



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-
CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM
DALI



**KLİNİK ANLAMLI ÖRNEKLERDEN ELDE EDİLEN
KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARINDA FOSFOMİSİN
DİRENCİNİN İNCELENMESİ VE FOSFOMİSİNİN AMİKASİN,
MEROPENEM, COLİSTİN İLE KOMBİNASYONLARININ
ANTİBAKTERİYEL SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayşe Betül KELEŞ BURUL

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI

İSTANBUL – 2025

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ – CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ANLAMLI ÖRNEKLERDEN ELDE EDİLEN
KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARINDA FOSFOMİSİN
DİRENCİNİN İNCELENMESİ VE FOSFOMİSİNİN AMİKASİN,
MEROPENEM, COLİSTİN İLE KOMBİNASYONLARININ
ANTİBAKTERİYEL SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayşe Betül KELEŞ BURUL

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI

İSTANBUL – 2025

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimime başladığım günden itibaren derin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin planlanması ve yönlendirilmesinde yardımcı olan, akademik desteği, sabrı ve anlayışı için değerli hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya,

Eğitimim süresince çok emekleri geçen hocalarımız Sayın Prof. Dr. Bekir Sami KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Murat HÖKELEK, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ, merhum Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Hırsı BAHAR, TOKMAN, Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Prof. Dr. Sevgi ERGİN, Prof. Dr. Nuri KİRAZ, Prof. Dr. Erdal POLAT, Doç. Dr. Emine KÜÇÜKATEŞ, Doç. Dr. Suat SARIBAŞ, Doç. Dr. Yavuz UYAR'a,

Eğitim hayatım boyunca, özellikle tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e ve örnek ve veri toplama sürecindeki destekleri için Uzm. Dr. Ahmet Furkan KURT'a,

Tezimin laboratuvar çalışmasında göstermiş olduğu yardım ve destekleri için doktora öğrencisi Metin YALÇIN'a,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince beraber çalıştığım Gözde Arslanca, Fatmanur Zehra Altay, Gülhanım Yusifli, Sevinç İsmayilova, Ayşe Akgönül, Meryem Aras, Suheyp Pirim, Hilal Bilgin, Mehmet Ali Tanrısever, Sinem Vatansever'e, tanımış olmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm değerli asistan arkadaşlarıma,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım tüm mesai arkadaşlarıma, doktora ve yüksek lisans arkadaşlarımıza teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, her zaman yanımda olduklarını hissettiren annem Sultan Keleş'e, babam Mümtaz Keleş'e, ablalarım Rumeysa Süt'e, Sümeysa Keleş Yeşiltaş'a, Süheyla Atak'a, desteğini esirgemeyen biricik eşim Furkan Kaan Burul'a ve bana ikinci bir aile olan ailesine en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, hem hayatımdaki hem tez sürecindeki katkıları ve desteği nedeniyle kardeşim Huzeyfe Keleş'e özel olarak teşekkür ederim.

Dr. Ayşe Betül KELEŞ BURUL

İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR.....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	v
ETİK KURUL ONAYI.....	vi
TEZ/PROJE FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Enterobacteriaceae Ailesi ve Klinik Önemi.....	3
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Tarihçesi.....	5
2.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nın Mikrobiyolojik Özellikleri.....	6
2.2.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nın Patogenezi ve Virülans Faktörleri.....	7
2.2.4. Antimikrobiyal Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları.....	7
2.2.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nın Yaygınlığı ve Dağılımı.....	9
2.2.6. Enfeksiyonların Klinik Özellikleri.....	9
2.2.7. MDR ve PDR <i>Klebsiella pneumoniae</i> Enfeksiyonlarında Tedavi Yöntemleri.....	10
2.3. Fosfomisin.....	10
2.3.1. Fosfomisinin Etki Şekli.....	10
2.3.2. Farmakokinetik Özellikler: Vücutta Dağılım ve Atılım.....	11
2.3.3. Farmakodinamik Özellikler: Doz-Etki İlişkisi.....	12
2.3.4. Antimikrobiyal Etki Spektrumu.....	12
2.3.5. Fosfomisin Direnci ve Gelişim Yolları.....	12
2.3.6. Klinik Uygulamalar: Fosfomisinin Rolü ve Kullanım Alanları.....	13
2.3.7. Antibiyotik Kombinasyonlarında Fosfomisin (Amikasin, Meropenem, Kolistin).....	14
2.3.8. Yan Etkiler ve Güvenlik Profili.....	15
2.3.8. Fosfomisin Duyarlılığının Belirlenmesi: Yöntemlerin Karşılaştırılması ve Uygulama Zorlukları.....	15
2.4. Amikasin.....	15
2.4.1. Amikasinin Etki Mekanizması.....	15
2.4.2. Amikasinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri.....	16

2.4.3. Amikasinin Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları.....	16
2.4.4. Amikasinin Klinik Kullanımı.....	17
2.4.5. Toksisite ve Yan Etkiler.....	17
2.5. Meropenem.....	18
2.5.1. Meropenemin Etki Mekanizması.....	18
2.5.2. Meropenem Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları.....	18
2.5.3. Meropenem Klinik Kullanımı.....	18
2.5.4. Toksisite ve Yan Etkiler.....	19
2.6. Kolistin.....	19
2.6.1. Kolistinin Etki Mekanizması.....	19
2.6.2. Kolistinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri.....	19
2.6.3. Kolistin Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları.....	20
2.6.4. Kolistinin Klinik Kullanımı.....	20
2.6.5. Kombinasyon Tedavilerinde Kolistin (Fosfomisin, Amikasin, Meropenem ile).....	20
2.6.6. Toksisite ve Yan Etkiler.....	21
2.7. Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri.....	21
2.7.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	21
2.7.2. Gradient Difüzyon Test Yöntemi (Epsilometre Test – E-Test).....	22
2.7.3. Agar Dilüsyon Yöntemi.....	22
2.7.4. Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi.....	23
2.7.5. Sıvı Mikrodilüsyon (SMD) Yöntemi.....	23
2.7.6. Otomatize Sistemler.....	24
2.8. Antibiyotik Kombinasyon Testleri.....	24
2.8.1. Sinerji Saptama Yöntemleri.....	24
2.8.1.1. Sıvı Mikrodilüsyon Dama Tahtası Yöntemi.....	25
2.8.1.2. Makrodilüsyon Yöntemi.....	28
2.8.1.3. Agar Dilüsyon Yöntemi.....	28
2.8.1.4. Zamana Bağlı Öldürme Testi (Time-Kill Yöntemi).....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Hasta Örneklerinin Toplanması.....	32
3.2. Gereç.....	32
3.2.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler.....	32
3.2.2. Besiyerleri.....	33
3.2.3. Sarf Malzemeler.....	33

3.2.4. Antibiyotikler ve Kullanılan Diğer Kimyasallar.....	33
3.3. Yöntemler.....	34
3.3.1. Bakteri izolatlarının toplanması.....	34
3.3.2. Klinik Örneklerin Kültür İşlemleri.....	34
3.3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	35
Meropenem Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Düzeyinin Belirlenmesi	35
Kolistin MİK Düzeyinin Belirlenmesi.....	36
Amikasin MİK Düzeyinin Belirlenmesi.....	38
Fosfomisin MİK Düzeyinin Belirlenmesi.....	39
MİK Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	41
3.3.4. Koloni PZR Yöntemi ile Karbapenemaz Direnç Genlerinin Tespiti.....	42
3.3.5. Sinerji Saptanmasına Yönelik Agar Dilüsyon Testi.....	42
İzolatların Yeniden Canlandırılması.....	42
4. BULGULAR.....	54
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇ.....	78
KAYNAKÇA.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	90
İNTİHAL TARAMA RAPORU.....	92

SİMGE VE KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AK: Amikasin

AMC: Amoksisilin-klavulanat

ATCC: American Type Culture Collection

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CAZ: Seftazidim

CAZ-AVI: Seftazidim-avibaktam

CB: Checkerboard

CIP: Siprofloksasin

CFU: Colony Forming Unit

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMS: Kolistin Metansülfonat (Kolistimetat Sodyum)

CRE: Karbapenem Dirençli *Enterobacterales*

CR-Kp: Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*

CTX: Sefotaksim

ESBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz

ETA: Endotrakeal aspirat

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEP: Sefepim

FİK: Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu

FOS: Fosfomisin

GN: Gentamisin

İM: İntramüsküler

IPM: İmipenem

İV: İntravenöz

İYE: İdrar yolu enfeksiyonu

KAMHB: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth

KKA: Koyun kanlı agar

KPC: *K. pneumoniae* karbapenemaz

KPC Kp: KPC üreten *Klebsiella pneumoniae*

LPS: Lipopolisakkarid

MALDI-TOF MS: Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi)

MBL: Metallo-beta-laktamaz

MDR: Multi Drug Rezistans (Çoklu İlaç Dirençli)

MEM: Meropenem

mcr: Mobil Kolistin Direnci

MHA: Mueller-Hinton Agar

MİO: Hareket ve indol Agar

MİK: Minimum İnhibitor Konsantrasyon

MRSA: Metisiline Dirençli *S. aureus*

NCTC: National Collection of Type Cultures

NDM: New Delhi Metallo- β -laktamaz

OXA: Oksasilinaz

PBP: Penisilin Bağlayıcı Protein

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PDR: Pan Drug Resistant

SHV: Sülf-hidril değişken aktif bölgeye sahip enzimler

SMD: Sıvı mikrodilüsyon

TEM: Yunanistan'da tanımlanan Temoniera beta-laktamazları

TMP-SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol

TSİ: Triple Sugar Iron

TZP: Piperasilin-tazobaktam

ÜSE: Üriner Sistem Enfeksiyonu

VİP: Ventilator ile ilişkili Pnömoni

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

XDR: Extensively Drug Resistant (Yaygın İlaç Direnci)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. FİKİ hesaplama formülü

Şekil 2. Kolistin sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematik gösterimi

Şekil 3. Kolistin sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Şekil 4. Amikasinin sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematik gösterimi

Şekil 5. Fosfomisin agar dilüsyon yönteminde besiyeri hazırlanması

Şekil 6. Fosfomisin agar dilüsyon testinde üreme kontrol plağı

Şekil 7. Besiyeri hazırlanması sırasında boş steril petri kaplarının işaretlenmesi (8x8 agar dilüsyon temelli dama tahtası yöntemi)

Şekil 8. İnokülasyonların yapılacağı numaralı çizimlerin yer aldığı kâğıt şablon

Şekil 9. Fosfomisin-amikasin kombinasyon çalışması için uygulanan yöntemin şematik görünümü

Şekil 10. Fosfomisin-meropenem kombinasyon çalışmasının dilüsyonlarının şematik gösterimi

Şekil 11. Fosfomisin-amikasin kombinasyon çalışmasının dilüsyonlarının şematik gösterimi

Şekil 12. Fosfomisin-kolistin kombinasyon çalışmasının dilüsyonlarının şematik gösterimi

Şekil 13. Sonuçların değerlendirilmesi, kâğıt şablon üzerinde yapılan okuma (8 setten 3 tanesi fotoğrafta sunulmuştur.)

Şekil 14. Kâğıt şablon üzerinde değerlendirilen agar dilüsyon sonucu

Şekil 15. 3 numaralı izolata ait fosfomisin-meropenem kombinasyon çalışmasına ait sonuçlar

Şekil 16. Karbapenemaz genlerinin dağılımı

Şekil 17. Bakteriyemi kaynaklarının dağılımı

Şekil 18. Etki türlerine göre antibiyotik kombinasyon dağılımı

Şekil 19. Karbapenemaz türlerine göre etki türlerinin yüzdelik dağılımı

Şekil 20. Fosfomisin+meropenem kombinasyonunun etki türlerinin karbapenemazlara göre dağılımı

Şekil 21. Fosfomisin + kolistin kombinasyonunun etki türlerinin karbapenemazlara göre dağılımı

Şekil 22. Fosfomisin+amikasin kombinasyonunun etki türlerinin karbapenemazlara göre dağılımı

Şekil 23. Meropenem duyarlılık durumuna göre fosfomisin kombinasyonunun etki türleri

Şekil 24. Kolistin duyarlılık durumuna göre fosfomisin kombinasyonunun etki türleri

Şekil 25. Amikasin duyarlılık durumuna göre fosfomisin kombinasyonunun etki türleri



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: 3 numaralı izolata ait fosfomisin-meropenem kombinasyonunda hesaplanan FİK indeksleri

Tablo 2. Hastaların demografik verileri

Tablo 3. KD-Kp bakteriyemi kaynaklarının dağılımı

Tablo 4. Suşların değerlendirildikleri MİK aralıkları, MİK50, MİK90 değerleri ve kombinasyonlarda kullanılan antibiyotiklere duyarlılıkları ve oranları (n=140 izolat)

Tablo 5. Suşların sahip olduğu direnç genleri, kombinasyonlarda kullanılan antibiyotiklerin tek başlarına MİK değerleri, kombinasyon hâlinde elde edilen FİK indeksleri ve etkileşim türleri

Tablo 6. Fosfomisin ile birlikte kullanılan üç farklı antibiyotik kombinasyonuna ait etki türlerinin dağılımları

Tablo 7. Karbapenemaz türlerine göre fosfomisin ile kombinasyon halinde kullanılan meropenem, kolistin ve amikasin antibiyotiklerinin gösterdiği etki türleri

Tablo 8. Fosfomisin içeren antibiyotik kombinasyonlarının etki türleri, ilgili antibiyotiğe karşı duyarlılıklarına göre sınıflandırılması

ÖZET

Amaç: Küresel ölçekte hızla artan antibiyotik direncinin merkezinde yer alan Gram-negatif bakterilerden *Klebsiella pneumoniae*, özellikle yoğun bakım üniteleri ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda yüksek mortalite oranları ile çoklu ilaç direnci ya da pan-rezistan profil sergileyerek tedavi seçeneklerini büyük ölçüde sınırlamaktadır. Bu tez çalışması, karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında fosfomisin ile amikasin, meropenem ve kolistin kombinasyonlarının olası sinerjik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Elde edilecek veriler, dirençli patojenlere karşı etkili yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu yaklaşımla, çoklu ilaç direncine sahip bakteriyel enfeksiyonların yönetimine yönelik güncel ve klinik açıdan uygulanabilir çözüm önerileri sunulması hedeflenmektedir.

Gereç ve Yöntem: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen kan kültürü örneklerinden elde edilen ve çalışma kriterlerini karşılayan 150 karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Meropenem, amikasin ve kolistinin fosfomisin ile potansiyel sinerjik etkilerini değerlendirebilmek amacıyla agar dilüsyon temelli dama tahtası (checkerboard) sinerji testi uygulanmıştır.

Bulgular: Suşlar üzerinde yapılan kombine tedavi incelemelerinde, fosfomisin-amikasin kombinasyonunun %48,8'inde, fosfomisin-meropenem kombinasyonunun %84,2'sinde ve fosfomisin-kolistin kombinasyonunun %15,6'sinde sinerjistik etki gözlenmiştir. Tüm kombinasyonlar arasında antagonist etki fosfomisin-kolistin kombinasyonunda (%17,0) gözlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* kaynaklı invaziv enfeksiyonların tedavisinde, fosfomisin disodyumun amikasin, meropenem ve kolistinle kombine kullanılmasının, etkili bir tedavi alternatifi olabileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda, in vitro koşullarda gözlenen sinerjik etkinin klinik uygulamalara yansıtılabilmesi için, fosfomisin-meropenem, fosfomisin-kolistin ve fosfomisin-amikasin kombinasyonlarının in vivo etkililik ve güvenilirlik çalışmalarının yapılması, artan direnç profiliyle mücadelede büyük önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Fosfomisin disodyum, *Klebsiella pneumoniae*, Sinerji testleri,
Agar dilüsyon



ABSTRACT

Aim: *Klebsiella pneumoniae*, a Gram-negative bacterium at the forefront of the rapidly escalating global antibiotic resistance problem, poses a significant threat particularly in intensive care units and hospital-acquired infections, where its high mortality rates and multi-drug or pan-resistant profile severely limit treatment options. This thesis aims to evaluate the potential synergistic effects of fosfomycin combined with amikacin, meropenem, and colistin in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. The data obtained are expected to contribute to the development of novel and effective therapeutic strategies against resistant pathogens, thereby offering contemporary and clinically applicable solutions for managing multi-drug resistant bacterial infections.

Materials and Methods: A total of 150 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated from blood culture samples sent to the Laboratory of the Departments of Infectious Diseases and Clinical Microbiology and Medical Microbiology at Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Medical Faculty, and meeting the study criteria, were included in the study. To evaluate the potential synergistic effects of meropenem, amikacin and colistin in combination with fosfomycin, the agar dilution-based checkerboard synergy test was performed.

Results: In studies investigating combination therapies on the strains, a synergistic effect was observed in 48.8% of the fosfomycin-amikacin combinations, 84.2% of the fosfomycin-meropenem combinations, and 15.6% of the fosfomycin-colistin combinations. Among all combinations, antagonistic interaction was observed only in the fosfomycin-colistin combination (17.0%).

Conclusion: In conclusion, the combination of fosfomycin disodium with amikacin, meropenem and colistin is considered a potentially effective therapeutic option for the treatment of invasive infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. In this context, conducting in vivo efficacy and safety studies on the combinations of fosfomycin-meropenem, fosfomycin-colistin, and fosfomycin-amikacin is of great importance in translating the in vitro synergistic effects into clinical practice and in combating the increasing resistance profile.

Key words: Fosfomicin disodium, *Klebsiella pneumoniae*, Synergy tests, Agar dilution



1. GİRİŞ

Küresel çapta artan antibiyotik direnci, sağlık sistemleri açısından en önemli tehditlerden biri olarak dikkat çekmektedir. [1]. Gram-negatif bakteriler, bu sorunun merkezinde yer alırken, *Klebsiella pneumoniae* gibi patojenler, sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonların gelişiminde önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır [2]. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda yüksek mortalite oranlarıyla ilişkilendirilen *Klebsiella pneumoniae*'nin, çoklu ilaç direnci (MDR) ve bazen pan-rezistan (PDR) profil sergilemesi tedavi seçeneklerini son derece kısıtlamaktadır [3,4]. Karbapenemler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklere bile direnç geliştiren *Klebsiella pneumoniae* suşları, tedavi stratejilerinin gözden geçirilmesini zorunlu kılmaktadır [3]. Bu kapsamda, alternatif antibiyotikler ve bu antibiyotiklerin kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılması kritik bir öneme sahiptir. Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi maliyetli ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu nedenle bakterilerin mevcut ajanlara karşı hızla direnç geliştirmesi, mevcut tedavi seçeneklerinin etkinliğini ciddi şekilde tehdit etmektedir. Bu bağlamda, kombine antibiyotik tedavileri; direnç gelişimini önleme, toksisiteyi azaltma ve tedavi başarısını artırma gibi önemli avantajlar sunmaktadır.

Fosfomisin, bakteri hücre duvarı biyosentezini inhibe eden geniş spektrumlu bir antibiyotik olup, uzun yıllardır idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır [5,6]. Ancak fosfomisinin, artan dirençli Gram-negatif patojenlere karşı sistemik enfeksiyonlarda da potansiyel bir tedavi seçeneği sunabileceği düşünülmektedir. Özellikle *Klebsiella pneumoniae* gibi karbapenem direnci gösteren patojenlerde, fosfomisinin kullanımı üzerine yapılan çalışmalar umut vadeden sonuçlar ortaya koymaktadır [5,7]. Ancak, fosfomisine direncinin hızla gelişmesi ve bu direncin bakteriler arasında yayılma potansiyeli, bu antibiyotiğin tek başına kullanımını sınırlandırmaktadır [8]. Bu nedenle, fosfomisinin diğer antibiyotiklerle kombinasyonu, sinerjik etki oluşturma potansiyeli taşıyan bir tedavi stratejisi olarak dikkat çekmektedir [9,10].

Amikasin, meropenem ve kolistin gibi antibiyotikler, *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı etkinliği olan diğer güçlü ajanlar arasında yer almaktadır [11].

Amikasin, aminoglikozid sınıfı antibiyotiklerden olup, bakteriyel protein sentezini engelleyerek bakterisidal özellik göstermektedir. [12]. Meropenem ise, karbapenem sınıfında geniş spektrumlu bir beta-laktam antibiyotiği olarak, özellikle MDR Gram-negatif bakterilere karşı etkin bir tedavi seçeneği sunar [3,13]. Ancak karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında, meropenemin etkisi ciddi şekilde azalmaktadır [14]. Kolistin ise polimiksin sınıfı bir antibiyotik olarak, özellikle MDR ve PDR suşlar üzerinde etkili bir son çare tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır [15,16]. Bununla birlikte, son yıllarda kolistin direncinde belirgin bir artış gözlenmektedir ve bu durum tedavi seçeneklerini daha da sınırlamaktadır [16].

Antibiyotik kombinasyonları, çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı sinerjik etkiler gösterebilecek potansiyel tedavi yaklaşımları arasında giderek daha fazla dikkat çekmektedir [17]. Bu bağlamda, fosfomisin ile amikasin, meropenem ve kolistin kombinasyonlarının *in vitro* antibakteriyel sinerjik etkilerinin araştırılması, *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında etkin tedavi protokollerinin belirlenmesi açısından değerli bilgiler sunabilir [18]. Sinerji çalışmaları, antibiyotiklerin tek başlarına sahip oldukları etkiden daha büyük bir etki yaratıp yaratmadıklarını değerlendirmek için dama tahtası (checkerboard) analizi ve time-kill yöntemleri gibi laboratuvar testleriyle gerçekleştirilir [5,17]. Bu yaklaşımlar, bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirme olasılığını azaltabilir, tedavi başarısını artırabilir ve potansiyel toksik yan etkileri en aza indirebilir [17].

Bu tez çalışmasında, kan kültürü örneklerinden elde edilen karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında fosfomisin direncinin incelenmesi ve fosfomisin ile amikasin, meropenem ve kolistin kombinasyonlarının antibakteriyel sinerjik etkinliğinin araştırılması amaçlanmaktadır. Çalışma, çoklu ilaç direncine sahip bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yeni ve etkili kombinasyon stratejilerinin geliştirilmesine yönelik literatüre katkı sağlamayı hedeflemektedir. *Klebsiella pneumoniae*'nin klinik önemi, artan direnç profili ve sınırlı tedavi seçenekleri göz önünde bulundurulduğunda, bu kombinasyonların etkinliğinin değerlendirilmesi, özellikle MDR ve PDR izolatlara karşı daha etkili tedavi protokollerinin geliştirilmesi açısından kritik bir rol oynamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Enterobacteriaceae Ailesi ve Klinik Önemi

Enterobacteriaceae, Gram-negatif, fakültatif anaerobik özelliklere sahip, çomak şeklindeki bakterilerden oluşan bir bakteri ailesidir [19]. Bu bakteri ailesinin üyeleri, hem insanlarda hem de çevresel ortamlarda yaygın olarak bulunur ve başta sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonlar olmak üzere toplum kaynaklı birçok ciddi enfeksiyona neden olabilirler [20]. Enterobacteriaceae ailesinde yer alan en bilinen türler arasında *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella spp.* ve *Citrobacter freundii* bulunmaktadır. Bu bakteriler, gerek normal insan mikrobiyotasında yer almakta, gerekse çevresel koşullarda, toprakta ve suda geniş bir dağılım göstermektedir [21].

Klinik önemi açısından, Enterobacteriaceae ailesinin en dikkat çekici özelliklerinden biri, enfeksiyonlara neden olabilme kapasitelerinin yanı sıra antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarıdır. Özellikle *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* gibi üyeler, sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonların yanı sıra toplum kökenli enfeksiyonların da başlıca etkenleri arasında yer alır. Bu bakteriler, genellikle idrar yolu enfeksiyonları, karın içi enfeksiyonlar (özellikle peritonit), nozokomiyal pnömoni, sepsis ve yara enfeksiyonlarına neden olur [2,22]. Ayrıca, kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları ve ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) gibi hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sıkça sorumlu patojenlerdir [22].

Enterobacteriaceae ailesine ait patojen bakterilerin patogenezi, sahip oldukları çeşitli virülans faktörlerine dayanır. Bu faktörler arasında adhezinler, kapsül üretimi, endotoksin (lipopolisakkarit - LPS), hemolizin üretimi ve serin proteazlar yer almaktadır [23]. Bu virülans faktörleri, bakterilerin konağa yapışmasını, yayılmasını ve bağışıklık savunmasından kaçınmasını sağlar, böylece bakteriler klinik olarak önemli enfeksiyonlara yol açar. Örneğin, *Klebsiella pneumoniae*'nin kapsülü, fagositozdan kaçmasına ve insan bağışıklık sistemi tarafından tanınmasının zorlaşmasına olanak tanır [24].

Antibiyotik direnci açısından, Enterobacteriaceae ailesinin giderek daha fazla önem kazanan bir sorun haline geldiği bilinmektedir. Bu bakteriler, geniş spektrumlu

beta-laktamazlar (ESBL) ve karbapenemazlar gibi direnç enzimleri üretirler [25]. ESBL üretimi, üçüncü nesil sefalosporinler ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin etkinliğini azaltırken, karbapenem dirençli *Enterobacterales* (CRE) suşları, karbapenem grubu antibiyotiklere direnç kazandıkları için tedavi seçeneklerini ciddi şekilde kısıtlamaktadır. Karbapenemler, genellikle son çare antibiyotikleri olarak kabul edilir; bu nedenle bu gruptaki antibiyotiklere karşı gelişen direnç, klinik tedavi açısından önemli bir kriz oluşturmaktadır [26].

Karbapenemaz üretimi, sadece karbapenemlere karşı değil, aynı zamanda birçok diğer antibiyotiğe karşı da direnç gelişmesine neden olur. Bu direnç, çeşitli mekanizmalarla sağlanır; en yaygın mekanizma ise *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC), New Delhi metallo-beta-laktamaz (NDM) ve OXA-48 gibi karbapenemaz enzimlerinin üretimidir. Bu enzimler, beta-laktam halkasına saldırarak antibiyotiğin etkisini ortadan kaldırır. Ayrıca, plazmid aracılığıyla taşınabilen bu genler, dirençli bakterilerin hızla yayılmasına olanak sağlar [27].

Klinik önemi, Enterobacteriaceae ailesinin yaygın enfeksiyon etkenleri olmalarının yanı sıra antibiyotik direnci geliştirme kapasiteleri ile de pekişmektedir [2]. Özellikle, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) takip edilen hastalarda yaygın olarak görülen çoklu ilaç dirençli (MDR) ve pan-rezistan (PDR) Enterobacteriaceae ailesine ait bakteriler, mortalite ve morbidite oranlarının artmasına yol açmaktadır. Bu dirençli suşlar, hastane enfeksiyonlarının kontrolünü zorlaştırmakta ve tedavi seçeneklerinin kısıtlanmasına neden olmaktadır [27]. Dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşları ile ilişkili nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde etkili tedavi seçeneklerinin azalması, fosfomisin gibi eski nesil antibiyotiklerin tekrar gündeme gelmesine sebep olmuştur [5].

Sonuç olarak, Enterobacteriaceae ailesi, çeşitli direnç mekanizmaları ve klinik açıdan önemli enfeksiyonlara neden olabilme kapasiteleri nedeniyle modern tıbbın karşılaştığı en büyük mikrobiyolojik tehditlerden biridir [27,28]. Antibiyotik direnci ile mücadelede, bu bakterilerle etkili bir şekilde başa çıkmak için yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi, mevcut antibiyotiklerin akıllıca kullanımı ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin sıkılaştırılması gerekmektedir [27]. Enterobacteriaceae ailesinin yol açtığı klinik sorunlar, özellikle dirençli suşlar açısından zamanla daha da karmaşık bir

yapı kazanmakta olup, bu durumun küresel sağlık sistemi için büyük bir tehdit oluşturduğu açıkça görülmektedir [1,28].

2.2 *Klebsiella pneumoniae*

2.2.1. *Klebsiella pneumoniae* Tarihçesi

Klebsiella cinsi bakteriler, ismini Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'ten almakta olup, tıbbi mikrobiyolojide önemli bir yer tutmaktadır [29].

Klebsiella pneumoniae, 1882 yılında Carl Friedländer tarafından pnömonili hastaların akciğer dokusundan izole edilmiştir. Bakterinin kapsül yapısına sahip olduğu ve bu özelliğinin patojenite açısından önemli olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, ilk yıllarda Friedländer basili olarak anılmıştır. Zamanla yapılan çalışmalar, *Klebsiella* türlerinin yalnızca solunum yolu enfeksiyonlarına değil, sepsis, üriner sistem ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi farklı klinik tablolara da neden olabileceğini ortaya koymuştur [30].

Klebsiella, başlangıçta tek bir tür olarak kabul edilmiş, ilerleyen yıllarda yapılan genotipik ve fenotipik analizler sonucunda farklı türlere ayrılmıştır. *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola* ve *Klebsiella aerogenes* gibi türlerin tanımlanması, bu cinsin mikrobiyolojik çeşitliliğini ortaya koymuştur [29].

Klebsiella türleri, antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirme eğilimi göstermektedir. 1980'li yıllardan itibaren ESBL üreten *Klebsiella* suşlarının yaygınlaşması, tedavi seçeneklerini önemli ölçüde kısıtlamıştır. Bu bakteriler, 3. kuşak sefalosporinlere karşı dirençli olup, ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır [30].

2000'li yıllarda ise karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* (KPC, NDM gibi enzimler aracılığıyla) küresel sağlık açısından ciddi bir tehdit oluşturmuştur. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (CR-Kp) suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar, mortalite oranlarını artırmakta ve tedavi seçeneklerini büyük ölçüde sınırlandırmaktadır. Bu direnç mekanizmalarının yayılması, hastanelerde enfeksiyon kontrol önlemlerinin önemini artırmıştır [29].

Günümüzde *Klebsiella* türleri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken öncelikli patojenler arasında gösterilmektedir. Antibiyotik direncinin hızla yayılması nedeniyle, enfeksiyon kontrol önlemlerinin güçlendirilmesi, hastane hijyen protokollerinin sıkılaştırılması ve etkili tedavi

yaklaşımlarının geliştirilmesi bu tehditle mücadelede kritik bir rol oynamaktadır. Genetik ve moleküler düzeyde yapılan çalışmalar, *Klebsiella*'nın patogenezi mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamakta ve aşı geliştirme çalışmalarına ışık tutmaktadır [31].

2.2.2. *Klebsiella pneumoniae*'nin Mikrobiyolojik Özellikleri

Klebsiella türleri doğada yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır ve gıda, kanalizasyon, toprak ve bitkiler gibi çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilebilmektedir. Ayrıca, insan ve hayvanların mukozal yüzeylerini kolonize edebilme yeteneğine sahiptirler [29].

