



**Tıp Fakültesi**

**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HASTANEMİZDE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE*  
SUŞLARINDAKİ FOSFOMİSİN DİRENÇ DURUMLARININ  
ARAŞTIRILMASI**

**DR. UĞUR KÜÇÜKSU  
UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL 2022**



**Tıp Fakültesi**

**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HASTANEMİZDE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE*  
SUŞLARINDAKİ FOSFOMİSİN DİRENÇ DURUMLARININ  
ARAŞTIRILMASI**

**DR. UĞUR KÜÇÜKSU  
UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. M. UFUK HASDEMİR**

**İSTANBUL 2022**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresinde beni destekleyen, deneyim ve bilgisinden her zaman yararlandığım, saygıdeğer Hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. M. Ufuk Hasdemir'e; asistanlık eğitimim sürecimin en iyi şekilde geçmesini sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Nilgün Çerikçioğlu, Prof. Dr. Nurver Ülger Toprak, Prof. Dr. Ayşegül Karahasan, Prof. Dr. Zeynep Arzu İlki, Dr. Öğr. Üyesi Burak Aksu, Dr. Öğr. Üyesi Elvan Sayın'a; tez sürecinde bilgisiyle ve kişiliğiyle beni her an destekleyen ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Gülşen Altınkanat Gelmez'e; mezun olsalar bile her an yanımda olmayı sürdüren Dr. Öğr. Üyesi Şerife Yılmaz, Uz. Dr. Beyza Öncel, Uz. Dr. Esra Baran, Uz. Dr. Nurcan Duman, Uz. Dr. Nazmiye Ünlü ve Uz. Dr. Burçin Özalp'e; birlikte keyifle çalışmış olduğum Dr. Aslı Özanat, Dr. Büşra Kaya, Dr. Bilgehan Ergan, Dr. Meltem Sarı, Dr. Özge Demirkol ve Dr. Sena Demircan'a; uzmanlarımız Doç. Dr. Rabia Can Sarınoğlu ve Uz. Dr. Büşra Betül Özmen Çapın'a; araştırma görevlisi Deniz Güneşer'e; laboratuvardaki tüm ekip arkadaşlarıma; hayatımın her anında olduğu gibi tez döneminde de hayatımdaki desteklerini hissettiğim arkadaşlarım Büşra İnanlı, Seçil Nail ve Tolga Cuğ'a; varlıklarıyla en büyük destekçim olan abim Barış Küçükusu ve eşi Saniye Deniz Küçükusu'ya; bugünlere gelmemde şüphesiz en çok emeği geçen canım annem Ayşe Küçükusu ve canım babam Halil Küçükusu'ya çok teşekkür ederim.

Dr. Uğur Küçükusu

Haziran, 2022

## İÇİNDEKİLER

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR .....                                                | i    |
| İÇİNDEKİLER .....                                             | ii   |
| KISALTMALAR .....                                             | iv   |
| TABLolar DİZİNİ .....                                         | v    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                         | vi   |
| ÖZET .....                                                    | viii |
| ABSTRACT .....                                                | x    |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                        | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                       | 3    |
| 2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                        | 3    |
| 2.1.1 Tarihçe .....                                           | 3    |
| 2.1.2. Taksonomi .....                                        | 3    |
| 2.1.3. Mikrobiyolojik ve biyokimyasal özellikleri .....       | 4    |
| 2.1.4. Virülans faktörleri .....                              | 6    |
| 2.1.4.1. Kapsül .....                                         | 6    |
| 2.1.4.2. Lipopolisakkarit (LPS) .....                         | 8    |
| 2.1.4.3. Tip 1 ve Tip 3 fimbrialar .....                      | 8    |
| 2.1.4.4. Demir taşıyıcıları .....                             | 8    |
| 2.1.4.5. Diğer mekanizmalar .....                             | 9    |
| 2.1.4.5.1. Dış membran proteini A (OmpA) .....                | 9    |
| 2.1.4.5.2. Pompalar ve taşıyıcılar .....                      | 9    |
| 2.1.4.5.3. Biyofilm .....                                     | 10   |
| 2.1.5. Epidemiyoloji .....                                    | 11   |
| 2.1.5.1. Hastane kaynaklı fırsatçı patojen .....              | 11   |
| 2.1.5.2. Antibiyotiklere dirençli suşlar .....                | 12   |
| 2.1.5.3. Toplumdan kazanılan hipervirülen suşlar (hvKP) ..... | 12   |
| 2.1.6. Tedavi .....                                           | 13   |
| 2.2. Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları .....             | 15   |
| 2.2.1. Meropenem .....                                        | 15   |
| 2.2.1.1. Karbapenem direnci .....                             | 17   |
| 2.2.2. Fosfomisin .....                                       | 20   |
| 2.2.2.1. Fosfomisin direnci .....                             | 23   |
| 2.2.3. Kolistin .....                                         | 25   |
| 2.2.3.1. Kolistin direnci .....                               | 26   |
| 2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....                    | 27   |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM .....                                      | 29   |
| 3.1. Gereçler .....                                           | 29   |
| 3.1.1. Besiyerleri .....                                      | 29   |
| 3.1.2. Standart kökenler .....                                | 29   |

|                                                                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.3. Antibiyotikler ve diğer kimyasallar .....                                                                                                                     | 30        |
| 3.1.4. Araçlar ve aygıtlar .....                                                                                                                                     | 30        |
| <b>3.2. Yöntemler .....</b>                                                                                                                                          | <b>31</b> |
| 3.2.1. Klinik örneklerin seçimi .....                                                                                                                                | 31        |
| 3.2.2. Bakterilerin tanımlanması .....                                                                                                                               | 31        |
| 3.2.3. Antibiyotik duyarlılık testleri .....                                                                                                                         | 32        |
| 3.2.3.1. Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması .....                                                                                                         | 32        |
| 3.2.3.1. Agarda dilüsyon .....                                                                                                                                       | 32        |
| 3.2.3.2. Sıvı mikrodilüsyon .....                                                                                                                                    | 34        |
| 3.2.3.3. Fosfomisin sıvı disk elüsyon .....                                                                                                                          | 36        |
| 3.2.4. Antibiyotik Direnç Genlerinin Araştırılması .....                                                                                                             | 37        |
| 3.2.4.1. DNA izolasyonu .....                                                                                                                                        | 37        |
| 3.2.4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu .....                                                                                                                           | 37        |
| 3.2.4.3. Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu .....                                                                                                                | 38        |
| 3.2.4.4. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin gösterilmesi .....                                                                                                  | 39        |
| 3.2.5. İstatistiksel analiz .....                                                                                                                                    | 40        |
| 3.2.6. Etik kurul onayı .....                                                                                                                                        | 40        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                                                                                                             | <b>41</b> |
| 4.1. İzolatların Fosfomisin, Kolistin ve Karbapenem Duyarlılık Sonuçları ....                                                                                        | 42        |
| 4.2. Antibiyotik Direnç Genleri .....                                                                                                                                | 43        |
| 4.3. İzolatların VITEK® 2 ile Elde Edilen Fosfomisin, Kolistin ve Meropenem Duyarlılık Sonuçlarının Standart Yöntemlerle Karşılaştırılması .....                     | 44        |
| 4.4. İzolatların Sıvı Disk Elüsyon ile Elde Edilen Fosfomisin Duyarlılık Sonuçlarının Standart Yöntemle Karşılaştırılması .....                                      | 46        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                                                                                                                             | <b>48</b> |
| 5.1 İzolatlarda Standart Yöntemlerle Elde Edilen Fosfomisin, Kolistin ve Karbapenem MİK'leri ve Bu Antibiyotiklere Dirençten Sorumlu Olabilecek Direnç Genleri ..... | 49        |
| 5.2. Fosfomisin, Kolistin ve Karbapenem Duyarlılığını Saptamada VITEK® 2 Otomatize Sistemin Performansı .....                                                        | 53        |
| 5.3. Fosfomisin Duyarlılığını Saptamada Sıvı Disk Elüsyon Alternatif Olabilir Mi? .....                                                                              | 55        |
| <b>6. SONUÇ .....</b>                                                                                                                                                | <b>56</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                                                                                                                                            | <b>57</b> |

## KISALTMALAR

|                   |                                                                                   |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| ATCC              | American Type Culture Collection                                                  |
| CLSI              | Clinical And Laboratory Standards Institute                                       |
| ÇİD               | Çoklu ilaç direnci                                                                |
| DHP               | Dehidropeptidaz                                                                   |
| DSÖ               | Dünya Sağlık Örgütü                                                               |
| ECOFF             | Epidemiological cutt-off value                                                    |
| EUCAST            | Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi                                   |
| hvkP              | Hipervirülan <i>K. pneumoniae</i>                                                 |
| IL                | İnterlökin                                                                        |
| Lpp               | Murein lipoprotein                                                                |
| LPS               | Lipopolisakkarit                                                                  |
| MALDITOF-MS       | Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı<br>kütle spektrometresi |
| MHA               | Mueller-Hinton Agar                                                               |
| MHB               | Mueller Hinton Broth                                                              |
| MİK               | Minimum İnhibitör Konsantrasyon                                                   |
| MİK <sub>50</sub> | İzolatların %50'sini inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu              |
| MİK <sub>90</sub> | İzolatların %90'ını inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu               |
| NCTC              | National Collection of Type Cultures                                              |
| OMP               | Dış membran proteini                                                              |
| ONPG              | Orto-nitrofenil-β-D-galaktozidaz                                                  |
| Pal               | Peptidoglikanla ilişkili lipoprotein                                              |
| PBP               | Penisilin bağlayıcı protein                                                       |
| PEP               | Fosfoenolpiruvat                                                                  |
| PRR               | Kalıp tanıma reseptörleri                                                         |
| PZR               | Polimeraz zincir reaksiyonu                                                       |
| TE                | Tris EDTA                                                                         |
| TNF-α             | Tümör nekroz faktörü-α                                                            |
| YBÜ               | Yoğun bakım ünitesi                                                               |

## TABLÖLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> <i>Klebsiella</i> türlerinin biyokimyasal ve metabolik özellikleri.....                                                                                                                                               | 5  |
| <b>Tablo 2.</b> Karbapenem grubu antibiyotikler <sup>52</sup> .....                                                                                                                                                                   | 16 |
| <b>Tablo 3.</b> Fosfomisin direnç mekanizmaları <sup>77</sup> .....                                                                                                                                                                   | 23 |
| <b>Tablo 4.</b> Çalışmamızda PZR yönteminde kullanılan kontrol izolatları .....                                                                                                                                                       | 29 |
| <b>Tablo 5.</b> EUCAST v.12.0 kılavuzuna göre <i>K. pneumoniae</i> için klinik sınır değerler .....                                                                                                                                   | 33 |
| <b>Tablo 6.</b> Çalışmamızda kullanılan primerler .....                                                                                                                                                                               | 38 |
| <b>Tablo 7.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 <i>K. pneumoniae</i> izolatının gönderildikleri kliniklere göre dağılımı .....                                                                                                    | 41 |
| <b>Tablo 8.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 <i>K. pneumoniae</i> izolatında standart yöntemlerle elde edilen fosfomisin, kolistin ve meropenem duyarlılık sonuçları ile MİK <sub>50</sub> ve MİK <sub>90</sub> Değerleri..... | 42 |
| <b>Tablo 9.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 <i>K. pneumoniae</i> izolatında karbapenemaz genlerinin dağılımı .....                                                                                                            | 44 |
| <b>Tablo 10.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 <i>K. pneumoniae</i> izolatında alternatif yöntemlerle edilen fosfomisin, kolistin ve meropenem duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması .....           | 44 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Klebsiella cinsinin sınıflandırılması .....                                                                                                                                 | 4  |
| <b>Şekil 2.</b> Virülans Faktörleri <sup>14</sup> .....                                                                                                                                     | 7  |
| <b>Şekil 3.</b> Biyofilm oluşumu.....                                                                                                                                                       | 11 |
| <b>Şekil 4.</b> Penamların (penisilinler), sefamlerin (sefalosporinler) ve karbapenemlerin çekirdek yapıları ve beta-laktam halkaları .....                                                 | 15 |
| <b>Şekil 5.</b> Karbapenem grubu antibiyotiklerinin en önemli yapısal özellikleri <sup>52</sup> .....                                                                                       | 17 |
| <b>Şekil 6.</b> Ambler sınıflamasına göre beta-laktamaz enzimleri.....                                                                                                                      | 18 |
| <b>Şekil 7.</b> Gram negatif mikroorganizmalarda karbapenem direnç mekanizmaları.....                                                                                                       | 19 |
| <b>Şekil 8.</b> Karbapenemazların tespitinde kullanılan fenotipik ve moleküler testler.....                                                                                                 | 20 |
| <b>Şekil 9.</b> Fosfomisin molekül yapısı <sup>66</sup> .....                                                                                                                               | 21 |
| <b>Şekil 10.</b> Fosfomisin hücre içine alınması ve etki mekanizması .....                                                                                                                  | 22 |
| <b>Şekil 11.</b> FosA proteinleri için filogenetik ağaç ve doğal rezervuarı olarak bilinen türler <sup>82</sup> .....                                                                       | 25 |
| <b>Şekil 12.</b> Kolistinin etki mekanizması <sup>85</sup> .....                                                                                                                            | 26 |
| <b>Şekil 13.</b> Agarda dilüsyonun çalışma basamakları.....                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Şekil 14.</b> Sıvı mikrodilüsyonun çalışma basamakları .....                                                                                                                             | 35 |
| <b>Şekil 15.</b> Sıvı disk elüsyon testinin çalışma basamakları .....                                                                                                                       | 37 |
| <b>Şekil 16.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 K. pneumoniae izolatlarında standart yöntemlerle elde edilen fosfomisin, kolistin ve meropenem antibiyotikleri için MİK dağılımı ..... | 43 |
| <b>Şekil 17.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 K. pneumoniae izolatlarında VITEK® 2 ile elde edilen fosfomisin duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması ..... | 45 |
| <b>Şekil 18.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 K. pneumoniae izolatlarında VITEK® 2 ile elde edilen kolistin duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması .....   | 45 |

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 19.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 K. pneumoniae izolatlarında VITEK® 2 ile elde edilen meropenem duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması .....           | 46 |
| <b>Şekil 20.</b> Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 K. pneumoniae izolatlarında sıvı disk elüsyon ile elde edilen fosfomisin duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması ..... | 47 |



## ÖZET

**Amaç:** Hastanemizde kan kültürlerinden izole edilen ve karbapenem dahil çoklu ilaç direnci gösteren (ÇİD) *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının fosfomisin ve kolistine duyarlılıklarını belirlemeyi; dirençten sorumlu olası mekanizmaları araştırmayı; fosfomisin, kolistin ve meropenem duyarlılıklarının belirlenmesinde otomatize sistemlerin performansını değerlendirmeyi ve ayrıca fosfomisin duyarlılığını belirlemede sıvı disk elüsyon testinin yerini araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** 2019-2021 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen ve VITEK® 2 otomatize sistemi ile karbapeneme dirençli bulunan 61 *K. pneumoniae* izolatının fosfomisine duyarlılıkları, standart agar dilüsyon yöntemiyle; kolistin ve meropeneme duyarlılıkları standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır. Fosfomisin ve karbapenem direncinden sorumlu olası direnç genleri (fosfomisin için; *fosA3*, *fosC2*, karbapenem için; *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* ve *bla<sub>VIM</sub>*) PZR ile kolistin direncinden sorumlu olası direnç genleri (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* ve *mcr-5*) multipleks PZR yöntemleriyle araştırılmıştır. Fosfomisin, kolistin ve meropenem için VITEK® 2 otomatize sisteminin; fosfomisin için ise ayrıca sıvı disk elüsyon metodunun performansları, standart duyarlılık testleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle meropeneme 'dirençli' veya 'duyarlı, yüksek dozda' bulunan ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatının %42,6'sı fosfomisine, %57,4'ü kolistine duyarlı olarak bulunmuştur. İzolatların %19,6'sı hem fosfomisine hem de kolistine duyarlı iken en az birine duyarlı izolat oranı %78,6'dır.  $MİK_{50}$  ve  $MİK_{90}$  değerleri sırasıyla fosfomisin için 64 µg/mL ve 512 µg/mL; kolistin için 2 µg/mL ve 64 µg/mL'dir. Altmış bir izolatın hiçbirinde fosfomisin direncinden sorumlu plazmidik *fosA3* ve *fosC2*; kolistin direncinden sorumlu plazmidik *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* saptanmamıştır.

İzolaların %98,3'ünde karbapenem direncinden sorumlu en az bir gen saptanmıştır. Altmış bir izolatın 46'sında (%75,4) tek başına *bla*<sub>OXA-48</sub>, 2'sinde (%3,3) tek başına *bla*<sub>NDM</sub>, 4'ünde (%6,6) *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>NDM</sub> birlikte ve 8'inde (%13,1) tek başına *bla*<sub>KPC</sub> saptanmış olup *bla*<sub>IMP</sub> ve *bla*<sub>VIM</sub> hiçbir izolatta bulunmamıştır. Fosfomisin için standart agar dilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında VITEK® 2'nin kategorik uyum oranı %70,5; büyük hata oranı %1,6; çok büyük hata oranı %27,9; sıvı disk elüsyon yönteminin ise kategorik uyum oranı %63,9; büyük hata oranı %32,8; çok büyük hata oranı %3,3 olarak bulunmuştur. Kolistin için standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında VITEK® 2'nin kategorik uyum oranı %83,6; büyük hata oranı %4,9; çok büyük hata oranı %11,5'tir. Meropenem için ise standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında VITEK® 2'nin kategorik uyum oranı %95,1; küçük hata oranı %4,9 olarak saptanmış olup büyük hata ve çok büyük hata saptanmamıştır.

**Sonuç:** Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisin (%42,6) ve kolistine (%57,4) duyarlılık oranlarının belirgin olarak düşük olması dikkat çekici ve tehdit edici niteliktedir. Fosfomisin direnciyle ilişkili plazmidik *fosA3*, *fosC2* ve kolistin direnciyle ilişkili *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* genlerinin hiçbir izolatta saptanmamış olması çalışmamızın ilginç bir sonucudur. Karbapenem direncinde *bla*<sub>OXA-48</sub>'in baskınlığı yanında *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>KPC</sub>'nin de azımsanmayacak oranlarda saptanması dikkat çekicidir. VITEK® 2'nin performansı meropenem için iyi düzeyde iken; fosfomisin ve kolistin duyarlılığını belirlemede kullanılması uygun değildir. Sıvı disk elüsyon yönteminin de fosfomisin için performansı uygun bulunmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Klebsiella pneumoniae*, fosfomisin, kolistin, meropenem, agarda dilüsyon, sıvı mikrodilüsyon

## ABSTRACT

**Objective:** In our study, we aimed to determine the fosfomycin and colistin susceptibility of multi drug resistant, including resistance to carbapenem, *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from blood culture in our hospital, to investigate possible mechanisms responsible for resistance, and to determine the performance of the VITEK® 2 system in detecting susceptibility to fosfomycin, colistin and carbapenem. We also evaluated the performance of broth disc elution method for fosfomycin susceptibility.

