kolistin ve meropenem kombinasyonunda saptanan yüksek additif etkiden dolayı, ciddi KDKp enfeksiyonlarında bir tedavi seçeneği olarak akılda tutulması gerektiği kanaatindeyiz.

Literatürde trimetoprim/sulfametoksazol ile kolistin kombinasyonu gibi geleneksel olmayan kolistin kombinasyonlarının sinerji potansiyeli ve bakterisidal aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Bu kombinasyonda sinerjik etki, iki antibiyotığın farklı etki mekanizmaları ile açıklanabilir; kolistin bakteriyel hücre zarına hasar verirken, trimetoprim/sulfametoksazol folat sentezini inhibe etmektedir. Çalışmamızda trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonunda 10 (%47,6) suşta additif etkileşim, 8 suşta (%38) sinerji, 3 (%14,2) suşta indifferans etkileşim görüldü. Hiçbir suşta antagonizma saptanmadı. Fransa'da yapılan bir çalışmada time-kill yönteminde kolistin ve trimetoprim-sülfametoksazolün 0,25x ve 0,5x MİK'de *K. pneumoniae* ATCC 700603'ün kolistine dirençli bir türevi olan KpM1'e karşı sinerji ve bakterisidal aktiviteleri gösterilmiştir. Ancak kolistin duyarlı, trimetoprim/sulfametoksazol dirençli Kp3 ve Kp4 suşlarında sinerji saptanmamıştır [242]. Simmons ve ark.'nın çalışmasında disk difüzyon ve replikasyon plaka yöntemi kullanılarak içlerinde *Klebsiella aerogenes*'in de bulunduğu çeşitli Gram negatif bakteriler üzerinde kolistin ile trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonu değerlendirilmiştir. Bu ilaç kombinasyonu, test edilen 72 organizmanın 66'sında sinerjistik etki göstermiştir (14 *Klebsiella aerogenes* suşunun 12'sinde) [243]. Ancak bu çalışmada sinerjistik etki gözlenen *Klebsiella* suşlarının 14'ünün kolistin ve trimetoprim, 8'inin ise sülfametoksazol duyarlı olması dikkat çekicidir. Çalışmamızdaki tüm suşların kolistin ve trimetoprim/sulfametoksazol dirençli olması sinerji sonuçlarımızın farklı çıkmasına neden olmuş olabilir.

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi non-fermenter suşlarda kolistin ile trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonunun in vitro sinerjik etkili olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur [243-246].

Hem trimetoprim hem de sülfametoksazole karşı direnç çoğunlukla hedef bölge modifikasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bu durum kolistin içeren

kombinasyonlardaki sinerjiye dış membran permeabilite artışının aracılık ettiği düşünüldüğünde trimetoprim-sülfametoksazol ve kolistin arasında görülen düşük sinerji oranını açıklayabilir [247].

Çalışmamızda hiç antagonizma saptanmaması ve sinerji/additivite birlikte değerlendirildiğinde %85,7'lik bir oran (18/21 suş) elde edilmiş olması kolistin-trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonunun çok ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae* üzerinde potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda kolistin ile gentamisin kombinasyonunda sinerji oranları en düşük (4 suşta [%19]) saptanmıştır. Bununla birlikte 8 (%38) suşta additif etkileşim, 8 (%38) suşta indifferans etki, 1 (%4,7) suşta ise antagonizma tespit edilmiştir. Bununla birlikte kolistin-gentamisin kombinasyonunun FIKI ortalaması istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,005$). İndiferansiyel/antagonist olanların ise kolistin-gentamisin grubunda olma oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,001$). Literatürde kolistin ile aminoglikozidlerin kombinasyonlarının sinerjistik etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Ontong ve ark.'nın bir çalışmasında kolistin dirençli 11 *Klebsiella pneumoniae* izolatı kolistin ve gentamisin kombinasyonu açısından damatahtası yöntemiyle değerlendirilmiş, 8/11 suşta (%72,72) sinerji saptanmıştır [248]. Yu ve ark.'nın bir çalışmasında KDKp suşlarında kolistin-amikasin ve kolistin-meropenem kombinasyonu damatahtası yöntemi ile araştırılmış ve test edilen 39 KDKp izolatında kolistin-amikasin kombinasyonunda %65 sinerjistik ve %3,25 additif etki saptanmıştır. Ancak seçilen izolatların %97,5'inin amikasinine duyarlı olması çalışma sonuçlarını etkilemiş olabilir [211]. Brennan-Krohn ve ark.'nın çalışmasında 20 adet kolistin dirençli *Enterobacteriaceae* izolatında dama tahtası yöntemi ile kolistin ve çeşitli antibiyotiklerin sinerjik etkileri değerlendirilmiştir. Tüm suşlarda kolistin-amikasin kombinasyonunda %15, kolistin-apramisin kombinasyonunda %10 oranında sinerji elde edilmiştir. Bu oranlar çalışmamızla benzer bulunmuştur[241].

Çalışmamızda antagonizmanın görüldüğü tek kombinasyon kolistin-gentamisin olmuştur ve antagonizmanın tespit edilmesi klinik sonuçları olumsuz etkileyebileceğinden tedavi sürecinde dikkatli değerlendirmeler yapılması gerekir. *Enterobacteriaceae*'da aminoglikozidlere direnç genellikle aminoglikozid değiştirici enzimlerden kaynaklanır ve hidrofilik aminoglikozid grubu antibiyotikler aktif taşıma

yoluyla Gram negatif bakteri hücre duvarına girebilir. Bu nedenle mekanizmanın dış zar geçirgenliğinden etkilenmemesi beklenebilir [247]. Ayrıca, bu iki ajanın nefrotoksik etkileri olması, klinik uygulama alanında sınırlamalara neden olabileceğinden kolistin-gentamisin kombinasyonunun çoklu ilaç dirençli *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonlarında alternatif olarak ilk planda tercih edilmemesi gerektiğini düşünüyoruz.