Klebsiella türleri, Gram-negatif, yaklaşık 1–2 µm uzunluğunda ve 0,5–0,8 µm çapında çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik bakterilerdir ve Enterobacteriaceae familyasına aittir. Genellikle hareketsizdirler ve polisakkarit yapısında kalın bir kapsüle sahip olmalarıyla bilinirler, bu kapsül fagositoza karşı direnç sağlayarak patojenitelerini artırır. Hücreler tek başına, çiftler halinde veya kısa zincirler şeklinde dizilebilir. Çoğu suş fimbriyalara sahiptir, ancak solunum yollarına ait bazı suşlarda fimbria bulunmayabilir. Laktoz fermentasyonu yapabilen *Klebsiella* türleri, MacConkey agar gibi besiyerlerinde pembe koloniler oluşturur. Oksidaz negatif olup, katalaz pozitiflerdir. Metabolik olarak, çoğu *Klebsiella* suşu sitrat ve glukozu tek karbon kaynağı olarak kullanabilir, ancak L-sorbozu kullanamazlar. Karbonhidrat fermentasyonu sırasında gaz üretimi gözlemlenir ve nişastadan gaz üretimi, bu bakterilerin tanımlanmasında önemli bir biyokimyasal özelliktir [29].

Optimum üreme sıcaklıkları 37 °C olup, 4 ila 43 °C arasında gelişim gösterebilirler. Nemli ısı ile 55 °C'de öldürülebilirler. Ancak, kuru ortamlarda birkaç ay boyunca hayatta kalabilirler [29].

Klebsiella türleri, insan ve sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemini kolonize edebilir ve fekal örneklerde bakteri yoğunluğu 10⁸ koloni oluşturan birim (Colony Forming Unit-CFU) / gram seviyesine ulaşabilir. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde (YDYB) erken doğan bebeklerde %50 oranında taşıyıcılık bildirilmektedir ve bu bakteriler, bebeklerin dışkıında bir aydan uzun süre kalıcılık gösterebilmektedir [29].

2.2.3. *Klebsiella pneumoniae*'nin Patogenezi ve Virölans Faktörleri

Klebsiella pneumoniae, insanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir patojen olup, özellikle sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlarda öne çıkar [2,32]. Bu bakterinin patogenezi mekanizmaları, bakterinin hayatta kalma ve konak hücreleri enfekte etme yeteneğini artıran çok sayıda virölans faktörü içerir. Bunların başında, bakterinin en önemli savunma mekanizması olan polisakkarit kapsülü gelir. Kapsül, bakterinin fagositozdan korunmasına yardımcı olarak konak bağışıklık hücrelerinden saklanması sağlar [32,33].

Diğer bir önemli virölans faktörü, lipopolisakkarit (LPS) yapısıdır. LPS, bakterinin dış membranında bulunan ve konak bağışıklık sistemi üzerinde güçlü bir inflamatuvar yanıt uyandıran bir moleküldür. LPS'nin endotoksin aktivitesi, septik şok gibi ölümcül komplikasyonların gelişmesine katkıda bulunabilir. LPS ayrıca bakterinin epitel hücrelerine bağlanmasını kolaylaştırır ve enfeksiyonun başlatılmasında kritik bir rol oynar [33].

Klebsiella pneumoniae'nin patogeneziinde siderofor üretimi de önemli bir mekanizmadır. Sideroforlar, bakterilerin demir gibi hayati elementleri bağlayarak konak hücrelerden almasını sağlayan moleküllerdir. Konak organizma, enfeksiyona yanıt olarak demiri biyolojik olarak erişilemez hale getirme eğilimindedir; ancak sideroforlar, bu bariyeri aşarak bakterinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlar [33].

Ek olarak, *Klebsiella pneumoniae*'nin yüzeyinde bulunan adhezinler ve fimbrialar, bakterinin konak hücrelere tutunmasını sağlar. Bu yapıların etkinliği, bakterinin solunum ve üriner sistem epitel hücrelerine sıkı bir şekilde bağlanmasına ve bu bölgelerde enfeksiyon başlamasına zemin hazırlar. Özellikle tip 1 ve tip 3 fimbrialar, bakterinin hücre yüzeylerine sıkı bir şekilde tutunmasını sağlayarak enfeksiyonların başlaması ve yayılım sürecinde etkili bir rol oynamaktadır [33].

2.2.4. Antimikrobiyal Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları

Klebsiella pneumoniae'nin antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmeye yeteneği, tedavi yaklaşımlarını önemli ölçüde karmaşıktırmakta ve hasta prognozunu olumsuz yönde etkilemektedir [34]. Antibiyotik direncinin gelişiminde

birden fazla mekanizma rol oynamakta olup bu mekanizmalar genetik ve biyokimyasal düzeyde bakterinin adaptasyon yeteneğini göstermektedir [32].

Direnç gelişiminin başlıca mekanizmalarından biri beta-laktamaz enzimlerinin sentezlenmesidir. Beta-laktamaz enzimleri, yapılarında beta-laktam halkası bulunan antibiyotikleri hidrolize ederek bu antibiyotiklerin etkinliğini ortadan kaldırır [35]. *Klebsiella pneumoniae*, ESBL üreterek özellikle sefalosporinler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir. ESBL pozitif suşlar, çoğunlukla TEM (Yunanistan'da tanımlanan Temoniera beta-laktamazları), SHV (sülf-hidril değişken aktif bölgeye sahip enzimler), sefotaksime karşı belirgin hidrolitik aktivite gösteren ve ilk olarak Münih'te tespit edilen CTX-M gibi beta-laktamaz genlerini taşımakta ve bu genler, genellikle plazmid aracılığıyla horizontal gen transferi ile hızla yayılabilmektedir. Ayrıca PER, VEB, GES gibi enzimler de bulunmaktadır [36].

CR-Kp suşları, karbapenem grubu antibiyotiklere karşı çoklu direnç mekanizmaları geliştirerek hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ciddi tedavi zorluklarına neden olmaktadır. Karbapenemlere yönelik direnç çoğunlukla enzim üretimi, effluks pompası aktivitesi veya porin mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bu mekanizmalar arasında en yaygın olanı, karbapenemaz enzimlerinin üretilmesidir. Enterobacterales takımı üyelerinde görülen karbapenemazlar, Ambler sınıflandırması çerçevesinde çeşitli kategorilere ayrılır. Buna göre, Sınıf A'da KPC, Sınıf B'de "Imipenem-resistant" *Pseudomonas* (IMP), NDM ve Verona "integron-encoded" metallo- β -laktamaz (VIM), Sınıf D'de ise OXA-48 benzeri karbapenemazlar yer alır [3,37]. Ülkemizde bugüne kadar gerçekleştirilen araştırmalarda en sık karşılaşılan karbapenemaz geninin OXA-48 olduğu bildirilmektedir [38–40].

Bunun yanı sıra, *Klebsiella pneumoniae*'nin direnç kazanmasında bakterinin dış membran yapısındaki değişiklikler, bu süreçte belirleyici bir rol üstlenmektedir. Dış membranda yer alan porin proteinlerindeki (OmpK35 ve OmpK36 gibi) mutasyonlar veya azalmış porin ekspresyonu, antibiyotiklerin bakteriyel hücreye girişini engelleyerek direnç oluşmasına katkı sağlar [41].

Bakteriyel direnç mekanizmalarından bir diğeri ise effluks pompaları aracılı antibiyotik atılımıdır. *Klebsiella pneumoniae*, etkin effluks pompa sistemleri sayesinde antibiyotik moleküllerini aktif olarak hücre dışına pompalayarak birden

fazla antibiyotik sınıfına karşı direnç kazanabilmektedir [42]. Effluks pompaları, beta-laktam antibiyotiklerinin yanı sıra aminoglikozidler, kinolonlar ve tetrasiklinler gibi antibiyotiklerin etkinliğini azaltmaktadır [43].

Direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesine ve yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

2.2.5. *Klebsiella pneumoniae* 'nın Yaygınlığı ve Dağılımı

Klebsiella pneumoniae, dünya genelinde yaygın olarak bulunan bir patojen olup, hem toplum kaynaklı hem de sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlarda önemli bir yer tutar [2,44]. Özellikle hastanelerde ve uzun süreli bakım ünitelerinde kalan hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olur [45]. Yoğun bakım ünitelerinde, invaziv tıbbi cihazların kullanımı (örneğin, mekanik ventilatörler, intravenöz kateterler) bu bakterinin yayılmasını ve enfeksiyon yapmasını kolaylaştırır [46]. Ayrıca, hastane kaynaklı pnömoni, sepsis, yara ve idrar yolu enfeksiyonlarına en sık neden olan etkenlerden biri *Klebsiella pneumoniae*'dir [2–4].

Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonların yanı sıra, *Klebsiella pneumoniae* toplumda da idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni gibi klinik tablolara neden olabilir [33]. Toplum kökenli enfeksiyonlarda, özellikle yaşlı hastalar, diyabetli bireyler, kronik akciğer hastalığı olanlar ve alkolizm öyküsü bulunan hastalar yüksek risk altındadır. Bu bireylerde bakterinin neden olduğu enfeksiyonlar genellikle daha ağır seyreder ve mortalite oranı artar [47].

2.2.6. Enfeksiyonların Klinik Özellikleri

Klebsiella pneumoniae enfeksiyonları genellikle şiddetli klinik tablolarla ilişkilidir ve hastanede yatan hastalarda ciddi komplikasyonlara neden olabilir [44]. En yaygın klinik tablo, pnömoni olup, bu hastalık genellikle ağır seyreder ve bazen nekrotizan pnömoni şeklinde kendini gösterebilir [45]. Nekrotizan pnömoni, akciğer dokusunun parçalanması ve yaygın akciğer hasarı ile karakterize olup, yüksek mortalite oranlarıyla seyretmektedir [48].

İdrar yolu enfeksiyonları, *Klebsiella pneumoniae*'nin neden olduğu diğer yaygın enfeksiyonlardır. Özellikle üriner kateter kullanan hastalarda yaygın olarak görülebilmektedir. Bunun yanı sıra, *Klebsiella pneumoniae* bakteriyemi ve sepsis gibi sistemik enfeksiyonlara da neden olabilir [2]. Bu durumlar özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde yaşamı tehdit eden sonuçlara yol açabilir [45]. Yara enfeksiyonları ve karın içi enfeksiyonlar da bu patojenin neden olduğu ciddi klinik durumlar arasında yer alır [2,45].

2.2.7. MDR ve PDR *Klebsiella pneumoniae* Enfeksiyonlarında Tedavi Yöntemleri

MDR ve PDR *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisi, sınırlı tedavi olanakları nedeniyle önemli bir klinik zorluk oluşturmaktadır [2]. Bu tür dirençli suşlar, çoklu antibiyotik tedavilerine karşı direnç geliştirmiş olup, geleneksel tedavi yöntemlerini etkisiz hale getirir [33]. Fosfomisin, kolistin, aminoglikozidler (amikasin) ve karbapenemler (meropenem) gibi antibiyotikler, dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarına karşı etkinlik gösteren ajanlar arasında yer alır [49]. Ancak bu ajanların tek başına kullanımı her durumda yeterli etkinlik sağlayamayabildiğinden, genellikle antibiyotik kombinasyonlarına başvurulması gerekmektedir [50].

Tedavi stratejilerinin etkinliği, genellikle hasta bazında değerlendirilmelidir, çünkü hastaların genel sağlık durumu, enfeksiyonun yaygınlığı ve bakterinin direnç profili gibi faktörler tedavi sürecini büyük ölçüde etkileyebilir.

2.3. Fosfomisin

2.3.1. Fosfomisinin Etki Şekli

Fosfomisin, bakteriyel hücre duvarı biyosentezini spesifik ve geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe ederek antimikrobiyal etkisini gösteren geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. İlacın başlıca hedefi, peptidoglikan sentezinin ilk basamaklarından biri olan ve UDP-N-asetilglukozamin'in fosfoenolpirüvat ile birleşmesini katalize eden MurA (enolpirüvil transferaz) enzimidir. Fosfomisin, MurA enzimine kovalent olarak bağlanarak bu enzimin işlevini geri döndürülemez şekilde inhibe eder. Bu mekanizma, hücre duvarı sentezinin devam etmesini engeller, böylece bakterilerin hücresel bütünlüğü bozulur. Hücre duvarının sentezlenememesi, bakterilerin büyümesini durdurur ve sonunda hücre ölümü gerçekleşir [51].

Fosfomisinin hücre içine alınması, bakterilerin membran transport sistemleri aracılığıyla gerçekleşir. Fosfomisin, gliserol-3-fosfat ve glukoz-6-fosfat gibi maddeler aracılığıyla bakteriyel hücre zarından içeri alınır. Bu taşıma sistemlerinin aktifliği, fosfomisinin etkinliğini belirleyen önemli faktörlerden biridir. Bakterilerde bu taşıyıcı sistemlerde meydana gelebilecek mutasyonlar, fosfomisinin hücre içine alınmasını engelleyebilir ve bu durum bakteriyel direnç gelişimine katkıda bulunabilir [52].

Fosfomisinin bu etki mekanizması, özellikle hücre duvarı sentezini hedef alan diğer antibiyotiklerle sinerjik etkileşim göstermesi açısından önemlidir. Meropenem ve kolistin gibi antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanıldığında, hücre zarına ya da protein sentezine müdahale eden bu ajanlarla birlikte bakterilerin birçok biyolojik süreçte baskılanmasına neden olabilir. Bu sayede, çoklu dirençli patojenlere karşı daha etkili tedavi stratejileri geliştirilmiş olur [6].

2.3.2. Farmakokinetik Özellikler: Vücutta Dağılım ve Atılım

Fosfomisin hem oral hem de intravenöz formları olan bir antibiyotiktir ve farmakokinetik özellikleri uygulama yoluna bağlı olarak değişiklik gösterir. Oral fosfomisin trometamol formunda verilir ve gastrointestinal sistemde hızla emilir. Ancak oral biyoyararlanımı düşüktür; yaklaşık %30-40 oranında emilir ve biyoyararlanımı esas olarak idrar yollarında yüksek konsantrasyonlara ulaşmasıyla sınırlıdır. Bu nedenle fosfomisin, özellikle komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde sıkça tercih edilir [51].

İntravenöz fosfomisin ise, sistemik enfeksiyonlarda kullanılır ve plazmada hızlı bir şekilde yüksek konsantrasyonlara ulaşır. İntravenöz uygulama sonrasında fosfomisin, vücudun pek çok dokusuna yayılır, özellikle böbrekler, akciğerler, karaciğer ve safra yollarında yüksek düzeylere ulaşır. Ancak, fosfomisinin beyin omurilik sıvısına (BOS) geçişi sınırlıdır ve meningeal inflamasyon olmadığı sürece BOS'ta düşük konsantrasyonlarda bulunur [8,51].

İlacın yarı ömrü yaklaşık 4-8 saat olup, böbreklerden glomerüler filtrasyon yoluyla atılır. Renal yetmezlik durumunda, fosfomisinin eliminasyonu yavaşlayabilir ve bu durum, böbrek fonksiyonları bozulmuş hastalarda doz ayarlaması yapılmasını gerektirir [8,51].

2.3.3. Farmakodinamik Özellikler: Doz-Etki İlişkisi

Fosfomisin, bakterisidal etkili bir antibiyotiktir. [5]. Farmakodinamik açıdan fosfomisinin önemli bir özelliği, post-antibiyotik etki (PAE) göstermesidir. PAE, ilacın plazma konsantrasyonları minimum inhibitör konsantrasyon seviyesinin altına düştükten sonra bile antimikrobiyal etkinliğin devam ettiği süreyi ifade eder. Bu özellik, fosfomisinin klinikte doz aralıklarını optimize ederek kullanımını kolaylaştırır. Ayrıca, fosfomisinin diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanımı, tedavi süresince etkinliğini artırır [8]. Örneğin, meropenem veya kolistin gibi ajanlarla birlikte kullanıldığında, farklı mekanizmalara etki eden bu ilaçların sinerjisi, bakterilerin direnç geliştirme potansiyelini azaltır ve tedavi başarısını artırır [53].

2.3.4. Antimikrobiyal Etki Spektrumu

Fosfomisin, geniş bir antibakteriyel etki spektrumuna sahip bir antibiyotiktir ve hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere karşı etkinlik göstermektedir [53]. Gram-negatif bakteriler arasında fosfomisine en duyarlı olanlar *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* türleri, *Proteus mirabilis* ve *Serratia marcescens* gibi patojenlerdir [54–56].

Gram-pozitif bakteriler arasında ise fosfomisin, *Staphylococcus aureus* (özellikle metisiline dirençli *S. aureus*, MRSA), *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* gibi patojenlere karşı etkili bir bakterisidal etki gösterir [6,51].

Fosfomisinin bu geniş spektrumu, nozokomiyal enfeksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli klinik durumlarda kullanılmasını sağlar. Özellikle karbapenem ve kolistin gibi son çare antibiyotiklere dirençli suşlara karşı fosfomisinin etkinliği, bu ilacın kritik hasta gruplarında önemini artırmaktadır [5].

2.3.5. Fosfomisin Direnci ve Gelişim Yolları

Fosfomisin direnci, genellikle bakterilerin genetik adaptasyonları sonucunda ortaya çıkan üç ana mekanizma ile gelişir. İlk ve en yaygın direnç mekanizması, fosfomisinin hedef aldığı MurA enziminde meydana gelen mutasyonlardır. Bu

mutasyonlar, fosfomisin MurA'ya bağlanmasını engelleyerek ilacın etkisini azaltır [51,52].

İkinci direnç mekanizması, fosfomisin bakteriyel hücre içine girmesini sağlayan gliserol-3-fosfat ve glukoz-6-fosfat taşıyıcı proteinlerinde meydana gelen değişikliklerdir. Bu taşıma sistemlerinde oluşan mutasyonlar, ilacın hücre içine alınmasını engeller ve böylece bakterilerin fosfomisin karşısında dirençli hale gelmesine yol açar [57,58].

Üçüncü mekanizma ise bakterilerin fosfomisin etkisiz hale getirilmesine neden olan enzimler üretmesidir. FosA, FosB ve FosC gibi enzimler, fosfomisin etkisiz hale getirilmesine neden olur ve bu enzimler genellikle plazmid aracılığıyla aktarılabilir. Plazmid aracılığıyla taşınan bu direnç genleri, bakteriler arasında yatay gen transferi yoluyla hızla yayılabilir ve direnç gelişimini daha karmaşık hale getirebilir [52]. Özellikle MDR bakterilerde bu direnç mekanizmalarının bir arada görülmesi, fosfomisin etkinliğini sınırlayabilir.

2.3.6. Klinik Uygulamalar: Fosfomisin Rolü ve Kullanım Alanları

Fosfomisin, geniş bir klinik kullanım alanına sahip olup özellikle üriner sistem enfeksiyonlarında yaygın olarak tercih edilmektedir. Tek doz fosfomisin trometamol, alt üriner sistemin komplike olmayan enfeksiyonlarında yaygın kullanım alanı bulmakta ve hızlı iyileşme sağlamaktadır. Bununla birlikte, fosfomisin intravenöz formu, hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde önemi zamanla artmaktadır. Özellikle karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (CRE), çoklu ilaç direncine sahip *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlerle enfekte olan kritik hastalarda fosfomisin, tedavi seçeneklerinin tükenmeye başladığı durumlarda etkin bir alternatif sunmaktadır [6].

Yoğun bakım ünitesindeki hastalar, bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler ve septik şok gibi ciddi enfeksiyon tablosu gösteren hastalarda, fosfomisin genelde diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde yüksek doz intravenöz olarak uygulanabilmektedir. Bu tür durumlarda fosfomisin, etki spektrumunun genişliği ve yan etki profilinin düşüklüğü sayesinde tercih edilmektedir [59].

2.3.7. Antibiyotik Kombinasyonlarında Fosfomisin (Amikasin, Meropenem, Kolistin)

Fosfomisin, tek başına kullanıldığında etkinlik gösterebilse de, amikasin, meropenem ve kolistin gibi antibiyotiklerle kombinasyonu, çoklu ilaç dirençli patojenlere karşı tedavi etkinliğini artırma potansiyeli sunmaktadır. Bu tür kombinasyonlar, özellikle dirençli patojenlerin farklı biyokimyasal yollarını hedef alarak sinerjik bir etki oluşturabilmekte ve direnç gelişimini yavaşlatabilir [8,10,51].

Fosfomisin; imipenem, doripenem, kolistin, netilmisin, tigesiklin, amikasin, meropenem ve kolistin gibi antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında sinerjik bir etki gösterebilmektedir [8,60]. Amikasin ile fosfomisin kombinasyonun, Gram-negatif bakterilere karşı etkinliğini ortaya koyan çalışmalar olup, aminoglikozidlerin protein sentezini inhibe eden etkisiyle fosfomisinin hücre duvarı sentezini baskılayıcı etkisi birleştiğinde sinerjik bir etki ortaya çıkabilmektedir. [61]

Meropenem ile fosfomisin kombinasyonu, özellikle karbapenem dirençli Enterobacteriaceae suşlarına karşı etkili bir tedavi alternatifi olarak öne çıkmaktadır. Meropenem, bakteriyel transpeptidaz enzimlerini inhibe etmek suretiyle hücre duvarı sentezine yönelik geniş spektrumlu bir etki gösterirken, fosfomisin bu etkiyi tamamlayıcı bir mekanizma sunar. Fosfomisin, MurA olarak da bilinen UDP-N-asetilglukozamin-3-enolpiruviltransferaz enzimini inaktive ederek bakteriyel hücre duvarı biyosentezini engeller. Bu enzim, fosfoenolpiruvatın UDP-N-asetilglukozaminin 3'-hidroksil grubuna bağlanmasını katalize ederek peptidoglikan biyosentezinde kritik bir adım oluşturur. Fosfomisinin bu etkisi, meropenemin bakteriye girişini kolaylaştırabileceği için kombinasyon tedavisi sonuçlarını iyileştirebilmektedir [8,10,61–63].

Ancak yapılan bazı çalışmalarda kolistin ile fosfomisin kombinasyonunun, KPC pozitif suşlarda sinerjik bir etki gösterdiği, ancak OXA-48 pozitif suşlarda antagonistik bir etki oluşturduğu tespit edilmiştir [18,64].

Bu kombinasyonlar, hem bakteriyel direnç gelişimini azaltma hem de mortalite oranlarını düşürme açısından klinik olarak anlamlı faydalar sağlamaktadır, ancak her hasta ve enfeksiyon tipi için spesifik antibiyogram testleri yapılması ve bireysel

yaklaşım gerekliliği unutulmamalıdır [10]. Ancak sinerji testlerinin sonuçlarının her zaman klinik uygulamalarda fayda sağlayacağına ilişkin yeterli kanıt bulunmamaktadır [65].

2.3.8. Yan Etkiler ve Güvenlik Profili

İntravenöz ve oral fosfomisin, genellikle iyi tolere edilen ve güvenli profiliyle öne çıkan bir antibiyotik olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, oral formunda gastrointestinal yan etkiler yaygın olup, ishal ve karın ağrısı, bulantı, kusma gibi semptomlar gözlemlenebilir. İV fosfomisin disodyum kullanımı sırasında ise en sık hipernatremi ve hipokalemi gibi elektrolit bozuklukları görülmektedir [8].

Yapılan bir çalışmada, fosfomisinin aminoglikozidlerin neden olduğu mast hücre yıkımına bağlı histamin salınımını engelleyerek nefrotoksisiteye karşı koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir [66].

2.3.8. Fosfomisin Duyarlılığının Belirlenmesi: Yöntemlerin Karşılaştırılması ve Uygulama Zorlukları

Fosfomisin duyarlılığının belirlenmesinde agar dilüsyon yöntemi, glukoz-6-fosfat varlığında uygulanması gereken altın standart yöntem olarak kabul görmektedir. Ancak, bu yöntemin uygulanması laboratuvarlarda rutin çalışma koşulları açısından zorluklar oluşturabilmektedir. Otomatik sistemlerin fosfomisin duyarlılığını değerlendirmede güvenilir sonuçlar veremediği bildirilmiş olup, disk difüzyon yönteminin ise yalnızca *Escherichia coli* izolatları (idrar yolu kaynaklı) için geçerli sonuçlar sunmaktadır. Öte yandan, E-test yöntemiyle fosfomisin duyarlılığının belirlenmesi güvenilir bir yöntem olarak önerilmemektedir [67].

2.4. Amikasin

2.4.1. Amikasinin Etki Mekanizması

Amikasin, aminoglikozid sınıfı antibiyotikler arasında yer alan, bakterisidal etki gösteren bir ajandır (25). Etki mekanizması, bakterilerin ribozomal 30S alt birimine geri dönüşümsüz olarak bağlanarak, protein sentezini baskılamasına dayanır. Bu süreçte bakterilerde yanlış aminoasit dizilimi ile hatalı proteinler üretilir ve sonuçta bu hatalı proteinler, bakteri hücresinin normal işlevlerini yerine getirememesine neden

olur. Amikasinin, diğer aminoglikozidlere göre daha geniş bir etki spektrumuna sahip olması, özellikle aminoglikozid inaktivasyon enzimlerine karşı direnç gösterdiği durumlarda önemli bir avantaj sunmaktadır [12,68].

2.4.2. Amikasinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Amikasin, IV ya da IM olarak uygulanabilir ve her iki yolla da vücutta hızla dağılım gösterir. Uygulama sonrası doruk plazma seviyelerine IV yolla dakikalar içinde, IM yolla ise yaklaşık 30-60 dakika içinde ulaşır. Amikasin, vücut dokularına sınırlı penetrasyon gösterir; bu nedenle esas olarak hücre dışı sıvılarda yoğunlaşır [12,68].

Amikasin büyük ölçüde glomerüler filtrasyon yoluyla değişikliğe uğramadan böbrekler yoluyla atılır; bu nedenle, böbrek yetmezliği bulunan hastalarda eliminasyon yarı ömrü anlamlı şekilde artış göstermektedir ve dikkatli doz ayarlamaları gerektirir. Normal böbrek fonksiyonlarına sahip hastalarda yarı ömrü yaklaşık 2-3 saattir, ancak kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda bu süre dramatik şekilde uzayabilir [12,68].

2.4.3. Amikasinin Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları

Amikasin direnci, diğer aminoglikozidlerde olduğu gibi birkaç farklı mekanizma ile ortaya çıkar. Aminoglikozid modifiye edici enzimler, en sık karşılaşılan direnç mekanizmalarından birini oluşturmaktadır. Bu enzimler, aminoglikozid moleküllerini asetilasyon, fosforilasyon veya adenilasyon yoluyla değiştirerek, ilacın ribozomal hedeflerine bağlanmasını engeller ve antibakteriyel aktivitesini azaltır. Ancak amikasin, birçok aminoglikozid inaktivasyon enzimine karşı daha dirençli olduğundan, bu enzimlerin neden olduğu dirence karşı avantaj sağlar [69].

Bir diğer direnç mekanizması, bakterilerin ribozomal 30S alt biriminde meydana gelen mutasyonlardır. Bu mutasyonlar, aminoglikozidin ribozomal bağlanmasını ve protein sentezini inhibe etme yeteneğini azaltır. Ayrıca, bakteriyel hücre zarının geçirgenliğinde azalma ve porin kanallarında değişiklikler de ilacın hücreye girişini engelleyerek direnç gelişimine katkıda bulunur. Bakteriyel efflux pompalarının aktivasyonu ise ilacın hücre dışına atılmasını hızlandırarak, hücre içi antibiyotik konsantrasyonunu azaltır ve tedavi etkinliğini düşürür [69,70].

2.4.4. Amikasinin Klinik Kullanımı

Amikasin, nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde sıkça tercih edilen bir antibiyotiktir. Özellikle hastane kaynaklı pnömoni, sepsisemi, komplike idrar yolu enfeksiyonları, intraabdominal enfeksiyonlar ve yumuşak doku enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılır. Amikasinin klinik kullanımı, *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve diğer çoklu ilaç dirençli (MDR) Gram-negatif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde de önem taşır. Gram-pozitif bakterilerde genellikle sınırlı etkilidir ve genellikle beta-laktam antibiyotikler ya da glikopeptidler ile kombinasyon halinde kullanılır [12,68].

Amikasinin İV formu, ağır septik hastalarda veya immün baskılanmış bireylerde sistemik enfeksiyonların kontrolünde kullanılmak üzere formüle edilmiştir. Ayrıca ventilatör ile ilişkili pnömoni tedavisinde de amikasin önemli bir role sahiptir [12,68,70].

2.4.5. Toksisite ve Yan Etkiler

Amikasin, aminoglikozidlerin tipik yan etkilerini taşıyan bir ilaçtır. En belirgin yan etkiler arasında nefrotoksisite ve ototoksisite yer alır. Nefrotoksisite, özellikle uzun süreli kullanımda veya yüksek dozlarda uygulandığında görülebilmektedir. Böbreklerde ilacın birikmesi, hücre zedelenmesine neden olur ve bu tablo geri dönüşümsüz renal hasara kadar ilerleyebilir. Bu sebeple, böbrek fonksiyonları bozulmuş hastalarda doz ayarlamaları dikkatle yapılmalıdır [12].

Ototoksisite ise vestibüler ve koklear toksisite şeklinde ortaya çıkabilir. Vestibüler toksisite denge bozukluklarına yol açarken, koklear toksisite işitme kaybı ile sonuçlanabilir. Bu durum genellikle geri dönüşümsüzdür ve bu nedenle uzun süreli aminoglikozid tedavilerinde sıkı izlem gereklidir. Nadir de olsa nöromüsküler blokaj etkileri, özellikle altta yatan nöromüsküler hastalıkları olan hastalarda solunum kaslarının etkilenmesiyle ortaya çıkabilir [12].

2.5. Meropenem

2.5.1. Meropenemin Etki Mekanizması

Meropenem, karbapenem grubu bir beta-laktam antibiyotiktir ve bakterisidal aktivitesini esasen hücre duvarı sentezinde görevli penisilin bağlayıcı proteinlerle (PBP) etkileşime girerek bakteri hücre duvarının sentezinin inhibisyonu yoluyla gerçekleşir. Karbapenemler, özellikle geniş spektrumlu etkileri ve beta-laktamaz enzimleri tarafından inaktive edilememeleri ile dikkat çeker. Meropenemin geniş etki spektrumu, Gram-negatif, Gram-pozitif bakterileri hedef almasını sağlar; ancak Gram-negatif suşlar üzerinde daha güçlü bir aktivite gösterir [13].

2.5.2. Meropenem Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları

Meropenem direnci, başlıca karbapenemaz üreten bakterilerde görülmektedir (34). Özellikle KPC, NDM ve OXA tipi karbapenemazlar, meropenem direncinin yaygın nedenleri arasında yer alır (37). Ayrıca, bazı bakterilerde aktif efflux pompaları da meropenem gibi antibiyotikleri hücre dışına atarak direnç geliştirme mekanizmasını güçlendirebilir [13,71].