**Materials and Methods:** The fosfomycin, colistin and meropenem susceptibilities of 61 *K. pneumoniae* which were isolated from blood cultures in 2019-2021 and found resistant to carbapenem by the VITEK® 2 automated system, were studied using the standard agar dilution and broth microdilution methods. Possible resistance genes responsible for fosfomycin (*fosA3*, *fosC2*) and carbapenem (*bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* ve *bla<sub>VIM</sub>*) resistance were investigated by PCR. Multiplex PCR was used for detection of possible colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* ve *mcr-5*). In addition, the performances of the VITEK® 2 automated system was evaluated for fosfomycin, colistin and meropenem and the broth disc elution method for fosfomycin in comparison to standard methods.

**Results:** Of the 61 *K. pneumoniae* isolates found 'resistant' or 'susceptible, increased exposure' to meropenem by standard broth microdilution method, 42,6% were found to be susceptible to fosfomycin and 57.4% to colistin. While 19,6% of the isolates were susceptible to both fosfomycin and colistin, the rate of isolates susceptible to at least one of fosfomycin and colistin was %78,6. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were 64 µg/mL and 512 µg/mL for fosfomycin, 2 µg/mL and 64 µg/mL for colistin, respectively. *fosA3*, *fosC2* genes responsible for fosfomycin resistance and *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* genes responsible for colistin resistance were not detected in any of

the 61 isolates. At least one gene responsible for carbapenem resistance was detected in %98,3 of the isolates. Only *bla*<sub>OXA-48</sub> was found in 46 (75,4%) of 61 isolates, only *bla*<sub>NDM</sub> in 2 (3,3%), both of *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> in 4 (6,6%), and *bla*<sub>KPC</sub> in 8 (13,1%) isolates. *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> were not detected in any isolate. Compared with the standard agar dilution method for fosfomycin, the categorical agreement of VITEK® 2 was 70,5%, the major error rate was %1,6, the very major error rate was 27,9%, and the broth disc elution method had a categorical agreement of 63,9%, major error rate of 32.8%, very major error rate was found to be 3,3%. Compared with the standard broth microdilution method for colistin, the categorical agreement of VITEK® 2 was 83,6%; major error rate 4,9%; very major error rate was 11,5%. For meropenem, when compared to the standard broth microdilution method, the categorical agreement of VITEK® 2 was 95,1%; the minor error rate was 4,9%. No major or very major error was detected for meropenem susceptibility.

**Conclusion:** The low susceptibility rates to fosfomycin and colistin in carbapenem 'resistant' or 'susceptible, increased exposure' *K. pneumoniae* isolates is remarkable and threatening. An interesting result of our study is that *fosA3*, *fosC2* genes associated with fosfomycin resistance and *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* genes associated with colistin resistance were not detected in any isolate. In addition to the predominance of *bla*<sub>OXA-48</sub> in carbapenem resistance, it is noteworthy that *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> were also detected at substantial rates. While VITEK® 2 performed well in testing susceptibility to meropenem, it performed poorly in susceptibility to fosfomycin and colistin. The fosfomycin broth disc elution method also performed poorly.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, fosfomycin, colistin, meropenem, agar dilution, broth microdilution

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Klebsiella pneumoniae*'nin neden olduğu insan enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Bu mikroorganizma, pnömoni, menenjit, osteomyelit, bakteriyemi gibi ciddi hayatı tehdit eden enfeksiyonlara sebep olmaktadır.

*K. pneumoniae*'nin antimikrobiyal direnci günümüzde global bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 2017 yılında yayınladığı “acil olarak yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken antibiyotik dirençli bakteriler” listesinde karbapenem dahil çoklu ilaç direnci (ÇİD) *K. pneumoniae*'yi “kritik öncelikli grup” içinde değerlendirmiştir<sup>1</sup>. Bu enfeksiyonlarda ölüm oranı %50'den fazladır ve neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotik seçenekleri oldukça sınırlıdır<sup>2</sup>. Şu ana kadar en sık kullanılan ve etkin olan antibiyotikler; polimiksinler, tigesiklin, fosfomisin ve bazı aminoglikozidlerdir<sup>3</sup>.

ÇİD gösteren *K. pneumoniae* izolatlarının artışı, hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antimikrobiyal ajanların sayısını sınırlamaktadır. Yeni antimikrobiyal ajanların bulunması ya da geliştirilmesinde yaşanan güçlükler de dikkate alındığında, mevcut antimikrobisallerin kullanım algoritmalarının yeniden düzenlenmesi dolayısıyla tedavi etkinliklerinin artırılması büyük önem taşımaktadır.

Fosfomisin, 1969 yılında İspanya'da *Streptomyces spp.* sıvı kültürlerinden elde edilen fosfoenolpiruvat (PEP) analogu eski bir antimikrobiyal ajandır. Bakterisidal etkili ve geniş spektrumlu olan bu antibiyotik bakteriyel hücre duvarının sentezinin ilk adımındaki enzim katalizli bir reaksiyonu (MurA;UDP-N-acetylglucosamine enolpürivil transferaz) inhibe etmekte ve peptidoglikan biyosentezini bu aşamada bozarak hücrenin lizisine sebep olmaktadır.

Bu eski bir antibiyotik ÇİD mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde alternatif bir ilaç olarak yeniden kullanıma girmeye başlamıştır. Kullanıma girmesiyle birlikte fosfomisine dirençli

bakteriler de dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilmeye başlanmıştır. Yapılan çalışmalar, ilacın hedef bölgesinde ortaya çıkan mutasyonların, hücre içine taşınmasından sorumlu taşıyıcıların ve aktif dışa atım pompaların ekspresyonundaki değişimlerin ya da ilacın enzimatik inaktivasyonunun fosfomisin direncine yol açabildiğini göstermektedir. Fosfomisin, Türkiye’de 2018 yılından itibaren ÇİD bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde alternatif bir ilaç olarak kullanıma girmiştir. Bununla birlikte ülkemizde fosfomisin direncine ilişkin yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada merkezimizde 2019-2021 yılları arasında bakteriyemiye sebep olan ve standart yöntemle meropeneme ‘dirençli’ veya ‘duyarlı, yüksek dozda’ bulunan ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya dahil edildi. Bu izolatlarda tedavide kullanılan fosfomisin, kolistin ve meropenem antibiyotiklerinin duyarlılık durumlarını standart metodlarla belirledikten sonra dirençten sorumlu olası mekanizmaları (fosfomisin için; *fosA3*, *fosC2*; kolistin için; *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, karbapenem için; *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* ve *bla<sub>VIM</sub>*); fosfomisin, kolistin ve meropenem duyarlılıklarının belirlenmesinde otomatize sistemlerin performansını değerlendirmeyi ve ayrıca fosfomisin duyarlılığını belirlemede sıvı disk elüsyon testinin yerini araştırmayı amaçladık. Tedavide kullanılan bu antibiyotiklerin direnç oranlarının bilinmesi karbapenem dahil ÇİD *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının alternatif tedavi protokolu önerilerine katkı sunacağı görüşündeyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 *Klebsiella pneumoniae*

#### 2.1.1 Tarihçe

İlk defa on dokuzuncu yüzyılda Theodor Albrecht Edwin Klebs (1834-1913, Almanya) tarafından izole edilmiştir. Carl Friedländer (1847-1887, Almanya) 'ın basili kliniği kötü giden pnömoni etkeni olarak tariflemesiyle literatüre 'Friedlander basili' olarak geçmiştir<sup>4</sup>.

1886 yılında; Joseph Schröter (1837 –1894, Almanya)'ın isimlendirmesiyle "*Hyalococcus pneumoniae*" olarak bilinen basil, 1887 yılında; Vittore Benedetto Antonio Trevisan de Saint-Léon (1818 - 1897, İtalya) önerisiyle '*Klebsiella pneumoniae*' isimlendirmesini almış ve bu şekilde mikroorganizmayı ilk izole eden bilim adamı onurlandırılmıştır<sup>4,5</sup>.

#### 2.1.2. Taksonomi

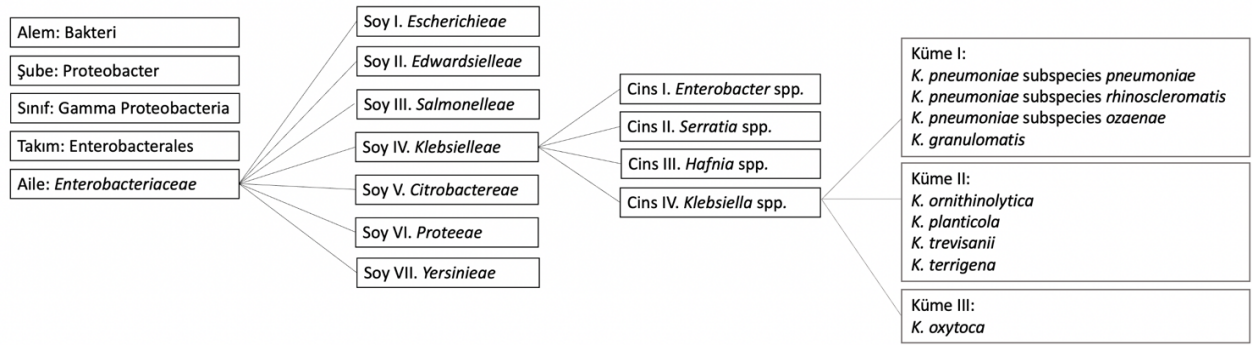
2020 yılında dünyada *Enterobacterales* kullanmak üzere bir taksonomi değişikliği kabul edildi. *Enterobacteriaceae*, *Erwinaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* ve *Budvicaceae* bu takımın içindeki yedi ailedir<sup>6</sup>.

*Enterobacteriaceae* ailesinde 51 cins sınıflandırılmıştır bunlardan yaklaşık 25 türün klinik önemi bulunmaktadır<sup>7</sup>. Bu ailenin soylara bölünmesi sınıflandırma açısından geçerliliğe sahiptir. Taksonomik önemi olmayan soy kavramı anlaşılmayı kolaylaştırmak amacıyla Ewing tarafından önerilmiştir<sup>8</sup>. *Enterobacteriaceae* ailesindeki yedi soydan birisi olan *Klebsiella* soyu beş büyük cinsi kapsamaktadır.

*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp. ve *Klebsiella* spp. cinsleri *Klebsiella* soyunda yer almaktadır. *Klebsiella* spp. cinsi başlangıçta tıbbi

önemi olan ve neden oldukları hastalıklara atfedilen 3 türe ayrılmıştır; *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis*<sup>9</sup>.

16S rRNA ve rpoB (bakteri RNA polimerazı β alt birimi kodlayan) genlerinin sekans analizini yapan Drancourt ve arkadaşları 2001 yılında bu heterojen cinsi 3 kümeye ayırmıştır (Şekil 1). Daha sonraki araştırmalar ile de ikinci kümede yer alan türler yeni bir cins olarak tanımlanarak *Raoultella* cinsine dahil edilmiştir<sup>4</sup>. Günümüzde *Klebsiella* cinsinin 20'den fazla tür ve alt tür içerdiği bilinmektedir<sup>10</sup>.



Şekil 1. *Klebsiella* cinsinin sınıflandırılması

### 2.1.3. Mikrobiyolojik ve biyokimyasal özellikleri

*Klebsiella* spp., Gram negatif boyanma özelliği gösteren kısa (0,3–1µm x 0,6–6µm) ve hareketsiz basillerdir. Fakültatif anaerop ya da aerop olarak ürerler. Bir çoğunda polisakkarit yapıda kapsül (sahip oldukları kapsül ile mukoid koloni morfolojisi gösterirler) bulunmaktadır<sup>11</sup>.

Şekerleri (glikoz, laktoz, sükroz, sorbitol, adonitol, arabinoz) fermente edebilirler ve bunun sonucunda karbon dioksit açığa çıkarırlar. Açığa çıkan bu asidik ürün ile besiyerinin pH değerini düşürerek çeşitli seçici besiyerlerinde farklı renkte koloni morfolojileri oluştururlar.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan bir çok genel üretici besiyerinde (Nutrient agar, Triptik Soy Agar, Bromkrezol Moru Laktoz Agar, %5 Koyun Kanlı Agar) ve seçici besiyerinde (MacConkey agar (Pembe),

Eozin Metilen Mavisi Laktoz Sukroz Agar(Mor), CHROMagar (Mavi), Hektoen-Enterik agar (Turuncu), Ksiloz-Lisin-Deoksikolat Agar (Sarı), Salmonella Shigella Agar (Pembe)) kolaylıkla üreyebilmektedir.

Üreyen kolonilerden yapılan IMViC testi (İndol Testi (I) negatif; Metil Kırmızısı (M) negatif, Voges-Proskauer (Vi) pozitif, C (Sitrat) pozitif), üreyi parçalama özellikleri ve Üç Şekerli Demirli Besiyeri'nde oluşturdıkları asit/asit (sarı/sarı) reaksiyon ile tanımlanabilmektedir<sup>11</sup>.

35-37°C sıcaklık ve pH 7,2 olan ortamlar optimal üreme koşullarıdır. 18-24 saatlik inkübasyonda genellikle büyük ve mukoid koloniler yaparlar. Sahip oldukları kapsül ile kuruluğa dirençli olmalarının yanı sıra nemli ortamlarda 55 °C'de yarım saat içinde ölürler. 25°C'de birkaç hafta, +4°C'de birkaç ay canlılıklarını sürdürebilmektedirler<sup>4</sup>.

Tıbbi önemi olan *Klebsiella* türlerinin ayırımında kullanılabilen biyokimyasal ve metabolik özellikler Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** *Klebsiella* türlerinin biyokimyasal ve metabolik özellikleri

| Biyokimyasal Testler | <i>K.pneumoniae</i><br>subsp.<br><i>pneumoniae</i> | <i>K.pneumoniae</i><br>subsp.<br><i>ozaenae</i> | <i>K.pneumoniae</i><br>subsp.<br><i>rhinoscleromatis</i> | <i>K.oxytoca</i> |
|----------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------|
| İndol                | -                                                  | -                                               | -                                                        | +                |
| Metil Kırmızısı      | -                                                  | +                                               | +                                                        | D(20)            |
| Voges-Proskauer      | +                                                  | -                                               | -                                                        | +                |
| Üreaz                | +                                                  | -                                               | -                                                        | +                |
| Lizin                | +                                                  | D(40)                                           | -                                                        | +                |
| Ornitin              | -                                                  | -                                               | -                                                        | -                |
| ONPG                 | +                                                  | D(80)                                           | -                                                        | +                |
| Malonat              | +                                                  | -                                               | +                                                        | +                |
| 5 °C'de üreme        | -                                                  | -                                               | -                                                        | -                |
| 10 °C'de üreme       | -                                                  | -                                               | -                                                        | +                |
| 41 °C'de üreme       | +                                                  | VY                                              | VY                                                       | +                |

+, %90 veya daha fazla suş pozitif; -, %90 veya daha fazla suş negatif; D, suşların %11-89'u pozitif; VY, veri yok; parentez içindeki sayılar pozitif reaksiyon veren suşların yüzdesidir; ONPG, orto-nitrofenil-β-D-galaktozidaz

#### 2.1.4. Virölans faktörleri

*K. pneumoniae*'nin genomunda bir çok plazmid ve kromozomal gen lokusu bulunmaktadır. Sahip oldukları bu plazmidik genoma göre suşlar; fırsatçı, hipervirölant ve çoklu ilaca dirençli olarak 3 gruba ayrılmaktadırlar<sup>12</sup>.

Konağın mekanik ve kimyasal bariyerlerini geçen *K.pneumoniae* kalıp tanıma reseptörleri (PRR; pattern recognition receptor) tarafından tanınır ve bağışıklık sistemi aktif hale gelir<sup>13</sup>. Anahtar rolü mononükleer fagositer sistem oluşturur ve doğal bağışıklık sistemi aracılığıyla mikroorganizmanın fagositozla öldürülebilmesi için çeşitli sitokinler ve kemokinler salınır. İlk yanıt veren nötrofiller IL-8, IL-23 ve IL-17'nin üretimini indükler ve granülositopoez teşvik edilir<sup>14</sup>. Ayrıca IL-1 $\beta$  ve IL-6 ve tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dahil olmak üzere diğer proinflamatuvar faktörlerin artışıyla inflamatuvar yanıt sürdürülür<sup>15</sup>.

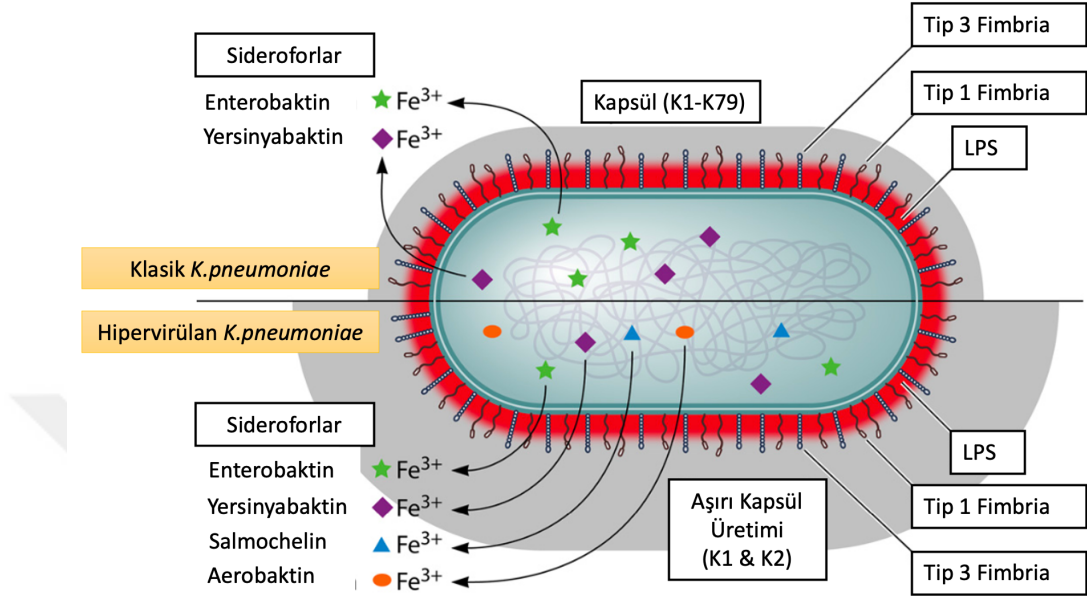
Dört adet virölans faktörü bulunmaktadır. Bunlar: pili olarak da bilinen fimbria, kapsül, lipopolisakkarit (LPS) ve demir taşıyıcılar (Şekil 2)<sup>16</sup>. Yakın zamanda tanımlanan ancak etki mekanizmaları ile klinik önemi tam bilinmeyen diğer virölans faktörleri ise; OMP (Outer membrane protein A; dış membran proteini), porinler, akış pompaları ve allantoin mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalar göz önüne alındığında immün yanıtı karşı kendini korumada saldırgan olmaktan daha çok savunmacı görünmektedirler<sup>14</sup>.

##### 2.1.4.1. Kapsül

Fagositozun inhibisyonunu sağlayarak ve bağışıklık yanıtının aktivasyonunu değiştirerek (IL-6, TNF-  $\alpha$ ; proinflamatuvar sitokin cevabının azalması, IL-10; anti-inflamatuvar sitokinlerin arttırılması) mikroorganizmayı bağışık yanıttan korur<sup>17,18</sup>.