5.1. Tezin Kısıtlılıkları

- Çalışmamıza yaklaşık 3 yıllık bir dönemde 21 suş dahil edilebilmiştir. Suş sayısının nispeten az olması çalışma sonuçlarını etkileyebilir.
- Çalışmaya dahil etmiş olduğumuz suşların birbirleriyle olan klonal ilişkisi araştırılamamıştır.
- Çalışmamızda antibiyotiklerin kombinasyonlarının etkinliği sadece dama tahtası (checkerboard) yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. Dama tahtası yönteminde çapraz kontaminasyon riski artmaktadır. Bir diğer sorun, testi yorumlamak için literatürde dört farklı yöntem bulunmasıdır [249]. Bunlar aynı zamanda bireysel yorumlamaya göre de farklılık gösterebilmektedir.
- Deneyler dama tahtası (checkerboard) yöntemi ile gerçekleştirildiğinden sonuçlar etkileşim türünün konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değişimini gösterememiştir. Bu nedenle, etkileşimi belirli bir zamanda değerlendiren dama tahtası metodolojisi yetersizdir. Time-kill yöntemi PK/PD modellemesiyle beklenen etkileşimi karakterize etmeye yardımcı olabilir [233]. Birlikte çalışılması faydalı olabilecek ve in vitro sinerjinin tespitinde güvenilir bir yöntem olan time kill yöntemi çalışma bütçesinin kısıtlılığı ile birlikte zaman alıcı ve yoğun emek gerektirmesi nedeniyle çalışılamamıştır.
- In vitro çalışmalar kolistin kombinasyon tedavisiyle klinikte sık karşılaşılan yan etkiler olan nefrotoksisite ve nörotoksisiteyi inceleyememektedir.

6. SONUÇ

Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumonia* suşları son yıllarda dünya çapında artan bir tehdit oluşturmaktadır. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ve risk faktörleri olan hastalarda yüksek mortalite ve morbidite oranları görülebilmektedir. Giderek artan ilaç direnci bu noktada klinisyenleri çaresiz bırakmakta ve bir seçenek olarak kombinasyon tedavilerine yönlendirmektedir. Bu aşamada karbapenemaz direnç genlerinin bilinmesi optimal tedavi düzenlenmesi ve yerel direnç verilerinin oluşturulmasında oldukça önem arz etmektedir.

Hastanemizde en sık görülen karbapenemaz türünün OXA-48 (%100) olduğu, ayrıca OXA-48+NDM (%19) tipi karbapenemaz taşıyan suşların varlığı ve oranlarının arttığı tespit edildi. Yalnızca 1 suшта (%4,7) OXA-48+KPC birlikteliği saptandı. Karbapenem direncinin saptandığı suşlarda moleküler paterninin de bilinmesinin özellikle riskli hasta gruplarında doğru ve etkin tedavi için yol gösterici olacağını düşünüyoruz. Ek olarak, hareketli gen elemanları (plazmid, transpozon vb) ile yüksek yayılma kabiliyetleri olan direnç genlerinin diğer bakteri türlerine geçiş olasılığı unutulmamalıdır. Dirençli izolatlarda birlikte bulunan tüm direnç gen ve mekanizmalarının tanımlanması için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda en yüksek sinerji kolistin-tigesiklin kombinasyonunda (%80,9), ikinci olarak kolistin-seftazidim-avibaktam kombinasyonunda (%52,3) saptanmıştır. En yüksek additif etki ise kolistin-meropenem kombinasyonunda (%57,1) görülmüştür. Antagonizma ise yalnızca kolistin-gentamisin kombinasyonunda 1 suшта tespit edilmiştir.

Verilerimize göre kolistin-tigesiklin ve kolistin-seftazidim-avibaktam kombinasyonlarının kolistin dirençli KDKp izolatlarına karşı geçerli ve etkili tedavi seçenekleri olabileceğini düşünmekteyiz. Kolistin-gentamisin kombinasyonunun ise potansiyel antagonizma ve toksisite nedeniyle ilk planda tercih edilmemesini öneriyoruz.

In vitro sinerji çalışmamız, klinisyenler için tedavisi oldukça zor ve sınırlı olan izolatlarla karşı antibiyotik kombinasyonlarında yol göstermek açısından umut vericidir. Ancak standart tedavi olarak önerilebilmesi için daha geniş bir suş yelpazesi ile daha ileri in vitro çalışmaların yanı sıra enfeksiyonların tedavisindeki etkinliğini belirlemek için *in vivo* klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Koneman EW, A.S., Janda WM, Schreckenberger P, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5 ed. 1997: Lippincott-Raven Publishers. 171-241.
2. Gülen, D., et al., *Curcumin-meropenem synergy in carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae curcumin-meropenem synergy*. Iran J Microbiol, 2021. **13**(3): p. 345-351.
3. *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual epidemiological report for 2022*. 17 Nov 2023.
4. European Centre for Disease, P., Control, and E. World Health Organization. Regional Office for, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data*. 2022, Copenhagen: World Health Organization. Regional Office for Europe.
5. Wu, Y., et al., *Effect of ceftazidime-avibactam combined with different antimicrobials against carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr, 2024. **12**(6): p. e0010724.
6. Patel, G., et al., *Outcomes of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Infection and the Impact of Antimicrobial and Adjunctive Therapies*. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2008. **29**(12): p. 1099-1106.
7. Davarcı, İ., E.K. Mücahide, and F. Zengin, *Karbapenemaz Üreten Klebsiella pneumoniae Suşlarında Karbapenem İnaktivasyon Testi ve Modifiye Hodge Testinin Karşılaştırılması: KLİMİK Journal*. KLİMİK Dergisi, 2018. **31**(3): p. 223-226.
8. Kahraman, E.P., et al., *[Investigation of blaOXA-48-like genes in carbapenemase producing Klebsiella spp. isolates]*. Mikrobiyol Bul, 2019. **53**(2): p. 134-143.
9. Rojas, L.J., et al., *Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae: Laboratory Detection and Impact on Mortality*. Clin Infect Dis, 2017. **64**(6): p. 711-718.
10. Kutlu, H.H., et al., *The emergence of Klebsiella pneumoniae sequence type 395 non-susceptible to carbapenems and colistin from Turkey*. Indian J Med Microbiol, 2023. **46**: p. 100419.
11. Carroll KC, H.J., Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell and M.J. TG, Sakanari JA, Jawetz, *Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 27 ed. 2016, Mcgraw-Hill Education, New York, ABD. 231.
12. Topçu A.W, S.G., Doğanay M., *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 4 ed. 2017: Nobel Tıp Kitabevleri. 1853.
13. John E. Bennett MD, R.D.M., / Martin J. Blaser MD, *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9 ed. Enterobacteriaceae species. 2020. 2669.
14. Ma, Y., et al., *Proposal for reunification of the genus Raoultella with the genus Klebsiella and reclassification of Raoultella electrica as Klebsiella electrica comb. nov.* Res Microbiol, 2021. **172**(6): p. 103851.
15. J.P, E. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, LPSN*. Family Enterobacteriaceae 1997; Available from: <https://lpsn.dsmz.de/family/enterobacteriaceae>.