2.5.3. Meropenem Klinik Kullanımı

Meropenem, hem Gram-pozitif hem de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi dirençli Gram-negatif suşlara, aerob ve anaerob bakterilere karşı etkilidir ve bu geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliği nedeniyle ciddi, hayatı tehdit eden enfeksiyonlarda terapötik açıdan büyük önem taşır. Başta yoğun bakım ünitelerinde karşılaşılan MDR patojenlere karşı güçlü bir tedavi seçeneği sunar. Komplike intraabdominal enfeksiyonlar, bakteriyel menenjit, sepsisemi, nozokomiyal pnömoni ve ciddi cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi durumlar meropenem tedavisinin en yaygın kullanım alanlarıdır [13,71].

Meropenem ayrıca, immun sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyon riskini azaltmak için profilaktik olarak da kullanılabilir. Merkezi sinir sistemine iyi nüfuz etmesi ve menenjit gibi ciddi beyin enfeksiyonlarında etkinliği, klinik kullanımını daha da genişletmektedir [71].

2.5.4. Toksisite ve Yan Etkiler

Meropenem iyi tolere edilse de bazen istenmeyen yan etkiler görülebilir. Sıklıkla karşılaşılan yan etkiler gastrointestinal sistem üzerinde olup, en sık gözlenenler; bulantı, kusma, ishal ve abdominal rahatsızlıktır. Nörolojik yan etkiler arasında baş ağrısı, konfüzyon ve nadiren nöbetler yer alır. Özellikle yüksek dozlarda veya böbrek fonksiyonları bozuk olan hastalarda nöbet riski artabilir [71].

Alerjik reaksiyonlar, özellikle beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı duyarlılığı olan hastalarda daha sık görülür. Bu durum cilt döküntüleri, kaşıntı ve nadir durumlarda anafilaksi şeklinde kendini gösterebilir. Hematolojik yan etkilerden lökopeni, trombositopeni ve eozinofili gibi kan hücrelerinde anormallikler görülebilir. Ayrıca, meropenem uzun süreli kullanıldığında böbrek fonksiyonları üzerinde olumsuz etkiler yapabileceğinden böbrek fonksiyonlarının izlenmesi gerekir [71].

2.6. Kolistin

2.6.1. Kolistinin Etki Mekanizması

Kolistin, polimiksin sınıfına ait, bakterisidal etkili bir antibiyotiktir. Temel etki mekanizması, bakteriyel hücre zarının dış membranına bağlanarak hücre zarı permeabilitesini bozmaktır. Bu süreç, LPS molekülleri ile etkileşime girerek hücre zarında destabilizasyona yol açar ve hücre içi bileşenlerin dışarı sızmasına neden olur. Kolistin, Gram-negatif bakterilere karşı oldukça etkilidir, çünkü bu bakterilerin dış membranı lipid tabakalarından zengin bir yapıdadır ve polimiksinlerin hedefi olan LPS moleküllerine sahiptir [16].

2.6.2. Kolistinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Kolistin, IV olarak uygulandığında prodrug formu olan kolistin metansülfonat (kolistimetat sodyum, CMS) şeklinde verilir. CMS, dolaşımda aktif kolistine dönüşür. Kolistinin farmakokinetik profili oldukça karmaşıktır, çünkü böbrek yoluyla yavaş bir şekilde elimine olur ve aktif formda plazmada düşük konsantrasyonlarda bulunur. Kolistinin farmakodinamiği, zamana bağımlı antibiyotikler kategorisine girer. Bu nedenle, plazma konsantrasyonunun belli bir eşiğin üzerinde olması önemlidir [16].

2.6.3. Kolistin Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları

Kolistin, 1950'lerde ilk kez kullanıldığında direnç gelişimi sınırlıydı, ancak son yıllarda dirençli suşların sayısında artış gözlenmiştir. En yaygın direnç mekanizması, bakterilerin hücre dış zarı lipid A bölgesinde yapısal değişiklikler yaparak kolistinin bağlanmasını engellemesidir. Bu değişiklikler, *mcr-1* gibi plazmid kaynaklı genlerle veya kromozomal mutasyonlarla gerçekleşebilir. Plazmid aracılığıyla hızla yayılabilen bu direnç mekanizması, kolistin gibi son çare antibiyotiklerin etkinliğini tehdit etmektedir [72].

2.6.4. Kolistinin Klinik Kullanımı

Kolistin, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülen MDR ve PDR Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Kolistinin özellikle CRE suşlarına karşı önemli bir tedavi seçeneği olarak kullanımı yaygındır [16]. Klinik uygulamalarda, kolistin metansülfonat (CMS) intravenöz formu kullanılır ve genellikle ciddi enfeksiyonlar, sepsis, alt solunum yolu enfeksiyonları, ventilatör ilişkili pnömoni ve komplike üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilir [73]. Kolistin nebulizasyon yöntemiyle solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılabilir [74]. Ancak, kolistin tedavisi sırasında böbrek fonksiyonlarının dikkatle izlenmesi gereklidir, çünkü nefrotoksisite kolistinin yaygın bir yan etkisidir [16].

2.6.5. Kombinasyon Tedavilerinde Kolistin (Fosfomisin, Amikasin, Meropenem ile)

Kolistinin klinik kullanımı genellikle tek başına değil, diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde olur. Kolistin ile fosfomisin kombinasyonu, özellikle CR-Kp suşlarına karşı etkili bir sinerji gösterebilmektedir [9,75]. Amikasin ile kolistin kombinasyonu da MDR *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlere karşı sinerjik etki gösterebilmektedir [76]. Kombinasyon tedavileri, genellikle ağır hastalık tablolarında veya monoterapi ile başarısız olunan durumlarda tercih edilmektedir [16,73].

2.6.6. Toksisite ve Yan Etkiler

Kolistin tedavisinin en belirgin yan etkisi nefrotoksisite olup, doz bağımlı böbrek hasarı gelişebilir. Özellikle uzun süreli ve yüksek doz kolistin kullanımı, akut böbrek yetmezliği riskini artırabilmektedir. Nefrotoksisitenin mekanizması, kolistinin böbrek tübüllerinde birikmesi ve hücre zarını bozarak hücre hasarına neden olmasından kaynaklanır [16,73].

Ayrıca, nörotoksisite de kolistin tedavisi sırasında karşılaşılan bir diğer önemli sorundur. Hastalarda baş dönmesi, parestezi, konfüzyon ve nadiren kas güçsüzlüğü gibi nörolojik semptomlar ortaya çıkabilir. Bunun yanında, yüksek dozlarda kullanıldığında solunum depresyonu gibi ciddi yan etkiler görülebilir. Kolistin tedavisi sırasında bu yan etkilerin önlenmesi için, doz ayarlamasına dikkat edilmeli ve özellikle böbrek fonksiyonları düzenli olarak izlenmelidir [16].

2.7. Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri

Antibiyotik duyarlılık testleri, enfeksiyona neden olan patojenlerin spesifik antibiyotiklere karşı duyarlılığını veya direncini belirlemek için kullanılan yöntemlerdir. Bu testler, hastalık tedavisinde doğru antibiyotik seçiminde kritik bir rol oynar ve özellikle dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların kontrolünde büyük önem taşır [77].

2.7.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi, en yaygın kullanılan ve kolay uygulanabilir antibiyotik duyarlılık testlerinden biridir. İlk olarak 1966 yılında Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiştir. Disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülerek, bakterinin antibiyotiğe duyarlılığı hakkında bilgi elde edilir. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [78] ve EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [79] gibi kuruluşlar, antibiyotiklerin duyarlılık sınırlarını ve inhibisyon zonlarının değerlendirilmesini standartlaştırmıştır. Disk difüzyon yöntemi, özellikle rutin klinik laboratuvarlarda hızlı sonuç vermesi ve düşük maliyetli olması nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemde, dilüsyon testlerinde olduğu gibi doğrudan MİK değeri belirlenemez [80,81].

2.7.2. Gradient Difüzyon Test Yöntemi (Epsilometre Test – E-Test)

Epsilometre Test (E-Test), yarı kantitatif bir antibiyotik duyarlılık yöntemidir ve hem MİK değerini ölçebilir hem de disk difüzyon testine kıyasla daha hassas sonuçlar elde edilebilir. MİK değeri, şeridin etrafında oluşan inhibisyon zonunun şerit üzerindeki skalaya denk gelen noktasında ölçülür. Yöntem, yaygın bir şekilde Gram-negatif, Gram-pozitif patojenlerin, maya ve küflerin duyarlılık testlerinde kullanılır ve daha maliyetli olmasına rağmen kesin MİK değeri elde edilebilmesi ile avantaj sağlar [82].

2.7.3. Agar Dilüsyon Yöntemi

Agar dilüsyon yöntemi, antimikrobiyal duyarlılığın ölçümünde kullanılan kantitatif bir yöntemdir ve CLSI tarafından referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem, MİK değerlerinin kesin ve tekrarlanabilir ölçülmesini sağlar, ancak zaman alıcıdır ve yüksek iş gücü gerektirir. Klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaz, genellikle araştırma laboratuvarlarında tercih edilir [82].

Agar dilüsyon yöntemi, mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığını belirlemek için kullanılan standart bir laboratuvar tekniğidir. Bu yöntem, farklı konsantrasyonlardaki antimikrobiyal maddelerin katı besiyerine eklenmesi ve mikroorganizmanın bu ortamlardaki üremesinin gözlemlenmesi esasına dayanır [83].

Mueller-Hinton agar (MHA) gibi uygun bir besiyeri seçilir. Antimikrobiyal ajanların istenilen konsantrasyonları (genellikle seri dilüyon şeklinde), 40-45°C'deki erimiş agara eklenir. Hazırlanan karışım, petri kaplarına yaklaşık 3-4 mm kalınlık olacak şekilde dökülür ve katılaşmaya bırakılır [83].

Test edilecek mikroorganizma, saf kültürden elde edilir. Mikroorganizmanın yoğunluğu, 0.5 McFarland standardına (yaklaşık $1-2 \times 10^8$ CFU/ml) ayarlanır. Bu süspansiyon, 1:10 oranında seyreltilerek yaklaşık 10^7 CFU/ml'lik bir yoğunluk elde edilir. Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonundan 1-2 µl alınarak, antimikrobiyal ajan içeren agar plaklarının yüzeyine manuel olarak veya özel inokülatörler yardımıyla nokta inokülasyon yapılır [83].

Her bir plak, farklı bir antimikrobiyal konsantrasyonu içerir. İnoküle edilen plaklar, 35°C'de 18-24 saat süreyle inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında, her bir plak üzerindeki üreme durumu gözlemlenir. Mikroorganizmanın üremediği en düşük antimikrobiyal konsantrasyon, MİK değeri olarak belirlenir [67,83].

Agar dilüsyon yöntemi, özellikle çok sayıda suşun aynı anda test edilmesi gereken durumlarda ve anaerobik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem, sonuçların standardizasyonu ve tekrarlanabilirliği açısından güvenilirlik sağlar. Zaman ve yoğun emek gerektiren bir yöntemdir [83].

2.7.4. Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi

Sıvı makrodilüsyon yöntemi, hassas ve güvenilir sonuçlar sağlamasına rağmen pratikte yaygın olarak tercih edilmez, çünkü yüksek hacimli besiyeri kullanımı ve çok sayıda tüp gerektirir. Genellikle yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi sırasında veya araştırma laboratuvarlarında tercih edilmektedir [67].

2.7.5. Sıvı Mikrodilüsyon (SMD) Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, antimikrobiyal ajanların MİK değeri belirlenmesinde kullanılan yarı kantitatif standart bir mikrobiyolojik testtir. Bu yöntem, antimikrobiyal ilaçların bakteri veya mantar büyümesini engelleme kapasitesini ölçerek, tedaviye rehberlik edecek duyarlılık profillerinin oluşturulmasına katkı sağlar [67,84].

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, antimikrobiyal ajanların seri iki kat dilüsyonlarının steril bir sıvı besiyeri içinde hazırlanarak yapılır. Test, genellikle 96 kuyucuklu mikrotitre plaklarda gerçekleştirilir. Her bir kuyucuk, belirli bir konsantrasyonda antimikrobiyal madde içerir ve standart bir bakteri inokulumu ile aşılır. Negatif kontrol (yalnızca besiyeri) ve pozitif kontrol (bakteri ve besiyeri) kuyucukları da oluşturulur. Plaklar, uygun sıcaklıkta (genellikle 35-37°C) 16-20 saat arasında inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda büyüme olup olmadığı görsel ya da spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirilir. Büyümenin gözlemlenmediği en düşük antimikrobiyal konsantrasyon MİK olarak tanımlanır [84].

Hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlar. Farklı antimikrobiyal ajanların aynı anda test edilmesine olanak tanır. Yarı otomatik sistemlerle uyumlu çalışabilir. Ancak zaman alıcıdır, dikkatli pipetleme ve steril çalışma koşulları gerektirir. Yavaş büyüyen bakteriler için uygun değildir [84].

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde altın standart yöntemlerden biri olarak kabul edilmekte olup, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [67].

2.7.6. Otomatize Sistemler

Son yıllarda klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyotik duyarlılık testlerinde otomatize sistemlerin kullanımı artmıştır. Vitek, BD Phoenix ve MicroScan gibi otomatize sistemler, bakteriyel izolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin aynı anda gerçekleştirilmesini sağlar. Otomatize sistemlerin en önemli avantajları arasında hızlı sonuç alma ve manuel hataların azaltılması yer alır. Ancak, belirli bakteriler için sınırlı antibiyotik panelleri ve bazı zorlu patojenlerin test edilmesinde kısıtlılıklar dezavantajları arasındadır [85].

2.8. Antibiyotik Kombinasyon Testleri

Antibiyotik kombinasyon testleri, klinikte özellikle çoklu ilaç direncine sahip bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde önemli bir rol oynar. Kombinasyon tedavileri, genişletilmiş bir antibakteriyel spektrum ve direnç gelişimini engelleme gibi avantajlar sağlar. *Klebsiella pneumoniae* gibi MDR veya PDR patojenlerin tedavisinde fosfomisin gibi antibiyotiklerin diğer ajanlarla kombinasyonları, sinerjik etkileri açısından kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır [86].

2.8.1. Sinerji Saptama Yöntemleri

Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini değerlendirmek amacıyla çeşitli test yöntemleri geliştirilmiştir. Bu testler, antibiyotiklerin birlikte kullanımının sinerjik, aditif, antagonistik veya indiferans etkisini belirlemeye yönelik olup, dört ana grupta incelenebilir [87]:

✓ **Dilüsyon Yöntemleri (Dama tahtası (Checkerboard))**

- Sıvı Mikrodilüsyon
- Sıvı Makrodilüsyon
- Agar dilüsyon

✓ **Zamana Bağlı Öldürme Yöntemi (Time-Kill Assay)**

Bu yöntem, belirlenen zaman aralıklarında bakteri üreme oranlarının ölçülmesi yoluyla antibiyotiklerin bakterisidal etkisini belirlemek amacıyla kullanılır [87,88].

✓ **Disk Difüzyon Yöntemi**

Kombinasyon halindeki antibiyotiklerin inhibisyon zon çaplarını ölçerek etkileşim türünü değerlendirmeye olanak tanır [87].

✓ **E-test (Epsilometre Testi) (Gradient difüzyon yöntemi)**

Bu test, antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimlerini doğrudan MİK değerleri üzerinden belirlemeye yardımcı olur [87].

Dilüsyon yöntemleri, antibiyotik kombinasyonlarının inhibisyon etkilerini değerlendirirken, zamana bağlı öldürme yöntemi bakterisidal etkiyi analiz etmeye yöneliktir. Bu testler, kombine antibiyotik tedavilerinin klinik etkinliklerini öngörmek açısından önemli bilgiler sağlamaktadır [87].

2.8.1.1. Sıvı Mikrodilüsyon Dama Tahtası Yöntemi

Mikrodilüsyon yöntemi, antibiyotik kombinasyonlarının sinerji testlerinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemin uygulanması kolay olup, sonuçların yorumlanması pratik bir şekilde gerçekleştirilebilir [67,86,88].

Testin uygulanabilmesi için her bakteri suşu ve test edilecek antibiyotik kombinasyonu için ayrı olmak üzere, U-tabanlı ve 96 kuyucuklu steril mikropalaklar kullanılır. Antibiyotik kombinasyon testinde, öncelikle her iki antibiyotiğin stok solüsyonları farklı mikropalaklarda hazırlanır. İlk antibiyotik soldan sağa, ikinci antibiyotik ise yukarıdan aşağı doğru seri dilüsyonlarla seyreltilir. Daha sonra, ikinci antibiyotik içeren mikropalaktan, birinci antibiyotik solüsyonu bulunan mikropalağa

aktarım yapılır. Ayrıca, antibiyotiklerin MİK değerlerini belirlemek amacıyla mikroplağın belirli bölgelerinde kontrol sütunları ayrılır. Her antibiyotik için beklenen veya bilinen MİK değerlerinin en az 3-4 kat altından ve tercihen 4 kat üstüne kadar seyreltilmiş konsantrasyonlar kullanılarak çalışma gerçekleştirilir [87,88].

Testte kullanılacak bakteri süspansiyonu, taze izolatlardan elde edilir ve uygun besiyerinde subkültür edilerek hazırlanır. İnokulum hazırlamak için öncelikle, 0,5 McFarland bulanıklığında (yaklaşık $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) standart bir bakteri süspansiyonu hazırlanır. Mikrodilüsyon testi sırasında, her kuyucuğa belirli miktarda bakteri inoküle edildiğinde, son bakteri konsantrasyonunun ortalama 5×10^5 CFU/mL olması sağlanmalıdır. Bu amaçla, kuyucuklardaki toplam sıvı hacmi göz önüne alınarak uygun dilüsyonlar gerçekleştirilir. Örneğin, kuyucuğa 0,1 mL besiyeri ve 0,01 mL bakteri süspansiyonu eklenecekse, başlangıçtaki 0,5 McFarland süspansiyonu yaklaşık 1:20 oranında seyreltilerek 5×10^6 CFU/mL'ye ayarlanır. Bu süspansiyondan 0,01 mL mikroplağa eklenerek, hedeflenen 5×10^5 CFU/mL inokulum konsantrasyonuna ulaşılır [87,88].

Her mikroplakta, üreme kontrolü amacıyla bir kuyucuk antibiyotiksiz bırakılır. İnkübasyon sonunda bu kuyucukta yoğun bakteri üremesi gözlenmelidir. Ayrıca, mikroplakta bir diğer kuyucuk yalnızca besiyeri içerecek şekilde düzenlenir ve besiyerinin sterilitesini kontrol etmek için kullanılır. İnkübasyon tamamlandığında, bu kontrol kuyucuğunda bakteri üremesi olmaması beklenir [87].

Testin güvenilirliğini sağlamak için kalite kontrol suşları (örneğin *American Type Culture Collection* – ATCC suşları) kullanılır [86].

İnokulum saflığını kontrol etmek amacıyla, 5×10^6 CFU/mL olarak hazırlanmış süspansiyon 1:100 oranında seyreltilir ve 1 µL alınarak kanlı agara ekilir. 24 saatlik inkübasyonun ardından, agar yüzeyinde üreyen kolonilerin saf olup olmadığı değerlendirilir. Benzer şekilde, inokulum yoğunluğunu doğrulamak için üreme kontrol kuyucuğundan alınan 10 µL süspansiyon serum fizyolojik içinde 1:10 oranında seyreltilerek kademeli dilüsyonlar oluşturulur. Elde edilen son dilüsyondan 100 µL alınarak kanlı agara yayılır ve 35-37°C'de 16-20 saat inkübe edilir. Plak üzerinde ortalama 100 koloni (75-125 arası) gözlenmelidir [86].

Antibiyotik kombinasyon paneli tamamlandıktan sonra, mikroplaklar 35-37°C’de 16-20 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda, kalite kontrol suşlarının MİK değerleri belirlenmiş standart aralıklarla uyumlu ise ve inokulum kontrolleri beklenen sonuçları veriyorsa, test geçerli kabul edilir ve sonuçlar değerlendirilir [87].

Öncelikle, antibiyotiklerin tek başına MİK değerleri belirlenir. Ardından, kombinasyon kuyucukları incelenerek üreme gözlenen kuyucuklar kayıt altına alınır. Sonuçların değerlendirilmesi için her iki antibiyotiğin fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) hesaplanır. FİK değeri aşağıdaki formüle göre belirlenir [86,89]:

FİKA=A antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri/A antibiyotiğinin tek başına MİK değeri

FİKB=B antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri/B antibiyotiğinin tek başına MİK değeri

FİK İndeksi (FİKİ)=FİKA+FİKB

$$FIC = \left(\frac{MİK_A \text{ (kombinasyonda)}}{MİK_A \text{ (tek başına)}} \right) + \left(\frac{MİK_B \text{ (kombinasyonda)}}{MİK_B \text{ (tek başına)}} \right)$$

Şekil 1. FİKİ hesaplama formülü

Elde edilen FİKİ değerlerine göre antibiyotik kombinasyonunun etki profili aşağıdaki şekilde yorumlanır [86,90]:

- **FİKİ ≤ 0,5** → Sinerjistik etki
- **0,5 < FİKİ ≤ 1** → Aditif etki
- **1 < FİKİ ≤ 4** → İndiferans etki
- **FİKİ > 4** → Antagonistik etki

Bu yöntem, antibiyotik kombinasyonlarının etkileşimlerini değerlendirmede hassas ve güvenilir bir test olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

2.8.1.2. Makrodilüsyon Yöntemi

Makrodilüsyon yöntemi, mikrodilüsyon yöntemine benzer şekilde antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğini değerlendirmekte kullanılan bir yöntemdir. Ancak, uygulama mikropaklar yerine deney tüplerinde gerçekleştirilmekte olup, bu yönüyle mikrodilüsyondan farklılık göstermektedir. Test sırasında her tüpte bulunması gereken toplam hacim 1 mL olup, bu hacim 0,25 mL birinci antibiyotik solüsyonu, 0,25 mL ikinci antibiyotik solüsyonu ve 0,5 mL bakteri süspansiyonu olacak şekilde hazırlanır [87].

Makrodilüsyon yöntemi, daha büyük hacimlerde çalışılmasını gerektirdiğinden, geniş kapsamlı antibiyotik kombinasyon panellerinin tamamının bu yöntemle yürütülmesi zorluk yaratabilir. Bu nedenle, genellikle sınırlı sayıda antibiyotik kombinasyonu içeren kısıtlı paneller kullanılır. Çalışmalarda 1:2 MİK, MİK ve 2×MİK konsantrasyonları ile analiz gerçekleştirilir. Test sırasında kullanılan antibiyotik stok solüsyonlarının istenen son konsantrasyonun dört katı yoğunlukta hazırlanması gerekmektedir. Sonuçların değerlendirilmesi, mikrodilüsyon yöntemindeki ölçütler ile benzer şekilde yapılır [86,87].

2.8.1.3. Agar Dilüsyon Yöntemi

Agar dilüsyon yöntemi, az sayıda antibiyotik kombinasyonunun, ancak çok sayıda bakteri izolatu üzerinde test edilmesi gerektiğinde tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, klasik agar dilüsyon protokolü izlenerek antibiyotik kombinasyonlarının etkinliği değerlendirilir [87].

Öncelikle, antibiyotik stok solüsyonları istenen son konsantrasyonun 20 katı yoğunlukta hazırlanır. Bunun nedeni, petri kabında bulunan 20 mL besiyeri ile seyreltilerek uygun konsantrasyonun elde edilmesinin gerekliliğidir. Antibiyotik solüsyonlarının besiyerine eklenmesi sırasında, toplam agar hacminin %5'ini geçmeyecek şekilde ayarlanması önemlidir [87].

Bakteri inokülasyonu sırasında, her bir agar yüzeyine yaklaşık 10^4 CFU bakteri içerecek şekilde süspansiyon uygulanır. Testin inkübasyonu tamamlandıktan sonra, sonuçların değerlendirilmesi mikrodilüsyon yönteminde kullanılan kriterlere benzer şekilde yapılır [87].

Bu yöntem, özellikle büyük ölçekli çalışmalarda geniş bakteri popülasyonlarının değerlendirilmesine olanak tanımakta olup, antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğini kapsamlı bir şekilde analiz etmek için sıkça tercih edilmektedir [79,83].

2.8.1.4. Zamana Bağlı Öldürme Testi (Time-Kill Yöntemi)

Time-kill yöntemi, antimikrobiyal ajanların ve bunların çeşitli kombinasyonlarının bakteriyel canlılık üzerindeki etkilerini zaman içinde izleyerek sinerjik veya antagonistik etkileşimleri belirlemek amacıyla kullanılan bir in vitro yöntemdir. Bu yöntem, bir antimikrobiyal maddenin zamana bağlı olarak mikroorganizma üremesi üzerindeki baskılayıcı veya öldürücü etkisini değerlendirme amacı taşır. Hem öldürme hızını hem de öldürme kapasitesini değerlendirebilme imkanı sunmasına rağmen, standartlaştırılmış bir protokolü bulunmamaktadır [78,91].

Testin uygulanmasına başlamadan önce, dama tahtası (checkerboard) sinerji testi sonuçları analiz edilerek sinerji göstermesi en muhtemel ilaç konsantrasyonları belirlenir. Bu yöntem belli bir antimikrobiyal ajanın sabit konsantrasyonlarda mikroorganizma kültürlerine uygulanması ve farklı zaman noktalarında (0, 2, 4, 6, 8, 24 saat gibi) numuneler alınarak CFU/mL değerinin kantitatif olarak belirlenmesi esasına dayanır. Bu veriler, zamana karşı logaritmik CFU/mL grafiğine dökülerek antimikrobiyal etkinliğin kinetiği analiz edilir [91].

Test edilecek mikroorganizma saf kültürlerden elde edilmektedir ve standart bir yoğunluğa (genellikle 10^5 - 10^6 CFU/mL) ayarlanmaktadır. Sinerjik etkinin beklenmesi durumunda, antimikrobiyal ajanlar belirlenen MİK değerinin 1/4 ve 1/8 oranlarında test edilirken; antagonistik bir etkinin öngörüldüğü durumlarda ise her bir ajan $2 \times$ MİK düzeyinde incelenir. Antibiyotikler hem tek başlarına hem de kombinasyon halinde değerlendirilir. Bu yöntem yüksek düzeyde emek ve zaman gerektirdiğinden, bir seferde sınırlı sayıda bakteri suşu ve antimikrobiyal konsantrasyon çalışılabilmektedir [91].

Belirlenen konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajan mikroorganizma süspansiyonuna eklenir. Belirli zaman dilimlerinde (0, 2, 4, 6, 8, 24 saat) numuneler alınır ve seri seyreltmeler yapılarak petri kaplarına ekilir. Plakalar uygun inkübasyon koşullarında bekletilir. Koloni sayımı, 30 ile 300 arasında koloni üremesi gösteren

plaklardan gerçekleştirilir. Toplam koloni sayısı, ekim sırasında kullanılan dilüsyon faktörleriyle çarpılarak mililitre başına düşen CFU değeri hesaplanır. Elde edilen bu değerlerin 10 tabanında logaritması alınarak zamana karşı (x eksen) $\log_{10}$ CFU/ml (y eksen) değerlerini gösteren bir zamana bağlı öldürme eğrisi oluşturulur. Elde edilen veriler, logaritmik üreyebilme kapasitesi (CFU/mL) ile zamana karşı grafiklendirilir. Antimikrobiyal ajanın etkinliği, kontrol grubuna göre 3 $\log_{10}$ CFU/mL veya daha fazla azalma göstermesi durumunda bakterisidal olarak kabul edilir. Zamana bağlı öldürme testi sonuçlarına göre sinerji, en etkili tekil ajana kıyasla kombinasyon tedavisinde $\geq 2 \log_{10}$ CFU/ml düzeyinde daha fazla bakteri azalması ile tanımlanır. Antagonizma ise, en etkili tekil ajana kıyasla kombinasyon tedavisinde $\geq 2 \log_{10}$ CFU/ml artış gözlenmesi ile belirlenir [91].

Antimikrobiyal ajanın zaman içerisindeki etkisini göstermesi, kombinasyon tedavilerinin etkinliğini değerlendirebilmesi gibi avantajları, laboratuvar koşullarında çok sayıda malzeme ve zaman gerektirmesi, in vivo koşullarla tam uyumlu olmaması gibi sınırlılıkları vardır [88,91].

Antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanılması sonucunda, ajanlar arasında dört farklı etkileşim türü gözlemlenebilir [86,89,90]:

Sinerjistik Etki: Kombinasyona dahil edilen antibiyotiklerin birlikte oluşturduğu etki, her birinin tek başına gösterdiği etkiden anlamlı derecede daha yüksektir. Bu etkileşim, antibiyotiklerin farklı mekanizmalar üzerinden veya aynı mekanizma üzerinde farklı yollarla etki göstermesi sonucunda ortaya çıkabilir. Sinerjistik etki, direnç gelişimini yavaşlatma, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite sağlama ve polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisini kolaylaştırma gibi önemli avantajlar sunar [92].

Antagonistik Etki: Antibiyotiklerin birlikte kullanımı, her birinin ayrı ayrı gösterdiği etkinin toplamından daha düşük bir etkiye neden oluyorsa, bu durum antagonistik etki olarak adlandırılır. Bu tür bir etkileşim, tedavi başarısını azaltabileceği gibi direnç gelişimini hızlandırma riskini de beraberinde getirebilir [92].

Aditif Etki: Kombinasyona dahil edilen antibiyotiklerin birlikte oluşturduğu etki, tek tek kullanıldıklarında gösterdikleri etkilerin toplamına eşittir. Bu durumda,

antibiyotikler arasında tam anlamıyla sinerjik bir etkileşim olmasa da tedavi etkinliğinde artış sağlanabilir [92].