Kapsül K antijenleri olarak adlandırılan suşa özgü polisakkaritlerden oluşur (K1-K79)<sup>19</sup>. K antijenleri geleneksel olarak serolojik yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir; ancak günümüzde, K antijen tiplmesi sıklıkla *wzi*

lokusunun sekanslanmasıyla gerçekleştirilir. Bu lokus, *K. pneumoniae*'nin tüm kapsüller tiplerinde mevcuttur<sup>20,21</sup>.



Şekil 2. Virülans Faktörleri<sup>14</sup>

Üretilen K antijenleri ile enfeksiyonun şiddeti arasında bir ilişki bulunmaktadır. Şimdiye kadar tanımlanan 79 serotipten, klinik örneklerden izole edilen suşların %70'inden fazlasını sadece 25 serotip oluşturmaktadır<sup>22</sup>. K2 suşları klinik olarak izole edilen en sık türdür. Diğer suşlara göre artan virülansa sahip olanlar; K1 ve K2 suşlarıdır. Bunun birkaç olası nedeni vardır; daha az miktarda reaktif oksijen türü salmaları ve yüzeylerinde sialik asit, konak hücreler tarafından da üretilir, bulundurarak konakçı bağışıklığından kaçmalarıdır<sup>23,24</sup>.

Mikroorganizma hipervirülan *K. pneumoniae* suşlarındaki gibi aşırı kapsül üretiminin artırılması ile patojenesini artırabilir<sup>25</sup>. Buna neden olan mekanizmalar çeşitlidir. *RmpA*; hipervirülan *K. pneumoniae* suşlarında kapsül üretimini düzenleyen plazmidik bir virülans faktörüdür<sup>26</sup>. Ayrıca çevresel faktörler de kapsül üretimini etkileyebilmektedir; artan glikoz konsantrasyonları, *rmpA* aracılığıyla kapsül üretiminin yukarı regülasyonuna sebep olurken yüksek hücre dışı demir konsantrasyonları ise aşağı regülasyona sebep olmaktadır<sup>14</sup>.

#### 2.1.4.2. Lipopolisakkarit (LPS)

Gram-negatif bakterilerin hücre dışı membranında bulunan LPS; O antijeni, çekirdek oligosakkarit ve lipid A'dan meydana gelir. Bu bileşenler sırasıyla *wb*, *waa* ve *lpx* gen kümelerindeki genler tarafından kodlanmaktadır<sup>27,28</sup>. LPS, humoral bağışıklığa karşı koruma sağlamasının yanı sıra güçlü bir bağışıklık aktivasyonu da sağlar.

Lipit A, TLR4'ün güçlü bir ligandıdır ve bu şekilde hücresel yanıt etkinleştirilmektedir.

9 farklı O-antijen tipi tanımlanmıştır ve O1 en yaygın olanıdır<sup>29</sup>. C1q'nun bakteriye bağlanmasını engelleyerek kompleman aktivasyonunu engellerken, C3b'nin bakteri dışı membranından uzağa bağlanmasını sağlayarak membran atak kompleksi tarafından lizisin gerçekleşmesini engeller.

#### 2.1.4.3. Tip 1 ve Tip 3 fimbrialar

Adezyonu sağlayan yapışkan yapılardır ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırırlar. Tip 1 fimbrialar; ipliksi, ince çıkıntılara sahipken tip 3 fimbrialar sarmal benzeri filament yapıdadırlar.

#### 2.1.4.4. Demir taşıyıcıları

Enfeksiyon sırasında mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu kaynaklardan birisi demirdir. İnsan vücudunda demir, transferrin gibi demir taşıyıcılarda bulunduğu için dolayı serbest demir miktarı oldukça azdır. Bu nedenle de mikroorganizmanın insan vücudunda hayatta kalabilmesi ve enfeksiyon oluşturabilmesi için konakçıdan demiri alabilecek mekanizmalara ihtiyacı vardır.

En önemli mekanizma demire yüksek bir afinitesi olan sideroforlar ile konakçıdan demiri çalmaktır<sup>30</sup>. Birden fazla sideroforun üretilmesi kolonizasyonu kolaylaştırmakta ve mikroorganizmanın konak savunmasından kaçmasını kolaylaştırmaktadır.

*K. pneumoniae*'da bulunabilen çeşitli sideroforlar şunlardır; enterobaktin (birincil mekanizma, en yüksek afiniteli), yersinyabaktin, salmochelin ve aerobaktin (en düşük afiniteli)<sup>14</sup>.

#### 2.1.4.5. Diğer mekanizmalar

##### 2.1.4.5.1. Dış membran proteini A (OmpA)

Dış membran proteini A (Outer membrane protein A; OmpA), peptidoglikanla ilişkili lipoprotein (peptidoglycan-associated lipoprotein; Pal) ve murein lipoprotein (murein lipoprotein; LppA) gibi birçok OMP'nin virülansta önemli olduğu bilinmektedir.

OmpA; doğal bağışıklık yanıtı karşı mikroorganizmayı korumaktadır. Pal ve LppA ise fagositoza karşı koruma sağlamaktadır. Ayrıca hücre membranının bütünlüğüne ve seçici geçirgenliğine katkı sağlayarak mikroorganizmayı çeşitli ajanlara karşı daha dirençli hale getirmektedir<sup>31</sup>.

OmpK35 ve OmpK36; *K.pneumoniae*'daki başlıca dış zar porlarıdır (Outer membrane porins; Omp). Bu porlar; demir, besinler ve çeşitli antibiyotikler gibi küçük hidrofilik moleküllerin taşınmasına izin veren protein kanallarıdır. Bu nedenle bu porların eksikliği antibiyotik direncine sebep olurken mikroorganizmanın virülansını azaltmaktadır<sup>32</sup>.

##### 2.1.4.5.2. Pompalar ve taşıyıcılar

AcrAB zararlı konak moleküllerinin veya antibiyotiklerin bakteriyel hücreden dışarı aktarılması aracılık eden dışa atım pompalarıdır.

Kfu, *K. pneumoniae*'daki demir taşınmasında rol oynayan ATP-bağlayan kaset transport (ATP-binding cassette transporters; ABC transporters) sistemidir. Eksprese edilmesi ile hipervirülen *K. pneumoniae* suşları arasında ilişki bulunmaktadır<sup>33</sup>.

#### 2.1.4.5.3. Biyofilm

Mikroorganizmanın meydana getirdiği jelsi ekzopolisakkarit matrikstten oluşan ağ yapısıdır. Mikroorganizma biyofilm yapısıyla çeşitli cihazlara ve hücrelere yapışarak küçük kolonilerin oluşumunu ve olgunlaşmasını sağlar. Buradan ayrılan serbest mikroorganizmalar ile yayılması kolaylaşır. Sindirim sisteminde, genitoüriner sistemde veya solunum sisteminde kolonizasyonu ve invazyonu kolaylaştıran biyofilm; katater gibi lümenli cihazlara da yapışmayı kolaylaştırarak enfeksiyonun kontrolünü zorlaştırmaktadır.

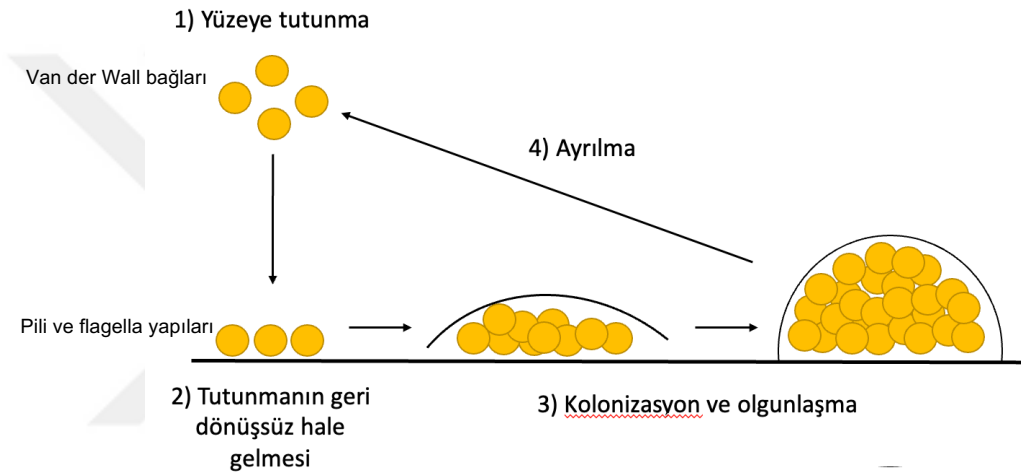
Oluşabilmesi birkaç basamaklı bir süreçtir (Şekil 3). **i)** Yüzeye tutunma; planktonik bakteri hücresinin Van der Waal bağları ile yüzeyle etkileşime girmesi. **ii)** Tutunmanın geri dönüşsüz hale gelmesi; bakterinin pili ve flagella yapıları ile bağlanması. **iii)** Kolonizasyon ve olgunlaşma; bakteri çoğalır ve küçük koloniler oluşturur. **iv)** Ayrılma; çevresel koşullar veya flagella aracılığıyla ayrılan bakterinin diğer odakları oluşturması.

Temelde iki yapıdan oluşmaktadır; bakteri ve bakterileri bir arada tutan polimerik yapıdaki hücre dışı madde. %96-98 kadarı su olan ve heterojen bir yapısı olan biyofilmin diğer içerikleri şunlardır; matriks, glikoproteinler, fosfolipitler, nükleik asitler, kalsiyum ve magnezyum<sup>13,34</sup>.

Genellikle, herhangi bir semptomatik hastalığa neden olmadan insanlarda kolonize olabilmektedir. Kolonizasyon; oranlarının bireyler arasında habitatlarına ve maruziyetlerine bağlı olarak büyük ölçüde değiştiği üst solunum yolu, idrar yolu, bağırsak dahil olmak üzere çeşitli mukozal yüzeylerde gerçekleşmektedir. Konak bağışıklığının düştüğü durumlarda

(diyabet, glukokortikoid kullanımı, organ nakli gibi) kolonizasyon bir enfeksiyona dönüşebilmektedir.

Hastanede yatan hastalarda bu kolonizasyon oranı daha çok artarak nazofarenkste %19'a yükselirken, gastrointestinal sistemde %77'ye kadar çıkabilmektedir. İnsanlarda yaygın olarak bulunması nedeniyle, gastrointestinal kolonizasyon, diğer bölgelere bulaşma ve enfeksiyon için önemli bir rezervuar görevi görmektedir. Yakın tarihli birçok çalışmalar, kolonize *K. pneumoniae* suşları ile enfeksiyon bölgelerinden elde edilen suşlar arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır<sup>35,36</sup>.



**Şekil 3.** Biyofilm oluşumu

### 2.1.5. Epidemioloji

*K. pneumoniae* sıklıkla su, kanalizasyon, toprak ve bitki yüzeylerinde bulunmaktadır<sup>37</sup>. Klasik olarak hastane kaynaklı ve bağışıklığı baskılanmış kişileri enfekte eden bir fırsatçı patojen olarak kabul edilse de günümüzde antibiyotiklere dirençli suşlar ve hipervirülan suşlar da bulunmaktadır.

#### 2.1.5.1. Hastane kaynaklı fırsatçı patojen

Pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları ve bakteriyemi gibi ciddi enfeksiyonlara sebep olmasının yanında hastane kaynaklı (hastaneye yatıştan 48 saat sonra meydana gelen) pnömoni, yoğun bakım ünitelerinde ventilatör ilişkili pnömoni için önde gelen fırsatçı patojen olarak karşımıza çıkmaktadır.

#### 2.1.5.2. Antibiyotiklere dirençli suşlar

ABD'de her yıl 2,8 milyondan fazla antibiyotiğe dirençli enfeksiyon meydana gelmekte ve bunun sonucunda 35.000'den fazla insan ölmektedir. Bu sayılara antibiyotik kullanımıyla ilişkili enfeksiyonlar da eklendiğinde bu sayı 3 milyon enfeksiyon ve 48.000 ölümü aşmaktadır. Sağlıkta ve tarımda uygunsuz antibiyotik kullanımı ve yeni antimikrobiyal terapötiklerin eksikliği de antibiyotik direncinin yayılmasına katkı sağlamaktadır<sup>38</sup>.

*K.pneumoniae*, son yıllarda antibiyotik direncinde çarpıcı bir artış yaşayan birkaç bakteriden biridir. Antibiyotiğe dirençli mikroorganizma ile kolonizasyon, hastanede yatan hastalarda antibiyotiğe dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir; ancak kolonizasyondan enfeksiyona ilerleme tam olarak anlaşılmamıştır.

Antibiyotiğe dirençli *K. pneumoniae* ile kolonizasyon ve enfeksiyon için risk faktörleri sıklıkla birlikte düşünülmektedir. Bu risk faktörleri daha önce antibiyotik tedavisi, uzun süreli hastane yatışı, uzun süreli yoğun bakım ünitesinde kalış ve mekanik ventilasyon, böbrek fonksiyon bozukluğu, ileri yaş, cerrahi prosedürler olarak belirlenmiştir. Bunlardan uzun süreli hastaneye yatış ana faktör gibi görünmektedir<sup>39,40</sup>.

#### 2.1.5.3. Toplumdan kazanılan hipervirülan suşlar (hvKP)

Toplum kaynaklı olan hipervirülan suşlar (hvKP) ile ortaya çıkan enfeksiyonlar için risk faktörleri 50-60 yaş, erkek hasta ve diyabetes

mellitustur. Dünya çapında yaygın olan bu suşlar genellikle Asya kökenlidir. Bu suşlar çoğu antibiyotiğe oldukça duyarlı bulunmasına rağmen 2017 yılında, Çin'de meydana gelen karbapenem dirençli ST11 hvKP izolatına bağlı bir salgının meydana geldiğinin gösterilmesi ile durumun ciddiyeti ortaya konmuştur<sup>41</sup>.

Bu hvKP izolatlarının en çarpıcı yönü, sağlıklı hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilmesidir. Bu durumun aksesuar genom tarafından kodlanan virülans faktörlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

'İp testi' ile karakterize edilen bir hipermukoviskoz fenotipe sahiptir. Bu teste göre katı besiyerinde üreyen kolonilerden öze ile alındığında 5 mm ya da daha uzun (ip şeklinde) uzama pozitif sonuç olarak yorumlanır. Bu fenotipin iki protein tarafından verildiği belirlenmiştir: kapsül üretimini düzenleyen *rmpA* ve *magA*. Kapsül tipleri K1 ve K2, hvKP ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur<sup>14</sup>.

#### 2.1.6. Tedavi

ÇİD *K.pneumoniae*, klonal yayılma potansiyeliyle hastane salgınlarına yol açabilmektedir. Bulaşma yönteminin bilinmesi, enfeksiyon kontrol önlemlerinin rolünü anlamak için gereklidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) çapraz bulaşın, hasta cildinde ya da çevrede bulunan mikroorganizmanın sağlık çalışanının elleriyle hastalar arasında taşınması, en önemli mekanizma olduğunu belirten bir rapor yayınlamıştır<sup>42</sup>. Kolonize ya da enfekte hastalardan duyarlı olanlara çapraz bulaşı sınırlamak için enfeksiyon kontrol önlemlerine dikkat edilmesi gerekmektedir. El hijyeni, çevre temizliği, kişisel koruyucu ekipman, tek kişilik izolasyon odası, mümkün değilse hasta kohortu dikkate alınmalı ve kritik olmayan tıbbi malzemelerin kolonize veya enfekte olabileceği unutulmamalıdır<sup>43</sup>.

ÇİD *K.pneumoniae*'ya bağlı enfeksiyonlarda mortalite ve morbidite oranı %50'den yüksektir<sup>44,45</sup>. Ne yazık ki, ÇİD *K.pneumoniae* enfeksiyonları için optimal tedavi seçeneği hala tam olarak oluşturulamamıştır. Son yıllarda öne

çıkan tedavi protokollerini kolistin, fosfomisin, tigesiklin ve aminoglikozitler ile bunların kombine tedavileri oluşturmaktadır<sup>43</sup>.

İsrail, Yunanistan ve İtalya'daki altı hastanede yürütülen randomize, kontrollü, üstünlük çalışmasında kolistin ve meropenem ile kombinasyon tedavisinin tek başına kolistin tedavisine üstünlüğünü araştırılmıştır. Karbapenem dirençli patojenlere bağlı enfeksiyonlar için monoterapiye kıyasla kombinasyon tedavisi ile tedavi edilen hastalarda bir farklılık gösterilememiştir. Bu denemeler ÇİD organizmalarının, özellikle karbapenem dirençli patojenlerin kanıta dayalı antibiyotik tedavisinin ilk adımıdır<sup>46</sup>.

Bu çalışmanın aksine kombinasyon tedavisinin üstünlüğünü bir çok retrospektif çalışma doğrulamıştır. Tzouveleakis ve arkadaşları farklı protokoller kullanılarak karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* tedavisini analiz eden 20 çalışmayı (gözlemsel çalışmalar ve vaka serileri dahil) içeren retrospektif bir çalışma yürütmüştür. En düşük mortalite (%18.8), karbapenem dahil bir kombinasyon rejimi ile tedavi edilen hasta grubunda rapor edilmiştir<sup>47</sup>. Bu çalışmalar, bu enfeksiyonların tedavisinde meropenem bazlı bir rejimin üstünlüğünü doğrulamıştır<sup>48,49</sup>. Meropenem MİK değerlerinin kombinasyon rejimlere meropenem dahil edilip edilmemesi için önemli olmaya devam etmektedir. Farklı antibiyotiklerin birlikte uygulanması *Clostridium difficile* enfeksiyonu, nefrotoksisite gibi önemli yan etkilere de yol açabilmektedir<sup>50</sup>.

Çoklu ilaca dirençli *Enterobacterales*'e bağlı enfeksiyonlar hakkında en büyük veri tabanını oluşturan dünya çapında 33 merkezi kapsayan INCREMENT çalışması, kombinasyon tedavisinin yalnızca kritik hastalarda daha etkili olduğunu doğruladı; stabil veya kritik olmayan hastalarda antibiyotiklerin kombinasyonu önerilmemektedir<sup>51</sup>.

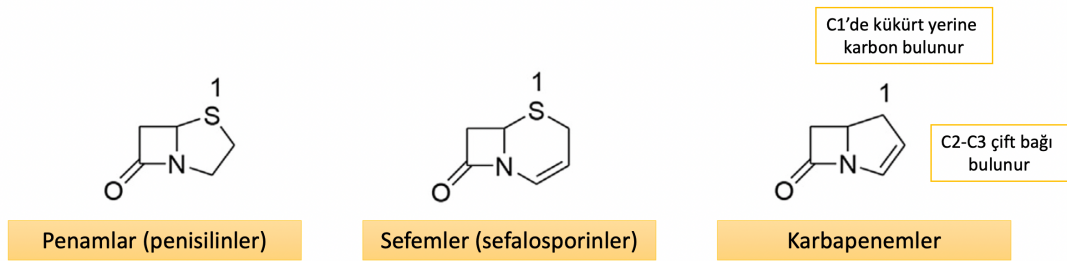
Çoklu ilaca dirençli *K.pneumoniae*'yi hedef alan yeni ilaçlara duyulan ihtiyaç 'acil' olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda bu amaçla geliştirilen yeni antibiyotikler şunlardır; sefiderokol, seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam, imipenem-relebaktam, plazomisin, aztreonam-avibaktam, eravasiklin, sefrarolin-avibaktam, sefepim-zidebaktam<sup>43</sup>. Çoklu ilaca dirençli *K.pneumoniae* tedavisi için optimal tedavi henüz belirlenememiştir. Kolistin,

aminoglikozitler ve fosfomisin gibi antibiyotikler, sıklıkla yüksek doz karbapenemlerle kombinasyon rejimlerinde kullanılmaktadır.