16. Deirdre L. Church , E.W.K., Gail L. Woods , Gary W. Procop , Geraldine S. Hall , Paul C. Schreckenberger , William M. Janda, *Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology*. 7 ed. 2017, Philadelphia. 213.
17. Patrick R. Murray, K.S.R., Michael A. Pfaller, *Murray Medical Microbiology*. 8 ed. 2016, Philadelphia. 253-254.
18. Bilgehan, H., *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. 2006, İzmir: Şafak Matbaacılık.
19. Deirdre L. Church , E.W.K., Gail L. Woods , Gary W. Procop , Geraldine S. Hall , Paul C. Schreckenberger , William M. Janda, *Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology*. 7 ed. 2017, Philadelphia. 499.
20. *National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy Browser*. 2020.
21. Drancourt, M., et al., *Phylogenetic analyses of Klebsiella species delineate Klebsiella and Raoultella gen. nov., with description of Raoultella ornithinolytica comb. nov., Raoultella terrigena comb. nov. and Raoultella planticola comb. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 3): p. 925-932.
22. Ustaçelebi Ş, M.G., İmir T, Cengiz T, Tümbay E, Mete Ö, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1999.
23. Wyres, K.L., M.M.C. Lam, and K.E. Holt, *Population genomics of Klebsiella pneumoniae*. Nature Reviews Microbiology, 2020. **18**(6): p. 344-359.
24. Dong, N., et al., *Klebsiella species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance*. eBioMedicine, 2022. **79**: p. 103998.
25. Von Frisch, A., *Zur aetiologie des rhinoscleroms*. Wien Med Wochenschr, 1882. **32**: p. 969-82.
26. Abel, R., *Bakteriologische studien über Ozaena simplex*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt, 1893. **1**: p. 161-173.
27. Trevisan, V., *Caratteri di alcuni nuovi generi di Batteriacee*. Atti della Accademia Fisio-Medico-Statistica in Milano. Series, 1885. **4**(3): p. 92-107.
28. Trevisan, V., *Sul Micrococco della rabbia e sulla possibilità di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona moricata, se ha contratta l'infezione rabbica*. Rend Ist Lombardo Accad Sci Lett Sez (ser. 2), 1887. **20**: p. 88-105.
29. Topçu A.W, S.G., Doğanay M., *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 4 ed. 2017, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 1870.
30. Deirdre L. Church , E.W.K., Gail L. Woods , Gary W. Procop , Geraldine S. Hall , Paul C. Schreckenberger , William M. Janda, *Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology*. 7 ed. 2017, Philadelphia. 235,269-270.
31. Paczosa, M.K. and J. Mecsas, *Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense*. Microbiol Mol Biol Rev, 2016. **80**(3): p. 629-61.
32. Lee, C.-R., et al., *Antimicrobial Resistance of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017. **7**.
33. Li, B., et al., *Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiology, 2014. **9**(9): p. 1071-1081.
34. Pan, Y.J., et al., *Capsular polysaccharide synthesis regions in Klebsiella pneumoniae serotype K57 and a new capsular serotype*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2231-40.

35. Cryz, S.J., et al., *Seroepidemiology of Klebsiella bacteremic isolates and implications for vaccine development*. Journal of Clinical Microbiology, 1986. **23**(4): p. 687-690.
36. Yeh, K.-M., et al., *Capsular Serotype K1 or K2, Rather than *magA* and *rmpA* , Is a Major Virulence Determinant for *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess in Singapore and Taiwan*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(2): p. 466-471.
37. Mizuta, K., et al., *Virulence for mice of Klebsiella strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types*. Infection and Immunity, 1983. **40**(1): p. 56-61.
38. Holden, V.I. and M.A. Bachman, *Diverging roles of bacterial siderophores during infection*. Metallomics, 2015. **7**(6): p. 986-995.
39. Holden, V.I., et al., *Klebsiella pneumoniae Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia*. mBio, 2016. **7**(5): p. e01397-16.
40. Murphy, C.N., et al., *Role of Klebsiella pneumoniae Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections*. Infection and Immunity, 2013. **81**(8): p. 3009-3017.
41. GÜN, İ. and F.Y. EkİNCİ, *Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam*. Gıda, 2009. **34**(3): p. 165-173.
42. Zhu, J., et al., *Virulence Factors in Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 642484.
43. Bagley, S.T., *Habitat Association of Klebsiella Species*. Infection Control, 1985. **6**(2): p. 52-58.
44. Chang, D., et al., *Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of Klebsiella pneumoniae Infection*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 750662.
45. Fuxench-López, Z. and C.H. Ramírez-Ronda, *Pharyngeal flora in ambulatory alcoholic patients: prevalence of gram-negative bacilli*. Arch Intern Med, 1978. **138**(12): p. 1815-6.
46. Russo, T.A. and C.M. Marr, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Clinical Microbiology Reviews, 2019. **32**(3): p. 10.1128/cmr.00001-19.
47. Lin, Y.-T., et al., *Seroepidemiology of Klebsiella pneumoniae colonizing the intestinal tract of healthy chinese and overseas chinese adults in Asian countries*. BMC Microbiology, 2012. **12**(1): p. 13.
48. Podschun, R. and U. Ullmann, *Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(4): p. 589-603.
49. Kloos, W.E. and M.S. Musselwhite, *Distribution and Persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin*. Applied Microbiology, 1975. **30**(3): p. 381-395.
50. Rosebury, T., *Microorganisms indigenous to man*. 1962.
51. Pollack, M., et al., *Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients*. Lancet, 1972. **2**(7779): p. 668-71.
52. Asensio, A., et al., *Outbreak of a Multiresistant Klebsiella pneumoniae Strain in an Intensive Care Unit: Antibiotic Use as Risk Factor for Colonization and Infection*. Clinical Infectious Diseases, 2000. **30**(1): p. 55-60.