İndiferans Etki (Etkileşim yok): Kombinasyona giren antibiyotiklerden biri baskın etki gösterirken, diğerinin etkisi belirgin bir değişiklik yaratmaz. Bu durumda, kombinasyonun etkinliği, en güçlü antibiyotiğin tek başına gösterdiği etkiye eşdeğer olur ve antibiyotikler arasında anlamlı bir etkileşim gözlenmez [92].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Örneklerinin Toplanması

Bu uzmanlık tez çalışması retrospektif, tek merkezli ve kesitsel bir araştırma olarak planlanmıştır. Çalışmaya, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Ocak 2015 - Aralık 2022 tarihleri arasında, sekiz yıllık süreçte kan kültüründe karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* üremesi saptanan ve klinik enfeksiyon tanısı alan 18 yaş üzerindeki hastalar dahil edilmiştir. Aynı hastadan alınan tekrarlayan numunelerde izole edilen mikroorganizmalar ise çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2. Gereç

3.2.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Etüv 37C ° (Memmert)

Buzdolabı (+4,-20 °C) (Uğur)

Derin Dondurucu

Otoklav (Hirayama)

Vorteks (İsolab)

Hassas terazi (Shimadzu)

Hassas terazi (Denver Instrument)

Pastör fırını (Memmert)

Ayarlanabilir otomatik pipet (1-10µl) (RAININ)

Ayarlanabilir otomatik pipet (100-1000µl) (RAININ)

McFarland Cihazı

Biyolojik kabin (Class II)

Çok noktalı inokülatör (Multipoint inoculator) (AQS, UK)

3.2.2 Besiyerleri

%5 Koyun Kanlı Agar (KKA)

Kasyon Ayrılmı Mueller Hinton Broth (KAMHB) (BD)

Mueller Hinton Broth (MHB) (Biolab)

Agar Agar (Biolife)

3.2.3. Sarf Malzemeler

Steril Petri kutuları (90 mm)

MacFarland 0.5 Standardı

Eldiven (Vinil-Small)

Otoklav bandı

Otoklav poşeti

Steril Eppendorf tüpleri (2 ml)

Steril cam tüp

Steril tek kullanımlık plastik öze

Mikrosantrifüj tüpü -1.5 ml

Steril folkon tüpü (15ml, 50 ml) (Microcult)

Steril Pipet ucu- Filtreli 1-10 µL (Microcult)

Steril Pipet ucu –Filtreli 100 µl (Microcult)

Steril Pipet ucu –Filtreli 200 µl (Microcult)

Steril Pipet ucu-Filtreli 1000 µl (Microcult)

Steril Mikroplate (U tabanlı, 96 kuyucuklu)

3.2.4. Antibiyotikler ve Kullanılan Diğer Kimyasallar

Fosfomisin disodyum salt hidrat (Biosynth, UK)

Kolistin sülfat antibiyotik tozu (Biosynth, UK)

Amikasin (Biosynth, UK)

Meropenem trihidrat antibiyotik tozu (Biosynth, UK)

d-Glikoz 6-fosfat disodyum salt hidrat (Biosynth, UK)

%0,9 steril serum fizyolojik

Steril distile su

%20 gliserollü Tryptic Soy Broth

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bakteri izolatlarının toplanması

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilmiş, konvansiyonel yöntemlerle *Klebsiella* spp. olarak tanımlandıktan sonra MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry) (bioMérieux, Fransa) kullanılarak *K. pneumoniae* olarak tespit edilen kökenlerden karbapenem direnci saptananlar dahil edildi. Bu suşların karbapenem direnci disk difüzyon yöntemi, E-test yöntemi ve moleküler olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun bulunan 150 hastaya ait karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşu analiz kapsamına alınmıştır. Agar dilüyon testi tüm izolatlar için aynı koşullarda gerçekleştirilmiş olup, saf kültürler %20 gliserollü Tryptic Soy Broth besiyerinde -20°C’de stoklanmıştır.

3.3.2. Klinik Örneklerin Kültür İşlemleri

Periferik kan örnekleri, BACTEC FX (Becton Dickinson, ABD) sisteminde inkübasyona alınmak üzere Bactec Plus aerobic/F veya BD Bactec Peds Plus/F şişelerine inoküle edilmiştir. Üreme sinyali veren şişelerden katı besiyerlerine (%5 KKA, Mac Concey agar) subkültürler yapılmıştır.

Gram negatif çomak üremesi saptanan petrillerdeki kolonilerden TSI (Triple Sugar Iron) agar, Simmon's sitrat agar, glukoz agar, hareket ve indol (MIO) besiyerlerine pasajlandı, *Klebsiella* spp. olduğu düşünülen suşlardan otomatize sistemler kullanılarak *K. pneumoniae* olarak tespit edilen bakteriler için antibiyotik duyarlılık çalışması yapıldı.

3.3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı arşivinde bulunan ve çalışmaya dahil edilen 150 hastaya ait -80°C'de %10 gliserin içeren triptik soy buyyon içerisinde saklanan CR-Kp izolatları, taze pasaj alınması amacıyla MacConkey agar (bioMérieux, Fransa) besiyerine ekilmiş ve 35-37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. CR-Kp suşlarında meropenem direncinin doğrulanması ve diğer antibiyotiklere duyarlılığın belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan 0.5 McFarland yoğunluğunda ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) bakteri süpansiyonu MHA (bioMérieux, Fransa) besiyerine steril eküvyon ile yayılarak imipenem (IPM, 10 µg), meropenem (MEM, 10 µg), siprofloksasin (CIP, 5 µg), amikasin (AK, 30 µg), gentamisin (GN, 10 µg), piperasilin-tazobaktam (TZP, 20/10 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SXT, 1.25/23.75 µg), seftazidim (CAZ, 10 µg), seftazidim-avibaktam (CAZ-AVI, 10/4 µg), sefepim (FEP, 30 µg), sefotaksim (CTX, 5 µg), amoksisilin-klavulanat (AMC, 20/10 µg) antibiyotik diskleri ile duyarlılık testleri uygulanmıştır. Diskler yerleştirildikten sonra, 35-37°C'de 20 saat inkübasyona alınmış ve inkübasyon sonrasında duyarlılık zon çapları ölçülmüştür. Testler, Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (EUCAST) 15.0 rehberi doğrultusunda değerlendirilmiştir.

Meropenem Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Düzeyinin Belirlenmesi

Meropenem MİK düzeyleri, gradiyent yöntemi (E-test) ile belirlenmiştir. Bu amaçla, disk difüzyon yöntemi ile hazırlanan bakteri süpansiyonu MHA besiyerine yayıldıktan sonra meropenem içeren E-test (bioMérieux, Fransa) şeritleri besiyerine yerleştirilmiş ve 35-37°C'de 20 saat inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrasında, elips şeklindeki inhibisyon alanının şeridi kestiği nokta belirlenerek MİK değerleri tespit edilmiştir. Sonuçlar, EUCAST 15.0 rehberinde belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiştir.

Kolistin MİK Düzeyinin Belirlenmesi

Kolistin MİK düzeyleri EUCAST 15.0 ve CLSI M100 (Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri İçin Performans Standartları) önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon ile saptanmıştır. *E. coli* ATCC 25922 ve NCTC 13846 suşları kontrol suşları olarak çalışılmıştır.

Test edilecek her bir izolat ve kontrol suşları için steril izotonik NaCl kullanılarak doğrudan koloni süspansiyon yöntemiyle 0,5 McFarland standardında süspansiyon hazırlandı.

Çalışmada kullanılan katyon ayarlı Mueller-Hinton toz besiyeri (KAMHB), 22 mg olacak şekilde ölçülerek 1000 mL distile su içerisinde tamamen çözülene kadar karıştırıldı. Hazırlanan karışım, sterilizasyon sağlamak amacıyla otoklavda 121 °C’de 15 dakika süreyle işlem gördü. Sterilizasyon işleminin ardından otoklavdan çıkarılan sıvı besiyeri oda sıcaklığına geldikten sonra, her bir mikropalak kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde dağıtıldı.

Kolistin, Kolistin sülfat toz formunda temin edilerek (Biosynth, UK) steril distile su ile, üreticinin belirttiği potens değerleri dikkate alınarak, hacim, ağırlık ve potens ilişkisini ifade eden aşağıdaki formüle göre hazırlandı ve stok çözeltisi hâline getirildi.

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

Bu formüle göre, 20 ml distile su içerisine 51,2 mg kolistin sülfat çözündürülerek kolistin için stok çözelti konsantrasyonu 1.280 mg/L olacak şekilde hazırlanarak çalışmada kullanıldı.

Çalışmanın yapılacağı gün 1 mL’lik antibiyotik süspansiyonu oda sıcaklığında çözündürüldü. Daha sonra, 9 mL KAMHB ile 1/10 oranında dilüe edildi. Bu işlem sonucunda, süspansiyonun son konsantrasyonu 128 µg/mL olarak elde edildi. A1’den H1’e kadar olan ikinci kuyucuklara, 128 µg/ml konsantrasyonundaki kolistin çözeltisinden 100 µL ilave edildi, böylece 100 µL KAMHB ile birleştiği için 2. kuyucuğun derişimi 64 µg/mL oldu. İkinci kuyucuktan başlanarak pipetaj işlemiyle 2’den 11’e kadar seri dilüsyon yapıldı. Her kuyucuktan 100 µL alınarak bir sonraki

kuyucuğa aktarıldı. Son kuyucuktan pipetaj yapıldıktan sonra 100 µL sıvı dışarı atıldı. 12. kuyucuğa ilaç eklenmedi ve bu kuyucuk üreme kontrolü olarak kullanıldı.

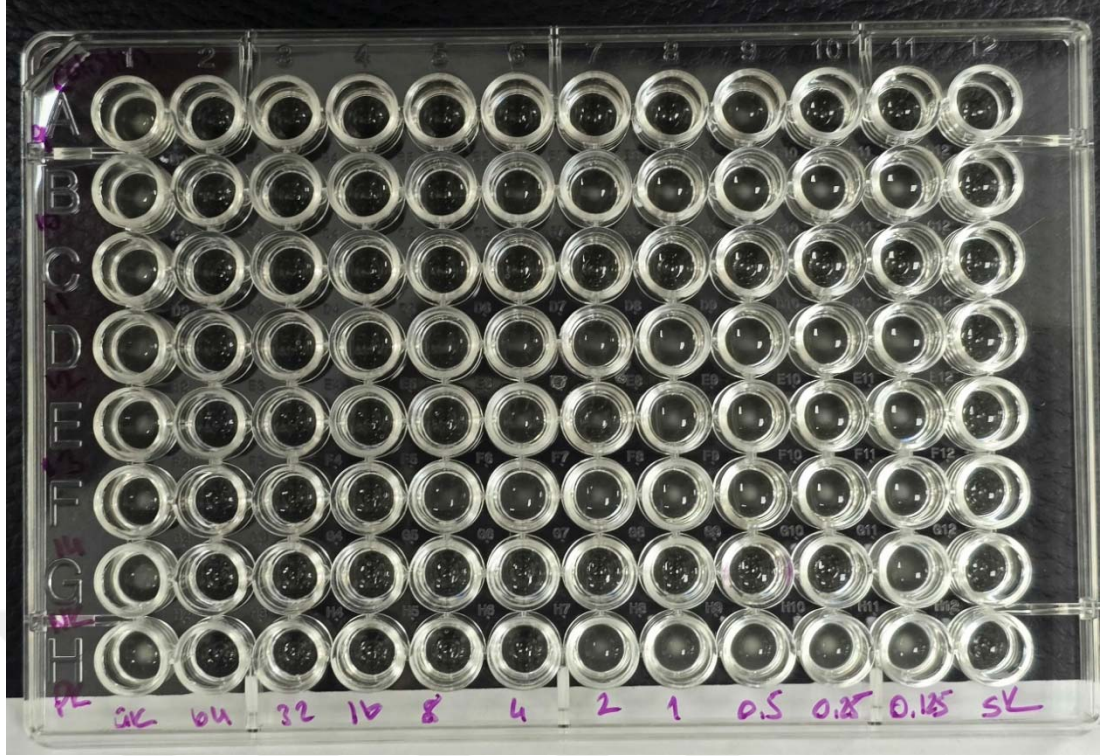
McFarland 0.5 standardında hazırlanan inokulum, 1:10 oranında dilüe edildikten sonra, her bir izolat için yatay bir sıra kullanılacak şekilde (1'den 12'ye kadar) sterilite kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 5 µL olacak şekilde bakteri süspansiyonu eklendi, inokulum 15 dakika içerisinde mikropklara inoküle edildi. Böylece mikropklardaki bakterinin son konsantrasyonu ortalama 5×10^5 CFU/mL oldu. Seri antibiyotik dilüsyonları ve bakteri inokulumları yapılan mikropklateler, 37 °C'de, 24 saat süreyle aerobik ortamda inkübe edildi.

Kalite kontrol suşlarının MİK değerleri, referans MİK değerleriyle uyumluysa; inokulum saflık kontrolü, üreme kontrolü, besiyeri sterilite kontrolü ve inokulum yoğunluğu beklendiği gibi ise test geçerli kabul edildi.

İnkübasyon süresi sonunda, her kuyucuktaki bakteri üremesi makroskopik olarak değerlendirildi. Görülebilir bulanıklığın olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu, MİK değeri olarak kaydedildi. Elde edilen MİK değerleri, EUCAST 15.0 sınır değerlerine göre standart dozda duyarlı, artmış dozda duyarlı veya dirençli şeklinde yorumlandı.

	Üreme Kontrol	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	0,5 mg/L	0,25 mg/L	0,125 mg/L	Sterilite Kontrol
A	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1	Suş 1
B	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2	Suş 2
C	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3	Suş 3
D	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4	Suş 4
E	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5	Suş 5
F	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6	Suş 6
G	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922
H	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846	NCTC 13846

Şekil 2. Kolistin sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematik gösterimi



Şekil 3. Kolistin sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Amikasin MİK Düzeyinin Belirlenmesi

Amikasin MİK değeri sıvı mikrodilüsyon ile belirlenmiştir. Stok çözeltisi hazırlamak amacıyla yukarıdaki formülden yola çıkarak 10 ml steril distile suda 102,5 mg amikasin toz formu (Biosynth, UK) çözündürülmüş ve 10.240 mg/L konsantrasyonunda stok solüsyonu elde edilmiştir. Antibiyotiklerin konsantrasyonları, duyarlılık MİK aralığının dört kat altı ve üç kat üstünü kapsayacak şekilde belirlenerek test için hazırlanmıştır.

Yukarıda anlatılan basamaklar takip edilerek sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiş ve yorumlanmıştır.

Üreme Kontrol	256 mg/L	128 mg/L	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	0.5 mg/L	Sterilite Kontrol
Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1	Suşı 1
Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2	Suşı 2
Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3	Suşı 3
Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4	Suşı 4
Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5	Suşı 5
Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6	Suşı 6
Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7	Suşı 7
ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922

Şekil 4. Amikasinin sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematik gösterimi

Fosfomisin MİK Düzeyinin Belirlenmesi

Fosfomisin MİK değeri CLSI M100 (Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri İçin Performans Standartları) önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Besiyeri olarak önerilen besiyeri MHA (Biolab) kullanıldı. MHA, üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanarak, 121 °C’de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edildi. Ardından, 45-50 °C sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda bekletildi bu sırada planlanan antibiyotik konsantrasyonları hazırlandı.

Duyarlılık çalışması, 1024 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonları arasında planlandı. Bu amaçla, 10.240 mg/l yoğunluğunda fosfomisin stok solüsyonu hazırlamak için 205 mg fosfomisin disodyum salt hidrat antibiyotiği (Biosynth, UK), 20 ml steril distile su içinde bir falkon tüpünde çözülmüştür. Ardından, her biri 10 ml steril distile su içeren steril falkon tüplerine sırasıyla seri dilüsyonlar uygulanmıştır. Son tüpten 10 ml alınarak uzaklaştırılmıştır. Böylece değişik konsantrasyonlarda fosfomisin antibiyotik solüsyonları elde edilmiştir.

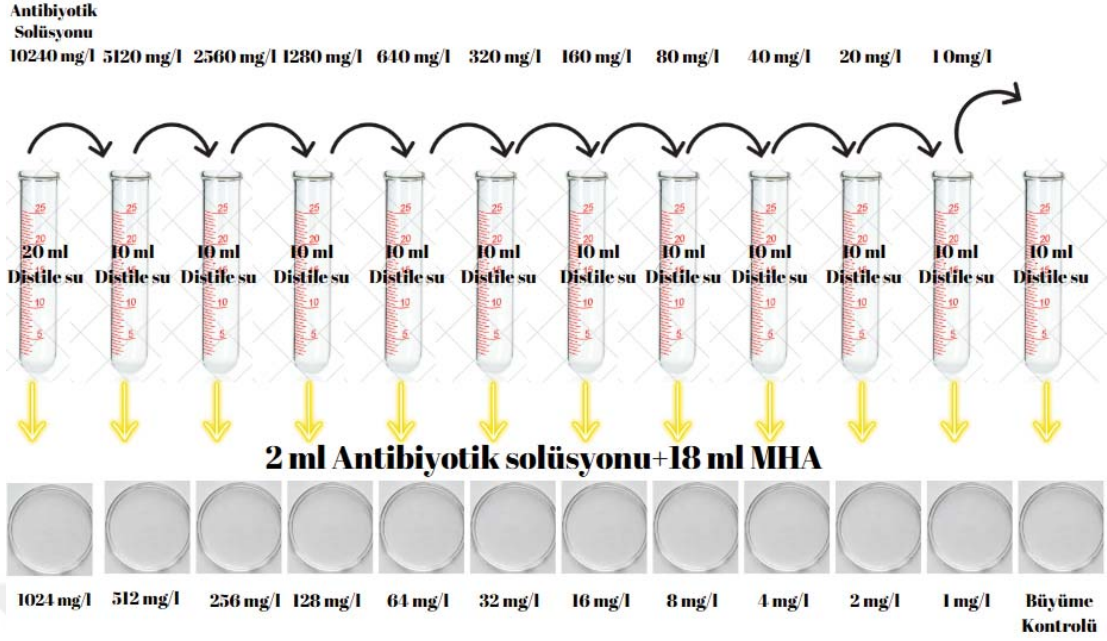
Fosfomisin moleküllerinin bakteri hücrelerine taşınmasında, gliserol-3-fosfat taşıyıcı (GlpT) ve glikoz-6-fosfat taşıyıcı (UhpT) permeazlar görev alır. GlpT, başlangıçta herhangi bir uyarıya ihtiyaç duymadan aktifleşirken, UhpT’nin etkinleşebilmesi için ortamda glikoz-6-fosfat (G6P) bulunması gerekmektedir. Bu

nedenle, fosfomisin alımını artırarak enfeksiyon bölgesindeki fizyolojik koşullara daha yakın bir ortam sağlamak amacıyla, agar dilüsyon yönteminde G6P eklenmesi önerilir. G6P ilavesi, MİK değerinin düşmesini sağlayarak, teorik değere daha yakın sonuçlar elde edilmesine ve yalancı dirençlerin önlenmesine yardımcı olur. EUCAST, agar dilüsyon yönteminde kullanılan MHA besiyerine 25 mg/L G6P eklenmesini önermektedir. Bu doğrultuda, 1 litre besiyeri için 25 mg G6P tartıldı. Daha sonra, 45-55 °C'ye kadar soğutulmuş 1 litrelik besiyerinden 20 ml alınarak, içerisinde 25 mg G6P çözüldü. Elde edilen G6P içeren 20 ml'lik MHA, 0,45 µm gözenek çapına sahip besiyeri filtresinden geçirilerek sterilize edildi. Son olarak, sterilize edilen karışım, kalan besiyeri ile birleştirildi ve böylece 25 µg/ml (25 mg/L) konsantrasyonunda G6P elde edildi.

Antibiyotik solüsyonlarından 2 ml, MHA 18 ml olacak şekilde boş petri kaplarına döküldü. Böylece, her petri 1024, 512, 256,...,2, 1 oranlarında farklı 11 antibiyotik konsantrasyonu içermekteydi. Son petriye üreme kontrolü olarak antibiyotik solüsyonu eklenmeden bırakıldı. Her petride 50 örnek çalışılması planlandığı için her konsantrasyondan 3'er adet olmak üzere toplam 36 adet besiyeri hazırlandı. Ertesi gün kullanılmak üzere +4 derecede buzdolabında saklandı.

Çalışma günü test edilecek bakterilerden 0.5 McFarland yoğunluğunda süspansiyonları hazırlandı. Sonrasında, serum fizyolojik ile 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 CFU/ml yoğunluğunda bir bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar, özel inokülasyon cihazı yardımıyla inoküle edileceği için basım işlemi kolaylaştırmak amacıyla özel işaretlenen mikropatelere 300'er µl koyuldu. Her petriye belli işaretlemeler ve numaralandırmalar yapılarak 50 adet bakteri solüsyonundan 1-2 ml inoküle edildi. Bu işlemle birlikte, agar yüzeyinde ortalama 10^4 CFU/ml bakteri yoğunluğu sağlanmış oldu. Bu işlem kalan 100 bakteri için de uygulandı.

İnoküle edilen petriler, 35 °C sıcaklıkta 18-24 saat inkübe edildi. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri, bakteri üremesinin tamamen durduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak belirlendi.



Şekil 5. Fosfomisin agar dilüsyon yönteminde besiyeri hazırlanması

MİK Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İnkübasyon süresinin (16-20 saat) tamamlanmasının ardından, hem sıvı mikrodilüsyon hem agar dilüsyon sonuçları bağımsız olarak çift göz kontrolü ile değerlendirilmiştir. Üremenin gözlemlenmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonuna karşılık gelen değer MİK olarak belirlenmiştir. MİK sonuçları, EUCAST 15.0 kriterlerine göre yorumlanmıştır.

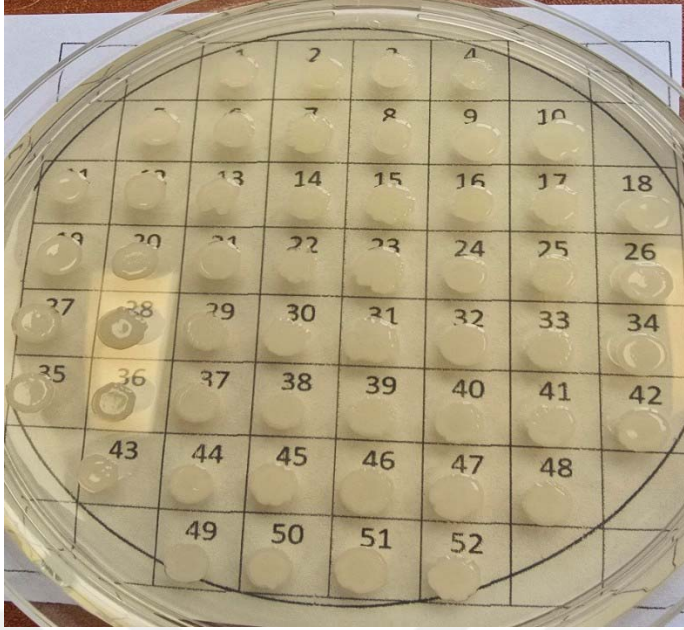
EUCAST 15.0 rehberinde verilen sınır değerler;

Meropenem: MİK ≤ 2 mg/L duyarlı, > 8 mg/L dirençli

Kolistin: MİK ≤ 2 mg/L duyarlı, > 2 mg/L dirençli

Amikasin: MİK ≤ 8 mg/L duyarlı, > 8 mg/L dirençli

Fosfomisin: EUCAST'te fosfomisin için yalnızca *Escherichia coli* (yalnız idrar yolu enfeksiyonu) suşlarına yönelik sınır değeri belirlenmiş olup *E. coli* dışındaki Enterobacterales takımı içindeki diğer türler için sınır değeri tanımlanmamıştır.



Şekil 6. Fosfomisin agar dilüsyon testinde üreme kontrol plağı

3.3.4. Koloni PZR Yöntemi ile Karbapenemaz Direnç Genlerinin Tespiti

Bu tezde değerlendirilen bakteri izolatları, ‘*Kan Kültüründe Üreyen Karbapeneme Dirençli Klebsiella Kökenlerinde Direnç Genleri ve Tedavi Başarısının Değerlendirilmesi*’ (2023) [93] adlı tez çalışmasında kullanılanlarla özdeş olduğu için, zaman ve kaynak verimliliği sağlamak amacıyla, ilgili çalışmadaki blaVIM, blaOXA-48, blaIMP, blaNDM ve blaKPC gen bölgelerine yönelik PCR sonuçları aynen alınmıştır. Bu nedenle, PCR yöntemleri ve sonuçlarına ilişkin detaylar için ‘*Kan Kültüründe Üreyen Karbapeneme Dirençli Klebsiella Kökenlerinde Direnç Genleri ve Tedavi Başarısının Değerlendirilmesi*’ (2023) tezine başvurulabilir.

3.3.5. Sinerji Saptanmasına Yönelik Agar Dilüsyon Testi

İzolatların Yeniden Canlandırılması

Sinerji testleri için kombinasyonda test edilecek başlıca antibiyotüğümüz fosfomisin olduğu için her üç kombinasyonun değerlendirilmesi için agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışma kapsamında, -80 °C’de %20 gliserol ilave edilmiş triptik soy buyyon içerisinde saklanan izolatlar, analiz öncesinde oda sıcaklığında

çözülerek kullanıma hazır hâle getirildi. Çözünen izolatlardan, tek koloni ekim yöntemi uygulanarak %5 KKA ve Chromagar besiyerlerine pasajlandı, 37 °C’de 24 saat süreyle inkübe edilerek izolatların canlandırılması sağlandı. Üreyen kolonilerden %5 KKA besiyerine 2. kez ekim yapıldı.

Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyeri olarak KAMHB (Becton Dickinson, ABD) kullanılmış ve üretici firma önerilerine uygun şekilde hazırlanarak 121°C’de 15–20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminin ardından besiyeri soğutulmuş ve 45-50°C’de sabit sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda, agar plakları döküm aşamasına kadar bekletilmiştir.

Kullanılan 90 mm'lik petri kaplarında, besiyeri ve antibiyotik solüsyonu karışımının toplam hacmi 20 mL olarak belirlendiğinden, her bir antibiyotik kombinasyonu için ticari firma önerileri doğrultusunda agar eklenerek 4 litre, toplamda 12 litre besiyeri hazırlanmıştır. [Her kombinasyon için 64 petri, 150 suş olduğu için her kombinasyondan 3'er petri ($64 \times 3 = 192$). Her kombinasyon için bu işlem tekrarlanmıştır. ($192 \times 3 = 576$). $576 \times 20 = 11.520$ ml (11,5 litre) besiyerine ihtiyaç duyulmuştur.]

Ayrıca, her 1 litre besiyeri için 25 mg G6P tartılmıştır. Önceden 45-55°C'ye soğutulmuş 1 litre besiyerinden 20 mL alınarak, içerisinde 25 mg G6P çözündürülmüştür. Hazırlanan G6P içeren 20 mL'lik MHA, 0,45 µm gözenek çapına sahip besiyeri filtresinden geçirilerek sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi tamamlanan karışım, kalan besiyerine eklenerek 25 mg/L G6P konsantrasyonu elde edilmiştir.

Deneyde uygulanacak dilüsyon sayısına göre, örneğin fosfomisin için 8 dilüsyon, uygun sayıda petri plağı hazırlanmış ve her petri kabının üzerine ilgili antibiyotik konsantrasyonları not edilmiştir. (Şekil 7) Çalışılan üç farklı antibiyotik kombinasyonu ve test edilen her bir suş için MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla çok sayıda petri plağı kullanılması gerektiğinden, her petri kabına izolat inokülasyonlarının yapılacağı numaralı çizimleri elle oluşturmak zaman alıcı olmuştur. Bu süreci standart hale getirmek ve kolaylaştırmak amacıyla, numaralı inokulum çizgileri kağıtlar üzerine standart olarak hazırlanmış ve inokülasyon

sonuçlarının değerlendirilmesi için bu şablonlar kullanılmıştır. (Şekil 8) Hazırlanan standart çizimlere uygun şekilde, petri kapları üzerine işaretlemeler yapılarak inokülasyon bölgeleri belirlenmiştir. Bu yöntem sayesinde, inokülasyon süreçleri daha sistematik hale getirilmiş ve sonuçların takibi kolaylaştırılmıştır.



Şekil 7. Besiyeri hazırlanması sırasında boş steril petri kaplarının işaretlenmesi (8x8 agar dilüsyon temelli dama tahtası yöntemi)

		1	2	3	4		
	5	6	7	8	9	10	
11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32	33	34
35	36	37	38	39	40	41	42
	43	44	45	46	47	48	
		49	50	51	52		

Şekil 8. İnokülasyonların yapılacağı numaralı çizimlerin yer aldığı kâğıt şablon

Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması ve Kombinasyon çalışma prosedürü

Fosfomisin disodyum salt hidrat (Biosynth, UK), Kolistin sülfat antibiyotik tozu (Biosynth, UK), Amikasin (Biosynth, UK), Meropenem trihidrat antibiyotik tozu (Biosynth, UK), d-Glikoz 6-fosfat disodyum salt hidrat (Biosynth, UK) toz formları çalışmada kullanılmıştır. Antibiyotiklerin sulandırılmasında CLSI Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri İçin Performans Standartları M100 önerilerine uygun olarak distile su kullanılmıştır.

Antibiyotik çözeltilerinin hazırlanmasında, antibiyotik tozlarının tartılarak uygun konsantrasyonlarda çözelti oluşturulması için " $\text{Ağırlık (mg)} = \text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon (mg/L)} / \text{Potens (}\mu\text{g/mg)}$ " formülü kullanılmıştır. Antibiyotiklerin konsantrasyonları, MİK değerinin dört kat altı ile üç kat üstü arasında olacak şekilde belirlenmiştir. Hazırlanan çözeltiler, herhangi bir etkinlik kaybını önlemek amacıyla bekletilmeden kullanılmıştır.

Kombinasyon çalışmaları kapsamında fosfomisin için 2 mg/l - 256 mg/l, amikasin için 0,5 mg/l - 64 mg/l, meropenem ve kolistin için ise 0,125 mg/l - 16 mg/l arasında değişen dilüsyon aralıkları oluşturulmuştur. Fosfomisin stok çözeltisi, 50 ml distile su içerisinde 256 mg fosfomisin disodyum çözündürülerek hazırlanmış ve 5120 mg/l konsantrasyona ulaşılmıştır. Amikasin, meropenem ve kolistin ile ayrı ayrı kombinasyon çalışmaları yürütüleceğinden, her biri için ayrı fosfomisin stok solüsyonu hazırlanmıştır.

Dilüsyon işlemleri için, 25 ml steril distile su içeren falkon tüplerine eşit hacimde (25 ml) stok solüsyon eklenerek seri dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Fosfomisin çözeltisi, son konsantrasyon olan 40 mg/L'ye ulaşana kadar toplamda yedi kez dilüe edilmiş, ardından son tüpten 25 mL çözelti dışarı atılmıştır. Bu işlem sonucunda, 8 tüp içerisinde farklı konsantrasyonlarda fosfomisin içeren çözeltiler elde edilmiştir.

Aynı yöntem, amikasin, meropenem ve kolistin stok çözeltilerinin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Amikasin için 64 mg, meropenem ve kolistin için 16 mg tartılarak her biri 50 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. Seri dilüsyon işlemleri fosfomisin için uygulanan protokole uygun şekilde yürütülmüş olup, son konsantrasyonlar; amikasin için 10 mg/l, meropenem için 2,5 mg/l ve kolistin için 2,5

mg/l olacak şekilde düzenlenmiştir. Böylece, her bir antibiyotikten 8'er tüp, fosfomisin üç farklı antibiyotik ile kombinasyona girdiğinden toplam 24 fosfomisin süspansiyonu hazırlanmıştır.

Son aşamada, içerisinde G6P bulunan KAMHA besiyerinden 18 ml, fosfomisin stok solüsyonundan 1 ml ve kombinasyona dahil edilen diğer antibiyotik stok solüsyonundan 1 ml alınarak steril petri kutularında karıştırılmış ve katılaşmaya bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda, her antibiyotik solüsyonu eşit hacimde diğer antibiyotik çözeltileri ile birleştigiinden konsantrasyonları yarıya düşmüş ve ayrıca besiyeri ile 9 kat dilüe edilmiştir.