## 2.2. Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

### 2.2.1. Meropenem

Beta-laktam grubu antibiyotikler, moleküler yapıda beta-laktam halkası bulunduran; etkili ve iyi tolere edilebilir olması nedeniyle de mikroorganizmalar ile mücadelede en çok tercih edilen antibiyotik grubudur (Şekil 4)<sup>52</sup>.



**Şekil 4.** Penamıların (penisilinler), sefemlerin (sefalosporinler) ve karbapenemlerin çekirdek yapıları ve beta-laktam halkaları

Beta-laktam grubu antibiyotikler, transpeptidasyondan sorumlu olan penisilin bağlayıcı protein (PBP)'lere kovalent olarak bağlanıp etkileyerek hücre duvarındaki peptidoglikan sentezini engellerler. Bu şekilde hücreyi lizise uğratarak bakterisidal etki gösterirler. PBP'ler bakterinin türüne özgü olarak değişebilen sayılardadırlar<sup>53</sup>.

Bu grup içinde yer alan antibiyotikler 5 ana sınıfa ayrılmaktadır; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları<sup>4</sup>. Beta-laktam antibiyotiklerden etki spektrumu en geniş (Gram pozitif, Gram-negatif, aerop, anaerop etkinlik) ve potensi en yüksek olan karbapenem grubudur (Tablo 2)<sup>52</sup>. Bakteri hücrelerine dış zar proteini ile giren karbapenemler PBP

enzimini açilleyerek işlevlerini bozlarlar. Çoklu bağlanabilmeleri nedeniyle de etkinlikleri daha yüksektir<sup>54</sup>.

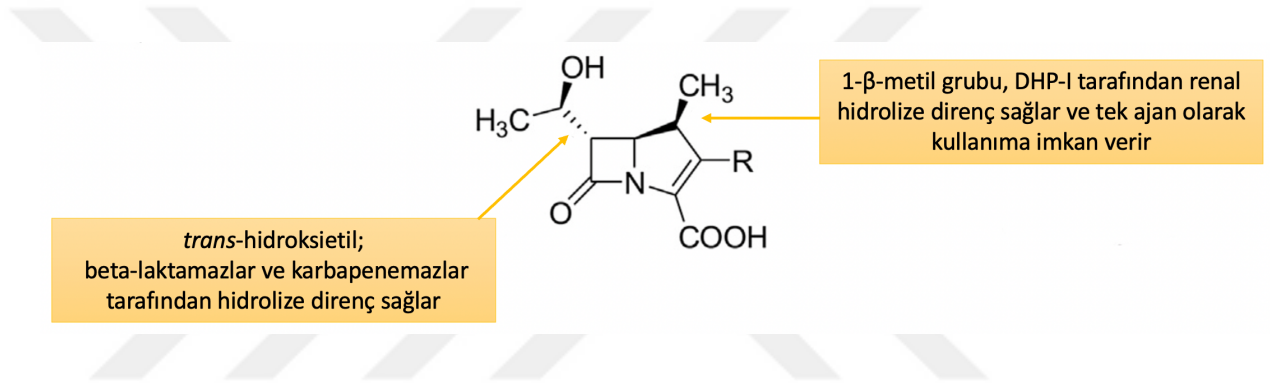
**Tablo 2.** Karbapenem grubu antibiyotikler<sup>52</sup>

| <i>Eski Ajanlar</i> | <i>Onay Tarihi</i>                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| İmipenem            | 1987                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Meropenem           | 1996                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Ertapenem           | 2001                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Doripenem           | 2007                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>Yeni Ajanlar</i> | <i>Etkinlik Durumu</i>                                                                                                                                                                                                                                                |
| Biapenem            | Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteri türlerine karşı etkili. Orta-şiddetli idrar yolu enfeksiyonu, alt solunum yolu enfeksiyonu (ventilatör ilişkili pnömonide etkin), bakteriyel kolanjit, kolesistitte etkin.                                               |
| Panipenem           | Gram pozitif ve Gram negatif; aerobik ve anaerobik bakterilere karşı etkin. DHP-I tarafından hidrolize karşı betamipron ile 1:1 oranında uygulanmalı.                                                                                                                 |
| Razupenem           | Polimikrobiyal anaerobik enfeksiyonların tedavisinde etkin. Ne yazık ki, Amerika'da razupenem geliştirmesi, faz II klinik çalışmalarda yüksek oranda yan etki nedeniyle durdurulmuştur.                                                                               |
| Tebipenem           | İlk oral karbapenem antibiyotik. Genellikle kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirmiş bakterilerle savaşmak için alternatif bir ilaç olarak yaratılmıştır. Ön ilacın klinik çalışmaları Japonya'da değerlendirilmektedir.                                         |
| Tomopenem           | Gram pozitif ve Gram negatif; aerobik ve anaerobik bakterilere karşı oldukça etkin. MRSA ve <i>P. aeruginosa</i> 'ya karşı etkinliği öne çıkan özelliğidir.                                                                                                           |
| Sanfetrinem         | İlk karbapenem trinemdir (trisiklik $\beta$ -laktam bileşiği). <i>S.aureus</i> , <i>S.pneumoniae</i> , <i>B.fragilis</i> , <i>P.vulgaris</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp.'a karşı etkin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. |

*Streptomyces cattleya*'nın oluşturduğu tienamisin, 1970'lerde keşfedilen ilk karbapenem grubu antibiyotiktir<sup>55</sup>. Kimyasal olarak kararsız bir molekül olması nedeniyle terapötik olarak kullanılmamıştır. *N*-formimidoil grubunun eklenmesiyle stabilize edilerek imipenem antibiyotiği oluşturulmuştur<sup>56</sup>. 1996 yılından sonra ise karbapenem grubunun ikinci üyesi olan meropenem kullanıma girmiştir. Geliştirilen diğer karbapenem grubu antibiyotiklerin güçlü geniş spektrumlu yapısı korunmuş olup moleküler

olarak daha stabil yapıdadırlar<sup>57,58</sup>. İmipenemin, ilacın inaktivasyonuna neden olan memelilerdeki proksimal renal tübüllerde bulunan renal dehidropeptidaz (DHP) tarafından hidrolize olma özelliğinden dolayı bir DHP inhibitörü olan silastatin ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Daha sonraki karbapenemler, insan DHP'sine stabilite kazandıran bir 1- $\beta$  -metil grubu içermektedir, böylece silastatin gibi bir inhibitörün birlikte uygulanması gerekliliğini ortadan kaldırılmıştır (Şekil 5)<sup>59</sup>.

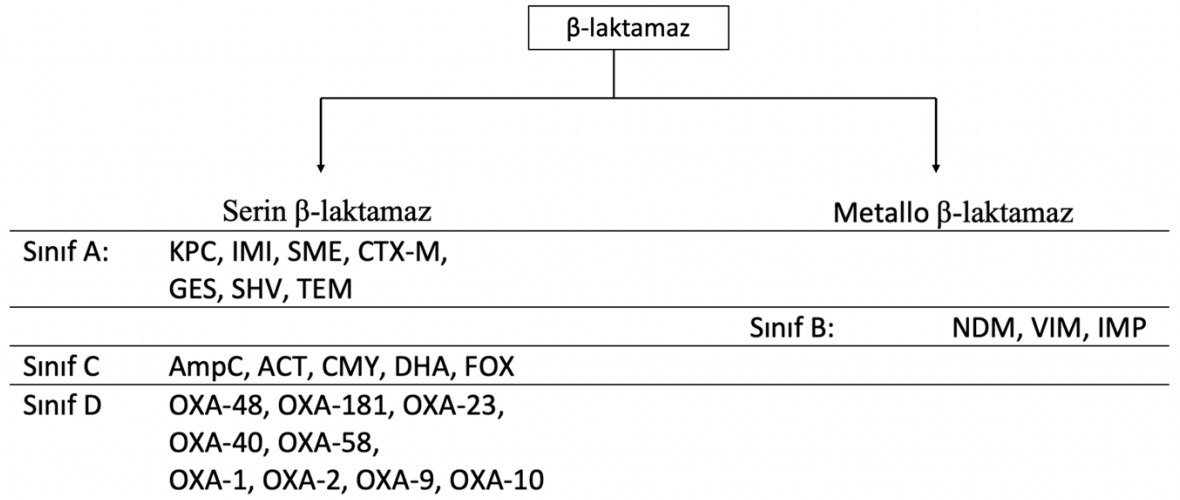
Meropenem parenteral kullanılan yarı sentetik bir karbapenemdir. PBP1a, PBP1b, PBP3 için güçlü afinitesi olsa da en güçlü şekilde PBP2'ye bağlanmaktadır<sup>59</sup>.



**Şekil 5.** Karbapenem grubu antibiyotiklerinin en önemli yapısal özellikleri<sup>52</sup>

#### 2.2.1.1. Karbapenem direnci

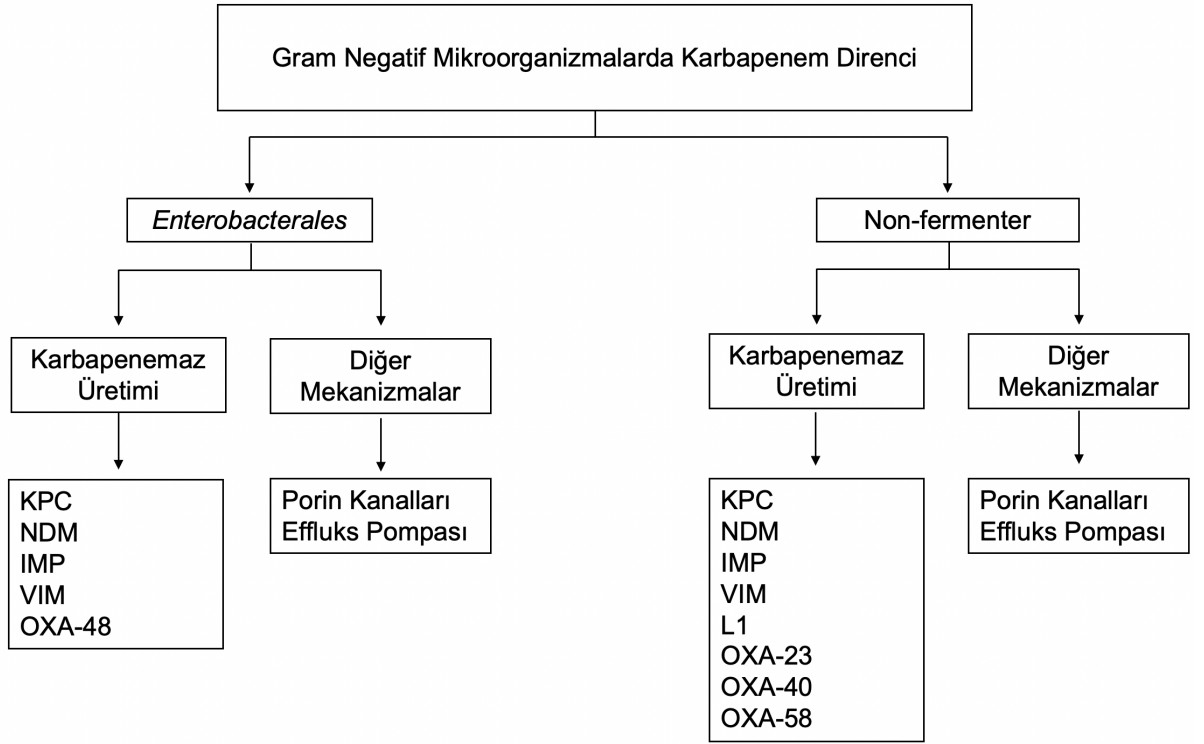
Karbapenem direncine sebep olan en önemli mekanizma karbapenemaz enzimleri ile karbapenemlerin hidroliz edilmesidir. Ambler sınıflamasına göre beta-laktamaz enzimleri 4 sınıfa ayrılır; A, B, C ve D. Bu sınıflama katalitik bölgedeki aminoaside (A, C ve D sınıfında serin; B sınıfında çinko bulunur) ve nükleotid sekans analizi temeline dayalıdır (Şekil 6). A, B ve D sınıfları karbapenemazları içerirken C sınıfındaki enzimler sefalosporinleri hidrolize eder<sup>60</sup>.



KPC, *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz; IMI, imipenem-hidrolize eden β-laktamaz; SME, *Serratia marcescens* enzim, CTX-M, Sefotaksim hidrolize eden β-laktamaz–Munich; GES, Guiana genişlemiş spektrumlu β-laktamaz; SHV, TEM enziminin sülfidril varyantı; TEM, Temoneira sınıf A genişlemiş spektrumlu β-laktamaz; AmpC, ampisilin kromozomal sefalosporinaz; ACT, AmpC tip β-laktamaz; CMY, sefamisin hidrolize eden β-laktamaz; FOX, plazmid aracılı sınıf C β-laktamaz, OXA, oksasilinaz/oksasilin karbapenemaz; NDM, New Delhi metallo-β-laktamaz; VIM, Verona integron kodlu metallo-β-laktamaz, IMP, imipenemaz metallo-β-laktamaz

**Şekil 6.** Ambler sınıflamasına göre beta-laktamaz enzimleri

AmpC'nin aşırı üretimi veya geniş spektrumlu β-laktamaz üretimi ile porin kodlayan genlerin ekspresyonunun kaybı, kromozomal olarak kodlanmış porin genlerindeki (*oprD*) mutasyonlar ve dışa atım pomplarını kodlayan genlerin (*mexAB-oprM*, *mexXY-oprM* veya *mexCD-oprJ* gibi) aşırı ekspresyonunun birlikteliği de karbapenem direncine sebep olabilmektedir<sup>61,62</sup>. Ayrıca karbapenem direnci, PBP'lerin üretim seviyesini veya bağlanma afinitesini değiştiren mutasyonlara veya diğer modifikasyonlara bağlı da görülebilmektedir<sup>63</sup> (Şekil 7).



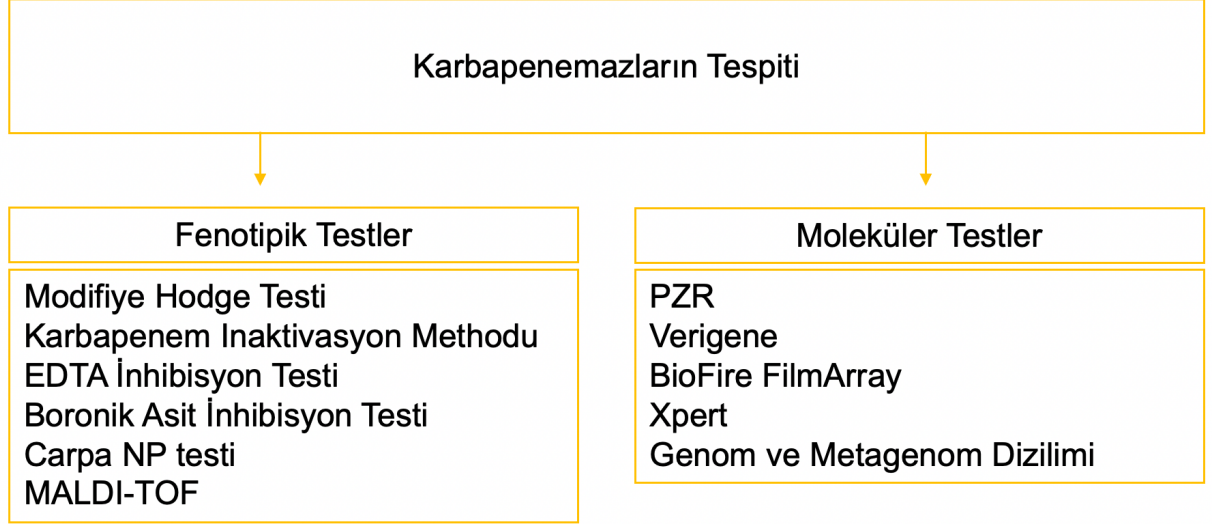
Şekil 7. Gram negatif mikroorganizmalarda karbapenem direnç mekanizmaları

Karbapenem dirençli *Enterobacterales* genel olarak tedavi ile ilgili zorluklara sebep olmaktadır. Karbapenemaz genleri çoğunlukla plazmidler üzerinde tanışmakta ve türler arası transfer edilebilmektedir. Bu nedenle altta yatan mekanizmaların bilinmesi enfeksiyon önlemlerinin alınabilmesini kolaylaştırmaktadır<sup>64</sup>.

Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), *Enterobacterales* izolatları için her yıl karbapenem grubu antibiyotiklerin (ertapenem, imipenem, meropenem ve doripenem) duyarlılık sınır değerlerini güncellemektedir. Ancak suşların karbapeneme karşı duyarlı olmadığı saptandığında altta yatan direnç mekanizması bilinmemektedir. Bu nedenle ek biyokimyasal ve/veya genetik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Direnç mekanizmasının bilinmesi tedavi rejimine yön vereceği için değerlidir.

Karbapenemaz varlığını belirlemek için çeşitli fenotipik ve moleküler testler mevcuttur (Şekil 8)<sup>64</sup>. Bu konuda atlanmaması gereken en önemli nokta; enzimatik olmayan mekanizmalar ile karbapenemlere dirençli

olabileceğidir. Ya da karbapenemaz direnç geninin varlığı karbapenem dirençli olduğu anlamına gelmemektedir (ekspresyon seviyesi sebebiyle)<sup>65</sup>.