53. Gorrie, C.L., et al., *Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of Klebsiella pneumoniae Infection in Intensive Care Patients*. Clinical Infectious Diseases, 2017. **65**(2): p. 208-215.
54. Tsay, R.W., et al., *Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial Klebsiella pneumoniae infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection*. Arch Intern Med, 2002. **162**(9): p. 1021-7.
55. Meatherall, B.L., et al., *Incidence, risk factors, and outcomes of Klebsiella pneumoniae bacteremia*. Am J Med, 2009. **122**(9): p. 866-73.
56. Szilágyi, E., et al., *Risk factors and outcomes for bloodstream infections with extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae ; Findings of the nosocomial surveillance system in Hungary*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2009. **56**(3): p. 251-262.
57. Stamm, W.E., R.A. Weinstein, and R.E. Dixon, *Comparison of endemic and epidemic nosocomial infections*. The American journal of medicine, 1981. **70**(2): p. 393-397.
58. Montgomerie, J.Z., *Epidemiology of Klebsiella and hospital-associated infections*. Rev Infect Dis, 1979. **1**(5): p. 736-53.
59. Siu, L.K., et al., *Klebsiella pneumoniae liver abscess: a new invasive syndrome*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(11): p. 881-7.
60. Fung, C.P., et al., *A global emerging disease of Klebsiella pneumoniae liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis?* Gut, 2002. **50**(3): p. 420-4.
61. Sobirk, S., *Primary Klebsiella pneumoniae Liver Abscess with Metastatic Spread to Lung and Eye, a North-European Case Report of an Emerging Syndrome*. The Open Microbiology Journal, 2010. **4**(1): p. 5-7.
62. Kuramochi, G., et al., *Klebsiella pneumoniae liver abscess associated with septic spinal epidural abscess*. Hepatol Res, 2005. **31**(1): p. 48-52.
63. Hu, B.S., et al., *Necrotizing Fasciitis Associated with Klebsiella pneumoniae Liver Abscess*. Clinical Infectious Diseases, 1999. **29**(5): p. 1360-1361.
64. Patel, P.K., T.A. Russo, and A.W. Karchmer, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Open Forum Infectious Diseases, 2014. **1**(1): p. ofu028-ofu028.
65. Cheng, D.L., et al., *Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with Klebsiella pneumoniae bacteremia in diabetic patients*. Arch Intern Med, 1991. **151**(8): p. 1557-9.
66. McCabe, R., L. Lambert, and B. Frazee, *Invasive Klebsiella pneumoniae Infections, California, USA*. Emerging Infectious Diseases, 2010. **16**(9): p. 1490-1491.
67. Rivero, A., et al., *K2 Serotype *Klebsiella pneumoniae* Causing a Liver Abscess Associated with Infective Endocarditis*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. **48**(2): p. 639-641.
68. Mandell, L.A., et al., *Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults*. Clinical Infectious Diseases, 2007. **44**(Supplement 2): p. S27-S72.
69. Yu, W.L. and Y.C. Chuang, *Clinical features, diagnosis, and treatment of Klebsiella pneumoniae infection*. Calderwood, Up To Date, 2015.
70. Topçu A.W, S.G., Doğanay M., *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 4 ed. 2017, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 1871.

71. Lin, Y.-T., et al., *Community-onset Klebsiella pneumoniae pneumonia in Taiwan: clinical features of the disease and associated microbiological characteristics of isolates from pneumonia and nasopharynx*. *Frontiers in Microbiology*, 2015. **9**.
72. Okada, F., et al., *Clinical and pulmonary thin-section CT findings in acute Klebsiella Pneumoniae pneumonia*. *European Radiology*, 2009. **19**(4): p. 809-815.
73. Lin, S.H., et al., *Sputum bacteriology in hospitalized patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in Taiwan with an emphasis on Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa*. *Respirology*, 2007. **12**(1): p. 81-7.
74. Wang, J.L., et al., *Changing Bacteriology of Adult Community-Acquired Lung Abscess in Taiwan: Klebsiella pneumoniae versus Anaerobes*. *Clinical Infectious Diseases*, 2005. **40**(7): p. 915-922.
75. Tumbarello, M., et al., *Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* : Risk Factors, Molecular Epidemiology, and Clinical Outcome*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. **50**(2): p. 498-504.
76. Grupper, M., A. Kravtsov, and I. Potasman, *Emphysematous cystitis: illustrative case report and review of the literature*. *Medicine (Baltimore)*, 2007. **86**(1): p. 47-53.
77. Huang, J.J. and C.C. Tseng, *Emphysematous pyelonephritis: clinicoradiological classification, management, prognosis, and pathogenesis*. *Arch Intern Med*, 2000. **160**(6): p. 797-805.
78. Chang, S.W., et al., *Klebsiella pneumoniae renal abscess*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*, 2000. **63**(10): p. 721-8.
79. Bae, G.B., et al., *Emphysematous prostatic abscess due to Klebsiella pneumoniae: report of a case and review of the literature*. *J Korean Med Sci*, 2003. **18**(5): p. 758-60.
80. Tai, H.C., *Emphysematous prostatic abscess: a case report and review of literature*. *J Infect*, 2007. **54**(1): p. e51-4.
81. Kuo, P.H., et al., *Emphysematous prostatitis caused by Klebsiella pneumoniae*. *J Formos Med Assoc*, 2007. **106**(1): p. 74-7.
82. Alsaif, H.S., et al., *CT appearance of pyogenic liver abscesses caused by Klebsiella pneumoniae*. *Radiology*, 2011. **260**(1): p. 129-38.
83. Brook, I. and E.H. Frazier, *Microbiology of liver and spleen abscesses*. *J Med Microbiol*, 1998. **47**(12): p. 1075-80.
84. Lee, C.H., et al., *Splenic abscess in southern Taiwan*. *J Microbiol Immunol Infect*, 2004. **37**(1): p. 39-44.
85. Sundaram, V., V. Manne, and A.M. Al-Osaimi, *Ascites and spontaneous bacterial peritonitis: recommendations from two United States centers*. *Saudi J Gastroenterol*, 2014. **20**(5): p. 279-87.
86. Korinek, A.M., et al., *Risk factors for adult nosocomial meningitis after craniotomy: role of antibiotic prophylaxis*. *Neurosurgery*, 2006. **59**(1): p. 126-33; discussion 126-33.
87. van de Beek, D., et al., *Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(18): p. 1849-59.
88. Chang, C.M., et al., *Klebsiella pneumoniae fascial space infections of the head and neck in Taiwan: emphasis on diabetic patients and repetitive infections*. *J Infect*, 2005. **50**(1): p. 34-40.