Antibiyotik Kombinasyon Çalışmalarında Uygulanan Yöntem

Fosfomisin ve diğer antibiyotiklerin kombinasyonlarının hazırlanması için, farklı derişimlerde antibiyotik çözeltileri belirlenen protokole uygun şekilde karıştırılmıştır. Bu kapsamda, 5120 mg/L konsantrasyonunda fosfomisin içeren tüplerden 1'er mL alınarak, amikasinin 10 mg/L - 1280 mg/L konsantrasyon aralığında bulunan sekiz farklı dilüsyon tüpünün her birinden 1'er mL örnek alınıp steril petri kutularında karıştırılmış ve petriler F1A1, F1A2, F1A3...F1A8 şeklinde harflendirilmiştir. (Şekil 9) Aynı işlem 2560 mg/L konsantrasyonunda fosfomisin içeren tüpler için de tekrarlanmış ve bu tüpler de F2A1, F2A2, F2A3,...,F2A8 şeklinde harflendirilmiştir. 1280, 640, 320, 160, 80 mg/L fosfomisin konsantrasyonlarında da aynı işlem tekrarlanmıştır. Son olarak, 40 mg/L fosfomisin içeren tüplerden 1'er mL alınarak amikasinin belirlenen dilüsyon aralığındaki sekiz tüpünden 1'er mL alınmış steril petri kutularına aktarılmış ve F8A1, F8A2,..., F8A8 harfleri yazılmıştır.

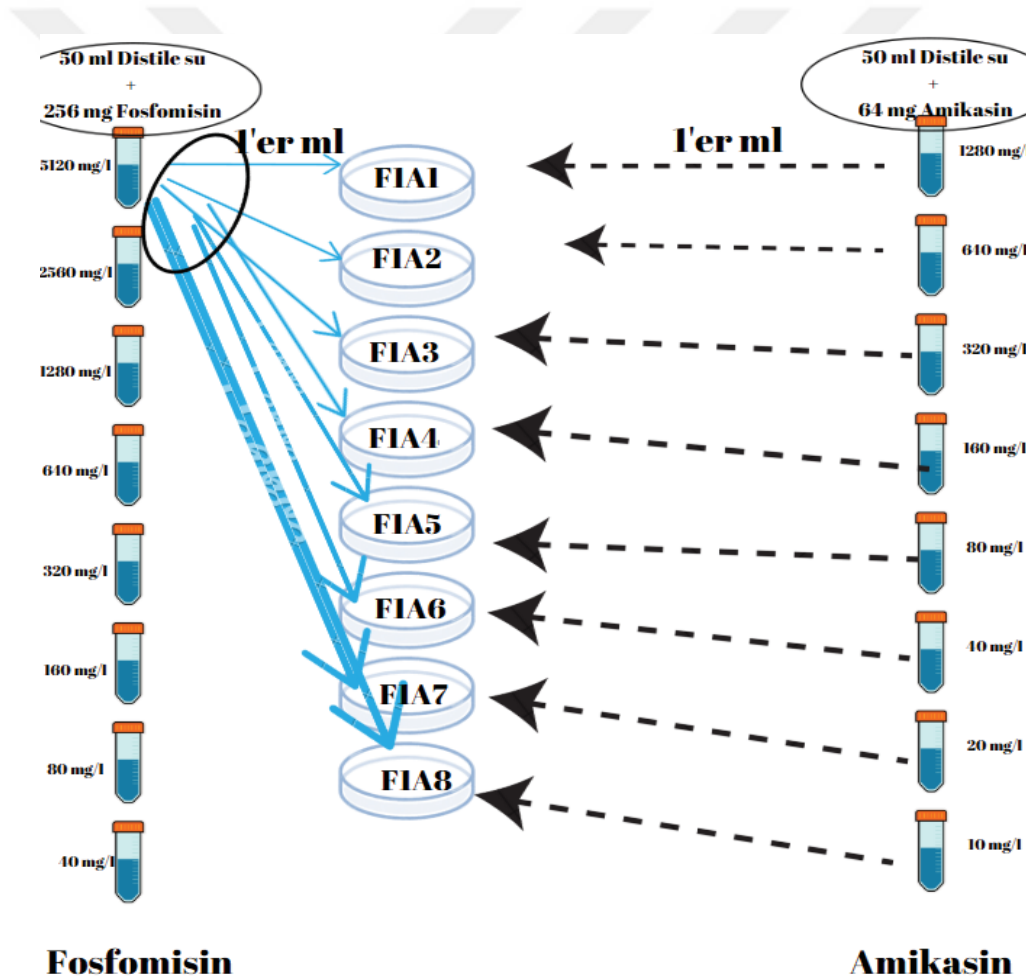
Benzer şekilde, fosfomisin ve meropenem kombinasyon çalışması için 5120 mg/L fosfomisin içeren tüplerden 1'er mL alınarak, meropenemin 2,5 mg/L - 320 mg/L konsantrasyon aralığındaki sekiz farklı dilüsyon tüpünün her birinden 1'er mL eklenmiş ve petri kutularında karıştırılmıştır. Aynı prosedür 2560 mg/l konsantrasyondan 40 mg/l konsantrasyona kadar fosfomisin içeren tüpler için de uygulanmış ve harflendirilmiştir.

Kolistin ile kombinasyon çalışmasında da aynı yöntem izlenmiş, fosfomisin tüplerinden 1'er mL alınarak, kolistinin 2,5 mg/L'den 320 mg/L'ye kadar olan konsantrasyon aralığında bulunan sekiz dilüsyon tüpünün her birinden 1'er mL

eklenmiş ve karışımlar steril petri kutularına aktarılmıştır. Harflendirmeler aynı şekilde F1C1, F1C2, F1C3, ..., F8C8'E kadar yapılmıştır.

150 suş ile çalışıldığı için her konsantrasyondan 3 adet petri olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır.

Bu işlemler sonucunda her kombinasyon için toplamda 64 farklı petri kutusunda, 64 farklı antibiyotik kombinasyonu elde edilmiştir. Karışım içeren her petri kutusuna 18 mL KAMHA besiyeri eklenmiştir. Böylece antibiyotik kombinasyonlarının stok çözeltilerine göre 1/20 oranında (kombinasyona giren diğer antibiyotik çözeltileri ile 1/2 ve besiyeri ile 1/10) seyreltilmesi sağlanmıştır.



Şekil 9. Fosfomisin-amikasin kombinasyon çalışması için uygulanan yöntemin şematik görünümü

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	FOS:256mg/L, MEM:16mg/L	FOS:256mg/L, MEM:8mg/L	FOS:256mg/L, MEM:4mg/L	FOS:256mg/L, MEM:2mg/L	FOS:256mg/L, MEM:1mg/L	FOS:256mg/L, MEM:0.5mg/L	FOS:256mg/L, MEM:0.25mg/L	FOS:256mg/L, MEM:0.125mg/L
2	FOS:128mg/L, MEM:16mg/L	FOS:128mg/L, MEM:8mg/L	FOS:128mg/L, MEM:4mg/L	FOS:128mg/L, MEM:2mg/L	FOS:128mg/L, MEM:1mg/L	FOS:128mg/L, MEM:0.5mg/L	FOS:128mg/L, MEM:0.25mg/L	FOS:128mg/L, MEM:0.125mg/L
3	FOS:64mg/L, MEM:16mg/L	FOS:64mg/L, MEM:8mg/L	FOS:64mg/L, MEM:4mg/L	FOS:64mg/L, MEM:2mg/L	FOS:64mg/L, MEM:1mg/L	FOS:64mg/L, MEM:0.5mg/L	FOS:64mg/L, MEM:0.25mg/L	FOS:64mg/L, MEM:0.125mg/L
4	FOS:32mg/L, MEM:16mg/L	FOS:32mg/L, MEM:8mg/L	FOS:32mg/L, MEM:4mg/L	FOS:32mg/L, MEM:2mg/L	FOS:32mg/L, MEM:1mg/L	FOS:32mg/L, MEM:0.5mg/L	FOS:32mg/L, MEM:0.25mg/L	FOS:32mg/L, MEM:0.125mg/L
5	FOS:16mg/L, MEM:16mg/L	FOS:16mg/L, MEM:8mg/L	FOS:16mg/L, MEM:4mg/L	FOS:16mg/L, MEM:2mg/L	FOS:16mg/L, MEM:1mg/L	FOS:16mg/L, MEM:0.5mg/L	FOS:16mg/L, MEM:0.25mg/L	FOS:16mg/L, MEM:0.125mg/L
6	FOS:8mg/L, MEM:16mg/L	FOS:8mg/L, MEM:8mg/L	FOS:8mg/L, MEM:4mg/L	FOS:8mg/L, MEM:2mg/L	FOS:8mg/L, MEM:1mg/L	FOS:8mg/L, MEM:0.5mg/L	FOS:8mg/L, MEM:0.25mg/L	FOS:8mg/L, MEM:0.125mg/L
7	FOS:4mg/L, MEM:16mg/L	FOS:4mg/L, MEM:8mg/L	FOS:4mg/L, MEM:4mg/L	FOS:4mg/L, MEM:2mg/L	FOS:4mg/L, MEM:1mg/L	FOS:4mg/L, MEM:0.5mg/L	FOS:4mg/L, MEM:0.25mg/L	FOS:4mg/L, MEM:0.125mg/L
8	FOS:2mg/L, MEM:16mg/L	FOS:2mg/L, MEM:8mg/L	FOS:2mg/L, MEM:4mg/L	FOS:2mg/L, MEM:2mg/L	FOS:2mg/L, MEM:1mg/L	FOS:2mg/L, MEM:0.5mg/L	FOS:2mg/L, MEM:0.25mg/L	FOS:2mg/L, MEM:0.125mg/L

Şekil 10. Fosfomisin-meropenem kombinasyon çalışmasının dilüsyonlarının şematik gösterimi

(FOS: Fosfomisin MEM: Meropenem)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	FOS:256mg/L, AK:64mg/L	FOS:256mg/L, AK:32mg/L	FOS:256mg/L, AK:16mg/L	FOS:256mg/L, AK:8mg/L	FOS:256mg/L, AK:4mg/L	FOS:256mg/L, AK:2mg/L	FOS:256mg/L, AK:1mg/L	FOS:256mg/L, AK:0.5mg/L
2	FOS:128mg/L, AK:64mg/L	FOS:128mg/L, AK:32mg/L	FOS:128mg/L, AK:16mg/L	FOS:128mg/L, AK:8mg/L	FOS:128mg/L, AK:4mg/L	FOS:128mg/L, AK:2mg/L	FOS:128mg/L, AK:1mg/L	FOS:128mg/L, AK:0.5mg/L
3	FOS:64mg/L, AK:64mg/L	FOS:64mg/L, AK:32mg/L	FOS:64mg/L, AK:16mg/L	FOS:64mg/L, AK:8mg/L	FOS:64mg/L, AK:4mg/L	FOS:64mg/L, AK:2mg/L	FOS:64mg/L, AK:1mg/L	FOS:64mg/L, AK:0.5mg/L
4	FOS:32mg/L, AK:64mg/L	FOS:32mg/L, AK:32mg/L	FOS:32mg/L, AK:16mg/L	FOS:32mg/L, AK:8mg/L	FOS:32mg/L, AK:4mg/L	FOS:32mg/L, AK:2mg/L	FOS:32mg/L, AK:1mg/L	FOS:32mg/L, AK:0.5mg/L
5	FOS:16mg/L, AK:64mg/L	FOS:16mg/L, AK:32mg/L	FOS:16mg/L, AK:16mg/L	FOS:16mg/L, AK:8mg/L	FOS:16mg/L, AK:4mg/L	FOS:16mg/L, AK:2mg/L	FOS:16mg/L, AK:1mg/L	FOS:16mg/L, AK:0.5mg/L
6	FOS:8mg/L, AK:64mg/L	FOS:8mg/L, AK:32mg/L	FOS:8mg/L, AK:16mg/L	FOS:8mg/L, AK:8mg/L	FOS:8mg/L, AK:4mg/L	FOS:8mg/L, AK:2mg/L	FOS:8mg/L, AK:1mg/L	FOS:8mg/L, AK:0.5mg/L
7	FOS:4mg/L, AK:64mg/L	FOS:4mg/L, AK:32mg/L	FOS:4mg/L, AK:16mg/L	FOS:4mg/L, AK:8mg/L	FOS:4mg/L, AK:4mg/L	FOS:4mg/L, AK:2mg/L	FOS:4mg/L, AK:1mg/L	FOS:4mg/L, AK:0.5mg/L
8	FOS:2mg/L, AK:64mg/L	FOS:2mg/L, AK:32mg/L	FOS:2mg/L, AK:16mg/L	FOS:2mg/L, AK:8mg/L	FOS:2mg/L, AK:4mg/L	FOS:2mg/L, AK:2mg/L	FOS:2mg/L, AK:1mg/L	FOS:2mg/L, AK:0.5mg/L

Şekil 11. Fosfomisin-amikasin kombinasyon çalışmasının dilüsyonlarının şematik gösterimi

(FOS: Fosfomisin AK: Amikasin)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	FOS:256mg/L, COL:16mg/L	FOS:256mg/L, COL:8mg/L	FOS:256mg/L, COL:4mg/L	FOS:256mg/L, COL:2mg/L	FOS:256mg/L, COL:1mg/L	FOS:256mg/L, COL:0.5mg/L	FOS:256mg/L, COL:0.25mg/L	FOS:256mg/L, COL:0.125mg/L
2	FOS:128mg/L, COL:16mg/L	FOS:128mg/L, COL:8mg/L	FOS:128mg/L, COL:4mg/L	FOS:128mg/L, COL:2mg/L	FOS:128mg/L, COL:1mg/L	FOS:128mg/L, COL:0.5mg/L	FOS:128mg/L, COL:0.25mg/L	FOS:128mg/L, COL:0.125mg/L
3	FOS:64mg/L, COL:16mg/L	FOS:64mg/L, COL:8mg/L	FOS:64mg/L, COL:4mg/L	FOS:64mg/L, COL:2mg/L	FOS:64mg/L, COL:1mg/L	FOS:64mg/L, COL:0.5mg/L	FOS:64mg/L, COL:0.25mg/L	FOS:64mg/L, COL:0.125mg/L
4	FOS:32mg/L, COL:16mg/L	FOS:32mg/L, COL:8mg/L	FOS:32mg/L, COL:4mg/L	FOS:32mg/L, COL:2mg/L	FOS:32mg/L, COL:1mg/L	FOS:32mg/L, COL:0.5mg/L	FOS:32mg/L, COL:0.25mg/L	FOS:32mg/L, COL:0.125mg/L
5	FOS:16mg/L, COL:16mg/L	FOS:16mg/L, COL:8mg/L	FOS:16mg/L, COL:4mg/L	FOS:16mg/L, COL:2mg/L	FOS:16mg/L, COL:1mg/L	FOS:16mg/L, COL:0.5mg/L	FOS:16mg/L, COL:0.25mg/L	FOS:16mg/L, COL:0.125mg/L
6	FOS:8mg/L, COL:16mg/L	FOS:8mg/L, COL:8mg/L	FOS:8mg/L, COL:4mg/L	FOS:8mg/L, COL:2mg/L	FOS:8mg/L, COL:1mg/L	FOS:8mg/L, COL:0.5mg/L	FOS:8mg/L, COL:0.25mg/L	FOS:8mg/L, COL:0.125mg/L
7	FOS:4mg/L, COL:16mg/L	FOS:4mg/L, COL:8mg/L	FOS:4mg/L, COL:4mg/L	FOS:4mg/L, COL:2mg/L	FOS:4mg/L, COL:1mg/L	FOS:4mg/L, COL:0.5mg/L	FOS:4mg/L, COL:0.25mg/L	FOS:4mg/L, COL:0.125mg/L
8	FOS:2mg/L, COL:16mg/L	FOS:2mg/L, COL:8mg/L	FOS:2mg/L, COL:4mg/L	FOS:2mg/L, COL:2mg/L	FOS:2mg/L, COL:1mg/L	FOS:2mg/L, COL:0.5mg/L	FOS:2mg/L, COL:0.25mg/L	FOS:2mg/L, COL:0.125mg/L

Şekil 12. Fosfomisin-kolistin kombinasyon çalışmasının dilüsyonlarının şematik gösterimi

(FOS: Fosfomisin COL: Kolistin)

İzolatların hazırlanması ve inokülasyon

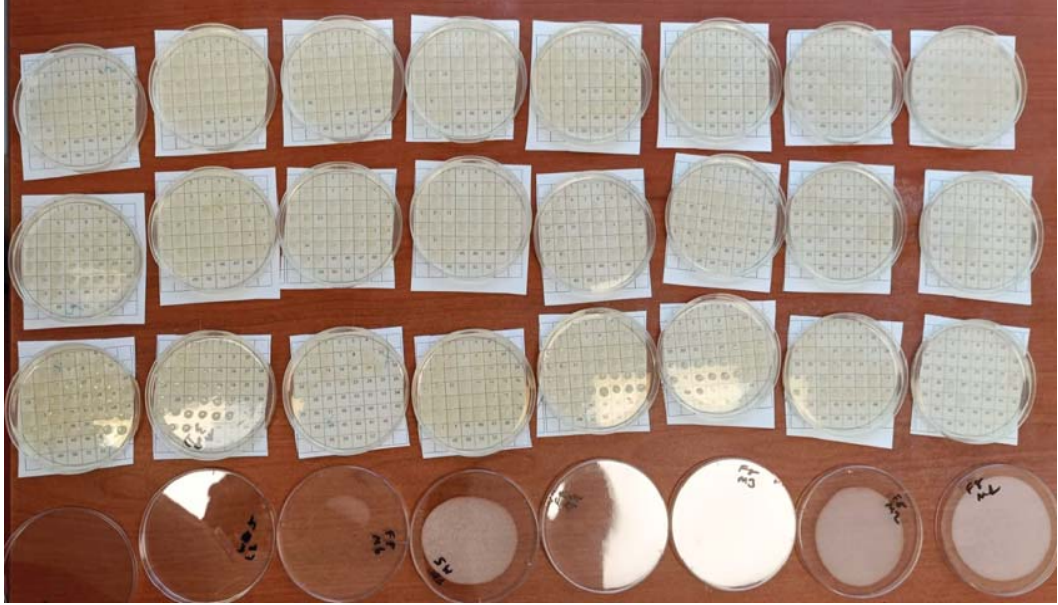
Agar dilüsyon prosedürüne göre, petri yüzeyinde son bakteri sayısının 10^4 KOB olması gerekmektedir. Bu hedefe ulaşmak için öncelikle 0,5 McFarland standardına ($1-2 \times 10^8$ KOB/mL bakteri içermektedir) ayarlanmış bir bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon, serum fizyolojik ile 1/10 oranında seyreltilerek 10^7 KOB/mL konsantrasyonunda bir bakteri süspansiyonu elde edilmiştir.

Elde edilen bu seyreltilmiş süspansiyondan, öncelikle antibiyotik içermeyen üreme kontrol plağına 1 µL inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra, çok noktalı inokülatör (multipoint inoculator) kullanılarak, en düşük antibiyotik konsantrasyonuna sahip petriden başlanmak üzere, artan konsantrasyon sırasına göre her bir petriye, her inokulumdan 1–2 µL olacak şekilde ilgili suşa ait işaretli alana agar yüzeyine inokülasyon yapılmıştır. Böylece, 5-8 mm çapındaki alanlarda her bir suş için 10^4 KOB bakteri inoküle edilmiştir. İnokülasyon işlemi, bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra en fazla 15 dakika içinde tamamlanmıştır. Çapraz kontaminasyonu ve antibiyotik taşınmasını önlemek amacıyla, son olarak ikinci bir üreme kontrol plağı inoküle edilerek kontrol sağlanmıştır.

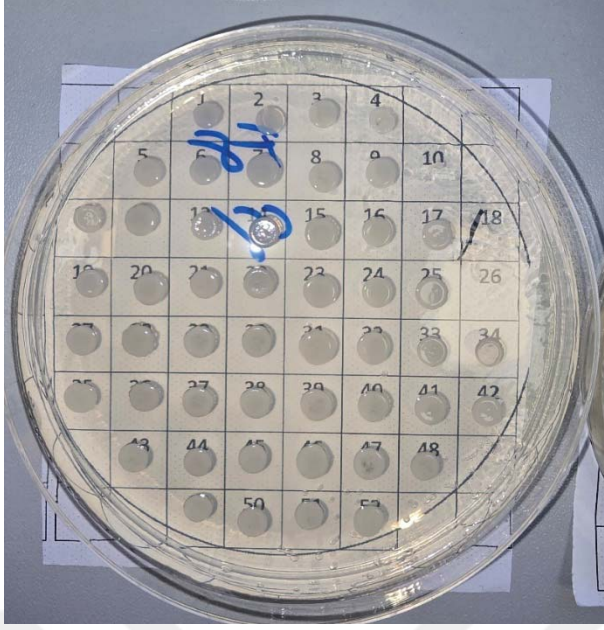
İnoküle edilen plaklar, oda sıcaklığında, inokulum noktalarının agara absorbe olması için 30 dakikadan uzun sürmeyecek şekilde bekletilmiş ve noktalar kuruyana kadar gözlemlenmiştir. Son olarak, plaklar ters çevrilerek $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16-20 saat inkübe edilmiştir.

Test sonuçlarının değerlendirilmesi

Plaklar önceden standart olarak çizilmiş ve numaralandırılmış kağıt şablon üzerine, plak üzerindeki işaretler dikkate alınarak hizalanmıştır. Sonuçların analizine bu yerleşim tamamlandıktan sonra başlanmıştır. Antibiyotik varlığında üremeyi engelleyen en düşük konsantrasyon, MİK değeri olarak kaydedilmiştir. İnoküluma bağlı üreme benzeri izler değerlendirme kapsamına alınmamıştır.



Şekil 13. Sonuçların değerlendirilmesi, kağıt şablon üzerinde yapılan okuma (8 setten 3 tanesi fotoğrafta sunulmuştur.)



Şekil 14. Kağıt şablon üzerinde değerlendirilen agar dilüsyon sonucu (Tek petrinin detaylı gösterimi)

FOS:256mg/l MEM:16mg/l	FOS:256mg/l MEM:8mg/l	FOS:256mg/l MEM:4mg/l	FOS:256mg/l MEM:2mg/l	FOS:256mg/l MEM:1mg/l	FOS:256mg/l MEM:0.5mg/l	FOS:256mg/l MEM:0.25mg/l	FOS:256mg/l MEM:0.125mg/l
FOS:128mg/l MEM:16mg/l	FOS:128mg/l MEM:8mg/l	FOS:128mg/l MEM:4mg/l	FOS:128mg/l MEM:2mg/l	FOS:128mg/l MEM:1mg/l	FOS:128mg/l MEM:0.5mg/l	FOS:128mg/l MEM:0.25mg/l	FOS:128mg/l MEM:0.125mg/l
FOS:64mg/l MEM:16mg/l	FOS:64mg/l MEM:8mg/l	FOS:64mg/l MEM:4mg/l	FOS:64mg/l MEM:2mg/l	FOS:64mg/l MEM:1mg/l	FOS:64mg/l MEM:0.5mg/l	FOS:64mg/l MEM:0.25mg/l	FOS:64mg/l MEM:0.125mg/l
FOS:32mg/l MEM:16mg/l	FOS:32mg/l MEM:8mg/l	FOS:32mg/l MEM:4mg/l	FOS:32mg/l MEM:2mg/l	FOS:32mg/l MEM:1mg/l	FOS:32mg/l MEM:0.5mg/l	FOS:32mg/l MEM:0.25mg/l	FOS:32mg/l MEM:0.125mg/l
FOS:16mg/l MEM:16mg/l	FOS:16mg/l MEM:8mg/l	FOS:16mg/l MEM:4mg/l	FOS:16mg/l MEM:2mg/l	FOS:16mg/l MEM:1mg/l	FOS:16mg/l MEM:0.5mg/l	FOS:16mg/l MEM:0.25mg/l	FOS:16mg/l MEM:0.125mg/l
FOS:8mg/l MEM:16mg/l	FOS:8mg/l MEM:8mg/l	FOS:8mg/l MEM:4mg/l	FOS:8mg/l MEM:2mg/l	FOS:8mg/l MEM:1mg/l	FOS:8mg/l MEM:0.5mg/l	FOS:8mg/l MEM:0.25mg/l	FOS:8mg/l MEM:0.125mg/l
FOS:4mg/l MEM:16mg/l	FOS:4mg/l MEM:8mg/l	FOS:4mg/l MEM:4mg/l	FOS:4mg/l MEM:2mg/l	FOS:4mg/l MEM:1mg/l	FOS:4mg/l MEM:0.5mg/l	FOS:4mg/l MEM:0.25mg/l	FOS:4mg/l MEM:0.125mg/l
FOS:2mg/l MEM:16mg/l	FOS:2mg/l MEM:8mg/l	FOS:2mg/l MEM:4mg/l	FOS:2mg/l MEM:2mg/l	FOS:2mg/l MEM:1mg/l	FOS:2mg/l MEM:0.5mg/l	FOS:2mg/l MEM:0.25mg/l	FOS:2mg/l MEM:0.125mg/l
1	2	3	4	5	6	7	8

Şekil 15. 3 numaralı izolata ait fosfomisin-meropenem kombinasyon çalışmasına ait sonuçlar

FOS: Fosfomisin, MEM: Meropenem

Koyu renkle işaretlenen alanlar üreme olan plaklarda bulunan antibiyotik konsantrasyonlarını temsil etmektedir.

MİK Sonuçlarının Değerlendirilmesi Sonuçlar ve FİK İndeksi Hesaplamaları

FİK indeksi formülüne göre yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen değerler tabloya yansıtılmıştır.

Tablo 1: 3 numaralı izolata ait fosfomisin-meropenem kombinasyonunda hesaplanan FİK indeksleri

Meropenem MİK (mg/L)	Fosfomisin MİK (mg/L)	FİKİ	FİK İneksi	Yorum
0,125	32	0,515625		
1	16	0,375	0,375	Sinerji
4	8	0,625		
8	2	1,03125		

En düşük FİKİ değerinin bulunduğu kuyucuk esas alındı. Her bir kuyucuk için, meropenem ve fosfomisine ait ayrı ayrı $MEM_{FİK}$, $FOS_{FİK}$ değerleri hesaplandı ve toplandı. $((FİKİ)=FİKA+FİKB)$ Böylece FİKİ hesaplanmış oldu. Kombinasyon plağında yer alan tüm inhibitör kuyucuklar tarandı ve içlerinden en düşük FİKİ değerine sahip olan kuyucuk belirlenerek analizde yalnızca bu değer kullanıldı. Bu yaklaşımla, kombinasyonun en etkili olduğu noktayı yansıtan minimum FİKİ'ye odaklanılmış olundu [89].

Toplamda 150 izolat için fosfomisin-amikasin, fosfomisin-kolistin ve fosfomisin-meropenem kombinasyonlarının FİK değerinin belirlenmesi amacıyla agar dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. 150 suşun tek bir plağa sığmaması nedeniyle çalışmalar üç ayrı plak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kombinasyon çalışmalarında toplamda 576 petri kabı, fosfomisinin tek başına MİK değerlerini belirlemek için ise 36 petri kabı kullanılmıştır. Her bir suş için üç farklı antibiyotik kombinasyonuna ait FİK indeksleri ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Kalite Kontrol Çalışmaları

Antibiyotik içermeyen agar plakları üzerine yapılan bakteri ekimleriyle besiyerlerinin uygunluğu ve izolatların üreme kontrolü sağlanmıştır. Kalite kontrol sürecinde *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* NCTC 13846 standart suşları kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde IBM SPSS Statistics (Versiyon 27, IBM Corp., Armonk, NY, ABD) yazılımı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler, sayısal değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma olarak; kategorik değişkenler için ise sayı (yüzde) şeklinde verilmiştir. Antibiyotiklere ait MİK dağılımları ve kombinasyon etkileri fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİKİ) ile değerlendirilmiştir.

Kombinasyon tedavilerinin etki türleri (sinerji, aditif, indiferans, antagonizm) arasındaki farkların analizinde Friedman testi kullanılmış, anlamlı bulunan sonuçlar için Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıralar testi ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Karbapenemaz türlerine göre kombinasyon etkilerinin dağılımı ise Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş, anlamlı sonuçlar sonrası Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile post-hoc analizler gerçekleştirilmiştir.

Antibiyotik kombinasyonlarının etkilerinin, izolatların antibiyotik duyarlılık durumlarına göre değişimi Ki-kare testi veya uygun olduğunda Fisher'in kesin testi ile incelenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

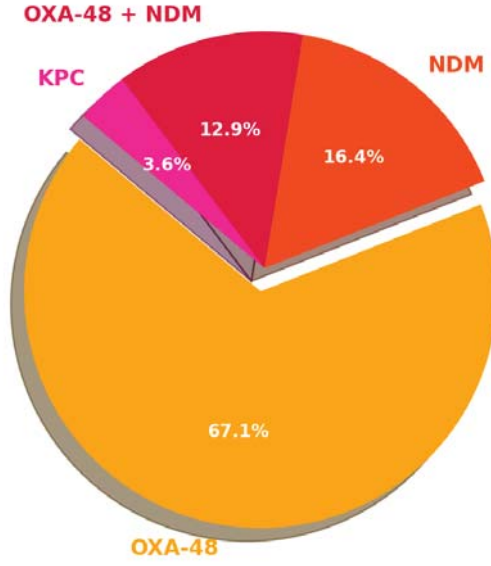
4. BULGULAR

Ocak 2015 ile Aralık 2022 arasındaki sekiz yıllık dönemde, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ve Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılan analizlerde, kan kültüründe karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* saptanan 150 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Ancak, üç izolatin canlandırılmaması nedeniyle (45,106,110 numaralı örnekler), 7 suş (51,81,95,96,98,99,125 numaralı izolatlar) ise çeşitli sebeplerden çalışmadan çıkarılmış, değerlendirmeler 140 izolat üzerinden yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 140 hastadan izole edilen CR-Kp suşlarına ait demografik ve klinik özellikler Tablo 2'de sunulmuştur. Olguların %59,3'ü erkek, %40,7'si kadındı. Hastaların büyük çoğunluğu YBÜ'de takip edilmekteydi ve bakteriyemi olgularının %72,9'u YBÜ'de takip edilirken gelişti.