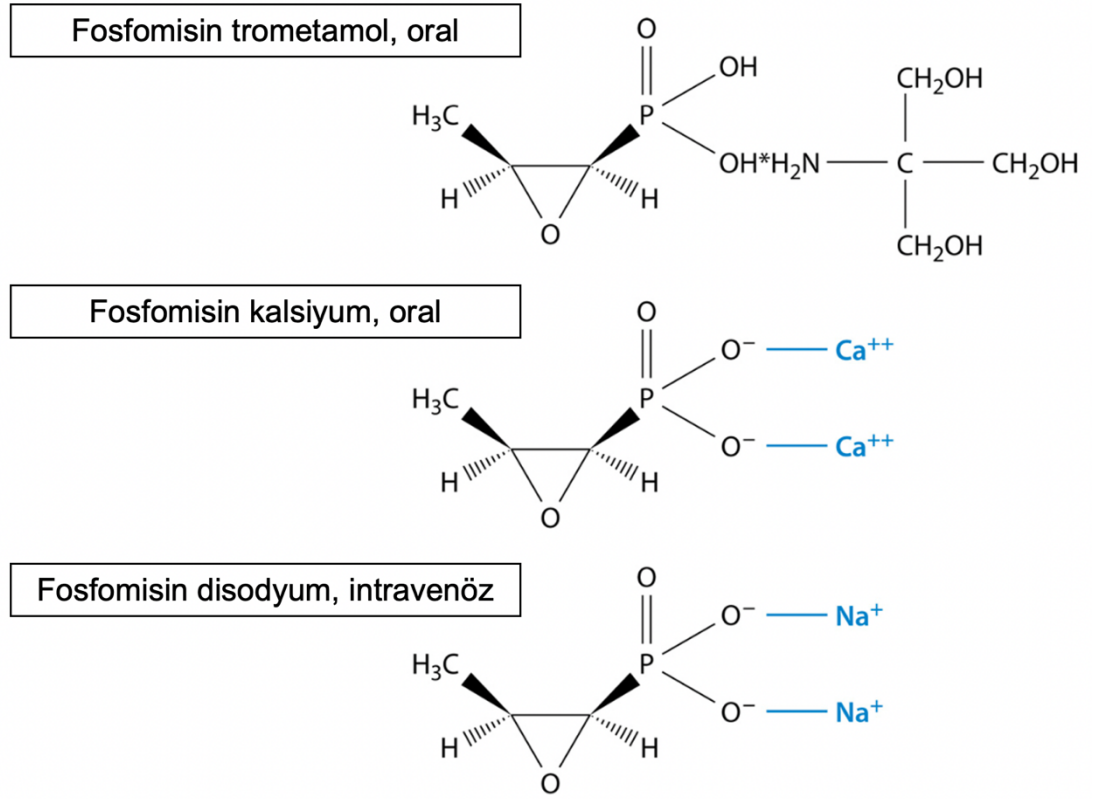


**Şekil 8.** Karbapenemazların tespitinde kullanılan fenotipik ve moleküler testler

### 2.2.2. Fosfomisin

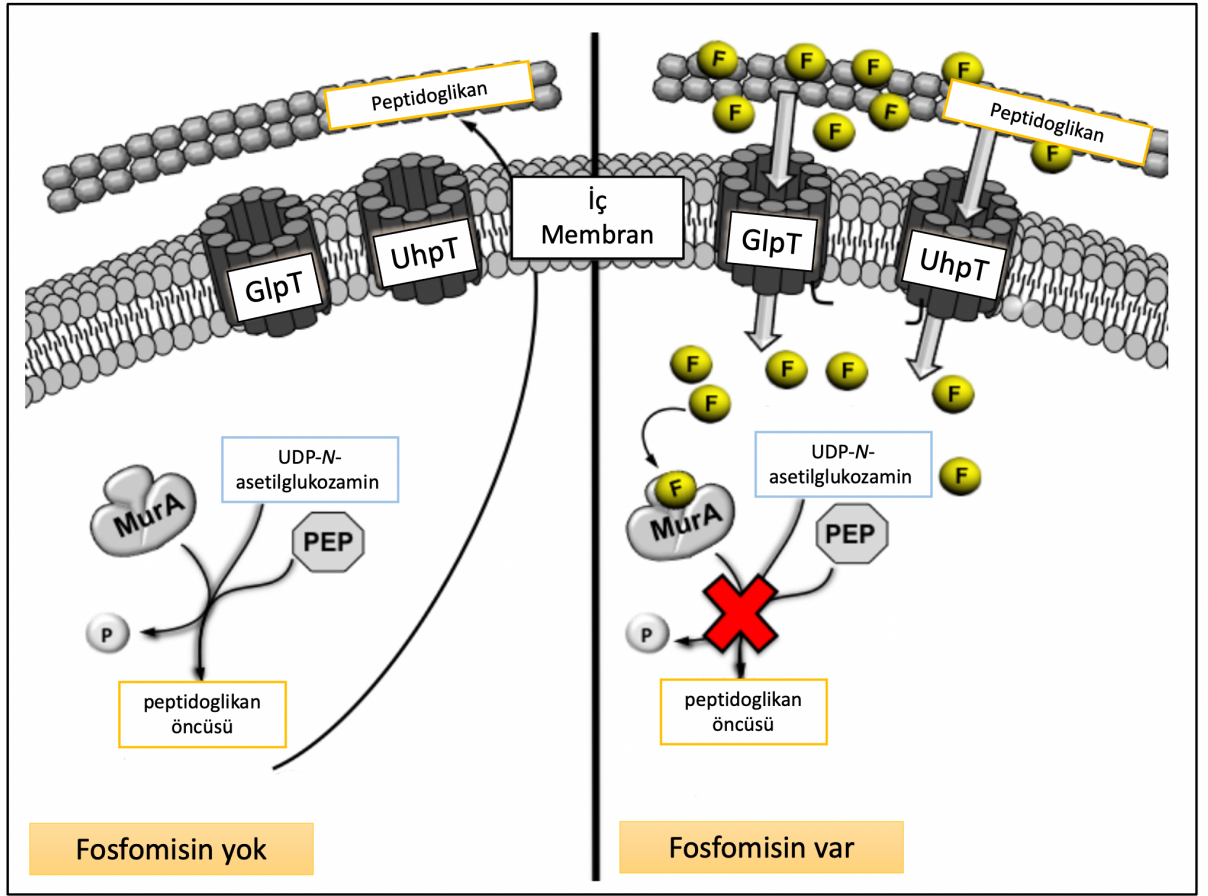
Fosfomisin, PEP analogu olarak 1969 yılında keşfedildi. *Streptomyces* spp. (*Streptomyces fradiae* (ATCC 21096), *S. viridochromogenes* (ATCC 21240) ve *S. wedmorensis* (ATCC 21239)) izolatlarından sentetik olarak üretilmektedir<sup>66</sup>.

Düşük moleküler ağırlıklı moleküler yapısı olan antibiyotiğin iki oral (fosfomisin trometamol, fosfomisin kalsiyum) ve bir intravenöz formülasyonu (fosfomisin disodyum) bulunmaktadır (Şekil 9).



**Şekil 9.** Fosfomisinin moleküler yapısı<sup>66</sup>

Bakteri hücre duvar sentezinin ilk sitoplazmik basamağı, MurA enziminin (UDP-*N*-asetilglukozamin enolpirüvil transferaz) katalizlediği basamaktır. Bu aşamada fosfoenolpiruvatın (PEP) enolpirüvil kısmının UDP-*N*-asetilglukozamin'in 3-hidroksil grubuna transferi sağlanır ve peptidoglikan öncüsü olan UDP-*N*-asetilmuramik asit (UDP-MurNAc) oluşumu gerçekleşir. Fosfomisin, MurA enziminin aktif bölgesindeki sisteinin tiyol grubuna geri dönüşsüz bir şekilde kovalent bağ ile bağlanarak peptidoglikan öncüllerinin sentezlenmesini engeller (Şekil 10)<sup>66,67,68</sup>. Hücre duvarı sentezlenemeyen hücre lizise gider.



Şekil 10. Fosfomisinin hücre içine alınması ve etki mekanizması

Fosfomisinin sitoplazmik bir enzimi inhibe etmektedir ve etkili olabilmesi için hücre içine alınması gerekmektedir. Sitoplazmaya girmek için kullandığı 2 taşıma sistemi şunlardır; heksoz monofosfat (UhpT; glukoz-6-fosfat ile indüklenmektedir) ve L- $\alpha$ -gliserofosfat taşıma (GlpT; gliseraldehid-3-fosfar ile indüklenmekte) sistemleri. Bu alım sistemlerinin gen ekspresyonu ve reseptör protein kompleksi boyunca cAMP varlığı gereklidir.

Ayrıca fosfomisin bakterinin idrar yolu epitel hücrelerine yapışmasını azalttığını ve solunum yolu epitel hücrelerinde trombosit aktivatör faktör reseptörlerini baskıladığı (böylece *S.pneumoniae*, *H. influenzae* gibi mikroorganizmalarının adezyonun azalttığı) da bilinmektedir<sup>69,70</sup>.

İmmünmodülatör etkisi de bulunan antibiyotiğin, akut inflamatuvar yanıtı değiştirdiği gösterilmiştir; TNF-  $\alpha$ , interlökin-1 (IL-1) üretimini baskımlarken IL-10 üretimini arttırmaktadır. IL-6 ile ilgili ise çelişkili veriler yayınlanmıştır.

Bunun yanında kronik hemodiyaliz ve böbrek nakli yapılan hastalarda bile nötrofillerin fagositik aktivitesini arttırdığı kanıtlanmıştır<sup>71-73</sup>.

Fosfomisin, biyofilmlere etki etme yeteneğine sahiptir. Birkaç deneysel çalışma (*in vitro* ve biyofilm enfeksiyon modelleri), fosfomisinin tek başına veya diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde, yalnızca klinik olarak önemli bakterileri biyofilmlerden azalttığını veya yok ettiğini değil, aynı zamanda biyofilm yapısında değişikliklere de yol açtığını göstermiştir. Bunun yanında bakterisidal etkisini biyofilm içerisindeki mikroorganizmalarda da gösterebilmekte ve biyofilm yapısında değişikliklere de neden olarak bakterinin kolonizasyonunu bozmaktadır<sup>74</sup>.

#### 2.2.2.1. Fosfomisin direnci

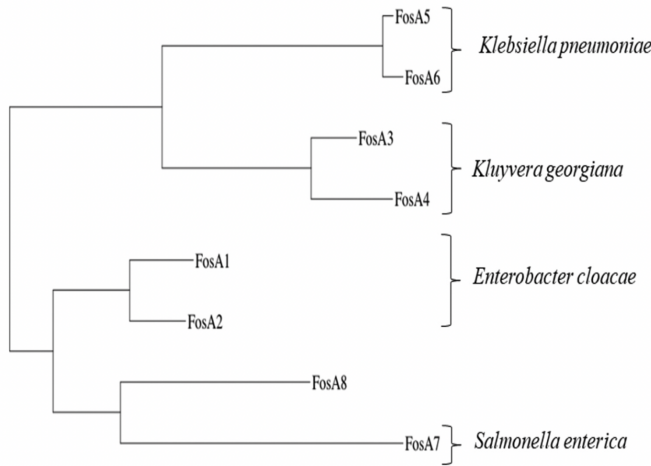
Hem Gram negatif hem de Gram pozitif patojenlere karşı etkili olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. (VRE), GSBL ve karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* dahil olmak üzere bir çok ÇİD patojene etkinliği bulunmaktadır<sup>75,76</sup>. Fosfomisine direnç kazandıran çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır (Tablo 3).

**Tablo 3.** Fosfomisin direnç mekanizmaları<sup>77</sup>

| 1. Doğal Direnç                                                                               | Bakteriler                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| MurA'nın aktif bölgesinde Sisteinden Aspartat'a değişim                                       | <i>Mycobacterium tuberculosis</i><br><i>Chlamydia trachomatis</i><br><i>Vibrio fischeri</i> |
| Peptidoglikan sentezinde MurA'nın katılmadığı geri dönüşüm yollarının varlığı                 | <i>Pseudomonas putida</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Chlamydia trachomatis</i>  |
| 2. Kazanılmış Direnç                                                                          |                                                                                             |
| <i>glpT</i> ve <i>uhpT</i> yapısındaki mutasyonlar                                            | <i>Escherichia coli</i>                                                                     |
| <i>uhpA</i> geninde değişiklik → <i>uhpT</i> 'nin azalmış ifadesi                             | <i>Escherichia coli</i>                                                                     |
| <i>ptsI</i> ve <i>cyaA</i> genlerindeki değişiklikler → hücre içi cAMP seviyelerinin azalması | <i>Escherichia coli</i>                                                                     |

|                                                                                                                           |                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| MurA'da yeni amino asit yer deęiřtirmeleri (aspartat369asparajin & l370izol370sin)                                        | <i>Escherichia coli</i>           |
| MurA'nın ekspresyonundaki değişiklikler (enolpiruvil transferaz ve fosfomisin arasında d370üş370ük afiniteye yol a370çar) | <i>Escherichia coli</i>           |
| <i>fosA</i> , <i>fosA2</i> , <i>fosA3</i> , <i>fosA4</i> , <i>fosA5</i> , <i>fosA6</i>                                    | <i>Enterobacteriaceae</i> spp.    |
| <i>fosB</i>                                                                                                               | <i>Staphylococcus</i> spp.        |
|                                                                                                                           | <i>Enterococcus</i> spp.          |
|                                                                                                                           | <i>Bacillus subtilis</i>          |
| <i>fosX</i>                                                                                                               | <i>Listeria monocytogenes</i>     |
| <i>fosC</i>                                                                                                               | <i>Pseudomonas syringae</i>       |
| <i>fomA</i> ve <i>fomB</i> (kinazlar)                                                                                     | <i>Streptomyces</i> spp.          |
| AbaF                                                                                                                      | <i>A. baumannii</i> <sup>78</sup> |
| Tet38                                                                                                                     | <i>S. aureus</i> <sup>79</sup>    |

Fosfomisin bağlanma hedefinin (MurA) modifikasyonu, taşıma sistemlerindeki mutasyonlar (*GlpT* ve *UhpT*), aktif dışa atım pompa ekspresyonu (AbaF, Tet38) ile fosfomisin modifiye edici enzimleri kodlayan genlerdeki (*fosA-varyantları*, *fosB*, *fosC*, *fosX*, *fosK*, *fosD*, *fosE*, *fosl*, *fosL*, *fomA* ve *fomB*) ve düzenleyici genlerdeki (*uhpA*, *cyaA* ve *ptsI*) değişiklikler fosfomisin direnciyle sonuçlanmaktadır. Plazmid aracılı fos enzimleri (*fosA2* ve *fosA7* kromozomal olarak kodlanmaktadır) fosfomisin modifiye edici enzimlerdir. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. izolatlarındaki en önemli direnç mekanizması olarak bilinmektedir. Bu mekanizma ilk olarak *fosA* tarafından kodlanan ve metalloenzim olan; glutatyon S-transferaz için tanımlanmıştır<sup>80</sup>. Glutatyon S-transferaz, tripeptid glutatyon sisteninin sülfidril grubunu fosfomisinin epoksit halkasının C1'ine ekleyerek fosfomisini inaktive etmektedir<sup>80,81</sup>. FosA3, dünya 370çapında en sık bulunan fosfomisin modifiye edici enzimdir ve bilinen bir 370çok varyantı vardır (Şekil 11)<sup>82</sup>. Aynı ya da bir konjuge plazmidde *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>SFO-1</sub>, *bla*<sub>AmpC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *gyrA*, *parC*, *parE*, *sul1*, *sul2*, *strA*, *strB*, *aac(6=)-Ib*, *aadA5*, *aphA6*, *tetA*, *mphA*, *floR*, *dfrA7*, *rmtB* ve *merA* genleri ile birlikteliği bildirilmiştir; diğer genlerle birlikte bulunmaları, 370ÇİD suşlarının ortaya çıkışını kötüleştirmektedir<sup>75</sup>.



**Şekil 11.** FosA proteinleri için filogenetik ağaç ve doğal rezervuarı olarak bilinen türler<sup>82</sup>

### 2.2.3. Kolistin

1947 yılında Gram negatif bakterilere karşı güçlü spesifik aktivite gösteren polimiksin grubun antibiyotikler Gram pozitif toprak bakterisi *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus*'un ikincil bir metaboliti olarak keşfedilmiştir.

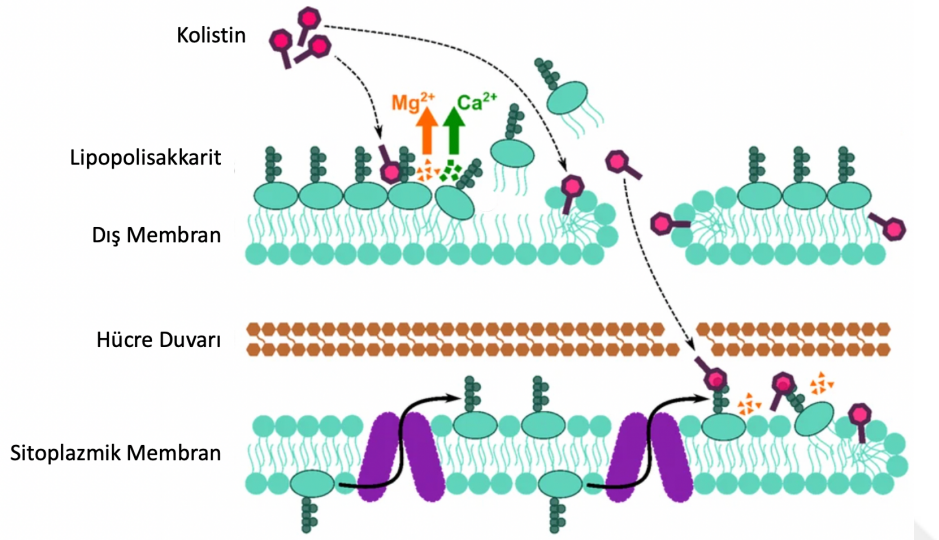
Nefrotoksik ve nörotoksik etkileri nedeniyle klinik uygulamalarda geri planda kalmışlardır. Yeni antibiyotik keşiflerinin azalması ve bu grubun yüksek etkinliği göz önüne alındığında ‘toksik’ olduğu düşünülen eski antibiyotiklerin özellikle polimiksinlerin, yeniden gündeme gelmesi kaçınılmaz olmuştur. Günümüzde ÇİD mikroorganizmaların artmasıyla kolistin *P.aeruginosa*, *A.baumani* ve *K.pneumoniae*'da son çare antibiyoterapi olarak kullanılmaktadır<sup>83</sup>.

İnsanlarda kullanımda olarak 2 kolistin formu mevcuttur; kolistin sülfat (oral, topikal) ve kolistin metansülfonat (parenteral, inhaler). Katyonik, siklik yapıda, polipeptid olan polimiksinler; polimiksin A, B, C, D ve E (kolistin) olarak beş farklı bileşikten oluşan bir gruptur. Klinik kullanımda olanlar polimiksin B ve kolistin (polimiksin E)'dir<sup>84</sup>.

Gram negatif bakterilerdeki dış membran (yapısındaki lipopolisakkarit tabakanın yardımıyla) kimyasallara karşı bir bariyer görevi görür. Katyonik

yapılı kolistin, LPS tabakadaki anyonik lipid A'nın fosfat gruplarıyla elektrostatik etkileşime girer ve hücre membranından  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  ile rekabet ederek yer değiştirir. LPS'nin üçlü boyutlu yapısının değişmesiyle hücre zarının geçirgenliği bozulur; hücre lizise gider (Şekil 12)<sup>84</sup>.

Dolaşımdaki serbest lipid A'ya bağlanabilir ve nötralize eder; böylece da antiendotoksik etkisi mevcuttur.



Şekil 12. Kolistinin etki mekanizması<sup>85</sup>.

#### 2.2.3.1. Kolistin direnci

Kolistine direnç çeşitli mekanizmalarla açıklanabilir. Bunlar;

1. LPS modifikasyonları (katyonik grupların eklenmesi)
2. LPS kaybına yol açan mutasyonlar
3. Porin mutasyonları ve dışa atım pompa sistemlerinin aşırı ekspresyonu
4. Kapsüler polisakaridin aşırı üretimi
5. Kolistinin enzimatik inaktivasyonu

Kazanılmış direnç mekanizmaları genellikle kromozomal mutasyonlarla olmaktadır. *S. enterica* ve *E. coli*, 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) veya fosfoetanolin (PEtn) biyosentezi yoluyla lipid A'yı değiştirebilir.