89. Topçu A.W, S.G., Doğanay M., *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 4 ed. 2017, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 243-359.
90. Öztürk, R. and Y. Aktuğlu, *Akılci antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar*. 2002: İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi komisyonu.
91. Baydur, H., T. GÜNDÜZ, and I. Mumcuoglu, *Escherichia, Klebsiella ve Proteus suşlarında genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu*. ANKEM Dergisi, 2004. **18**(1): p. 9-11.
92. Yıldız, İ., M.A. Varkal, and E. Ünüvar, *Cephalosporin Antibiotics and Antibiotic Resistance in Three Decades*. Tuberculin skin test in children, 2015.
93. Ghamrawi, R.J., E. Neuner, and S.J. Rehm, *Ceftaroline fosamil: A super-cephalosporin?* Cleveland Clinic Journal of Medicine, 2015. **82**(7): p. 437-444.
94. Stein, R.A., R.M. Goetz, and G.M. Ganea, *Ceftobiprole: a new beta-lactam antibiotic*. Int J Clin Pract, 2009. **63**(6): p. 930-43.
95. John E. Bennett MD, R.D.M., / Martin J. Blaser MD, *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9 ed. Vol. 1. 2020. 211-459.
96. Liu, C.-Y., et al., *Increasing Trends in Antimicrobial Resistance among Clinically Important Anaerobes and <i>Bacteroides fragilis</i> Isolates Causing Nosocomial Infections: Emerging Resistance to Carbapenems*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008. **52**(9): p. 3161-3168.
97. Gin, A., et al., *Piperacillin-tazobactam: a beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2007. **5**(3): p. 365-83.
98. Zhanel, G.G., et al., *Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination*. Drugs, 2013. **73**(2): p. 159-77.
99. Sanz Herrero, F., *Ceftazidime-avibactam*. Rev Esp Quimioter, 2022. **35 Suppl 1**(Suppl 1): p. 40-42.
100. Matesanz, M. and J. Mensa, *Ceftazidime-avibactam*. Rev Esp Quimioter, 2021. **34 Suppl 1**(Suppl1): p. 38-40.
101. Karaiskos, I., et al., *The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How*. Front Public Health, 2019. **7**: p. 151.
102. Suay-García, B. and M.T. Pérez-Gracia, *Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections*. Antibiotics (Basel), 2019. **8**(3).
103. Hellinger, W.C. and N.S. Brewer, *Imipenem*. Mayo Clin Proc, 1991. **66**(10): p. 1074-81.
104. Parakh, A., S. Krishnamurthy, and M. Bhattacharya, *Ertapenem*. Kathmandu Univ Med J (KUMJ), 2009. **7**(28): p. 454-60.
105. Baldwin, C.M., K.A. Lyseng-Williamson, and S.J. Keam, *Meropenem: a review of its use in the treatment of serious bacterial infections*. Drugs, 2008. **68**(6): p. 803-38.
106. Shah, D. and M. Narang, *Meropenem*. Indian Pediatr, 2005. **42**(5): p. 443-50.
107. Sercan Ulusoy, H.L., Dilek Arman *Gram-negatif Bakteri Enfeksiyonları*. 2012, Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi.
108. Chaves, B.J. and P. Tadi, *Gentamicin*. 2023: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
109. Rigatto, M.H., D.R. Falci, and A.P. Zavascki, *Clinical Use of Polymyxin B*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1145**: p. 197-218.
110. Falagas, M.E., et al., *Fosfomycin*. Clinical Microbiology Reviews, 2016. **29**(2): p. 321-347.

111. Baylan, O., *Fosfomycin: Past, present and future*. Mikrobiyoloji bülteni, 2010. **44**: p. 311-21.
112. AKTAŞ, F., *Antibiyotikler Güncel Durum Özel Sayısı-Sulfonamidler, Trimetoprim ve Trimetoprim/Sulfametoksazol*. Türkiye Klinikleri Enfeksiyon Hastalıkları, 2017. **10**(1): p. 117-120.
113. Topçu A.W, S.G., Doğanay M., *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 4 ed. 2017, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 226-236.
114. Livermore, D.M., *Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact*. Clinical Infectious Diseases, 2003. **36**(Supplement_1): p. S11-S23.
115. Smith HZ, H.C., Kendall B., *Carbapenem-Resistant Enterobacterales*. 2024 January: StatPearls Publishing.
116. Naas, T., L. Dortet, and B. I Iorga, *Structural and functional aspects of class A carbapenemases*. Current drug targets, 2016. **17**(9): p. 1006-1028.
117. Boyd, S.E., et al., *Metallo- β -Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020. **64**(10): p. 10.1128/aac.00397-20.
118. Watanabe, M., et al., *Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(1): p. 147-51.
119. Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel, *Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(10): p. 1791-8.
120. Walsh, T.R., et al., *Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study*. Lancet Infect Dis, 2011. **11**(5): p. 355-62.
121. Hammoudi Halat, D. and C. Ayoub Moubareck, *The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria*. Antibiotics (Basel), 2020. **9**(4).
122. Jousset, A.B., et al., *False-Positive Carbapenem-Hydrolyzing Confirmatory Tests Due to ACT-28, a Chromosomally Encoded AmpC with Weak Carbapenemase Activity from Enterobacter kobei*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2019. **63**(5): p. 10.1128/aac.02388-18.
123. Poirel, L., et al., *Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2004. **48**(1): p. 15-22.
124. Evans, B.A. and S.G.B. Amyes, *OXA β -Lactamases*. Clinical Microbiology Reviews, 2014. **27**(2): p. 241-263.
125. Jean, S.-S., et al., *Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria: Current Epidemics, Antimicrobial Susceptibility and Treatment Options*. Future Microbiology, 2015. **10**(3): p. 407-425.
126. Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann, *OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012. **67**(7): p. 1597-1606.
127. Pitout, J.D., et al., *The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases*. Clinical microbiology reviews, 2019. **33**(1): p. 10.1128/cmr. 00102-19.
128. Sawa, T., K. Kooguchi, and K. Moriyama, *Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance*. Journal of Intensive Care, 2020. **8**(1): p. 13.
129. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995. **39**(6): p. 1211-1233.

130. Bush, K. and G.A. Jacoby, *Updated functional classification of beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(3): p. 969-76.
131. Nazik, H. and B. Öngen, *Türkiye’de plazmit aracılı kinolon direnci*. Ankem Derg, 2010. **24**(1): p. 46-54.
132. Olaitan, A.O., S. Morand, and J.M. Rolain, *Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 643.
133. Caniaux, I., et al., *MCR: modern colistin resistance*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017. **36**(3): p. 415-420.
134. Sari, A.N., et al., *[Results of a multicenter study investigating plasmid mediated colistin resistance genes (mcr-1 and mcr-2) in clinical Enterobacteriaceae isolates from Turkey]*. Mikrobiyol Bul, 2017. **51**(3): p. 299-303.
135. Jain, A., et al., *NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(7): p. 1777-84.
136. Giani, T., et al., *Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(10): p. 3341-4.
137. Poirel, L., et al., *Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of Escherichia coli*. The Lancet Infectious Diseases, 2016. **16**: p. 281.
138. Osei Sekyere, J., et al., *Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods*. J Appl Microbiol, 2016. **121**(3): p. 601-17.
139. Kumar, S., et al., *Identification of a novel UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) from Vibrio fischeri that confers high fosfomycin resistance in Escherichia coli*. Arch Microbiol, 2009. **191**(5): p. 425-9.
140. Falagas, M.E., et al., *Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review*. The Lancet Infectious Diseases, 2010. **10**(1): p. 43-50.
141. Sköld, O., *Sulfonamide resistance: mechanisms and trends*. Drug Resistance Updates, 2000. **3**(3): p. 155-160.
142. Michael, G.B., et al., *Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in Salmonella: an update*. Microbes and Infection, 2006. **8**(7): p. 1898-1914.
143. Mehtap AYDIN, L.N.A., *Karbapenem Dirençli Gram-Negatif Bakteri Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi*. Türkiye Klinikleri-Karbapenem Dirençli Gram - Negatif Bakteri Enfeksiyonları, 2023: p. 8-10.
144. Tesfa, T., et al., *Prevalence and incidence of carbapenem-resistant K. pneumoniae colonization: systematic review and meta-analysis*. Systematic Reviews, 2022. **11**(1): p. 240.
145. Murray, C.J.L., et al., *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis*. The Lancet, 2022. **399**(10325): p. 629-655.
146. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021*. Geneva: World Health Organization; 2021. 2021.
147. Castanheira, M., et al., *Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among Enterobacteriaceae Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. Open Forum Infectious Diseases, 2019. **6**(Supplement_1): p. S23-S33.

148. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023. 2023.
149. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022*. Geneva: World Health Organization; 2022. 2022.
150. Durdu, B., et al., *Mortality markers in nosocomial Klebsiella pneumoniae bloodstream infection*. Springerplus, 2016. **5**(1): p. 1892.
151. Uyanık, A., et al., *KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUŞLARINDA OXA-48 VE ALT TÜREVLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE FENOTİPİK YANSIMA*. ANKEM Dergisi, 2021. **35**(1): p. 1-8.
152. Yesilbag, Z., et al., *Klebsiella pneumoniae Infections in Intensive Care Unit and Risk Factors for Carbapenem Resistance/Yogun Bakim Ünitesinde Klebsiella pneumoniae Enfeksiyonları ve Karbapenem Direncine Etki Eden Risk Faktörleri*. KLİMİK Journal, 2021. **34**: p. 25+.
153. Karampatakis, T., K. Tsergouli, and P. Behzadi, *Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options*. Antibiotics, 2023. **12**(2): p. 234.
154. Coşkun, U. and Y. Dagcioğlu, *Investigation of genotyping and phenotyping characteristics of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates*. An Acad Bras Cienc, 2024. **96**(2): p. e20231322.
155. Samra, Z., et al., *Outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007. **30**(6): p. 525-529.
156. Girmenia, C., A. Serrao, and M. Canichella, *Epidemiology of Carbapenem Resistant Klebsiella pneumoniae Infections in Mediterranean Countries*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2016. **8**(1): p. e2016032.
157. Labarca, J., et al., *KPC-producing Klebsiella pneumoniae, finally targeting Turkey*. New Microbes and New Infections, 2014. **2**(2): p. 50-51.
158. Poirel, L., et al., *Spread of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(5): p. 2929-33.
159. Bahar, G., et al., *Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate from Turkey*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(1): p. 282-3.
160. Yildirim, I., et al., *First detection of VIM-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase*. J Chemother, 2007. **19**(4): p. 467-8.
161. Yong, D., et al., *Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in Klebsiella pneumoniae Sequence Type 14 from India*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(12): p. 5046-5054.
162. Poirel, L., et al., *NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae now in Turkey*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2784-5.
163. Lee, C.R., et al., *Global Dissemination of Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 895.
164. Kilic, A. and M. Baysallar, *The First Klebsiella pneumoniae Isolate Co-Producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey*. Ann Lab Med, 2015. **35**(3): p. 382-3.

165. Epstein, L., et al., *New Delhi metallo- β -lactamase-producing carbapenem-resistant Escherichia coli associated with exposure to duodenoscopes*. Jama, 2014. **312**(14): p. 1447-55.
166. Tsai, W.C., et al., *Antimicrobial treatment of monomicrobial phenotypic carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae bacteremia: Two are better than one*. J Microbiol Immunol Infect, 2022. **55**(6 Pt 2): p. 1219-1228.
167. Roberts, J.A. and J. Lipman, *Editorial commentary: Closing the loop--a colistin clinical study to confirm dosing recommendations from PK/PD modeling*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(12): p. 1727-9.
168. Hirsch, E.B. and V.H. Tam, *Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(6): p. 1119-25.
169. Paul, M., et al., *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine)*. Clinical Microbiology and Infection, 2022. **28**(4): p. 521-547.
170. Tamma, P.D., et al., *Infectious Diseases Society of America 2024 Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections*. Clin Infect Dis, 2024.
171. Fritzenwanker, M., et al., *Treatment Options for Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections*. Dtsch Arztebl Int, 2018. **115**(20-21): p. 345-352.
172. G.Aktaş, *Antibiyotik kombinasyonları ve sinerjistik etkileşimleri*. Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi, 2014: p. 44(2):47-55.
173. Brennan-Krohn, T. and J.E. Kirby, *When One Drug Is Not Enough: Context, Methodology, and Future Prospects in Antibacterial Synergy Testing*. Clin Lab Med, 2019. **39**(3): p. 345-358.
174. Bal, Ç., *Antibiyotik Kombinasyonlarının İn vitro Etkinliğinin Saptanması*. 1999: p. 4(4):219-229.
175. Laishram, S., et al., *An Update on Technical, Interpretative and Clinical Relevance of Antimicrobial Synergy Testing Methodologies*. Indian Journal of Medical Microbiology, 2017. **35**(4): p. 445-468.
176. Chin, N.X., I. Weitzman, and P. Della-Latta, *In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with flucanazole and itraconazole against Candida species and Cryptococcus neoformans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997. **41**(4): p. 850-852.
177. Lorian, V., *Antibiotics In Laboratory Medicine*. 5 ed. 2005: Lippincott Williams & Wilkins.
178. Poirel, L., et al., *Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011. **70**(1): p. 119-23.
179. Garcia, L.S. *Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods*. 2010.
180. Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel, *Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!* Trends Mol Med, 2012. **18**(5): p. 263-72.
181. Çakar, A., et al., *[Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae strains isolated in 2014 in Turkey]*. Mikrobiyol Bul, 2016. **50**(1): p. 21-33.