Karbapenemaz genotip dağılımı incelendiğinde, izolatların %67,1'inde **OXA-48**, %16,4'ünde **NDM**, %12,9'unda **OXA-48 + NDM** ve %3,6'sında ise **KPC** geni tespit edilmiştir. OXA-48 taşıyan izolatlar, bu seride baskın karbapenemaz türü olarak öne çıkmıştır. (Şekil 14)

Tablo 2. Hastaların demografik verileri

		N	%
Yaş, ortalama $\pm$ SS (yıl)	62,1 $\pm$ 17,0		
Cinsiyet	Kadın	57	40,7%
	Erkek	83	59,3%
Bakteriyeminin Geliştiği Yer	YBÜ	102	72,9%
	Dahiliye Servis	33	23,6%
	Cerrahi Servis	5	3,6%
Karbapenemaz Genleri	OXA-48	94	67,1%
	NDM	23	16,4%
	OXA-48 + NDM	18	12,9%
	KPC	5	3,6%



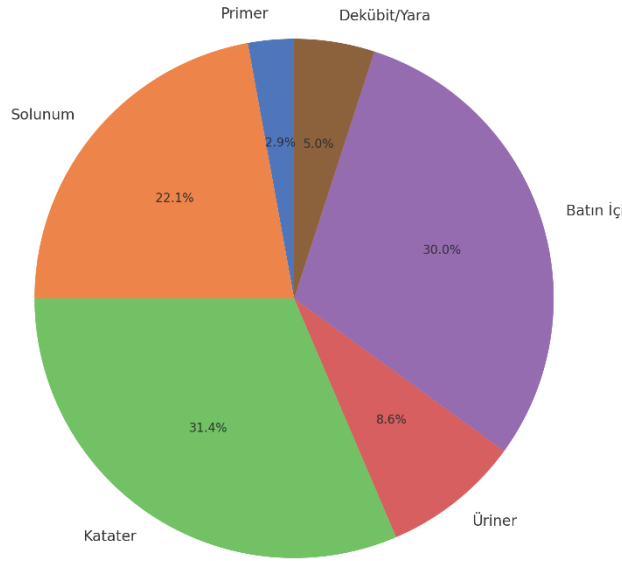
Şekil 16. Karbapenemaz genlerinin dağılımı

Tablo 3'te, karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında enfeksiyonun kaynaklarına göre dağılımı gösterilmektedir. En sık enfeksiyon kaynağı kateter (%31,4) saptanmıştır. Bunu sırasıyla batın içi odaklar (%30) ve solunum yolu enfeksiyonları (%22,1) izlemiştir. Üriner sistem enfeksiyonları %8,6, dekübit/ yara enfeksiyonları %5 ve primer kaynaklı bakteriyemiler ise %2,9 oranında gözlenmiştir.

Tablo 3. KD-Kp bakteriyemi kaynaklarının dağılımı

KDE Kaynak	n	%
Primer	4	2,90%
Solunum	31	22,10%
Katater	44	31,40%
Üriner	12	8,60%
Batın İçi	42	30,00%
Dekübit/Yara	7	5,00%

Grafik, enfeksiyon kaynaklarının klinik dağılımını görsel olarak özetlemekte olup, yoğun bakım ve girişimsel işlemlerle ilişkili kaynakların ön planda olduğunu göstermektedir.



Şekil 17. Bakteriemi kaynaklarının dağılımı

Çalışmaya dahil edilen izolatlarla ait amikasin, fosfomisin, kolistin ve meropenem antibiyotiklerine ilişkin MİK değerleri Tablo 5’te gösterilmiştir. Antibiyotiklerin her biri için geniş bir MİK aralığı gözlemlenmiş olup, özellikle amikasin ve meropenem için yüksek MİK değerlerine doğru bir yığılma dikkat çekmiştir. Kolistin için ise izolatların önemli bir kısmının düşük MİK değerlerinde toplandığı görülmektedir.

Değerlendirmeye alınan toplam 140 izolatın kolistin, amikasin, meropenem ve fosfomisin antibiyotiklerine karşı duyarlılık dağılımları değerlendirilmiştir. Kolistin için belirlenen MİK değerleri 0,125–64 mg/L aralığında değişmekte olup, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 1 mg/L ve 4 mg/L olarak saptanmıştır. EUCAST 15.0 kriterlerine göre yapılan değerlendirmede, izolatların %76,4’ü kolistine duyarlı, %23,6’sı ise dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Amikasin için elde edilen MİK değerleri 0,5–256 mg/L arasında değişmekte olup, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin her ikisi de >256 mg/L olarak bulunmuştur. Bu antibiyotiğe karşı duyarlılık oranı %25 olarak saptanırken, %75 oranında direnç tespit edilmiştir. Meropenem için belirlenen MİK değerleri 0,02–32 mg/L arasında değişmekte olup, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin her ikisi de 32 mg/L olarak hesaplanmıştır. Meropenem duyarlılığı oldukça düşük seviyede olup, yalnızca %1,4 oranında artmış dozda duyarlılık (I) izlenmiş, %98,6 oranında direnç gözlenmiştir.

Fosfomisin için MİK aralığı 1–1024 mg/L olarak belirlenmiştir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 128 mg/L ve 1024 mg/L olarak hesaplanmıştır. Ancak CLSI ve

EUCAST 15.0 kılavuzlarında fosfomisin için tanımlanmış klinik duyarlılık sınırlarının yalnızca *Escherichia coli* gibi sınırlı türler için geçerli olması nedeniyle, bu çalışmadaki izolatlar duyarlılık kategorilerine (standart dozda duyarlı, artmış dozda duyarlı, dirençli) ayrılmamıştır.

Tablo 4. Suşların Değerlendirildikleri MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve kombinasyonlarda kullanılan antibiyotiklere duyarlılıkları ve oranları (n=140 izolat)

	MİK Aralık (mg/l)	MİK ₅₀ (mg/l)	MİK ₉₀ (mg/l)	Standart Dozda Duyarlı		Artmış Dozda Duyarlı		Dirençli	
				n	%	n	%	n	%
Kolistin	0,125-64	1	4	107	76,4	0	0	33	23,6
Amikasin	0,5-256	>256	>256	35	25	0	0	105	75
Meropenem	0,02-32	32	32	0	0	2	1,4	138	98,6
Fosfomisin	1-1024	128	1024	--	--	--	--	--	--

Tablo 5. Suşların sahip olduğu direnç genleri, kombinasyonlarda kullanılan antibiyotiklerin tek başlarına MİK değerleri, kombinasyon hâlinde elde edilen FİK indeksleri ve etkileşim türleri

	Karbapenemaz geni**	Amikasin MİK	Fosfomisin Mik	Kolistin Mik	Meropenem Mik	F+M FİKİ	Yorum	F+K FİKİ	Yorum	F+A FİKİ	Yorum
1	OXA-48	4	1024	<0,125	32	0,03	Sinerjik	1,06	İndiferans	0,18	Sinerjik
2	OXA-48	16	512	1	12	0,07	Sinerjik	0,375	Sinerjik	0,15	Sinerjik
3	NDM	>256	64	<0,125	8	0,375	Sinerjik	2,2	İndiferans	0,25	Sinerjik
4	OXA-48	4	32	<0,125	8	0,125	Sinerjik	2,5	İndiferans	1	Aditif
5	OXA-48	4	64	<0,125	8	0,5	Sinerjik	3	İndiferans	2	İndiferans
6	OXA-48	8	128	4	8	0,3	Sinerjik	0,62	Aditif	0,3	Sinerjik
7	OXA-48	4	64	<0,125	6	0,22	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,6	Aditif
8	OXA-48	32	128	<0,125	16	0,25	Sinerjik	2,3	İndiferans	0,5	Sinerjik
9	OXA-48	4	32	<0,125	12	0,1	Sinerjik	2,1	İndiferans	1,125	İndiferans
10	OXA-48	2	16	<0,125	8	0,18	Sinerjik	2,2	İndiferans	2,25	İndiferans
11	OXA-48	4	>1024	2	24	0,34	Sinerjik	X	Hesaplanamadı	1,25	İndiferans
12	OXA-48	16	>1024	4	24	0,34	Sinerjik	X	Hesaplanamadı	0,5	Sinerjik
13	OXA-48	4	>1024	2	24	0,6	Aditif	X	Hesaplanamadı	2	İndiferans

14	OXA-48	4	512	8	32	0,375	Sinerjik	0,2	Sinerjik	0,5	Sinerjik
15	OXA-48	2	128	<0,125	4	0,15	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,5	Sinerjik
16	OXA-48	8	64	2	3	0,2	Sinerjik	1	Aditif	0,6	Aditif
17	OXA-48	8	128	<0,125	32	0,25	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,6	Aditif
18	NDM	>256	128	<0,125	32	0,25	Sinerjik	2,1	İndiferans	0,3	Sinerjik
19	OXA-48	>256	128	<0,125	12	0,13	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,2	Sinerjik
20	OXA-48 + NDM	>256	128	<0,125	32	0,3	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,6	Aditif
21	OXA-48	>256	>1024	1	32	0,12	Sinerjik	0,2	Sinerjik	0,1	Sinerjik
22	OXA-48 + NDM	128	128	<0,125	12	0,3	Sinerjik	3	İndiferans	0,3	Sinerjik
23	OXA-48	>256	512	2	24	0,2	Sinerjik	0,3	Sinerjik	<0,125	Sinerjik
24	OXA-48	>256	256	2	32	0,5	Sinerjik	0,3	Sinerjik	0,2	Sinerjik
25	OXA-48	256	64	2	32	0,5	Sinerjik	8	Antagonist	0,3	Sinerjik
26	OXA-48 + NDM	64	256	<0,125	24	0,25	Sinerjik	2,1	İndiferans	0,3	Sinerjik
27	OXA-48 + NDM	256	256	<0,125	24	0,06	Sinerjik	2,2	İndiferans	0,15	Sinerjik
28	OXA-48	4	128	0,125	32	0,375	Sinerjik	1,2	İndiferans	0,75	Aditif
29	OXA-48 + NDM	>256	64	8	32	1	Aditif	X	Hesaplanamadı	1	Aditif
30	OXA-48 + NDM	>256	128	1	32	0,5	Sinerjik	X	Hesaplanamadı	0,3	Sinerjik
31	OXA-48	2	256	1	32	0,5	Sinerjik	0,3	Sinerjik	0,5	Sinerjik
32	OXA-48 + NDM	>256	64	2	32	0,3	Sinerjik	1,5	İndiferans	0,5	Sinerjik
33	NDM	>256	256	2	12	0,5	Sinerjik	1	Aditif	0,2	Sinerjik
34	NDM	>256	128	4	32	0,25	Sinerjik	0,5	Sinerjik	0,3	Sinerjik
35	OXA-48	4	128	1	32	0,25	Sinerjik	2,1	İndiferans	0,3	Sinerjik
36	OXA-48	2	128	1	32	0,375	Sinerjik	2,1	İndiferans	0,5	Sinerjik
37	OXA-48 + NDM	>256	64	4	32	0,75	Aditif	1	Aditif	x	Hesaplanamadı
38	OXA-48 + NDM	>256	256	4	32	0,5	Sinerjik	0,25	Sinerjik	0,1	Sinerjik
39	OXA-48 + NDM	>256	64	2	32	2	İndiferans	1	Aditif	1	Aditif
40	OXA-48 + NDM	>256	256	0,5	24	0,5	Sinerjik	0,75	Aditif	0,6	Aditif
41	OXA-48 + NDM	>256	1024	4	32	0,2	Sinerjik	0,09	Sinerjik	0,14	Sinerjik
42	OXA-48 + NDM	>256	128	4	32	0,25	Sinerjik	4,25	Antagonist	0,3	Sinerjik
43	OXA-48 + NDM	>256	256	8	24	0,7	Aditif	0,14	Sinerjik	0,3	Sinerjik
44	OXA-48 + NDM	>256	256	<0,125	32	0,25	Sinerjik	2,2	İndiferans	0,18	Sinerjik
46	NDM	>256	1024	2	32	0,12	Sinerjik	0,18	Sinerjik	0,09	Sinerjik
47	NDM	>256	512	<0,125	16	0,07	Sinerjik	2,2	İndiferans	0,25	Sinerjik

48	OXA-48	16	256	16	24	0,25	Sinerjik	1	Aditif	0,3	Sinerjik
49	NDM	>256	32	32	32	0,75	Aditif	1	Aditif	1	Aditif
50	OXA-48	64	16	<0,125	32	1	Aditif	3	İndiferans	1,25	İndiferans
52	NDM	>256	512	<0,125	32	0,15	Sinerjik	4,2	Antagonist	x	Hesaplanamadı
53	NDM	>256	128	2	12	0,26	Sinerjik	0,5	Sinerjik	0,6	Aditif
54	OXA-48	0,5	128	<0,125	16	0,06	Sinerjik	2,3	İndiferans	2	İndiferans
55	NDM	0,5	64	<0,125	32	0,125	Sinerjik	2,5	İndiferans	1,25	İndiferans
56	OXA-48	>256	64	4	32	0,18	Sinerjik	1	Aditif	0,5	Sinerjik
57	NDM	>256	64	8	32	0,25	Sinerjik	1	Aditif	1	Aditif
58	OXA-48	16	64	4	3	1	Aditif	1,03	İndiferans	0,3	Sinerjik
59	OXA-48	1	16	<0,125	32	0,14	Sinerjik	6	Antagonist	1,5	İndiferans
60	OXA-48	>256	64	8	32	0,375	Sinerjik	0,5	Sinerjik	0,5	Sinerjik
61	OXA-48 + NDM	256	64	<0,125	32	0,375	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,6	Aditif
62	OXA-48	1	64	<0,125	32	0,18	Sinerjik	2,5	İndiferans	2,5	İndiferans
63	OXA-48	64	64	<0,125	32	0,25	Sinerjik	2,3	İndiferans	1	Aditif
64	OXA-48	64	64	0,25	32	0,5	Sinerjik	1	Aditif	1,25	İndiferans
65	OXA-48	64	>1024	<0,125	32	0,25	Sinerjik	4,2	Antagonist	x	Hesaplanamadı
66	OXA-48	64	64	<0,125	32	0,375	Sinerjik	2,5	İndiferans	1,125	İndiferans
67	NDM	128	64	4	32	0,5	Sinerjik	2	İndiferans	1	Aditif
68	OXA-48	>256	128	0,25	32	0,5	Sinerjik	1	Aditif	0,3	Sinerjik
69	OXA-48	>256	64	2	24	0,3	Sinerjik	1	Aditif	0,5	Sinerjik
70	OXA-48	32	32	<0,125	32	0,5	Sinerjik	2,5	İndiferans	2	İndiferans
71	OXA-48	16	128	<0,125	12	0,4	Sinerjik	2,3	İndiferans	1,125	İndiferans
72	OXA-48	16	256	<0,125	16	0,25	Sinerjik	2,5	İndiferans	1	Aditif
73	OXA-48	2	64	<0,125	32	0,09	Sinerjik	2,5	İndiferans	1	Aditif
74	OXA-48	128	64	2	24	0,9	Aditif	1	Aditif	1,25	İndiferans
75	OXA-48	32	256	0,25	16	0,3	Sinerjik	0,75	Aditif	0,375	Sinerjik
76	OXA-48	>256	256	32	32	0,18	Sinerjik	0,25	Sinerjik	1	Aditif
77	NDM	>256	128	<0,125	32	0,625	Aditif	2,5	İndiferans	2	İndiferans
78	KPC	256	128	<0,125	32	0,625	Aditif	2,5	İndiferans	1,125	İndiferans
79	OXA-48	2	32	<0,125	32	0,18	Sinerjik	8,8	Antagonist	2	İndiferans
80	NDM	>256	128	<0,125	32	0,375	Sinerjik	2,5	İndiferans	X	Hesaplanamadı
82	NDM	>256	64	<0,125	4	0,5	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,62	Aditif
83	NDM	>256	16	<0,125	24	1	Aditif	4	İndiferans	2	İndiferans
84	NDM	8	16	<0,125	32	1,125	İndiferans	4	İndiferans	4,5	Antagonist
85	OXA-48	0,5	16	<0,125	32	0,625	Aditif	12	Antagonist	3	İndiferans
86	OXA-48	>256	256	4	24	0,5	Sinerjik	4	İndiferans	1	Aditif
87	OXA-48	>256	128	1	24	0,4	Sinerjik	16	Antagonist	0,3	Sinerjik
88	NDM	2	32	1	32	0,312	Sinerjik	2	İndiferans	3	İndiferans
89	OXA-48	>256	>1024	0,125	32	0,25	Sinerjik	4	İndiferans	X	Hesaplanamadı

90	OXA-48	>256	64	<0,125	32	0,75	Aditif	4	İndiferans	1,125	İndiferans
91	OXA-48	2	>1024	0,25	32	0,5	Sinerjik	4	İndiferans	2	İndiferans
92	OXA-48	>256	>1024	<0,125	32	0,5	Sinerjik	8	Antagonist	x	Hesaplanamadı
93	OXA-48	2	>1024	<0,125	32	0,5	Sinerjik	8	Antagonist	2	İndiferans
94	OXA-48	>256	>1024	0,5	32	0,12	Sinerjik	32	Antagonist	x	Hesaplanamadı
97	OXA-48	>256	>1024	<0,125	32	x	Hesaplanamadı	4	İndiferans	x	Hesaplanamadı
100	OXA-48	>256	256	1	32	0,18	Sinerjik	16	Antagonist	0,18	Sinerjik
101	OXA-48	>256	256	4	32	0,18	Sinerjik	1	Aditif	0,25	Sinerjik
102	OXA-48	>256	256	2	32	0,25	Sinerjik	0,3	Sinerjik	X	Hesaplanamadı
103	OXA-48	>256	256	1	12	0,26	Sinerjik	1,25	İndiferans	0,25	Sinerjik
104	OXA-48	>256	128	4	16	0,5	Sinerjik	0,2	Sinerjik	1	Aditif
105	OXA-48	64	512	<0,125	12	0,5	Sinerjik	2,3	İndiferans	0,6	Aditif
107	OXA-48	>256	128	1	12	0,4	Sinerjik	17	Antagonist	0,5	Sinerjik
108	OXA-48	16	32	1	12	0,4	Sinerjik	0,625	Aditif	0,18	Sinerjik
109	OXA-48	>256	64	<0,125	12	0,5	Sinerjik	3	İndiferans	0,5	Sinerjik
111	OXA-48	>256	128	4	32	0,125	Sinerjik	4	İndiferans	0,375	Sinerjik
112	OXA-48	>256	64	0,5	32	0,28	Sinerjik	1,5	İndiferans	0,5	Sinerjik
113	NDM	>256	128	<0,125	32	0,312	Sinerjik	34	Antagonist	0,12	Sinerjik
114	OXA-48	>256	64	0,5	32	0,18	Sinerjik	1,5	İndiferans	2	İndiferans
115	NDM	16	256	4	16	0,25	Sinerjik	2,1	İndiferans	0,5	Sinerjik
116	OXA-48	>256	256	8	32	0,14	Sinerjik	0,13	Sinerjik	0,5	Sinerjik
117	KPC	>256	256	4	32	0,25	Sinerjik	5	Antagonist	x	Hesaplanamadı
118	OXA-48	>256	128	1	32	0,26	Sinerjik	16	Antagonist	1,125	İndiferans
119	OXA-48	4	32	<0,125	32	0,25	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,375	Sinerjik
120	OXA-48	>256	128	8	8	0,51	Aditif	4	İndiferans	1	Aditif
121	OXA-48	>256	128	2	32	0,31	Sinerjik	8,5	Antagonist	1	Aditif
122	OXA-48	>256	128	4	32	0,28	Sinerjik	1,25	İndiferans	1	Aditif
123	KPC	1	32	4	4	2,1	İndiferans	8	Antagonist	0,75	Aditif
124	OXA-48	>256	128	2	32	0,125	Sinerjik	0,5	Sinerjik	0,2	Sinerjik
126	OXA-48	4	512	<0,125	32	0,12	Sinerjik	2,2	İndiferans	0,14	Sinerjik
127	OXA-48	>256	128	8	12	0,22	Sinerjik	1	Aditif	0,3	Sinerjik
128	OXA-48	64	>1024	<0,125	12	0,6	Aditif	4,2	Antagonist	x	Hesaplanamadı
129	OXA-48	>256	128	2	16	0,5	Sinerjik	10	Antagonist	1	Aditif
130	OXA-48	>256	256	1	16	0,2	Sinerjik	0,3	Sinerjik	0,2	Sinerjik
131	OXA-48	16	1024	<0,125	32	0,75	Aditif	2,2	İndiferans	1,25	İndiferans
132	OXA-48	>256	256	1	16	0,25	Sinerjik	16	Antagonist	0,2	Sinerjik
133	KPC	1	32	<0,125	32	0,56	Aditif	4	İndiferans	1,5	İndiferans
134	OXA-48	64	32	<0,125	32	0,75	Aditif	3	İndiferans	0,14	Sinerjik
135	OXA-48	>256	64	1	32	0,28	Sinerjik	0,75	Aditif	2	İndiferans
136	OXA-48	128	64	<0,125	8	0,18	Sinerjik	2,3	İndiferans	0,18	Sinerjik

137	OXA-48	>256	128	2	8	0,2	Sinerjik	0,5	Sinerjik	1	Aditif
138	OXA-48	>256	128	8	32	0,31	Sinerjik	0,15	Sinerjik	1	Aditif
139	OXA-48	16	64	2	32	0,75	Aditif	3	İndiferans	0,625	Aditif
140	OXA-48	>256	128	16	32	0,5	Sinerjik	3	İndiferans	1	Aditif
141	KPC	1	64	<0,125	32	0,18	Sinerjik	3	İndiferans	1	Aditif
142	OXA-48	>256	128	2	32	0,5	Sinerjik	10	Antagonist	1,125	İndiferans
143	NDM	2	32	<0,125	32	0,18	Sinerjik	3	İndiferans	0,625	Aditif
144	NDM	64	32	<0,125	32	0,18	Sinerjik	3	İndiferans	0,75	Aditif
145	NDM	256	64	1	32	0,18	Sinerjik	1,1	İndiferans	0,375	Sinerjik
146	OXA-48	4	512	<0,125	32	0,25	Sinerjik	2,2	İndiferans	0,6	Aditif
147	OXA-48 + NDM	32	128	<0,125	32	0,5	Sinerjik	2,5	İndiferans	0,5	Sinerjik
148	OXA-48	>256	64	4	32	0,31	Sinerjik	5	Antagonist	0,5	Sinerjik
149	OXA-48 + NDM	128	1024	<0,125	32	0,25	Sinerjik	2,1	İndiferans	0,14	Sinerjik
150	OXA-48	>256	>1024	4	32	0,019	Sinerjik	4	İndiferans	0,01	Sinerjik

*45,51,81, 95,96,98, 99, 106, 110,125 numaralı kökenler çalışmadan çıkarılmış, 140 izolat üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

17 sonuç için kullanılan tüm üst düzey konsantrasyonlarda da üreme saptandığından kantitatif bir sonuç vermek mümkün olmamış, “Hesaplanamadı” olarak yazılmıştır.

Çalışmada, **blaVIM, **blaOXA-48**, **blaIMP**, **blaNDM** ve **blaKPC** gen bölgelerine yönelik PCR sonuçları, *Kan Kültüründe Üreyen Karbapeneme Dirençli Klebsiella Kökenlerinde Direnç Genleri ve Tedavi Başarısının Değerlendirilmesi* (2023) adlı tez çalışmasından referans alınarak kullanılmıştır [93].

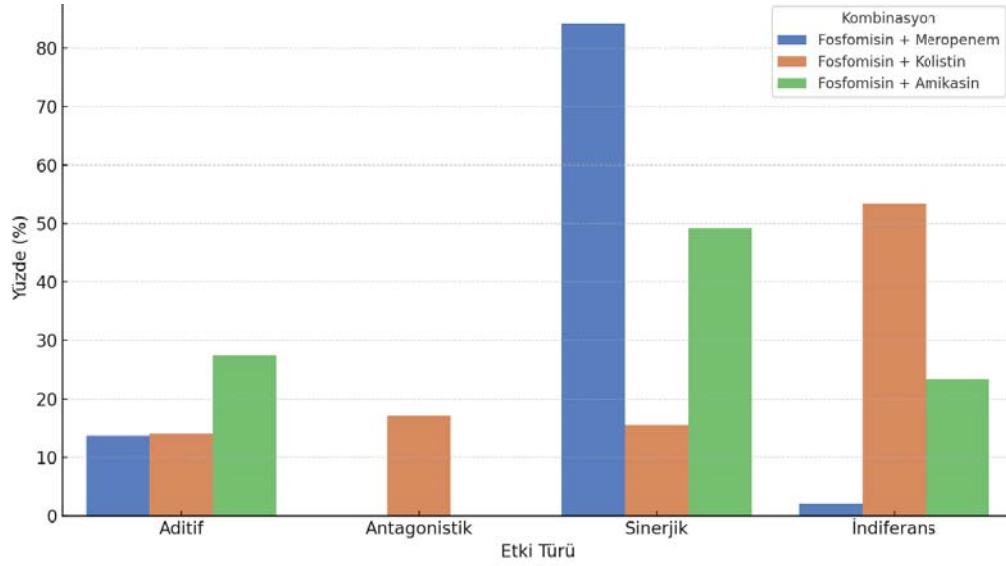
Fosfomisin ile birlikte kullanılan üç farklı antibiyotik kombinasyonuna ait etki türlerinin (sinerjik, aditif, indiferans, antagonistik) dağılımları Tablo 6’da gösterilmiştir. Fosfomisin + meropenem kombinasyonu, izolatların %84,2’sinde sinerjik etki göstermiş olup, bu oran diğer iki kombinasyonla karşılaştırıldığında belirgin şekilde daha yüksektir. Bu kombinasyonda aditif etki %13,7, indiferans ise yalnızca %2,2 oranında saptanmıştır.

Fosfomisin + kolistin kombinasyonu ile elde edilen sonuçlarda en yaygın etki indiferans olup, izolatların %53,3’ünde bu etki gözlenmiştir. Antagonistik etki oranı %17, sinerjik etki oranı %15,6 ve aditif etki %14,1 olarak belirlenmiştir. Fosfomisin + amikasin kombinasyonu ise %48,8 oranında sinerjik etki ile öne çıkarken, aditif etki %27,1, indiferans %23,3 ve antagonistik etki %0,8 olarak tespit edilmiştir.

Üç kombinasyonun etki profilleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$, Friedman testi). Post-hoc analizler sonucunda, fosfomisin+meropenem kombinasyonunun, hem fosfomisin+kolistin hem de fosfomisin+amikasin kombinasyonlarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$, Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon testi). Buna karşın, kolistin ve amikasin içeren kombinasyonlar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tablo 6. Fosfomisin ile birlikte kullanılan üç farklı antibiyotik kombinasyonuna ait etki türlerinin dağılımları

		N	%
Fosfomisin + Meropenem	Aditif	19	13,7%
	İndiferans	3	2,2%
	Sinerjik	117	84,2%
Fosfomisin + Kolistin	Aditif	19	14,1%
	İndiferans	72	53,3%
	Sinerjik	21	15,6%
	Antagonistik	23	17,0%
Fosfomisin + Amikasin	Aditif	35	27,1%
	İndiferans	30	23,3%
	Sinerjik	63	48,8%
	Antagonistik	1	0,8%



Şekil 18. Etki türlerine göre antibiyotik kombinasyon dağılımı

Karbapenemaz türlerine göre fosfomisin ile kombinasyon halinde kullanılan meropenem, kolistin ve amikasin antibiyotiklerinin gösterdiği etki türleri Tablo 7’de sunulmuştur. Fosfomisin + meropenem kombinasyonu, özellikle OXA-48 (%88,2) ve OXA-48 + NDM (%77,8) taşıyan izolatlarda yüksek oranda sinerjik etki göstermiştir. NDM (%82,6) taşıyan izolatlarda da bu kombinasyon yüksek düzeyde sinerji ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık KPC taşıyan izolatlarda, bu kombinasyonla sinerjik etkinin yalnızca %40 oranında görüldüğü, aynı oranda aditif ve %20 oranında indiferan etki de gözlemlendiği dikkat çekmektedir.

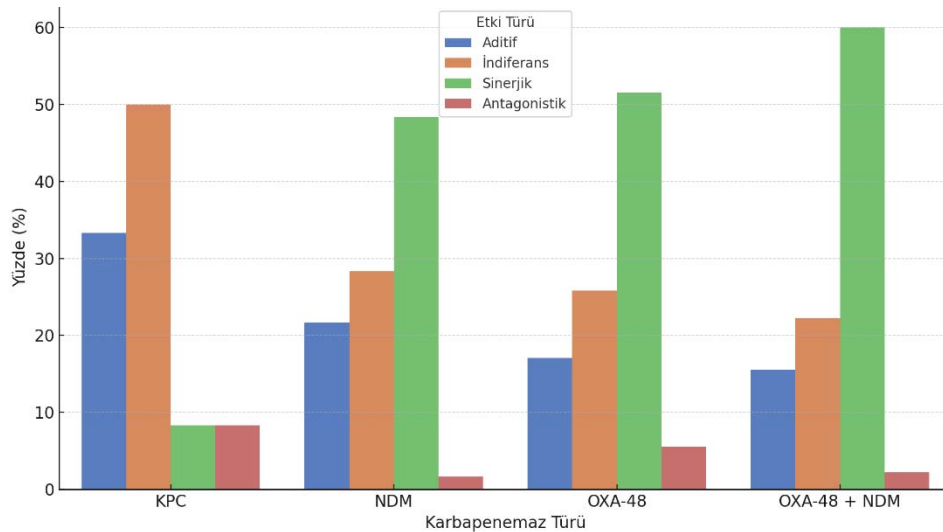
Fosfomisin + kolistin kombinasyonu incelendiğinde, tüm karbapenemaz gruplarında baskın etki biçiminin indiferans olduğu görülmektedir. Sinerjik etki %15,6 oranında antagonist etkiden sonra üçüncü sırada gelmektedir. Sinerjik etki, NDM grubunda %13, OXA-48’de %16,5 ve OXA-48 + NDM grubunda %18,8, KPC’de ise 0’dır. Ayrıca antagonist etkinin özellikle KPC (%40,0) ve OXA-48 (%19,8) gruplarında öne çıktığı görülmektedir. Bu durum, kolistin kombinasyonlarının bazı karbapenemaz türlerinde istenmeyen etki oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Fosfomisin + amikasin kombinasyonu ise özellikle OXA-48 + NDM taşıyan izolatlarda %70,6 oranında sinerjik etki ile dikkat çekmektedir. OXA-48 ve NDM taşıyan izolatlarda bu oran sırasıyla %48,3 ve %42,9’dur. KPC taşıyan izolatlarda ise sinerjik etki izlenmemiş, etkiler eşit oranda aditif (%50) ve indiferans (%50) olarak dağılmıştır.