Biyosentezi, iki bileşenli yanıt düzenleyicilere ve sensör kinaz sistemlerine bağlıdır (*PmrA/PmrB* ve *PhoP/PhoQ*). *Acinetobacter baumannii*'de LPS üretiminin baskılanması ile direnç gelişebilmektedir (lipit A biyosenteinden sorumlu *lpxA*, *lpxC* veya *lpxD*'nin inaktivasyonu). *PhoP/PhoQ* sinyal sistemi etkinleştirildiğinde, transmembran düzenleyici protein (*MgrB*) üretilir. *K. pneumoniae*'da *mgrB* geninin inaktivasyonuna bağlı direnç görülebilmektedir<sup>84</sup>.

Plazmidik *mcr-1*, ilk olarak 2015 yılında Çin'de *E.coli* izolatında tanımlanmıştır. *Mcr* gen ailesi (*mcr1-mcr10*) lipid A'nın fosfat grubuna fosfoetanolamin eklenmesini katalize eden fosfoetanolamin transferazları kodlar. Böylece bakteri dış membranının negatif yükü azalır ve kolistin direnci gelişir<sup>86</sup>.

### 2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri için dünyada yaygın olarak kullanılan iki standart mevcuttur. Bu standartlardan biri, yıllardır ülkemizde kullanılan "Klinik Laboratuvar Standartları Kurumu" (CLSI), diğeri ise Avrupa Birliği'ne üye birçok ülkede kullanılan ve 2015 yılında ülkemizde kullanıma giren ve "Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi" (EUCAST) standardıdır.

EUCAST v.12.0 ve CLSI M100 31<sup>st</sup> ed. klavuzlarına göre *Enterobacterales* izolatlarında fosfomisin için önerilen standart yöntem agar dilüsyondur, MİK tayini yapılırken yalancı direnç oranlarını azaltmak için 25 µg/mL glukoz-6-fosfat (UhpT yolağına girişi sağlar) eklenmiş Mueller-Hinton agarın kullanılması gereklidir ve kalite kontrol izolatı olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanılması önerilmektedir. Disk difüzyon sadece komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarında *E. coli* izolatları için önerilmektedir. Sıvı mikrodilüsyon, gradient test ve otomatize sistemler ile yapılan çalışmalarda standart test yöntemine göre büyük ve çok büyük hata oranları yüksek bulunmuştur<sup>87,88</sup>. Hızlı test yöntemlerine olan ihtiyacın olması ve fosfomisin

için duyarlılığın belirlenmesinde sıvı disk elüsyon testinin performansı ile ilgili yeterli verinin bulunmaması nedeniyle çalışmamız kapsamında değerlendirilmiştir.

EUCAST v.12.0 klavuzuna göre *Enterobacterales* izolatlarında kolistin için MİK tayini, sıvı mikrodilüsyonu ile yapılmalıdır. Kalite kontrol, hem kolistine duyarlı (*E. coli* ATCC 25922 veya *P. aeruginosa* ATCC 27853) hem de kolistine dirençli *E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1* pozitif) ile gerçekleştirilmelidir<sup>89</sup>. CLSI M100 31<sup>st</sup> ed. önerilerine göre kolistin için broth mikrodilüsyon, sıvı disk elüsyon ve kolistin agar test yöntemleri MİK belirlemede kullanılabilir<sup>90</sup>. Sıvı mikrodilüsyonun emek yoğun bir yöntem olması nedeniyle rutin laboratuvar pratiğinde kullanımı zaman alıcıdır. Yapılan çalışmada; gradient test, disk difüzyon ve otomatize sistemler ile çalışıldığından bu alternatif test yöntemlerinde kategorik uyumsuzluğun, büyük ve çok büyük hata oranlarında yüksek olduğu görülmüştür<sup>91,92</sup>.

Meropenem için EUCAST v.12.0 ve CLSI M100 31<sup>st</sup> ed. önerileri incelendiğinde sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon testleri önerilmektedir. Karbapenem duyarlılığının yanı sıra dirençten sorumlu karbapenemaz üreten izolatların belirlenebilmesi için de sınır değerler mevcuttur. Karbapenemazların varlığı veya yokluğu, duyarlılık kategorizasyonunu tek başına etkilememektedir. Ayrıca halk sağlığı ve enfeksiyon kontrolü amaçları için karbapenemaz tespiti ve karakterizasyonu önerilmektedir. Bu nedenle karbapenemaz taraması için >0.125 µg/mL (zon çapı <28 mm) olan bir meropenem tarama eşik değeri kullanılmasını önermektedir. MİK sonuçları ve kategorik yorumlar metodolojiye göre farklılık göstermekle beraber, hızlı sonuç üretiminde gradient testi ve otomatize sistemler meropenem duyarlılığının belirlenmesinde rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadırlar<sup>93,94</sup>.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Besiyerleri

MacConkey Agar (bioMérieux, Fransa)

Mueller-Hinton Agar (Oxoid,UK)

Mueller Hinton Broth (Becton Dickinson, ABD)

Skim milk (Oxoid, Birleşik Krallık)

##### 3.1.2. Standart kökenler

*Escherichia coli* ATCC 25922, fosfomisin agar dilüsyon; meropenem ve kolistin sıvı mikrodilüsyon testi için duyarlı kalite kontrol suşu olarak kullanılmıştır. *Escherichia coli* NCTC 13846; kolistin sıvı mikrodilüsyon testi için dirençli kalite kontrol suşu olarak ve *mcr-1* geni için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda PZR yönteminde kullanılan diğer kontrol izolatları Tablo 4'te sunulmuştur.

**Tablo 4.** Çalışmamızda PZR yönteminde kullanılan kontrol izolatları

| Genotipik olarak bilinen kontrol izolatları | Gen                         | Kaynak                        |
|---------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC13442      | <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> | Laboratuvarımız               |
| <i>Escherichia coli</i>                     | <i>bla<sub>NDM</sub></i>    | Kaynak Numarası <sup>95</sup> |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                | <i>bla<sub>KPC</sub></i>    | Kaynak Numarası <sup>95</sup> |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                | <i>bla<sub>IMP</sub></i>    | Kaynak Numarası <sup>95</sup> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>               | <i>bla<sub>VIM</sub></i>    | Kaynak Numarası <sup>95</sup> |
| <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846          | <i>mcr-1</i>                | Laboratuvarımız               |

### **3.1.3. Antibiyotikler ve diğer kimyasallar**

Fosfomisin trometamol antibiyotik tozu (Sigma-Aldrich, Almanya)

Kolistin sülfat antibiyotik tozu (Sigma-Aldrich, Almanya)

Meropenem trihidrat antibiyotik tozu (Sigma-Aldrich, Almanya)

Fosfomisin antibiyotik diski (Bioanalyse, Türkiye)

Glukoz-6-fosfat (Sigma-Aldrich, Almanya)

### **3.1.4. Araçlar ve aygıtlar**

Etüv (Memmert, Almanya)

Steril eküvyon

Steril cam tüp

Steril plastik öze (µL)

Steril petri (90ml, 20ml)

Balon joje (250 ml, 500 ml, 1000 ml)

Otoklav (Nüve-OT 020, Türkiye)

Terazi (Scaltec)

Hassas terazi (Sartorius, Almanya)

Buzdolabı (Indesit) +4 °C

Buzdolabı (Indesit) -20 °C

Buzdolabı (Indesit) -40 °C

Vorteks (IKA, ABD)

Distile su cihazı (Nüve NS 108)

Spektrofotometre (Optima)

Kurutma cihazı (Electro–mag)

Pastör fırını (Electro–mag)

VITEK® MS, MALDI-TOF (BioMérieux, Fransa)

Mikroplate

Mikrodalga fırın (Beko, Türkiye)

Elektroforez cihazı (Biometra, Almanya)

UV görüntüleyici (Gel Doc EZ Jel Dokümantasyon Sistemi, BIO-RAD, ABD)

Termal döngü cihazı (BIO-RAD, ABD)

Santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge, Almanya)

2 ml'lik ve 0,2 ml'lik mikrotüpler (Ratiolab, Almanya)

Isı bloğu (Labnet Digital Dry Baths, ABD)

DNA ladder (GeneMark, Tayvan)

2X PZR Master karışımı (GeneMark, Tayvan)

### **3.2. Yöntemler**

#### **3.2.1. Klinik örneklerin seçimi**

2019, 2020 ve 2021 yıllarında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na erişkin hastalardan gönderilen kan kültürü örnekleri incelenmiştir. Her hastadan ilk izole edilen köken çalışma kapsamına alınarak izole edilen 259 *K. pneumoniae* izolatının 85 (%32,8)'inde karbapenem MİK'i VITEK® 2 ile direnç tarama sınırı >0.125 µg/mL'nin üzerinde bulunmuştur. Bu kökenlerin meropenem duyarlılıkları standart yöntemle doğrulanmış; 'dirençli' veya 'duyarlı, yüksek dozda' bulunan ÇİD 61 izolat çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

#### **3.2.2. Bakterilerin tanımlanması**

Stoktan alınan örneklerin MacConkey Agar'a birinci pasajları yapıldı ve 18-24 saat boyunca +35±2 °C'deki etüvde inkübasyona kaldırıldı. Birinci pasajda

elde edilen örneklerin saflaştırılması için ikinci pasajları yapılarak üreyen mikroorganizma kolonilerinden Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDITOF MS) ile bakteri identifikasyonları doğrulandı.

### **3.2.3. Antibiyotik duyarlılık testleri**

#### **3.2.3.1. Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması**

Üretici firma tarafından sağlanan potensi belirlenmiş olan antimikrobiyal tozlar kalibre edilmiş hassas terazide tartılmıştır. İstenen son konsantrasyona ulaşmak için gereken distile su miktarı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

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

Antibiyotik stok çözeltileri 10240  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda çalışmanın yapıldığı gün taze olarak hazırlanmıştır. Stok solüsyonu seri olarak dilüe edilerek istenen antibiyotik solüsyonları elde edilmiştir.

#### **3.2.3.1. Ağarda dilüsyon**

Fosfomisin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlenirken EUCAST v.12.0 klavuzu doğrultusunda standart yöntem olan ağarda dilüsyon testi kullanıldı.

Steril petriler cama yazar kalem ile çalışılacak köken sayısına bölünmüştür. Her bir petrinin üzerine içerdiği antibiyotik ve konsantrasyonu yazılmıştır. MHA besiyeri karışımı üretici firmanın önerileri doğrultusunda sulandırılarak otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra 50 °C'ye

kadar soğutulup fosfomisin *Enterobacterales* ailesi üyelerindeki etkinliğini arttırmayı sağlayan glukoz-6-fosfat (25 µg/mL) eklenmiştir. Ardından seri sulandırılmaları yapılmış antibiyotiklerin bulunduğu petrilere 4 mm kalınlıkta, antibiyotik solüsyonu/besiyeri oranı 1/10 olacak şekilde hazırlanan besiyeri eklenmiştir. Antibiyotiklerin besiyerinde homojen dağılması için petrilere çevrilerek karıştırılmış ve düz bir zeminde soğumaya bırakılmıştır. Böylece her biri farklı konsantrasyonda antibiyotik içeren (0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL, 256 µg/mL, 512 µg/mL ve 1024 µg/mL) katı besiyerleri elde edilmiştir.

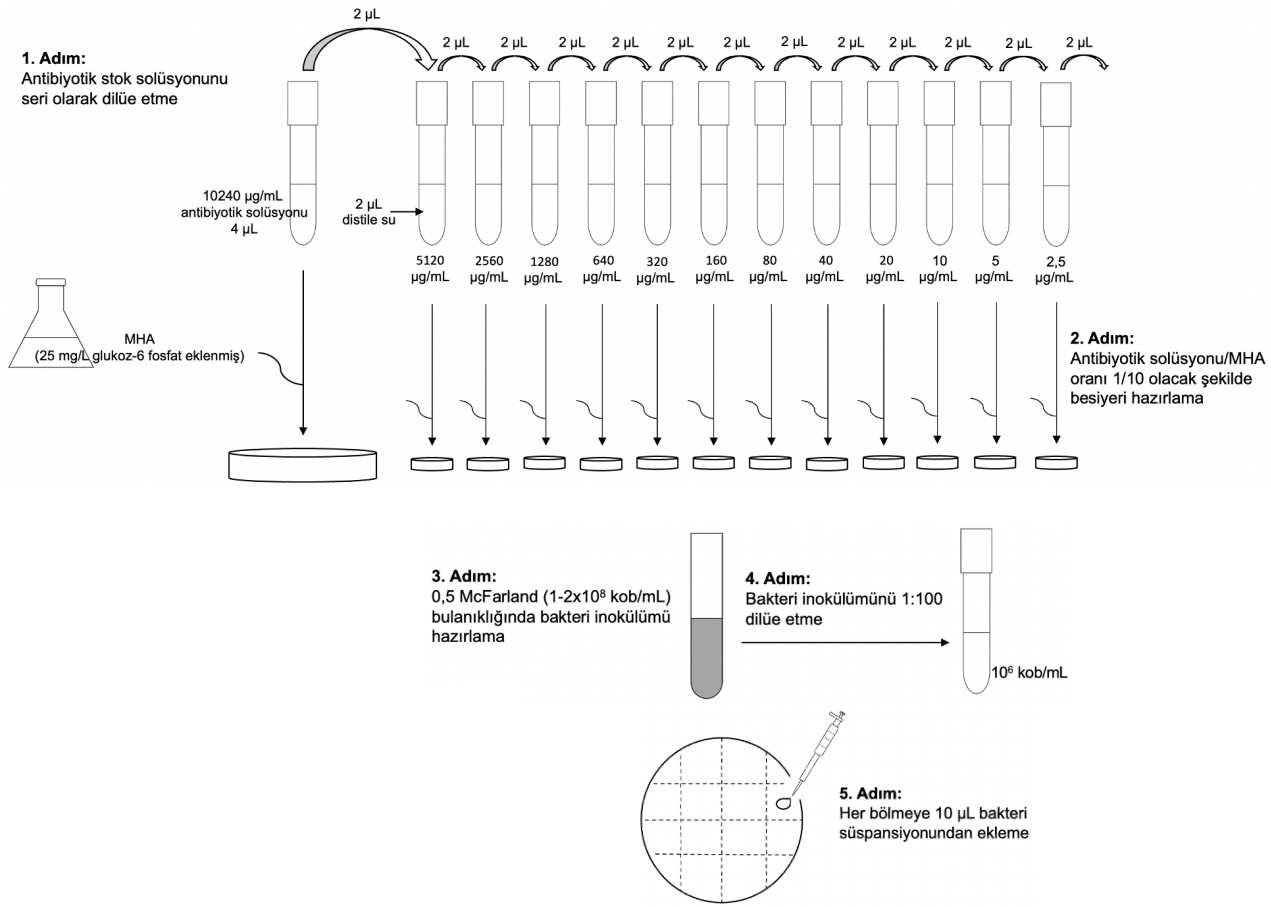
Test edilecek bakterinin yoğunluğu 0.5 McFarland'a ( $1,5 \times 10^8$  kob/mL) ayarlandıktan sonra 100 kat dilüe edilerek otomatik pipet yardımıyla 10 µL çekilmiş ve böylece istenilen bakteri yoğunluğu ( $10^4$  kob/mL) elde edilmiştir (Şekil 13).

Kontrol grubu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Pozitif kontrol olarak her çalışmada antibiyotik içermeyen plaklar hazırlanıp tüm suşlar test edilmiştir.

Ekimden sonra plaklar  $35 \pm 2$  °C olan etüvde  $18 \pm 2$  saat inkübasyona bırakılmıştır. Tek bir koloni şeklinde olan üremeler dikkate alınmamıştır. MİK, üremenin engellendiği en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak belirlenmiş olup EUCAST v.12.0 kılavuzuna göre 32 µg/mL ve altında olan değerler duyarlı, 32 üstünde olan değerler ise dirençli olarak yorumlanmıştır (Tablo 5).

**Tablo 5.** EUCAST v.12.0 kılavuzuna göre *K. pneumoniae* için klinik sınır değerler

| Antibiyotikler | MİK Sınır Değeri (µg/mL) |     |
|----------------|--------------------------|-----|
|                | ≤ S                      | R > |
| Meropenem      | 2                        | 8   |
| Kolistin       | 2                        | 2   |
| Fosfomisin     | 32                       | 32  |



**Şekil 13.** Agarda dilüsyonun çalışma basamakları

### 3.2.3.2. Sıvı mikrodilüsyon

Kolistin ve meropenem antibiyotiklerinin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlenirken EUCAST v.12.0 klavuzu doğrultusunda standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon testi kullanıldı.

Antibiyotik seri dilüsyonu ve bakteri inokulumu hazırlamada kullanmak üzere, Mueller-Hinton broth (MHB) üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanarak otoklavlandı. Antibiyotik stok solüsyonundan istenen konsantrasyonlara uygun sulandırma işlemleri yapılarak (1024 µg/mL'den 0,5 µg/mL'ye kadar) kuyucuklardaki son hacim 50 µL olarak ayarlandı.

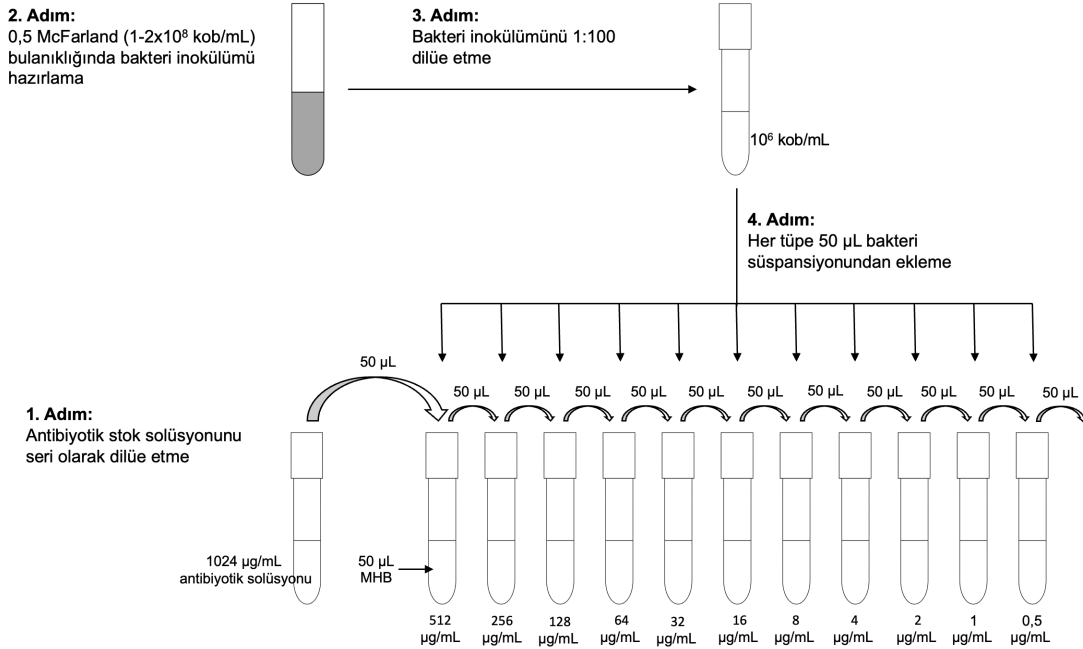
Her izolat için MacConkey agarda, uygun ortam koşullarında üreyen kolonilerden alınarak 0,5 McFarland standardına eşdeğer bir inokulum

süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan yeterli miktarda alınarak MHB besiyerinde 1/100 dilüe edildikten sonra 50 µL her kuyucuğa eklendi.