182. Arıcı, N., et al., *Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae outbreak with monoclonal spread: Evaluation of resistance genes and ceftazidime-avibactam susceptibility*. Indian J Med Microbiol, 2023. **46**: p. 100431.
183. Carrër, A., et al., *Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(3): p. 1369-73.
184. Hortaç İftar, E., H.E. Alışkan, and J.S. Göçmen, *Diverse efficacy of CarbaNP test among OXA-48 carbapenemase producing Enterobacterales in an endemic region*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2021. **68**(1): p. 34-39.
185. Nazik, H., et al., *Carbapenem resistance due to Bla(OXA-48) among ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates in a university hospital, Turkey*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2012. **43**(5): p. 1178-85.
186. Cetinkol, Y., et al., *The investigation of oxacillinase/metallo-beta-lactamase genes and clonal analysis in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae*. Infez Med, 2016. **24**(1): p. 48-53.
187. Bora, G., et al., *The molecular analysis of antibiotic resistance and identification of the aerobic bacteria isolated from pleural fluids obtained from patients*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2022. **26**(19): p. 7236-7244.
188. Erdem, F., O. Oncul, and Z. Aktas, *Characterization of Resistance Genes and Polymerase Chain Reaction-Based Replicon Typing in Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae*. Microb Drug Resist, 2019. **25**(4): p. 551-557.
189. Arabacı, Ç., et al., *Investigation of carbapenemase and mcr-1 genes in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates*. J Infect Dev Ctries, 2019. **13**(6): p. 504-509.
190. Karaman, E., et al., *Characterization of resistance genes and replicon typing in Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2024. **23**(1): p. 19.
191. Ozger, H.S., et al., *Ceftazidime - Avibactam susceptibility among carbapenem-resistant Enterobacterales in a pilot study in Turkey*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2021.
192. Hazirolan, G. and A. Karagöz, *Emergence of carbapenemase-producing and colistin resistant Klebsiella pneumoniae ST101 high-risk clone in Turkey*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2020. **67**(4): p. 216-221.
193. Çalık, Ş., N. Kansak, and S. Aksaray, *Phenotypic detection of carbapenemase production in carbapenem-resistant isolates with the rapid carbapenemase detection method (rCDM)*. J Microbiol Methods, 2022. **200**: p. 106536.
194. Barguigua, A., et al., *First report of a Klebsiella pneumoniae strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco*. Apmis, 2013. **121**(7): p. 675-7.
195. Iraz, M., et al., *Distribution of β -lactamase genes among carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains isolated from patients in Turkey*. Ann Lab Med, 2015. **35**(6): p. 595-601.
196. Guducuoglu, H., et al., *Hospital Outbreak of a Colistin-Resistant, NDM-1- and OXA-48-Producing Klebsiella pneumoniae: High Mortality from Pandrug Resistance*. Microb Drug Resist, 2018. **24**(7): p. 966-972.
197. Can, F., et al., *Impact of the ST101 clone on fatality among patients with colistin-resistant Klebsiella pneumoniae infection*. J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(5): p. 1235-1241.

198. Tekintaş, Y., et al., [Comparison of phenotypic methods and polymerase chain reaction for the detection of carbapenemase production in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates]. *Mikrobiyol Bul*, 2017. **51**(3): p. 269-276.
199. Hosbul, T., et al., *Carbapenem and Colistin Resistant Klebsiella Pneumoniae ST14 and ST2096 Dominated in Two Hospitals in Turkey*. *Clin Lab*, 2021. **67**(9).
200. Ulu, A.C., et al., *Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae at a Turkish centre: Is the increase of resistance a threat for Europe?* *Journal of global antimicrobial resistance*, 2017. **11**: p. 10-16.
201. Alp, E., et al., *Molecular characterization of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in a tertiary university hospital in Turkey*. *Journal of Hospital Infection*, 2013. **84**(2): p. 178-180.
202. Duman, Y., et al., *A silent outbreak due to Klebsiella pneumoniae that co-produced NDM-1 and OXA-48 carbapenemases, and infection control measures*. *Iran J Basic Med Sci*, 2020. **23**(1): p. 46-50.
203. Dalğış, D., et al., [Relationship of Hypervirulent Capsular Genotypes of *Klebsiella pneumoniae* with Antibiotic Susceptibility and Beta-Lactamase Genes]. *Mikrobiyol Bul*, 2023. **57**(1): p. 30-44.
204. Satlin, M.J., et al., *Impact of a Rapid Molecular Test for Klebsiella pneumoniae Carbapenemase and Ceftazidime-Avibactam Use on Outcomes After Bacteremia Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacterales*. *Clin Infect Dis*, 2022. **75**(12): p. 2066-2075.
205. Süzük Yıldız, S., et al., [The Epidemiology of Carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated in 2019 in Turkey]. *Mikrobiyol Bul*, 2021. **55**(1): p. 1-16.
206. Ibik, Y.E., et al., *Evaluating molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible Klebsiella pneumoniae isolates with MLST, MALDI-TOF MS, PFGE*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2023. **22**(1): p. 93.
207. Hoşbul, T., et al., [In Vitro Activity of Ceftazidime-avibactam and Colistin Against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates]. *Mikrobiyol Bul*, 2022. **56**(2): p. 218-229.
208. Taşkın Kafa, A.H., et al., *Molecular diversity of Klebsiella pneumoniae clinical isolates: antimicrobial resistance, virulence, and biofilm formation*. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*: p. 1-17.
209. Genç, S., F. Kolaylı, and E.Y. Özçelik, *Molecular characterization of carbapenemase producing Klebsiella pneumoniae strains by multiplex PCR and PFGE methods: The first K.pneumoniae isolates co-producing OXA-48/KPC and KPC/NDM in Turkey*. *J Infect Chemother*, 2022. **28**(2): p. 192-198.
210. Köle, M., et al., [Evaluation of In Vitro Efficacy of Ceftazidime-Avibactam, Meropenem, and Colistin Single and Binary Combinations Against Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Various Clinical Specimens]. *Mikrobiyol Bul*, 2022. **56**(2): p. 230-250.
211. Yu, L., et al., *Synergetic effects of combined treatment of colistin with meropenem or amikacin on carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in vitro*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019. **9**: p. 422.
212. Tacconelli, E., et al., *Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis*. *Lancet Infect Dis*, 2018. **18**(3): p. 318-327.