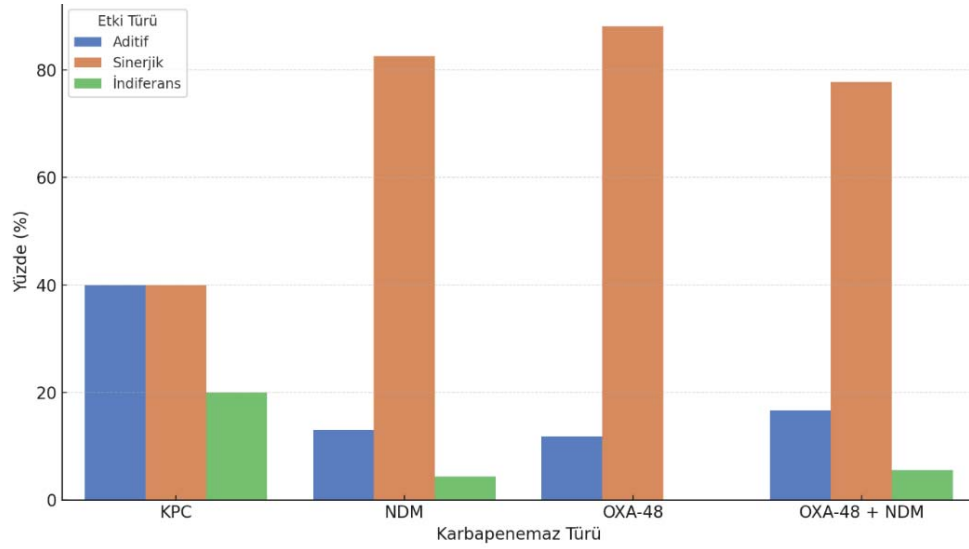
Bu bulgular, karbapenemaz türlerinin fosfomisin temelli kombinasyon tedavilerinin etki biçimleri üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermektedir. Kombinasyon etkilerinin karbapenemaz tipine göre değişimi istatistiksel olarak incelendiğinde Fosfomisin + Kolistin ve Fosfomisin + Amikasin kombinasyonlarında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Fosfomisin + Meropenem kombinasyonunun ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p = 0.044$, Kruskal-Wallis). Post-hoc analizlerde bu farkın özellikle KPC ile OXA-48 taşıyan izolatlar arasında anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p = 0.029$, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi).

Tablo 7. Karbapenemaz türlerine göre fosfomisin ile kombinasyon halinde kullanılan meropenem, kolistin ve amikasin antibiyotiklerinin gösterdiği etki türleri

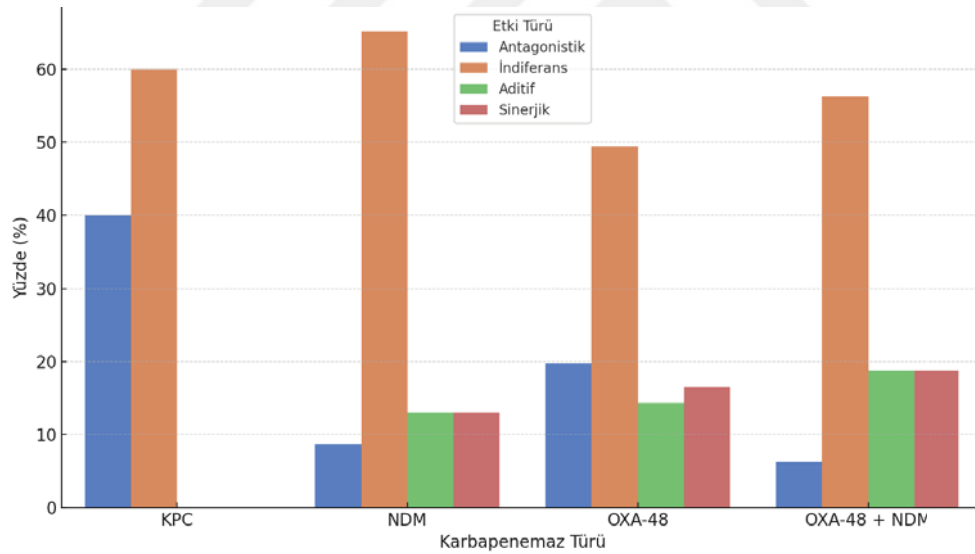
		Karbapenemaz							
		KPC		NDM		OXA-48		OXA-48 + NDM	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Fosfomisin+Meropenem	Aditif	2	40,00%	3	13,00%	11	11,80%	3	16,70%
	İndiferans	1	20,00%	1	4,30%	0	0,00%	1	5,60%
	Sinerjik	2	40,00%	19	82,60%	82	88,20%	14	77,80%
Fosfomisin+Kolistin	Aditif	0	0,00%	3	13,00%	13	14,30%	3	18,80%
	İndiferans	3	60,00%	15	65,20%	45	49,50%	9	56,30%
	Sinerjik	0	0,00%	3	13,00%	15	16,50%	3	18,80%
	Antagonistik	2	40,00%	2	8,70%	18	19,80%	1	6,30%
Fosfomisin+Amikasin	Aditif	2	50,00%	7	33,30%	21	24,10%	5	29,40%
	İndiferans	2	50,00%	4	19,00%	24	27,60%	0	0,00%
	Sinerjik	0	0,00%	9	42,90%	42	48,30%	12	70,60%
	Antagonistik	0	0,00%	1	4,80%	0	0,00%	0	0,00%



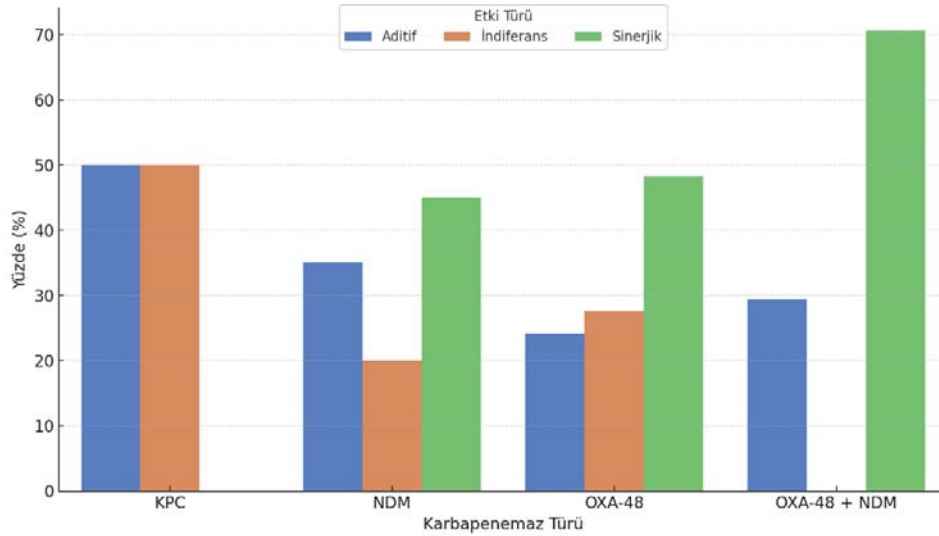
Şekil 19. Karbapenemaz türlerine göre etki türlerinin yüzdelik dağılımı



Şekil 20. Fosfomisin + Meropenem kombinasyonunun etki türlerinin Karbapenemazlara göre dağılımı



Şekil 21. Fosfomisin + Kolistin kombinasyonunun etki türlerinin karbapenemazlara göre dağılımı



Şekil 22. Fosfomisin + Amikasin kombinasyonunun etki türlerinin karbapenemazlara göre dağılımı

Fosfomisin içeren antibiyotik kombinasyonlarının etki türleri, ilgili antibiyotiğe karşı duyarlılık durumlarına göre sınıflandırılarak Tablo 8’de sunulmuştur.

Meropenem ile fosfomisin kombinasyonunda, tüm sinerjik etkiler meropenem dirençli izolatlarda gözlenmiş olup, bu grupta %83,5 oranında sinerji saptanmıştır. Artmış dozda duyarlı izolatların biri sinerjik, biri aditif etki göstermiştir. Meropenem’e duyarlı izolat bulunmamaktadır. Bu dağılım, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p = 0,319$).

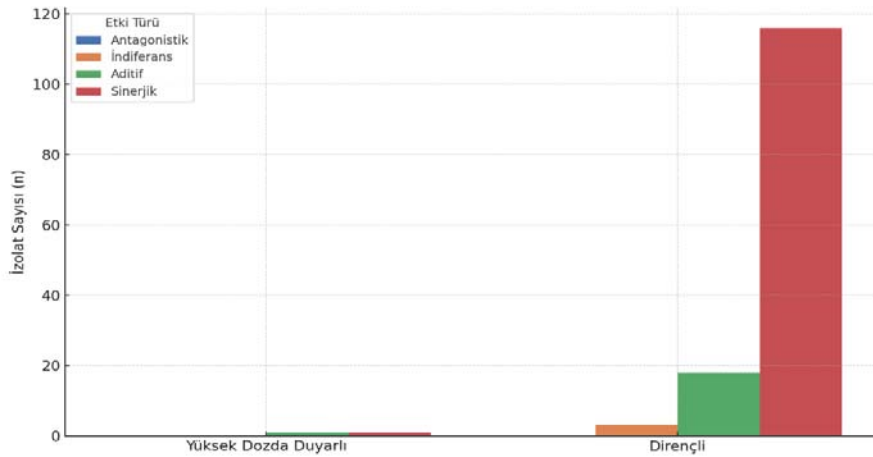
Kolistin ile fosfomisin kombinasyonunda ise etki türleri kolistin duyarlılığına göre belirgin farklılık göstermiştir ($p = 0,001$). Kolistine duyarlı izolatlarda en sık gözlenen etki indiferans (%46,7) olup, bunu antagonistik etki (%14,1) izlemiştir. Sinerjik ve aditif etkiler %8,1 oranında görülmüştür. Kolistin dirençli izolatlarda ise dağılım daha dengelidir; sinerjik etki %7,4, indiferans %6,7, aditif %5,9 ve antagonistik etki %3,0 oranında tespit edilmiştir.

Amikasin ile fosfomisin kombinasyonunda da benzer şekilde, etki türleri amikasin duyarlılık durumuna göre anlamlı farklılık göstermiştir ($p = 0,001$). Amikasin dirençli izolatlarda etki türleri arasında en yüksek oran sinerji (%41,9) iken; duyarlı izolatlarda bu oran %7,0’te kalmıştır. Amikasin duyarlı grupta en sık görülen etki indiferans (%11,6) olup, aditif (%7,8) ve sinerjik etkiler benzer düzeyde gözlenmiştir.

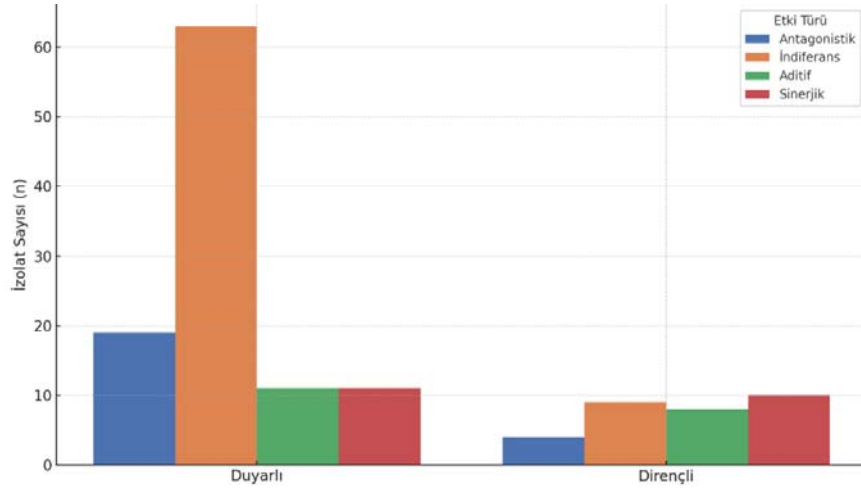
Bu bulgular, fosfomisin bazlı kombinasyonların etki türlerinin, eşlik eden antibiyotiğe karşı izolatın duyarlılık durumuna göre değişebileceğini göstermektedir. Özellikle kolistin ve amikasin ile yapılan kombinasyonlarda etki profillerinde anlamlı varyasyonlar izlenmiştir.

Tablo 8. Fosfomisin içeren antibiyotik kombinasyonlarının etki türleri, ilgili antibiyotiğe karşı duyarlılıklarına göre sınıflandırılması

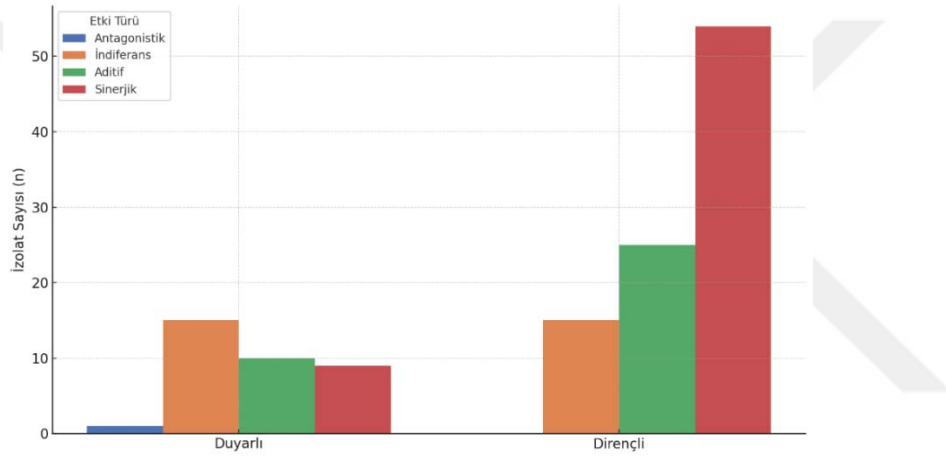
		Yorum								p
		Aditif		İndiferans		Sinerjik		Antagonistik		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
		Meropenem								
Meropenem	Standart Dozda Duyarlı	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0,319
	Artmış Dozda Duyarlı	1	0,7%	0	0,0%	1	0,7%	0	0,0%	
	Dirençli	18	12,9%	3	2,2%	116	83,5%	0	0,0%	
		Kolistin								
Kolistin	Standart Dozda Duyarlı	11	8,1%	63	46,7%	11	8,1%	19	14,1%	0,001
	Artmış Dozda Duyarlı	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
	Dirençli	8	5,9%	9	6,7%	10	7,4%	4	3,0%	
		Amikasin								
Amikasin	Standart Dozda Duyarlı	10	7,8%	15	11,6%	9	7,0%	1	0,8%	0,001
	Artmış Dozda Duyarlı	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
	Dirençli	25	19,4%	15	11,6%	54	41,9%	0	0,0%	



Şekil 23. Meropenem duyarlılık durumuna göre fosfomisin kombinasyonunun etki türleri



Şekil 24. Kolistin duyarlılık durumuna göre fosfomisin kombinasyonunun etki türleri



Şekil 25. Amikasin duyarlılık durumuna göre fosfomisin kombinasyonunun etki türleri

5. TARTIŞMA

Geçmişte Enterobacteriaceae ailesine ait bakteriler, sefalosporinler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, karbapenemler, aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi geniş yelpazedeki antibiyotiklerle güvenle tedavi edilebilmekteydi. Ancak zaman içinde bakterilerin ESBL, karbapenemaz ve AmpC beta-laktamaz gibi direnç mekanizmaları geliştirmesi, toplum ve hastane kaynaklı *Enterobacterales* enfeksiyonlarında bu ilaçları etkisiz hale getirmiştir. Bu durum, özellikle CR-Kp suşlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda tedavi seçeneklerini kısıtlayarak halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmuştur [52,94]. Antimikrobiyal direnç profillerindeki çeşitlenme ve yeni antibiyotik seçeneklerinin sınırlı olması, günümüzde yeniden önem kazanan polimiksin, fosfomisin ve tigesiklin gibi antibiyotiklerin kombinasyon tedavilerinde değerlendirilmesine neden olmuştur. Özellikle, dirençli Gram-negatif bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisinde kombine antibiyotik kullanımı önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır [95]. Pek çok araştırma, kombine tedavilerin tekli tedavilere kıyasla daha başarılı sonuçlar verdiğini göstermektedir. Ancak bu araştırmaların neredeyse tamamında, bazı ülkelerde en yaygın enzim tipi olarak öne çıkan KPC üreten *K. pneumoniae* (KPC Kp) suşları ele alınmıştır [96–98]. Türkiye’de ise uzun yıllar boyunca en yaygın karbapenemaz olarak kabul edilen OXA-48’in yanında NDM-1 tipi karbapenemaz görülme oranı hızla yükselmektedir. Çalışmamızda ise, 140 suştan 94 tanesi (%67,1) OXA-48, 23 tanesi (%16,4) NDM-1, 18 tanesi (%12,9) OXA-48+NDM-1, 5 tanesi (%3,6) KPC tip karbapenemaz direnç genine sahipti.

Meropenem/vaborbaktam, seftazidim-avibaktam, imipenem-relebaktam ve plazomisin gibi yeni antimikrobiyaller, birçok KPC, ESBL ve AmpC üreten suşa karşı etkili olmakla birlikte, hiçbirisi tek başına Metallo-beta-laktamaz (MBL; NDM, VIM, IMP) varlığında yeterli aktivite göstermemektedir. Bunun yanı sıra, imipenem-relebaktam ile meropenem/vaborbaktam OXA-48’e karşı da etkili değildir [26].

Peptidoglikan sentezini engelleme mekanizmasına sahip olan fosfomisin, geniş spektrumlu antibiyotikler arasında yer almaktadır. Bakteriyel hücre duvarının yapısında yer alan N-asetilmuramik asit sentezinden sorumlu MurA enzimini inhibe ederek hücre duvarının oluşumunu engeller. Bakteri hücrelerine başlıca GlpT ve UhpT

taşıyıcı sistemleri üzerinden alınır. Bazı antimikrobiyal ajanlarla kombine bir şekilde kullanılabilmekte ve bu ilaçlarla önemli bir çapraz direnç ya hiç göstermemekte ya da son derece düşük düzeyde ortaya çıkmaktadır. İyi tolere edilmesi ve güvenli bir ilaç olması sayesinde yan etkiler nadir olarak izlenmektedir. MDR *Enterobacterales* suşlarına karşı in vivo etkinliği, klinik faydası ve farmakokinetik/farmakodinamik avantajları sayesinde fosfomisin, olası tedavi seçenekleri arasında öne çıkmaktadır. Ayrıca uygun güvenlik profilinden dolayı yüksek dozlarda kullanılabilir. Bu durum, sistemik enfeksiyonların tedavisinde hedeflenen farmakodinamik değerlere ulaşma olasılığını artırmaktadır [5].

Farklı direnç mekanizmaları sayesinde fosfomisine karşı direnç ortaya çıkabilmektedir.

Taşıyıcı sistem mutasyonları: GlpT ve UhpT genlerinde meydana gelen mutasyonlar, hücre içine ilaç alımını engelleyerek direnç gelişmesine neden olabilir.

Fosfomisini modifiye eden enzimler: Fosfomisin; FosA, FosB ve FosC gibi çeşitli enzimler tarafından inaktive edilebilir [5]. Özellikle plazmit kaynaklı FosA genleri, bu ilacın enzimatik inaktivasyonunda önemli rol oynar. FosA'nın aktivitesinin baskılanmasının, fosfomisine duyarlılığı belirgin şekilde artırdığı gösterilmiştir [99].

Hedef bölgenin modifikasyonu: MurA enzimindeki yapısal değişiklikler, fosfomisinin bağlanma yeteneğini azaltarak direnç mekanizmasına katkıda bulunabilir [5].

Fosfomisine karşı in vitro duyarlılığını saptamak amacıyla agar (Mueller-Hinton agar) dilüsyon, disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve E-test gibi yöntemler kullanılmıştır [7,53].

Fosfomisin duyarlılığını belirlemek için yapılan bazı çalışmalarda kullanılan yöntemlerin birbiriyle çelişkili sonuçlar üretebildiği gözlemlenmiştir. Mesela, bir çalışmada ESBL-pozitif *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisin duyarlılığını değerlendirmek amacıyla sıvı mikrodilüsyon (SMD), disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle elde edilen MİK değerleri arasında özellikle *K. pneumoniae* suşlarında anlamlı düzeyde uyumsuzluklar tespit etmiştir [100]. MDR Gram-negatif bakterilerin fosfomisin duyarlılığını in vitro değerlendiren başka bir araştırmada da agar dilüsyon yöntemi, disk difüzyon ve E-test yöntemi karşılaştırılmış

ve gradyan testinin fosfomisin duyarlılığının tespitinde yeterli hassasiyeti göstermediği belirlenmiştir [101]. Fosfomisin duyarlılığını belirlemek için EUCAST, *Escherichia coli* türlerinde agar dilüsyon yöntemini tavsiye etmektedir. Ancak *E. coli* harici diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde herhangi bir duyarlılık testi önerilmemektedir. CLSI’da ise *Klebsiella pneumoniae* için referans yöntem olarak agar dilüsyonu önerilmektedir [72,73].

Çalışmamızda MİK tayini için agar dilüsyon testi tercih edilmiştir. Fosfomisin MİK₅₀ değeri 128 mg/l, MİK₉₀ değeri 1024 mg/l bulunmuştur. Fosfomisin için güncel EUCAST ve CLSI rehberlerinde *Enterobacteriaceae* ailesinden yalnızca *E. coli*’ye yönelik (idrar yolu enfeksiyonları için geçerli) MİK kırılma noktası belirtilmektedir. Fosfomisinin *Klebsiella spp.* için bu rehberlerde geçerli bir MİK kırılma noktası bulunmamaktadır; bu nedenle çalışmamızda bu antibiyotiğe ilişkin MİK değerleri yalnızca tanımlayıcı olarak raporlanmıştır, duyarlı ya da dirençli şekilde yorum yapılamamıştır.

Yapılan bir çalışmada, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* izolatlarında fosfomisin duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiş ve duyarlılıkları sırasıyla %92,2 ve %100 olarak tespit edilmiştir [102].

Yayımlanan çalışmaların önemli bir bölümü, fosfomisinin ESBL üreten *Enterobacteriaceae*, özellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae* üzerindeki in vitro etkinliğini incelemiştir [103,104].

Kan veya solunum örneklerinden elde edilen suşların duyarlılığını araştıran yayınlar bulunmakla birlikte, çoğunlukla idrar örnekleri odağa alınmıştır [7,105,106]. Genel olarak fosfomisinin *E. coli*’ye karşı (%82–%100 aralığında), *K. pneumoniae*’ye göre (%15–%100) daha yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [5]. Toplum kökenli suşların, hastane kökenli suşlara kıyasla daha yüksek duyarlılık sergilediği bildirilmiştir. Diğer *Enterobacteriaceae* türlerine yönelik fosfomisin duyarlılığına dair veri sayısı daha kısıtlı olsa da genel olarak %72–%97,5 aralığında etkinlik sağladığı; *P. mirabilis*’in ise bu grup içinde en az duyarlı tür olduğu belirtilmektedir. Buna ek olarak, fosfomisinin çok ilaca dirençli (MDR) *Enterobacteriaceae*’nin %90,5–%100’üne karşı aktif bulunduğu ifade edilmiştir [7,107]. Bazı çalışmalarda Karbapeneme dirençli (CR) Gram-negatif bakterilere yönelik olarak

değerlendirilmiştir. Çoğunlukla KPC Kp suşları ele alınmış, daha sınırlı ölçüde diğer *Enterobacteriaceae* türleri incelenmiştir [7,107,108]. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, ESBL üreten *K. pneumoniae* suşlarında genel olarak CR/KPC Kp suşlarına kıyasla bir dilüsyon daha düşük saptanmıştır. Fosfomisine ait MİK dağılımının oldukça değişken olduğu ve bu farklılığın MİK ölçüm yöntemi, suşun ait olduğu tür, diğer antibiyotik direnç genlerinin varlığı, altta yatan direnç mekanizmaları gibi etmenlerle ilişkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle, ESBL üreten suşlarda MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, CR/KPC Kp suşlarına oranla daha düşük seyretmiştir [108–110]. Ayrıca, rmtB genlerinin varlığının, KPC üreten suşlarda daha yüksek MİK değerleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [111].

Hiçbiri *blaKPC* taşımayan 18 ertapenem dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* klinik izolatında, fosfomisinin bir karbapenemle birlikte kullanımının değerlendirilmesi sonucunda, sinerjik bir katkı gözlenmiş ve karbapenem MİK değerlerinde yaklaşık iki kat azalma tespit edilmiştir [112].

Literatürde fosfomisin sinerjisini incelemek için çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte, bu yöntemlerden hangisinin en uygun olduğu konusunda bir uzlaşısı bulunmamaktadır [9].

E. coli bağlamında elde edilen veriler büyük ölçüde ESBL üreten suşlara odaklanmaktadır. Bu suşlara karşı karbapenemler (dama tahtası, zamana bağlı öldürme testleri ve E-test), aztreonam (dama tahtası ve zamana bağlı öldürme testleri), kolistin (zamana bağlı öldürme testleri ve E-test), netilmisin (E-test) ve tigesiklinin (zamana bağlı öldürme testleri ve E-test) sinerjik etkisi olduğu bildirilmiştir [75,113,114,114,115]. Ayrıca, izolatın MİK değerine eşit olacak şekilde uygulanan sefoksitin (zamana bağlı öldürme testleri ile) sinerji gösterirken, daha yüksek konsantrasyonlarda benzer bir etki saptanmamıştır [116].

Samonis ve ark.'nın [75] E-test yöntemi kullanarak yaptığı çalışmada ESBL üreten *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisinin karbapenemlerin (%43–%78; en yüksek oran imipeneme ait), kolistin (%7), netilmisinin (%43) ve tigesiklinin (%21) birlikte kullanımında sinerji gözlemlendiği raporlanmıştır. CR-Kp örneklerinde ise direnç mekanizması tam olarak belirtilmemesine rağmen, karbapenemler (%70), kolistin (%36), tigesiklin (%30) ve netilmisin (%42) ile sinerjik etki kaydedilmiştir.

Çalışmamızda ise fosfomisin + kolistin kombinasyonu agar dilüsyon yöntemiyle incelenmiş ve sinerji oranı %15,6 saptanmıştır.

Souli ve ark.'nın [117] yaptığı başka bir çalışmada time-kill yöntemi kullanılarak, *blaKPC-2* taşıyan 17 farklı genotipe sahip *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatında fosfomisinin meropenem, kolistin veya gentamisin ile etkileşimi değerlendirilmiş, meropenem ve kolistin ile birlikte uygulamada sırasıyla izolatların %64,7 ve %11,8'inde sinerjik etki gözlemlenirken, gentamisin ile kombinasyonda herhangi bir etkileşim tespit edilmemiştir. Bununla birlikte incelenen tüm kombinasyonlar, tek başına fosfomisine kıyasla daha güçlü bakterisidal etki göstermiştir. Ayrıca duyarlı olarak değerlendirilen izolatların sırasıyla %69,2, %53,8 ve %81,8'inde fosfomisin direncinin gelişmesini engellediği belirtilmiştir.

Ayrıca Tangden ve ark.'nın [118] yaptığı çalışmada benzer şekilde time-kill yöntemi kullanılmış, 2 VIM ve 2 NDM üreten *K. pneumoniae* suşlarında fosfomisin-kolistin, fosfomisin-meropenem ve fosfomisin-kolistin-meropenem kombinasyonlarının sinerjistik etkisi araştırılmıştır. Fosfomisin-kolistin-meropenem, fosfomisin-kolistinin sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca meropenem-kolistin kombinasyonunun bir suşa karşı sinerjik bir etki oluşturduğu, ancak bakterisidal olmadığı; diğer suşlarda sinerji ya da bakterisidal etkinlik göstermediği belirlenmiştir.

NDM-1 üreten *Enterobacteriaceae* için sıvı mikrodilüsyon ve dama tahtası yöntemiyle fosfomisin-kolistin kombinasyonunda sinerji raporlanırken, fosfomisin-tigesiklin ile ilgili benzer bir bildirim bulunmamaktadır [119].

Bazı çalışmalarda, intravenöz fosfomisinin, benzersiz etki mekanizması ve aminoglikozidler ya da kolistin kullanımının yol açtığı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisi nedeniyle, MRSA, vankomisine dirençli *Enterococcus* ve MDR Gram-negatif bakteriler (özellikle CR-Kp) kaynaklı sepsis veya hastane kökenli enfeksiyonları olan kritik hastalarda diğer antibiyotiklerle birlikte uygulandığında güvenli ve yararlı bir ek tedavi olabileceği bildirilmiştir [59,120,121]. Michalopoulos ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada, yoğun bakım ünitesinde CR-Kp enfeksiyonu gelişen 11 kritik hastada İV fosfomisinin etkililiği ve güvenliği değerlendirildi. Bu inceleme, fosfomisinin özellikle diğer antibiyotiklerle (kolistin, gentamisin) kombine

edildiğinde, CR-Kp kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde erişkin hastalar için potansiyel bir seçenek olabileceğini ortaya koymuştur [59].

Yapılan başka bir çalışmada, fosfomisin ve aminoglikozid kombinasyonunun KPC üreten farklı *K. pneumoniae* suşlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonlar (örneğin peritoneal sepsis) üzerindeki etkisinin sınırlı ve değişken olduğunu göstermiştir. Çalışmada, bu kombinasyonun yalnızca üç suшта doku bakteri konsantrasyonunu azalttığı ve sadece VIM-1 üreten suшта bakteriyemi düzeyinde azalma sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca, test edilen kombinasyonların hiçbiri KPC Kp kaynaklı enfeksiyonlarda sağkalımı artırmamıştır. Genel olarak bu bulgular, fosfomisin ile aminoglikozidlerin etkinliğinin, *K. pneumoniae* tarafından üretilen karbapenemazın sınıfına göre farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir [122]. 2022 tarihli bir tez çalışmasında [123], farklı klinik örneklerden elde edilen 71 karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşu, agar dilüsyon checkerboard yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada fosfomisin ile meropenem, imipenem ve amikasin kombinasyonlarının sinerjik etkileri incelenmiş; amikasin ile olan kombinasyonda %25, meropenem ile ise %45 oranında sinerji bildirildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda ise fosfomisin + amikasin kombinasyonunun sinerji oranı %48,8 olarak saptanmıştır. Bu oran OXA-48+NDM taşıyan izolatlarda %70,6 iken, OXA-48'de %48,3, NDM taşıyan izolatlarda ise %42,9'dur. KPC taşıyan izolatlarda ise sinerjik etki saptanmamıştır. Antagonistik etki ise sadece 1 izolatta (%4,8) gözlenmiştir.