Bu şekilde kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonları da yarı yarıya düşürülerek 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL ve 0,25 µg/mL antibiyotik konsantrasyonları elde edildi. (Şekil 14)

Her çalışmada ilk kuyucuk sterilite kontrol, 2. kuyucuk üreme kontrol olarak olarak ayrıldı ve kalite kontrol suşları (kolistin sıvı mikrodilüsyon için *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* NCTC 13846; meropenem sıvı mikrodilüsyon için *Escherichia coli* ATCC 25922 kalite kontrol kökenleri) çalışma plaklarına dahil edildi.

Kapağı kapatılan U tabanlı mikropalaklar 37°C'lik etüvde 24 saat aerob ortamda inkübasyona bırakıldı. Bakteri üremesinin inhibe olduğu, bulanıklığın görülmediği ilk kuyucuk, antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak değerlendirildi. MİK sonuçları EUCAST v.12.0 kılavuzuna göre yorumlanmıştır (Tablo 5).



**Şekil 14.** Sıvı mikrodilüsyonun çalışma basamakları

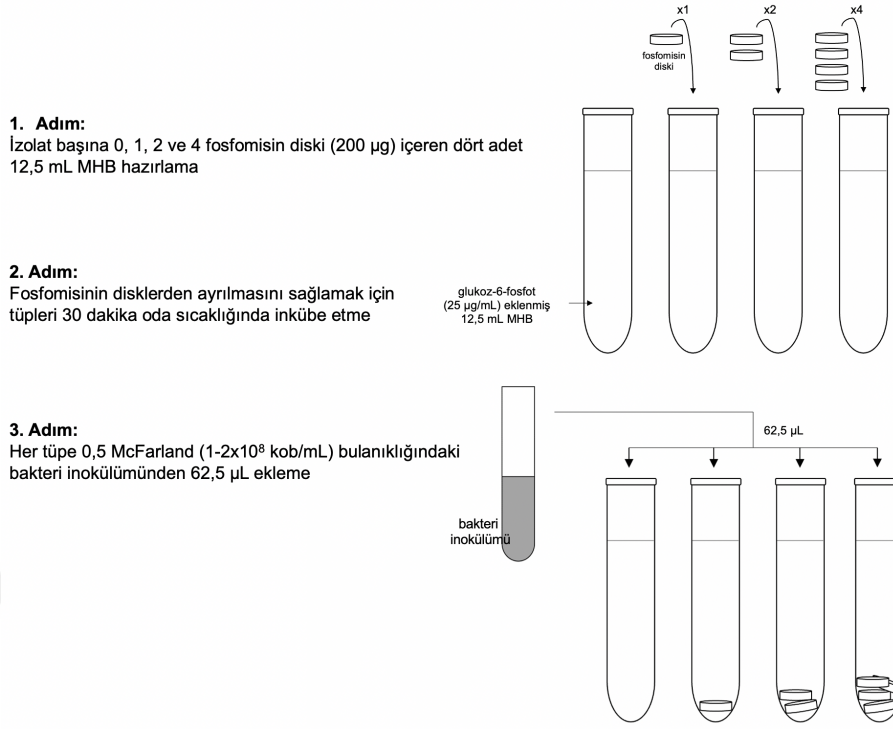
### 3.2.3.3. Fosfomisin sıvı disk elüsyon

Sıvı disk elüsyon testi, izolat başına 0, 1, 2 ve 4 fosfomisin diski (200 µg; Bioanalyse) içeren dört adet 12,5 mL MHB ile gerçekleştirildi. MHB'lere fosfomisinin *Enterobacterales* ailesi üyelerindeki etkinliğini arttırmayı sağlayan glukoz-6-fosfat (25 µg/mL) eklenmiştir. Fosfomisinin disklerden ayrılmasını sağlamak için 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

İlk tüp üreme kontrolü olarak kullanılırken diğer tüplerde sırasıyla 16 µg/mL, 32 µg/mL ve 64 µg/mL'lik nihai fosfomisin konsantrasyonları elde edildi. Bir gecelik inkübasyon sonrasında üreyen saf kolonilerden 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri inokülümü hazırlandı. Her tüpe standartlaştırılmış süspansiyondan 62,5 µL'lık bir kısım ilave edildi (Şekil 15). Tüpler 10<sup>5</sup> kob/mL'lik bir son inokülüm için vortekslendi.

Fosfomisin MİK değerleri, ortam havasında 35°C'de 16 ila 20 saatlik bir inkübasyondan sonra görsel olarak okundu.

Kontrol grubu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 izolatı, EUCAST v.12.0'ye göre beklenen MİK değerleri 0,5 ile 2 µg/mL aralığında, çalışmaya dahil edildi. Kontrol izolatını test etmek için 64 µg/mL'lik fosfomisin konsantrasyonundan uygun sulandırma ile 0,5 µg/mL; 1 µg/mL ve 2 µg/mL'lik konsantrasyonlar elde edildi.



**Şekil 15.** Sıvı disk elüsyon testinin çalışma basamakları

### 3.2.4. Antibiyotik Direnç Genlerinin Araştırılması

#### 3.2.4.1. DNA izolasyonu

Bir gecelik inkübasyona bırakılan saflaştırılmış bakteri kolonileri 250 µL distile su içeren steril tüpe alınarak karıştırıldı. Isı bloğuna yerleştirilen tüpler 95 °C'de 15 dakika kaynatıldı. Ardından tüpler 1000 rpm'de beş dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları PZR'da kullanılmak üzere ayrıldı.

#### 3.2.4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Her bir örnek için hazırlanan 25 µL'lik karışım, 0,5 µL ileri ve geri primerler (her biri 10 µM), 12,5 µL 2X PZR Master karışımı, 9,5 µL DNAaz, RNAaz içermeyen deiyonize su, 2 µL DNA içerecek şekilde hazırlandı. Bu yöntemle

*fosA3*, *fosC2*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* ve *bla<sub>VIM</sub>* genlerini saptamak için kullanılan ileri ve geri primerler tabloda verilmiştir (Tablo 6).

### 3.2.4.3. Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu

Her bir örnek için hazırlanan 25 µL'lik karışım, 10 primer solüsyonun her birinden 0,5 µL (10 µM), 12,5 µL 2X PZR Master karışımı, 5.5 µL DNAaz, RNAaz içermeyen deiyonize su, 2 µL DNA içerecek şekilde hazırlandı. Çalışmadan kullanılan ileri ve geri primerler Tablo 6'da verilmiştir. Bu yöntemle *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* ve *mcr-5* genleri araştırılmıştır.

**Tablo 6.** Çalışmamızda kullanılan primerler

| Direnç Geni                 | Amplikon uzunluğu (bp) | Primer Dizisi                                                               | Tepkime Şartları |    |           |        | Kaynak No |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------|----|-----------|--------|-----------|
|                             |                        |                                                                             | Aşamalar         | °C | Süre      | Siklus |           |
| <i>fosA3</i>                | 282                    | F: 5' GCC GTC AGG GCT GAG AAA 3'<br>R: 5' GCG TCA AGC CTG GCA TTT 3'        | ön denatürasyon  | 95 | 5 dakika  | X 35   | 97        |
|                             |                        |                                                                             | denatürasyon     | 93 | 40 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | birleşme         | 57 | 40 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | uzama            | 72 | 40 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | son uzama        | 72 | 3 dakika  |        |           |
| <i>fosC2</i>                | 334                    | F: 5' CTT GAT AGG GTT TAG ACT TC 3'<br>R: 5' CGT TCC GTG GAG TTC TAT AC 3'  | ön denatürasyon  | 94 | 5 dakika  | X 30   | 97        |
|                             |                        |                                                                             | denatürasyon     | 94 | 60 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | birleşme         | 54 | 60 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | uzama            | 72 | 60 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | son uzama        | 72 | 10 dakika |        |           |
| <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> | 743                    | F: 5' TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG 3'<br>R: 5' GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC 3' | ön denatürasyon  | 94 | 5 dakika  | X 35   | 98        |
|                             |                        |                                                                             | denatürasyon     | 94 | 60 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | birleşme         | 56 | 45 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | uzama            | 72 | 60 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | son uzama        | 72 | 7 dakika  |        |           |
| <i>bla<sub>NDM</sub></i>    | 475                    | F: 5' GGG CAG TCG CTT CCA ACG GT 3'<br>R: 5' GTA GTG CTC AGT GTC GGC AT 3'  | ön denatürasyon  | 95 | 5 dakika  | X 30   | 99        |
|                             |                        |                                                                             | denatürasyon     | 95 | 30 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | birleşme         | 60 | 40 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | uzama            | 72 | 50 saniye |        |           |
|                             |                        |                                                                             | son uzama        | 72 | 6 dakika  |        |           |

|                          |      |                                                                                |                 |    |           |      |     |
|--------------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----|-----------|------|-----|
| <i>bla<sub>KPC</sub></i> | 880  | F: 5' TGT CAC TGT ATC GCC GTC 3'<br>R: 5' CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC 3'       | ön denatürasyon | 95 | 5 dakika  | X 35 | 100 |
|                          |      |                                                                                | denatürasyon    | 95 | 45 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | birleşme        | 60 | 45 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | uzama           | 72 | 60 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | son uzama       | 72 | 8 dakika  |      |     |
| <i>bla<sub>IMP</sub></i> | 587  | F: 5' GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC 3'<br>R: 5' GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC 3'     | ön denatürasyon | 95 | 5 dakika  | X 35 | 101 |
|                          |      |                                                                                | denatürasyon    | 95 | 45 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | birleşme        | 60 | 45 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | uzama           | 72 | 60 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | son uzama       | 72 | 8 dakika  |      |     |
| <i>bla<sub>VIM</sub></i> | 389  | F: 5' GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC 3'<br>R: 5' AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG 3'     | ön denatürasyon | 95 | 5 dakika  | X 35 | 102 |
|                          |      |                                                                                | denatürasyon    | 95 | 45 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | birleşme        | 60 | 45 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | uzama           | 72 | 60 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | son uzama       | 72 | 8 dakika  |      |     |
| <i>mcr-1</i>             | 320  | F: 5' AGT CCG TTT GTT CTT GTG GC 3'<br>R: 5' AGA TCC TTG GTC TCG GCT TG 3'     | ön denatürasyon | 94 | 15 dakika | X 25 | 103 |
|                          |      |                                                                                | denatürasyon    | 94 | 30 saniye |      |     |
| <i>mcr-2</i>             | 715  | F: 5' CAA GTG TGT TGG TCG CAG TT 3'<br>R: 5' TCT AGC CCG ACA AGC ATA CC 3'     | birleşme        | 58 | 90 saniye |      |     |
|                          |      |                                                                                | uzama           | 72 | 60 saniye |      |     |
| <i>mcr-3</i>             | 929  | F: 5' AAA TAA AAA TTG TTC CGC TTA TG 3'<br>R: 5' AAT GGA GAT CCC CGT TTT T 3'  | son uzama       | 72 | 10 dakika |      |     |
|                          |      |                                                                                |                 |    |           |      |     |
| <i>mcr-4</i>             | 1116 | F: 5' TCA CTT TCA TCA CTG CGT TG 3'<br>R: 5' TTG GTC CAT GAC TAC CAA TG 3'     |                 |    |           |      |     |
|                          |      |                                                                                |                 |    |           |      |     |
| <i>mcr-5</i>             | 1644 | F: 5' ATG CGG TTG TCT GCA TTT ATC 3'<br>R: 5' TCA TTG TGG TTG TCC TTT TCT G 3' |                 |    |           |      |     |
|                          |      |                                                                                |                 |    |           |      |     |

#### 3.2.4.4. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin gösterilmesi

Elde edilen PZR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jelin hazırlanmasında pH: 8.0 olan 1X TBE (Tris, Borik asit, EDTA) tamponu kullanıldı. TBE tamponu; 121,1 gr/L Tris-Base, 61,8 gr/L Borik asit ve 7.4 gr/L EDTA disodiumsalt ile distile su içerisinde 10X stok solüsyon olarak hazırlandı.

PZR bantları ultraviyole (UV) altında değerlendirildi. Oluşan bantların molekül ağırlığını tespit edebilmek için 100-3000 baz çifti arasında ayırım yapabilen DNA ladder kullanıldı.

### **3.2.5. İstatistiksel analiz**

Çalışmamızın istatistiksel analizi SPSS 26.0 programı ile yapıldı. Verilerin dağılımına Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. Normal dağılan veriler ortalama $\pm$ SD, normal dağılmayan veriler medyan (%25-%75) olarak ifade edildi.

### **3.2.6. Etik kurul onayı**

Bu proje Marmara Tıp Fakültesi Klinik Araştırma Etik Kurulu tarafından 05.03.2021 tarihinde onaylanarak tıbbi etik açısından uygun bulunmuştur (Protokol kodu: 09.2021.355).

#### 4. BULGULAR

2019, 2020 ve 2021 yıllarında Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na erişkin hastalardan gönderilen kan kültürü örnekleri incelenmiştir. Her hastadan ilk izole edilen köken çalışma kapsamına alınarak izole edilen 259 *K. pneumoniae* izolatının 85 (%32,8)'inde karbapenem MİK'i VITEK® 2 ile direnç tarama sınırı >0.125 µg/mL'nin üzerinde bulunmuştur. Bu kökenlerin meropenem duyarlılıkları standart yöntemle doğrulanmış; 'dirençli' veya 'duyarlı, yüksek dozda' bulunan ÇİD 61 izolat çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

Hastaların yaş ortalaması 63,3±16,9 (yıl) olarak belirlenmiş olup izolatların kliniklere göre dağılımları Tablo 7'de sunulmuştur.

**Tablo 7.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatının gönderildikleri kliniklere göre dağılımı

| Klinik Birim                        | n         | %            |
|-------------------------------------|-----------|--------------|
| Anestezi ve Reanimasyon YBÜ         | 16        | 26,2         |
| Covid YBÜ                           | 9         | 14,8         |
| Genel YBÜ                           | 3         | 4,9          |
| Dahiliye YBÜ                        | 3         | 4,9          |
| Erişkin YBÜ                         | 4         | 6,6          |
| Organ Nakli YBÜ                     | 1         | 1,6          |
| <b>YBÜ Toplam</b>                   | <b>37</b> | <b>60,7</b>  |
| Dahiliye Servisi                    | 15        | 24,6         |
| Covid Servisi                       | 1         | 1,6          |
| Genel Cerrahi Servisi               | 1         | 1,6          |
| Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisi | 1         | 1,6          |
| KİT Servisi                         | 1         | 1,6          |
| Nöroloji Servisi                    | 1         | 1,6          |
| <b>Servis Toplam</b>                | <b>20</b> | <b>32,8</b>  |
| Acil Servis                         | 4         | 6,6          |
| <b>Acil Servis Toplam</b>           | <b>4</b>  | <b>6,6</b>   |
| <b>Toplam</b>                       | <b>61</b> | <b>100,0</b> |

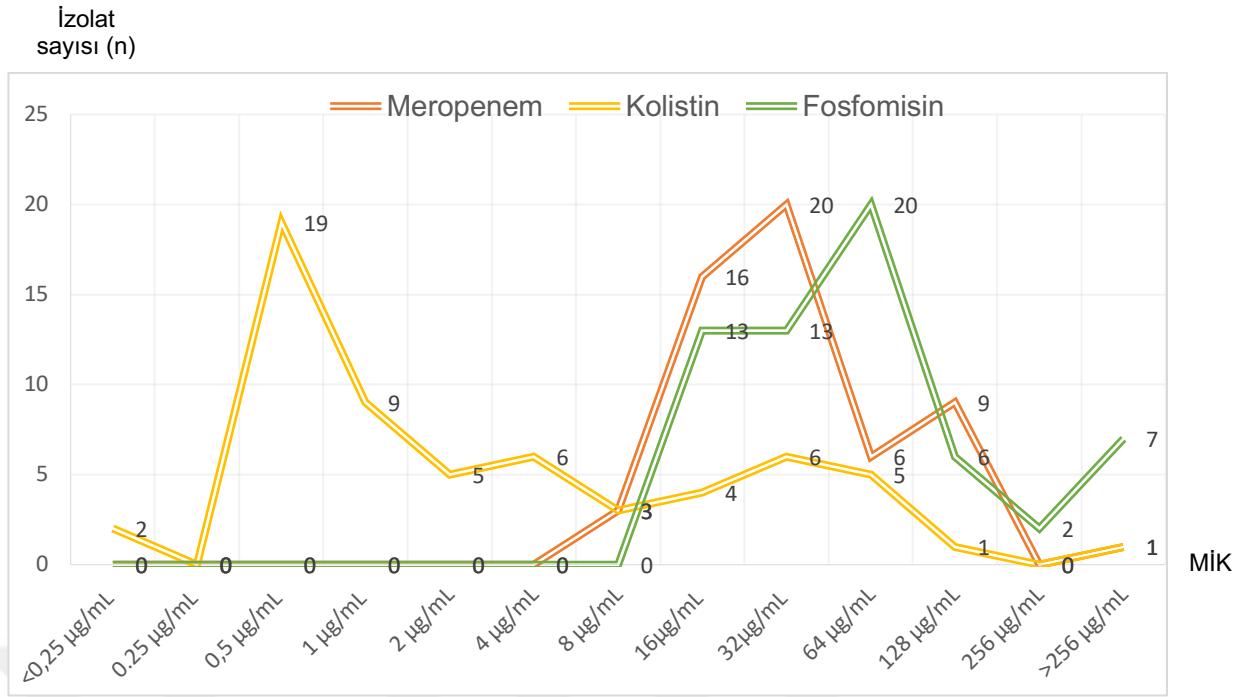
#### 4.1. İzolatların Fosfomisin, Kolistin ve Karbapenem Duyarlılık Sonuçları

Standart yöntemle meropeneme ‘dirençli’ veya ‘duyarlı, yüksek dozda’ bulunan çoklu ilaca dirençli (ÇİD) 61 izolatın 26 tanesi (%42,6) fosfomisine, 35 tanesi (%57,4) kolistine duyarlı olarak bulundu (Tablo 8). 61 izolatın 12 tanesi (%19,6) hem fosfomisine hem de kolistine duyarlı iken en az birine duyarlı izolat sayısı 48 (%78,6) olarak bulunmuştur.