213. Bayatinejad, G., et al., *In Vitro antibiotic combinations of Colistin, Meropenem, Amikacin, and Amoxicillin/clavulanate against multidrug-resistant Klebsiella pneumonia isolated from patients with ventilator-associated pneumonia*. BMC Microbiology, 2023. **23**(1): p. 298.
214. Tzouveleakis, L.S., et al., *Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(9): p. 862-72.
215. Mermutluoğlu, Ç., et al., *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 Medical Journal, 2023. **30**: p. 374-381.
216. Elemam, A., J. Rahimian, and M. Doymaz, *In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(10): p. 3558-62.
217. Vardakas, K.Z., et al., *Characteristics, risk factors and outcomes of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections in the intensive care unit*. Journal of Infection, 2015. **70**(6): p. 592-599.
218. Nguyen, M., et al., *Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010. **67**(2): p. 180-184.
219. Bergen, P.J., et al., *Synergistic killing of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa at multiple inocula by colistin combined with doripenem in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(12): p. 5685-95.
220. Zheng, Z., et al., *Ceftazidime/avibactam combined with colistin: a novel attempt to treat carbapenem-resistant Gram-negative bacilli infection*. BMC Infect Dis, 2023. **23**(1): p. 709.
221. Ku, Y.-H., et al., *Comparison of synergism between colistin, fosfomycin and tigecycline against extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates or with carbapenem resistance*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2017. **50**(6): p. 931-939.
222. Betts, J.W., et al., *In vitro and in vivo activities of tigecycline-colistin combination therapies against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(6): p. 3541-6.
223. Demiraslan, H., et al., *Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae sepsis in corticosteroid receipt mice: tigecycline or colistin monotherapy versus tigecycline/colistin combination*. Journal of Chemotherapy, 2014. **26**(5): p. 276-281.
224. Albur, M., et al., *Bactericidal Activity of Multiple Combinations of Tigecycline and Colistin against NDM-1-Producing Enterobacteriaceae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012. **56**(6): p. 3441-3443.
225. Pournaras, S., et al., *Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time–kill assay*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011. **37**(3): p. 244-247.
226. Öztaş, S., D.K. Er, and D. Dündar, *Karbapenemlere Dirençli ve Duyarlı Klebsiella pneumoniae İzolatlarının Çeşitli Antimikrobiyallere Direnç Oranları*. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2022. **8**(3): p. 229-232.
227. Kaya, F. and M. Ölçü, *Yoğun Bakım Ünitelerinde Çoklu İlaça Dirençli Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa*

- Suşlarında Seftazidim-Avibactam Direnç Oranlarının Değerlendirilmesi*. Flora the Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, 2024. **29**(1): p. 45-51.
228. Şenol, G., et al., *Ceftazidime-Avibactam Susceptibility of Klebsiella pneumoniae Isolates Obtained from Intensive Care Patients*. JOURNAL OF IZMIR CHEST DISEASES HOSPITAL, 2023. **37**(2): p. 84-88.
 229. MacVane Shawn, H., et al., *Unexpected In Vivo Activity of Ceftazidime Alone and in Combination with Avibactam against New Delhi Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in a Murine Thigh Infection Model*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014. **58**(11): p. 7007-7009.
 230. Yin, J., et al., *Mechanisms of bactericidal action and resistance of polymyxins for Gram-positive bacteria*. Appl Microbiol Biotechnol, 2020. **104**(9): p. 3771-3780.
 231. Tüzemen, N.Ü., et al., *Synergistic antibacterial activity of ceftazidime–avibactam in combination with colistin, gentamicin, amikacin, and fosfomycin against carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae*. Scientific Reports, 2024. **14**(1): p. 17567.
 232. Mataraci Kara, E., et al., *Evaluation of the synergy of ceftazidime/avibactam in combination with colistin, doripenem, levofloxacin, tigecycline, and tobramycin against OXA-48 producing Enterobacterales*. J Chemother, 2020. **32**(4): p. 171-178.
 233. Aubry, R., et al., *An improved PKPD modeling approach to characterize the pharmacodynamic interaction over time between ceftazidime/avibactam and colistin from in vitro time-kill experiments against multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae isolates*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2023. **67**(10): p. e00301-23.
 234. Zusman, O., et al., *Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(10): p. 5104-11.
 235. Adaleti, R., 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): p. 365-377.
 236. Erdem, F., et al., *In vitro evaluation of double carbapenem and colistin combinations against OXA-48, NDM carbapenemase-producing colistin-resistant Klebsiella pneumoniae strains*. Antimicrob Resist Infect Control, 2020. **9**(1): p. 70.
 237. Dhandapani, S., et al., *In-vitro synergistic activity of colistin and meropenem against clinical isolates of carbapenem resistant E.coli and Klebsiella pneumoniae by checkerboard method*. Indian J Med Microbiol, 2021. **39**(1): p. 6-10.
 238. Gheitani, L., et al., *Frequency Determination of Carbapenem-Resistant Klebsiella Pneumoniae (CRKP) Isolated from hospitals in Isfahan of Iran and Evaluation of Synergistic Effect of Colistin and Meropenem on them*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2018. **64**(1): p. 70-74.
 239. Krishnappa, L.G., M.A. Marie, and Y.A. Al Sheikh, *Characterization of carbapenem resistance mechanisms in Klebsiella pneumoniae and in vitro synergy of the colistin-meropenem combination*. J Chemother, 2015. **27**(5): p. 277-82.
 240. Laishram, S., et al., *Determination of synergy between sulbactam, meropenem and colistin in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae and*

- Acinetobacter baumannii* isolates and correlation with the molecular mechanism of resistance. Journal of Chemotherapy, 2016. **28**(4): p. 297-303.
241. Brennan-Krohn, T., A. Pironti, and J.E. Kirby, *Synergistic Activity of Colistin-Containing Combinations against Colistin-Resistant Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(10).
 242. Vidaillac, C., L. Benichou, and E. Duval Raphaël, *In Vitro Synergy of Colistin Combinations against Colistin-Resistant Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella pneumoniae Isolates*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012. **56**(9): p. 4856-4861.
 243. Simmons, N.A., *Colistin, sulphamethoxazole, and trimethoprim in synergy against Gram-negative bacteria*. J Clin Pathol, 1970. **23**(9): p. 757-64.
 244. Juhasz, E., et al., *In Vitro Activity of Colistin and Trimethoprim/Sulfamethoxazole Against Consortia of Multidrug Resistant Non-Fermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Lower Respiratory Tract*. Jundishapur J Microbiol, 2017. **10**(7): p. e14034.
 245. Giamarellos-Bourboulis, E.J., L. Karnesis, and H. Giamarellou, *Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant Stenotrophomonas maltophilia*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2002. **44**(3): p. 259-263.
 246. Nepka, M., et al., *In Vitro Bactericidal Activity of Trimethoprim-Sulfamethoxazole Alone and in Combination with Colistin against Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Clinical Isolates*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016. **60**(11): p. 6903-6906.
 247. Lovering, A. and D. Reeves, *Antibiotic and chemotherapy*. 2011, WB Saunders.
 248. Ontong, J.C., et al., *Synergistic antibacterial effects of colistin in combination with aminoglycoside, carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines, fosfomycin, and piperacillin on multidrug resistant Klebsiella pneumoniae isolates*. PLoS One, 2021. **16**(1): p. e0244673.
 249. Bonapace, C.R., et al., *Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002. **44**(4): p. 363-6.

EK A: Etik Kurul Onayı

EK B: Desteklenmiş Proje Sözleşmesi