Evren ve ark [18] fosfomisin ile meropenem kombinasyonunun, OXA-48 üreten izolatlarda in vitro ortamda %33 (n=4/12) oranında sinerji sağladığı göstermiştir. Her iki ilaç da bakteri hücre duvarı sentezini engellediğinden, bu sonuçlar beklenen bir etkileşim olarak değerlendirilebilir. Başka bir araştırmada, meropenem ile fosfomisin kombinasyonunun *E. coli* suşlarında sinerjik etki gösterdiği ve direnç gelişimini engellediği tespit edilmiştir. Araştırmacılar yüksek dozlarda ve kombine tedavi şeklinde uygulamanın yararlı olacağını belirtmektedir [124]. Sengel ve arkadaşlarının [61] karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatları üzerinde agar dilüsyon checkerboard yöntemiyle gerçekleştirdikleri çalışmada, 17 suş üzerinde yapılan değerlendirmede fosfomisinin meropenem ile kombinasyonunun en yüksek sinerji oranına sahip olduğu (15 suшта, %88) görülmüştür. Amikasin ve kolistin ile olan kombinasyonlarda ise sırasıyla %29 ve %41 oranlarında sinerji saptanmıştır.

Antagonistik etki yalnızca iki izolat için kolistin/fosfomisin kombinasyonunda gözlemlenmiştir. Çalışmamızda ise yukarıdaki çalışma sonuçlarıyla paralellik gösterecek şekilde fosfomisin+meropenem kombinasyonunda sinerjik etki, OXA-48 üreten izolatlarda %88,2, OXA-48 + NDM taşıyan izolatlarda %77,8, NDM üreten izolatlarda ise %82,6 gibi yüksek oranlarda saptanmıştır. Buna karşılık KPC taşıyan izolatlarda, bu sinerjik etki %40 olarak tespit edilmiştir. Fosfomisin hücre duvarı sentezini erken basamakta inhibe etmesi ile meropenem gibi karbapenem grubu antibiyotiklerin hücre duvarı sentezinin daha ileri basamaklarını hedef almasının tamamlayıcı etki gösterdiği düşünülmektedir. Bu sonuçlar meropeneme dirençli suşlarda bile fosfomisin ile birlikte kullanıldığında daha güçlü bir antimikrobiyal etki elde edilebileceğimizi düşündürmektedir.

Evren ve ark.'nın [18] yaptığı çalışmada dama tahtası yöntemiyle fosfomisin-kolistin kombinasyonu da incelenmiş, karbapenem dirençli OXA-48 üreten 12 farklı *K. pneumoniae* izolatında tamamen antagonistik etki gösterdiği bildirmiştir. Fosfomisin ve kolistin bakterisidal etki gösteren ve birbirinden farklı mekanizmalarla çalışan antibakteriyel ajanlardır: Fosfomisin bakteri hücre duvarı sentezini engellerken, kolistin hücre zarında lizise neden olur. Bu ikili arasında gözlenen antagonizmin nedeni henüz netlik kazanmamıştır ve tanımlanmamış bakteri faktörleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir [61]. Yaptığımız çalışmada fosfomisin-kolistin kombinasyonunda OXA-48 üreten 94 suştan 18'inde (%19,8) antagonistik etki saptanmıştır. Bu oran KPC üreten suşlarda %40 (n=2/5), NDM üretenlerde %8,7 (n=2/23), OXA-48 + NDM üretenlerde ise % 6,3'tür (n=1/8).

Fosfomisin-kolistin kombinasyonunda sinerjik etkinin oldukça düşük (%15,6) ve hatta antagonist etkinin %17,0 oranında gözlenmiş olması dikkat çekicidir. Bu durum, kolistin ile fosfomisin arasında olumsuz bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir. Bazı çalışmalarda, kolistin fosfomisin alımını azaltabileceği ve bu durumun etkinliği engelleyebileceği bildirilmiştir. Ayrıca, fosfomisin ve kolistin bazı direnç mekanizmaları (örneğin efflux pompaları veya modifiye hedef enzimler) açısından ortak hedeflere sahip olması, bu iki ajan arasında beklenmeyen antagonistik etkileşimlerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bulgularımız, bu kombinasyonun dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle, kullandığımız agar dilüsyon temelli sinerji testi, statik bir değerlendirme sunmakta olup, kombinasyon tedavilerinin zamana bağlı bakterisidal etkilerini daha kapsamlı şekilde değerlendirmeye olanak tanıyan ve bu alanda altın standart olarak kabul edilen “time-kill” analizlerinin yapılamamış olması, elde edilen sinerji sonuçlarının zaman içindeki değişimini izleme açısından önemli bir eksiklik teşkil etmektedir.

İkinci olarak, çalışma yalnızca in vitro laboratuvar verilerine dayandığı için, elde edilen bulguların doğrudan klinik etkinliğe yansımaları konusunda sınırlamalar söz konusudur. İzolatların hastalara ait klinik verilerle ilişkilendirilmemiş olması; enfeksiyonun şiddeti, tedaviye verilen yanıt, mortalite gibi klinik parametrelerin değerlendirilmesini mümkün kılmamıştır.

Çalışmanın tek merkezde yürütülmesi ve örnek sayısının 140 ile sınırlı kalması da önemli bir diğer sınırlılıktır. Tek bir coğrafi bölgeden elde edilen veriler, farklı bölgelerdeki direnç profillerini ve bakteriyel özellikleri tam olarak yansıtmayabilir. Bu nedenle, çok merkezli ve geniş hasta popülasyonlarını içeren çalışmalarla mevcut verilerin doğrulanması, genellenebilirliği artıracaktır.

Bir diğer sınırlama ise fosfomisin direnç genlerinin (örneğin fosA, fosA3) moleküler düzeyde araştırılmamış olması. Fosfomisinin in vitro duyarlılığı yüksek görünse bile, direnç genlerinin varlığı tedavi başarısını olumsuz etkileyebilir. Bu genlerin saptanmamış olması, çalışmada gözlenen sinerjilerin moleküler temelde açıklanmasını engeller.

Son olarak, sinerji testlerinin yalnızca fosfomisin ile kombinlenen amikasin, meropenem, kolistin ile sınırlı tutulmuş olması, çalışmanın kapsamını daraltmıştır. Günümüzde tedavi seçenekleri arasında yer alan tigesiklin, ceftazidim-avibactam, plazomisin gibi ajanlarla yapılan kombinasyonların da değerlendirilmesi, potansiyel alternatifleri ortaya koymak açısından değerli olabilir.

Çalışmamızın bulguları, fosfomisin içeren kombinasyonların özellikle CR-Kp suşlarıyla ilişkili invaziv enfeksiyonlarda tedavi alternatifi olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Klinik uygulamalarda, farmakokinetik/farmakodinamik parametreler, hasta bağışıklık durumu, enfeksiyonun

lokalizasyonu gibi pek çok faktör tedavi yanıtını etkilemektedir. Bu nedenle, özellikle fosfomisin-meropenem kombinasyonunun klinik etkinliğini değerlendiren prospektif ve kontrollü in vivo çalışmaların gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır.



6. SONUÇ

Çalışmamızda, CR-Kp suşlarının antibiyotik duyarlılık profili değerlendirilmiş ve çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının potansiyel sinerjik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, izolatların %98,6'sının meropenem, %75'inin amikasin ve %23,6'sının kolistin dirençli olduğunu ortaya koymuştur. Bu direnç oranları, klasik tedavi yaklaşımlarının yetersiz kalabileceğini ve alternatif tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Uygulanan agar dilüsyon temelli sinerji testleri sonucunda, özellikle fosfomisin-meropenem kombinasyonunda %84,2 oranında saptanan sinerjik etki, bu kombinasyonun in vitro koşullarda oldukça etkili olabileceğine işaret etmektedir. Benzer şekilde, fosfomisin-amikasin kombinasyonunda %48,8 oranında gözlenen sinerji de klinik açıdan dikkate değerdir. Öte yandan, fosfomisin-kolistin kombinasyonunda hem sinerjik (%15,6) hem de antagonist (%17,0) etkilerin gözlenmiş olması, bu kombinasyonun dikkatli değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda karbapenemaz türlerine göre fosfomisin ile birlikte kullanılan meropenem, kolistin ve amikasin antibiyotik kombinasyonlarının gösterdiği etki türlerinin oranları değişiklik göstermiştir. Fosfomisin + meropenem kombinasyonu, özellikle OXA-48 (%88,2), NDM taşıyan izolatlarda %82,6 ve OXA-48 + NDM (%77,8) pozitif izolatlarda yüksek düzeyde sinerjik etki ortaya koymuştur. Buna karşılık, KPC pozitif izolatlarda sinerjik etkinin yalnızca %40 oranında olduğu; aynı oranda aditif etki saptandığı dikkat çekmektedir.

Fosfomisin ve kolistin kombinasyonu değerlendirildiğinde ise, tüm karbapenemaz gruplarında en yaygın etki biçimi indifferans (%53,3) sonra sırasıyla antagonist (%17,0), sinerjik (%15,6) ve aditif etki (%14,1) olduğu belirlenmiştir. Sinerjik etki karbapenemaz türlerine göre; OXA-48 + NDM için %18,8, OXA-48 için %16,5, NDM için %13 ve KPC için %0 olarak kaydedilmiştir. Öte yandan, özellikle KPC (%40,0) ve OXA-48 (%19,8) pozitif izolatlarda antagonistik etkinin öne çıktığı görülmektedir. Bu bulgular, kolistin içeren kombinasyonların bazı karbapenemaz türlerinde olumsuz etki yaratabileceğini düşündürmektedir.

Fosfomisin ve amikasin kombinasyonunda ise özellikle OXA-48+NDM pozitif izolatlarda %70,6 oranında sinerjik etki ile öne çıkmaktadır. OXA-48 taşıyan izolatlarda bu oran %48,3, NDM taşıyanlarda ise %42,9 olarak saptanmıştır. KPC pozitif izolatlarda ise sinerjik etki gözlenmemiş, etkiler eşit şekilde aditif (%50) ve indiferans (%50) olarak dağılmıştır.

Bununla birlikte, çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Time-kill yöntemi gibi dinamik sinerji analizlerinin uygulanmamış olması, antibiyotik kombinasyonlarının zaman içindeki bakterisidal etkilerini değerlendirmemizi sınırlamıştır. Ayrıca, elde ettiğimiz bulgular yalnızca in vitro koşullara dayanmaktadır ve klinik verilerle desteklenmemiştir. Fosfomisin direnç genleri (fosA gibi) moleküler düzeyde araştırılamamıştır. Çalışmanın tek merkezli, sınırlı sayıda izolatla gerçekleştirilmiş olması da sonuçların genellenebilirliğini kısıtlayabilir. Bu nedenle, elde edilen sinerji verilerinin klinik pratikte uygulanabilirliğini değerlendirebilmek amacıyla, daha geniş kapsamlı, çok merkezli ve in vivo destekli ileri çalışmaların yapılması büyük önem arz etmektedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, CR-Kp suşlarına karşı fosfomisin disodyumun özellikle meropenem ve amikasin ile birlikte kullanımının potansiyel bir tedavi seçeneği oluşturabileceği düşünülmektedir. Tüm bu veriler ışığında, fosfomisin/karbapenem ve fosfomisin/amikasin kombinasyonları, tek başına karbapenem veya fosfomisin kullanımına göre daha umut verici bir tedavi alternatifi olabilir. Artan antibiyotik direnci göz önüne alındığında, karbapenem dirençli suşlara karşı etkili tedavi seçenekleri geliştirebilmek adına fosfomisinin, gerek monoterapi olarak ve gerekse sinerjik etki gösteren kombinasyonlarının kullanımının in vitro, in vivo ortamlarda klinik etkinlik ve güvenilirliklerinin ileri araştırmalarla daha ayrıntılı biçimde değerlendirilmesi dirençle mücadelede önemli bir adım olacaktır.

KAYNAKÇA

1. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2019:3. doi:10.15620/cdc:82532
2. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(19):1804-1813. doi:10.1056/NEJMra0904124
3. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791-1798. doi:10.3201/eid1710.110655
4. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017;41(3):252-275. doi:10.1093/femsre/fux013
5. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(2):321-347. doi:10.1128/CMR.00068-15
6. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomycin: Use Beyond Urinary Tract and Gastrointestinal Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(7):1069-1077. doi:10.1086/527442
7. Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) Enterobacteriaceae isolates to fosfomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(3):240-243. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.10.019
8. Hacettepe Universitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, Hazirolan G. Fosfomycin: Flashback. *Klimik Dergisi*. 2020;33(3):213-222. doi:10.5152/kd.2020.46
9. Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(4):359-368. doi:10.1007/s00228-010-0794-5
10. Liao Y, Hu GH, Xu YF, et al. Retrospective analysis of fosfomycin combinational therapy for sepsis caused by carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;13(3):1003-1010. doi:10.3892/etm.2017.4046
11. Öztaş S, Er DK, Dündar D. Karbapenemlere Dirençli ve Duyarlı Klebsiella pneumoniae İzolatlarının Çeşitli Antimikrobiyallere Direnç Oranları. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2022;8(3):229-232. doi:10.30934/kusbed.1163427
12. Ramirez MS, Tolmasky ME. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. *Molecules*. 2017;22(12):2267. doi:10.3390/molecules22122267

13. Hellinger WC, Brewer NS. Carbapenems and Monobactams: Imipenem, Meropenem, and Aztreonam. *Mayo Clinic Proceedings*. 1999;74(4):420-434. doi:10.4065/74.4.420
14. Adler A, Ben-Dalak M, Chmelnitsky I, Carmeli Y. Effect of Resistance Mechanisms on the Inoculum Effect of Carbapenem in *Klebsiella pneumoniae* Isolates with Borderline Carbapenem Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(8):5014-5017. doi:10.1128/aac.00533-15
15. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases*. 2022;75(2):187-212. doi:10.1093/cid/ciac268
16. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Medical Research and Opinion*. 2015;31(4):707-721. doi:10.1185/03007995.2015.1018989
17. Tängdén T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Uppsala Journal of Medical Sciences*. 2014;119(2):149-153. doi:10.3109/03009734.2014.899279
18. Evren E, Azap OK, Çolakoglu Ş, Arslan H. In vitro activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76(3):335-338. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.004
19. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacterales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(12):5575-5599. doi:10.1099/ijsem.0.001485
20. Amaretti A, Righini L, Candeliere F, et al. Antibiotic Resistance, Virulence Factors, Phenotyping, and Genotyping of Non-*Escherichia coli* Enterobacterales from the Gut Microbiota of Healthy Subjects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(5):1847. doi:10.3390/ijms21051847
21. González LV. Human Pathogenic *Enterobacterales*. In: Rezaei N, ed. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Elsevier; 2022:628-636. doi:10.1016/B978-0-12-818731-9.00160-9
22. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(4):689-692. doi:10.1093/jac/dkq520
23. Azam MW, Zarrilli R, Khan AU. Updates on the Virulence Factors Produced by Multidrug-Resistant Enterobacterales and Strategies to Control Their Infections. *Microorganisms*. 2023;11(8):1901. doi:10.3390/microorganisms11081901

24. Kuş H, Arslan U, Türk Dağı H, Fındık D. [Investigation of various virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from nosocomial infections]. *Mikrobiyol Bul.* 2017;51(4):329-339. doi:10.5578/mb.59716
25. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Current Opinion in Microbiology.* 2010;13(5):558-564. doi:10.1016/j.mib.2010.09.006
26. Bassetti M, Peghin M, Pecori D. The management of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(6):583-594. doi:10.1097/QCO.0000000000000314
27. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum.* 2016;4(2):10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015. doi:10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015
28. Antimicrobial resistance. Accessed January 2, 2025. <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/antimicrobial-resistance>
29. Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Fanning S. Bacteria: Other Pathogenic *Enterobacteriaceae* – *Enterobacter* and Other Genera. In: Motarjemi Y, ed. *Encyclopedia of Food Safety.* Academic Press; 2014:433-441. doi:10.1016/B978-0-12-378612-8.00104-9
30. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed March 24, 2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
31. Antimicrobial Resistance, Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - Global situation. Accessed March 25, 2025. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON527>
32. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews.* 1998;11(4):589-603. doi:10.1128/cmr.11.4.589
33. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8. doi:10.3389/fcimb.2018.00004
34. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2015;59(10):5873-5884. doi:10.1128/aac.01019-15
35. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):e00047-19. doi:10.1128/CMR.00047-19
36. Romyasamit C, Sornsene P, Kawila S, Saengsuwan P. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: insights from a tertiary hospital in Southern Thailand. *Microbiology Spectrum.* 2024;12(7):e00213-24. doi:10.1128/spectrum.00213-24

37. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3):122. doi:10.3390/antibiotics8030122
38. Davarcı İ, Şenbayrak S, Aksaray S, Koçoğlu ME, Kuşkucu MA, Samastı M. Molecular Epidemiology of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Anatolian Clin*. 2019;24(1):1-7. doi:10.21673/anadoluklin.423081
39. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, et al. Spread of NDM-1-Producing Enterobacteriaceae in a Neonatal Intensive Care Unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2929-2933. doi:10.1128/AAC.02047-13
40. Çiftçi İH, Karakeçe E, Aşık G, Demirey T, Er H. KARBAPENEM DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUŞLARINDA OXA-48 VE KPC VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI.
41. García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, Albertí S. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(4):1803-1805. doi:10.1128/aac.01441-10
42. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(2):337-418. doi:10.1128/cmr.00117-14
43. Nikaido H, Pagès JM. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012;36(2):340-363. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x
44. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2018;45:131-139. doi:10.1016/j.mib.2018.04.004
45. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629-661. doi:10.1128/MMBR.00078-15
46. Chen TA, Chuang YT, Lin CH. A Decade-Long Review of the Virulence, Resistance, and Epidemiological Risks of *Klebsiella pneumoniae* in ICUs. *Microorganisms*. 2024;12(12):2548. doi:10.3390/microorganisms12122548
47. Magill SS, O'Leary E, Janelle SJ, et al. Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. *N Engl J Med*. 2018;379(18):1732-1744. doi:10.1056/NEJMoa1801550
48. Boonsarngsuk V, Thungtitigul P, Suwatanapongched T. Chronic *Klebsiella pneumoniae*: a rare manifestation of *Klebsiella pneumoniae*. *J Thorac Dis*. 2015;7(9):1661-1664. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.09.31
49. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, et al. Comparing the Outcomes of Patients With Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2017;64(3):257-264. doi:10.1093/cid/ciw741

50. Yu L, Zhang J, Fu Y, et al. Synergetic Effects of Combined Treatment of Colistin With Meropenem or Amikacin on Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in vitro. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9. doi:10.3389/fcimb.2019.00422
51. Baylan O. [Fosfomycin: past, present and future]. *Mikrobiyol Bul*. 2010;44(2):311-321.
52. Sastry S, Doi Y. Fosfomycin: Resurgence of An Old Companion. *J Infect Chemother*. 2016;22(5):273-280. doi:10.1016/j.jiac.2016.01.010
53. Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V. The revival of fosfomycin. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(11):e732-e739. doi:10.1016/j.ijid.2011.07.007
54. BARRY AL, BROWN SD. Antibacterial spectrum of fosfomycin trometamol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1995;35(1):228-230. doi:10.1093/jac/35.1.228
55. de Cueto M, Hernández JR, López-Cerero L, Morillo C, Pascual A. [Activity of fosfomycin against extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(10):613-616. doi:10.1157/13095372
56. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;34(2):111-120. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.03.009
57. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, et al. Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(4):333-337. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011
58. Kadner RJ, Winkler HH. Isolation and Characterization of Mutations Affecting the Transport of Hexose Phosphates in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1973;113(2):895-900.
59. Michalopoulos A, Vartzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(2):184-186. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02921.x
60. Reffert JL, Smith WJ. Fosfomycin for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2014;34(8):845-857. doi:10.1002/phar.1434
61. Erturk Sengel B, Altinkanat Gelmez G, Soyletir G, Korten V. In vitro synergistic activity of fosfomycin in combination with meropenem, amikacin and colistin against OXA-48 and/or NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Chemotherapy*. 2020;32(5):237-243. doi:10.1080/1120009X.2020.1745501
62. Rodríguez-Rojas A, Couce A, Blázquez J. Frequency of Spontaneous Resistance to Fosfomycin Combined with Different Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(11):4948-4949. doi:10.1128/aac.00415-10

63. Brown ED, Vivas EI, Walsh CT, Kolter R. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1995;177(14):4194-4197. doi:10.1128/jb.177.14.4194-4197.1995
64. Zhao M, Bulman ZP, Lenhard JR, et al. Pharmacodynamics of colistin and fosfomycin: a “treasure trove” combination combats KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(7):1985-1990. doi:10.1093/jac/dkx070
65. Nutman A, Lellouche J, Temkin E, et al. Colistin plus meropenem for carbapenem-resistant Gram-negative infections: in vitro synergism is not associated with better clinical outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(9):1185-1191. doi:10.1016/j.cmi.2020.03.035
66. Bendirdjian JP, Morin JP, Foucher B, Fillastre JP. [The effect of fosfomycin on the respiration of rat kidney mitochondria]. *Minerva Med*. 1978;69(59):4079-4086.
67. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Accessed February 3, 2025. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>
68. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(6):a027029. doi:10.1101/cshperspect.a027029
69. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):430-450. doi:10.1128/CMR.16.3.430-450.2003
70. Wang N, Luo J, Deng F, Huang Y, Zhou H. Antibiotic Combination Therapy: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. *Front Pharmacol*. 2022;13. doi:10.3389/fphar.2022.839808
71. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, et al. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-1052. doi:10.2165/00003495-200767070-00006
72. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(2):161-168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
73. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1333-1341. doi:10.1086/429323
74. Karaikos I, Gkoufa A, Polyzou E, Schinas G, Athanassa Z, Akinosoglou K. High-Dose Nebulized Colistin Methanesulfonate and the Role in Hospital-Acquired Pneumonia Caused by Gram-Negative Bacteria with Difficult-to-Treat Resistance: A Review. *Microorganisms*. 2023;11(6):1459. doi:10.3390/microorganisms11061459
75. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(5):695-701. doi:10.1007/s10096-011-1360-5

76. Tessier F, Quentin C. In vitro activity of fosfomycin combined with ceftazidime, imipenem, amikacin, and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997;16(2):159-162. doi:10.1007/BF01709477
77. Bayot ML, Bragg BN. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2024. Accessed January 31, 2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>
78. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. Clinical & Laboratory Standards Institute. Accessed January 31, 2025. <https://clsi.org/>
79. EUCAST The European Committee on Antimicrobial. Accessed January 31, 2025. <https://www.eucast.org/>
80. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 1998;26(4):973-980.
81. Ransom EM, Carey-Ann DB. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol 2. 4th ed. ; 2016:848-920.
82. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics*. 2019;9(2):49. doi:10.3390/diagnostics9020049
83. Agar Dilution MIC Test. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 4th ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2016:5.4.1.1-5.4.2.12. doi:10.1128/9781555818814.ch5.4.1
84. Broth Microdilution Testing. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol 2. John Wiley & Sons, Ltd; 2016:5.2.1.1-5.2.2.10. doi:10.1128/9781555818814.ch5.2.1
85. Winstanley T, Courvalin P. Expert Systems in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011;24(3):515-556. doi:10.1128/cmr.00061-10
86. Doern CD, Humphries RM, Belkum A. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. John Wiley & Sons, Ltd; 2016:5.16.1-5.16.23. doi:10.1128/9781555818814.ch5.16
87. Bal Ç. Antibiyotik Kombinasyonlarının in vitro Etkinliğinin Saptanması. *Flora Dergisi*. Published online July 10, 1999:219-229.
88. Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, et al. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(11):4678-4683. doi:10.1128/aac.00497-10
89. Özseven AG, ÇetİN ES, Özseven L. Dama Tahtası Sinerji Testi Sonuçlarının Farklı Yöntemlerle Yorumlanması Sonuçlarımızı Etkiliyor mu?
90. den Hollander JG, Mouton JW, Verbrugh HA. Use of Pharmacodynamic Parameters To Predict Efficacy of Combination Therapy by Using Fractional Inhibitory Concentration Kinetics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(4):744-748.

91. Minimum Bactericidal Concentration Testing. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol 2. 4th ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2016:5.14.1.1-5.14.3.6. doi:10.1128/9781555818814.ch5.14.1
92. Özer BO. SİNERJİSTİK İLAÇ KOMBİNASYONLARININ ANALİZİNDE GÜNCEL MATEMATİKSEL VE İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER. *J Fac Pharm Ankara*. 2023;47(2):687-704. doi:10.33483/jfpau.1180259
93. KURT AF, SALTOĞLU N. KAN KÜLTÜRÜNDE ÜREYEN KARBAPENEME DİRENÇLİ KLEBSIELLA KÖKENLERİNDE DİRENÇ GENLERİ VE TEDAVİ BAŞARISININ DEĞERLENDİRİLMESİ. Uzmanlık Tezi. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ; 2023.
94. Bouchillon SK, Badal RE, Hoban DJ, Hawser SP. Antimicrobial Susceptibility of Inpatient Urinary Tract Isolates of Gram-Negative Bacilli in the United States: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program: 2009–2011. *Clinical Therapeutics*. 2013;35(6):872-877. doi:10.1016/j.clinthera.2013.03.022
95. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. 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):43-50. doi:10.1016/S1473-3099(09)70325-1
96. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouvelekis LS, et al. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2322-2328. doi:10.1128/AAC.02166-13
97. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(8):1135-1141. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03553.x
98. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):943-950. doi:10.1093/cid/cis588
99. Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, et al. Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal fosA Gene. *mBio*. 2017;8(4):10.1128/mbio.00749-17. doi:10.1128/mbio.00749-17
100. de Cueto M, López L, Hernández JR, Morillo C, Pascual A. In Vitro Activity of Fosfomycin against Extended-Spectrum- β -Lactamase- Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: Comparison of Susceptibility Testing Procedures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(1):368-370. doi:10.1128/aac.50.1.368-370.2006
101. Perdigão-Neto LV, Oliveira MS, Rizek CF, Carrilho CMDM, Costa SF, Levin AS. Susceptibility of Multiresistant Gram-Negative Bacteria to Fosfomycin and Performance of Different Susceptibility Testing Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(3):1763-1767. doi:10.1128/aac.02048-13
102. Ghayaz F, Kelishomi FZ, Amereh S, et al. In Vitro Activity of Fosfomycin on Multidrug-Resistant Strains of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca Causing

Urinary Tract Infection. *Curr Microbiol.* 2023;80(4):115. doi:10.1007/s00284-023-03208-0

103. Çağan Aktaş S, Gençer S, Batirel A, Haciseyit Toğlu D, Özer S. CLSI ve EUCAST Önerilerine Göre Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* İdrar İzolatlarında Fosfomisin Duyarlılığı. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48(4):545-555. doi:10.5578/mb.8327
104. Cho YH, Jung SI, Chung HS, et al. Antimicrobial susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in health care-associated urinary tract infection: focus on susceptibility to fosfomycin. *Int Urol Nephrol.* 2015;47(7):1059-1066. doi:10.1007/s11255-015-1018-9
105. Zhanel GG, Zhanel MA, Karlowsky JA. Oral and Intravenous Fosfomycin for the Treatment of Complicated Urinary Tract Infections. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology.* 2020;2020(1):8513405. doi:10.1155/2020/8513405
106. Seroy JT, Grim SA, Reid GE, Wellington T, Clark NM. Treatment of MDR urinary tract infections with oral fosfomycin: a retrospective analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2563-2568. doi:10.1093/jac/dkw178
107. Kahlmeter G, Poulsen HO. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study revisited. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2012;39(1):45-51. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.013
108. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, et al. In Vitro Activity of Fosfomycin against blaKPC-Containing *Klebsiella pneumoniae* Isolates, Including Those Nonsusceptible to Tigecycline and/or Colistin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010;54(1):526-529. doi:10.1128/aac.01235-09
109. Tuon FF, Rocha JL, Formighieri MS, et al. Fosfomycin susceptibility of isolates with blaKPC-2 from Brazil. *Journal of Infection.* 2013;67(3):247-249. doi:10.1016/j.jinf.2013.04.017
110. Jiang Y, Shen P, Wei Z, et al. Dissemination of a clone carrying a fosA3-harboring plasmid mediates high fosfomycin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2015;45(1):66-70. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.08.010
111. Li JJ, Sheng ZK, Deng M, et al. Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* ST11 Clone Coproducing KPC-2 and 16S rRNA Methylase RmtB in a Chinese University Hospital. *BMC Infectious Diseases.* 2012;12(1):373. doi:10.1186/1471-2334-12-373
112. Netikul T, Leelaporn A, Leelarasamee A, Kiratisin P. In vitro activities of fosfomycin and carbapenem combinations against carbapenem non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2010;35(6):609-610. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.01.021
113. Corvec S, Furustrand T, Tiffin U, Betrisey B, Borens O, Trampuz A. Activities of Fosfomycin, Tigecycline, Colistin, and Gentamicin against Extended-Spectrum-β-

- Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Foreign-Body Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(3):1421-1427. doi:10.1128/aac.01718-12
114. Lingscheid T, Tobudic S, Poepl W, Mitteregger D, Burgmann H. In vitro Activity of Doripenem plus Fosfomycin against Drug-Resistant Clinical Blood Isolates. *Pharmacology*. 2013;91(3-4):214-218. doi:10.1159/000348572
115. Hickman RA, Hughes D, Cars T, Malmberg C, Cars O. Cell-wall-inhibiting antibiotic combinations with activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(4):O267-O273. doi:10.1111/1469-0691.12374
116. Lefort A, Chau F, Lepeule R, et al. Activity of fosfomycin alone or combined with cefoxitin in vitro and in vivo in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* harbouring CTX-M-15-type extended-spectrum β -lactamase. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2014;43(4):366-369. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.12.001
117. Souli M, Galani I, Boukovalas S, et al. In Vitro Interactions of Antimicrobial Combinations with Fosfomycin against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Protection of Resistance Development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(5):2395-2397. doi:10.1128/aac.01086-10
118. Tängdén T, Hickman R, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske C, Cars O. Evaluation of Double- and Triple-Antibiotic Combinations for VIM- and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* by In Vitro Time-Kill Experiments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(3):1757-1762. doi:10.1128/aac.00741-13
119. Berçot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(10):2295-2297. doi:10.1093/jac/dkr296
120. Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis*. 2010;50(3):364-373. doi:10.1086/649865
121. Yamaguchi Y, Hanaki H, Yanagisawa C, et al. Characterization of beta-lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR) in a patient with septicemia during long-term vancomycin administration. *J Infect Chemother*. 2009;15(5):274-278. doi:10.1007/s10156-009-0703-y
122. Cebrero-Cangueiro T, Labrador-Herrera G, Pascual Á, et al. Efficacy of Fosfomycin and Its Combination With Aminoglycosides in an Experimental Sepsis Model by Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains. *Front Med*. 2021;8. doi:10.3389/fmed.2021.615540
123. Uzuner N, Akpolat N. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE KLİNİK İZOLATLARINDA AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE İNTRAVENÖZ FOSFOMİSİN DİRENCİNİN SAPTANMASI VE MEROPENEM, İMİPENEM, AMİKASİN ANTİBİYOTİKLERİ İLE SİNERJİST ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*. Tıpta Uzmanlık Tezi. Dicle Üniversitesi; 2022.

124. Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A, et al. Pharmacodynamics of Fosfomycin: Insights into Clinical Use for Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(9):5602-5610. doi:10.1128/aac.00752-15