**Tablo 8.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatlarında standart yöntemlerle elde edilen fosfomisin, kolistin ve meropenem duyarlılık sonuçları ile MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> Değerleri

| Antibiyotik | Çalışma Yöntemi    | S  |      | I |     | R  |      | MİK <sub>50</sub> | MİK <sub>90</sub> |
|-------------|--------------------|----|------|---|-----|----|------|-------------------|-------------------|
|             |                    | n  | %    | n | %   | n  | %    |                   |                   |
| Fosfomisin  | Agar Dilüsyon      | 26 | 42,6 | - | -   | 35 | 57,4 | 64                | 512               |
| Kolistin    | Sıvı Mikrodilüsyon | 35 | 57,4 | - | -   | 26 | 42,6 | 2                 | 64                |
| Meropenem   | Sıvı Mikrodilüsyon | 0  | 0,0  | 3 | 4,9 | 58 | 95,1 | 32                | 128               |

Fosfomisin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri 64 µg/mL ve 512 µg/mL iken kolistin için bu değerler sırasıyla 2 µg/mL ve 64 µg/mL’dir. İzolatların fosfomisin, kolistin ve meropenem MİK dağılımı Şekil 16’da gösterilmektedir. Fosfomisine duyarlı bulunan 26 izolatın MİK değerleri 16 µg/mL ve 32 µg/mL arasında olup klinik sınır değere yakındır. Kolistine duyarlı bulunan 35 izolatın 19’unda (%51,4) ise MİK değeri 0,5 µg/mL olarak bulunmuştur.



**Şekil 16.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatlarında standart yöntemlerle elde edilen fosfomisin, kolistin ve meropenem antibiyotikleri için MİK dağılımı

#### 4.2. Antibiyotik Direnç Genleri

Altmış bir izolatın hiçbirinde fosfomisin direncinden sorumlu plazmidik *fosA3* ve *fosC2*; kolistin direncinden sorumlu plazmidik *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* genleri saptanmadı.

Karbapenemaz kodlayan genler açısından, 61 izolatın 60 (%98,3)'ünde en az bir gen saptanmıştır (Tablo 9). İzolatların 50 (%82)'sinde *bla<sub>OXA-48</sub>*, 6 (%9,9)'sında *bla<sub>NDM</sub>* saptandı. Dört izolatta *bla<sub>OXA-48</sub>* ve *bla<sub>NDM</sub>* birlikteliği bulunmaktaydı. İzolatların 8 (%13,1)'inde *bla<sub>KPC</sub>* saptanmış olup *bla<sub>IMP</sub>* ve *bla<sub>VIM</sub>* hiçbir izolatta saptanmadı.

**Tablo 9.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatında karbapenemaz genlerinin dağılımı

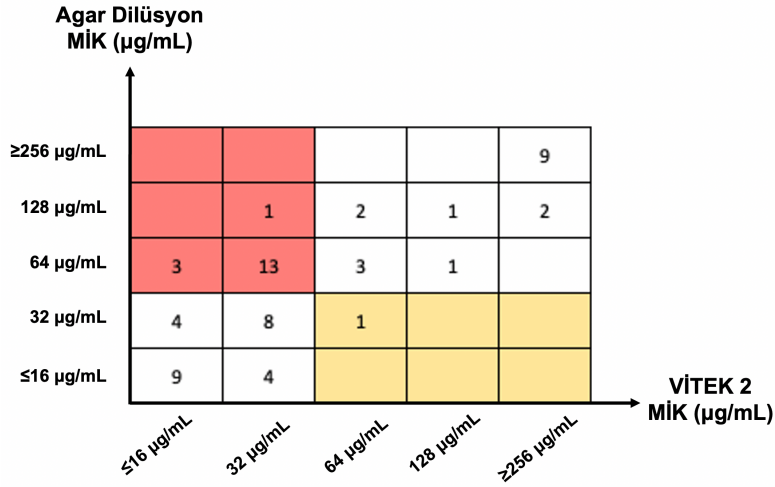
| Karbapenemaz Geni                                        | n         | %            |
|----------------------------------------------------------|-----------|--------------|
| <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>                             | 46        | 75,4         |
| <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub> | 4         | 6,6          |
| <i>bla</i> <sub>NDM</sub>                                | 2         | 3,3          |
| <i>bla</i> <sub>KPC</sub>                                | 8         | 13,1         |
| <i>bla</i> <sub>IMP</sub>                                | 0         | 0,0          |
| <i>bla</i> <sub>VIM</sub>                                | 0         | 0,0          |
| Gen yok                                                  | 1         | 1,6          |
| <b>Toplam</b>                                            | <b>61</b> | <b>100,0</b> |

#### 4.3. İzolatların VITEK® 2 ile Elde Edilen Fosfomisin, Kolistin ve Meropenem Duyarlılık Sonuçlarının Standart Yöntemlerle Karşılaştırılması

Standart agar dilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında VITEK® 2’de fosfomisin için kategorik uyum oranı %70,5 (43/61); büyük hata oranı %1,6 (1/61); çok büyük hata oranı %27,9 (17/61) olarak bulundu. Testin duyarlılığı %96,1; özgüllüğü %51,4; pozitif prediktif değeri %59,6 ve negatif prediktif değeri %94,7 olarak saptandı (Tablo 10) (Şekil 17).

**Tablo 10.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatında alternatif yöntemlerle edilen fosfomisin, kolistin ve meropenem duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması

| Parametre               | Sıvı Disk Elüsyon | VITEK® 2   |          |           |
|-------------------------|-------------------|------------|----------|-----------|
|                         | Fosfomisin        | Fosfomisin | Kolistin | Meropenem |
| Kategorik Uyum          | %63,9             | %70,5      | %83,6    | 95,1%     |
| Küçük Hata              | -                 | -          | -        | 4,9%      |
| Büyük Hata              | %32,8             | %1,6       | %4,9     | 0,0%      |
| Çok Büyük Hata          | %3,3              | %27,9      | %11,5    | 0,0%      |
| Duyarlılık              | %23,1             | %96,1      | %91,4    | -         |
| Özgüllük                | %94,3             | %51,4      | %73,1    | 98,2%     |
| Pozitif Prediktif Değer | %75               | %59,6      | %82,1    | -         |
| Negatif Prediktif Değer | %62,3             | %94,7      | %86,3    | 96,6%     |

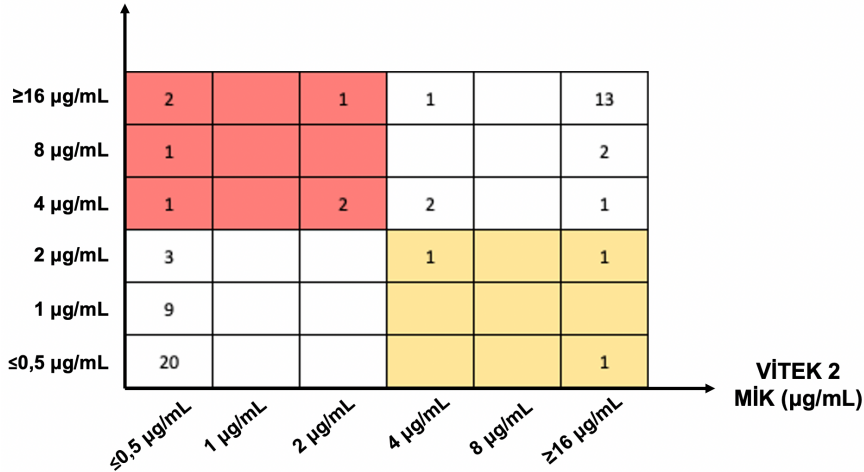


\*VİTEK® 2 için kırmızı alan çok büyük hatayı, sarı alan büyük hatayı temsil eder.

**Şekil 17.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatlarında VİTEK® 2 ile elde edilen fosfomisin duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması

Standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında VİTEK® 2’de kolistin için kategorik uyum oranı %83,6 (51/61); büyük hata oranı %4,9 (3/61); çok büyük hata oranı %11,5 (7/61) olarak bulundu. Testin duyarlılığı %91,4; özgüllüğü %73,1; pozitif prediktif değeri %82,1 ve negatif prediktif değeri %86,3 olarak saptandı (Tablo 10) (Şekil 18).

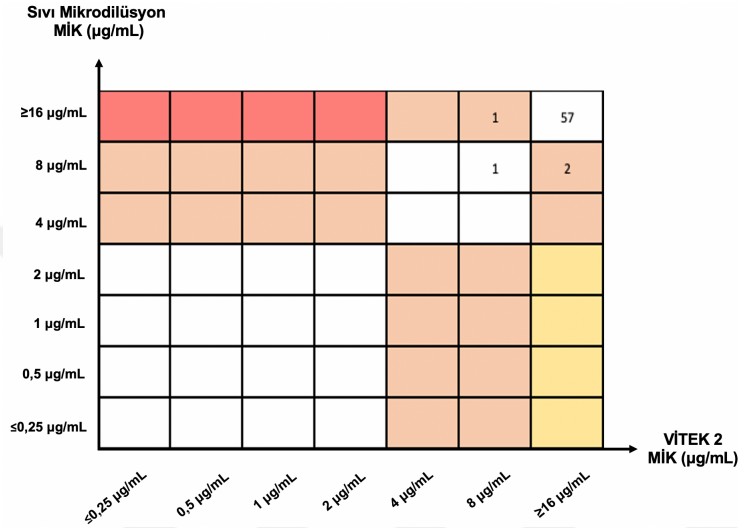
**Sıvı Mikrodilüsyon  
MİK (µg/mL)**



\*VİTEK® 2 için kırmızı alan çok büyük hatayı, sarı alan büyük hatayı temsil eder.

**Şekil 18.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatlarında VİTEK® 2 ile elde edilen kolistin duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması

Standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında VITEK® 2’de meropenem için kategorik uyum oranı %95,1 (58/61); küçük hata oranı %4,9 (3/61) olarak bulunmuş olup büyük hata ve çok büyük hataya saptanmamıştır. Testin özgüllüğü %98,2 iken negatif prediktif değeri %96,6’dır (Tablo 10) (Şekil 19).



\*VITEK® 2 için kırmızı alan çok büyük hatayı, sarı alan büyük hatayı, turuncu alan küçük hatayı temsil eder.

**Şekil 19.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatlarında VITEK® 2 ile elde edilen meropenem duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması

#### 4.4. İzolatların Sıvı Disk Elüsyon ile Elde Edilen Fosfomisin Duyarlılık Sonuçlarının Standart Yöntemle Karşılaştırılması

Standart agar dilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında sıvı disk elüsyon yönteminde fosfomisin için kategorik uyum oranı %63,9 (39/61); büyük hata oranı %32,8 (20/61); çok büyük hata oranı %3,3 (2/61) olarak bulundu. Testin duyarlılığı %23,1; özgüllüğü %94,3; pozitif prediktif değeri %75 ve negatif prediktif değeri %62,3 olarak saptandı (Tablo 10) (Şekil 20).

Kontrol izolatı olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922’nin MİK değeri sıvı disk elüsyon testine göre >2 µg/mL olarak bulunmuştur.

| Agar Dilüsyon<br>MİK (µg/mL) |                                  |          |          |           |
|------------------------------|----------------------------------|----------|----------|-----------|
| >64 µg/mL                    |                                  | 1        |          | 14        |
| 64 µg/mL                     | 1                                |          | 3        | 16        |
| 32 µg/mL                     | 1                                | 3        |          | 9         |
| ≤16 µg/mL                    | 1                                | 1        | 8        | 3         |
|                              | ≤16 µg/mL                        | 32 µg/mL | 64 µg/mL | >64 µg/mL |
|                              | Sıvı Disk Elüsyon<br>MİK (µg/mL) |          |          |           |

\*Sıvı disk elüsyon testi için kırmızı alan çok büyük hatayı, sarı alan büyük hatayı temsil eder.

**Şekil 20.** Kan kültüründen izole edilen ÇİD 61 *K. pneumoniae* izolatlarında sıvı disk elüsyon ile elde edilen fosfomisin duyarlılıklarının standart yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılması

## 5. TARTIŞMA

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında görülen çoklu antibiyotik direnç profili ve bu hastalardaki komorbidite yükü, yüksek oranda mortaliteye sebep olmaktadır. Yer değiştiren genetik elementler yoluyla yayılım göstermesi sonucu ise ÇİD *K.pneumoniae* her geçen gün daha da artmakta ve dünya çapında giderek daha fazla rapor edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü 2017 yılında yayınladığı “acil olarak yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken antibiyotik dirençli bakteriler” listesinde karbapenem dahil çoklu ilaç direnci (ÇİD) *K. pneumoniae*’yi “kritik öncelikli grup” içinde değerlendirmiştir<sup>104</sup>.

Bu mikroorganizmalar en sık yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilmektedir ve ölüm oranı %50'den fazladır<sup>39,39,45</sup>. Bizim çalışmamızda da izolatların %60,7 (n=37)’si yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir. Karbapenem dahil ÇİD *K. pneumoniae* izolatlarına hastanemizde en sık olarak anestezi YBÜ, COVID-19 YBÜ ve dahiliye servisinde rastlanmaktadır (Tablo 7). COVID-19 YBÜ’sindeki dirençli izolat sayısı dikkat çekicidir. Çalışmamızdaki hastalar incelendiğinde COVID-19 birlikteliği ise %16,4 olarak saptanmış olup bu durum enfeksiyonun kendisine ek olarak antimikrobiyal direnç insidansındaki artışın, COVID-19 pandemisinin mevcut durumuna ikincil hasar olarak karşımıza çıktığını düşündürmektedir<sup>105</sup>.

Günümüzde *K. pneumoniae*’nin antimikrobiyal direnci global bir sorundur. Ülkemizde DSÖ’nün yürüttüğü süveyans sistemi olan Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Süveyans (Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance, CAESAR) ağına dahil olan ve direnç oranlarının takibinin yapıldığı Ulusal Antimikrobiyal Direnç Süveyans Sistemi (UAMDSS) bulunmaktadır. UAMDSS verilerine göre 2019 yılında ülkemizdeki karbapenem dirençli *K.pneumoniae* oranı %51’e ulaşmıştır<sup>106</sup>. Avrupa Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) verilerine göre ise ülkemizde 2016 yılında %29,5 olan karbapenem dirençli *K.pneumoniae* oranı her yıl kademeli

olarak artmış ve 2020 yılında %48,2'ye ulaşmıştır<sup>107</sup>. Bizim hastanemizde de benzer şekilde kan kültürlerinden izole edilen ve rutin duyarlılık testlerinde en az bir karbapeneme dirençli bulunan *K. pneumoniae* izolatlarının oranı 2016 yılında %21,6 iken; 2021 yılında bu oranın %40,8'e ulaştığı görülmüştür. Bu sonuç hastanemizde karbapenem direncinin *K. pneumoniae* izolatlarında yaygınlığını ortaya koymakta ve önceki yıllarla kıyaslandığında, dirençli izolat sayısının hızla arttığını göstermektedir.

Tüm bu durumlar ÇİD *K. pneumoniae* ile mücadelede alternatif antibiyotik tedavisi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ancak kullanılabilecek seçenekler oldukça sınırlı olup en etkili antibiyotikler; polimiksinler, tigesiklin, fosfomisin ve bazı aminoglikozidlerdir<sup>2,3</sup>. Bu antibiyotiklerin duyarlılığını belirlemede kullanılan standart yöntemler zahmetli ve zaman alıcıdır. Fosfomisin, Türkiye'de 2018 yılından itibaren ÇİD bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde alternatif bir ilaç olarak intravenöz formülasyonda kullanıma girmiştir. Bu nedenle ülkemizde fosfomisin duyarlılığı ve direncine ilişkin yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır.

### **5.1 İzolatlarda Standart Yöntemlerle Elde Edilen Fosfomisin, Kolistin ve Karbapenem MİK'leri ve Bu Antibiyotiklere Dirençten Sorumlu Olabilecek Direnç Genleri**

Sıvı mikrodilüsyon ile karbapenem dirençli veya 'duyarlı, artmış dozda' olduğu doğrulanan 61 *K. pneumoniae* izolatının %42,6'sı fosfomisine; %57,4'ü de kolistine duyarlı bulunmuştur (Tablo 8). Her iki antibiyotiğe birden duyarlı izolatların oranı %21,3 iken; fosfomisin ya da kolistinden en az birine duyarlı izolatların oranı %78,7'dir. Ülkemizde yapılan sınırlı sayıda çalışmada karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da fosfomisine duyarlılık oranlarının %32,6 ile %69,4 arasında değiştiği bildirilmektedir<sup>108,109,110</sup>. Dünyanın farklı bölgelerinden yapılan çalışmalarda ise bu oranlar genellikle %48 ile %80 arasında bildirilmiştir<sup>93 - 96</sup>. Kolistin için ise 2016 yılında yayınlanan ECDC raporuna göre *K. pneumoniae*'daki duyarlılık oranı %91,5'dur<sup>115</sup>. Ülkemizde

yapılan çok merkezli bir çalışmaya göre ise 2019 yılında bu oran 71,6 olarak bildirilmiştir<sup>116</sup>. Fosfomisin MİK değerlerini dikkate aldığımızda MİK<sub>50</sub> (64 µg/mL) ve MİK<sub>90</sub> (512 µg/mL) değerlerinin, klinik sınır değerin üzerinde bulunması ve fosfomisine duyarlı bulunan izolatlarda MİK değerlerinin 16 µg/mL ve 32 µg/mL’de dağılım göstermesi, yakın gelecekte fosfomisine direncin de bir sorun olarak karşımıza çıkacağını düşündürmektedir (Tablo 8) (Şekil 16).

EUCAST v.12.0 kılavuzuna göre *Enterobacterales* izolatlarında 32 µg/mL ve altında olan değerler duyarlı kabul edilmektedir. Bununla birlikte EUCAST’ın konsültasyon sayfasında güncel veriler tartışmaya açılmıştır. *E. coli* için ECOFF (epidemiological cutt-off value; epidemiyolojik eşik değer) dağılımına göre sokak tipi bakterilerin ≤ 4 µg/mL MİK’e sahip olmaları ve MİK’i 8 olan suşlarda tedavi başarısının olması nedeniyle klinik sınır değerin güncellenmesi; 8 µg/mL ve altında bulunan değerlerin duyarlı olarak kabul edilmesi görüşündedir. *K. pneumoniae* izolatları içinse genellikle ÇİD izolatlarında kombinasyon tedavisinin bir parçası olması ve ECOFF’u belirleyecek yeterli verinin bulunmaması sonucu klinik sınır değerin belirlenmesi zorlaşmaktadır. Bu durum diğer *Enterobacterales* izolatları için incelendiğinde klinik sınır değeri veya ECOFF’u belirlemek için hem klinik hem de mikrobiyolojik yeterli yetersiz gözükmektedir. Tüm bu nedenlerin sonucu olarak *Enterobacterales* izolatlarında klinik sınır değerlerin yakın gelecekte güncellenmesi beklenmektedir<sup>117</sup>.

İzolatlarımızın kolistin MİK değerlerini dikkate alacak olursak kolistine duyarlı izolatların %34,4’ünün MİK’i 0,5 µg/mL ve altındadır ve MİK<sub>50</sub> değeri, 2 µg/mL olup klinik sınır değeri ile aynıdır. Bu sonuçlar; kolistinin, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatları üzerinde *in vitro* olarak fosfomisinle kıyaslandığında daha etkili olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda izolatlarımızda, fosfomisin, kolistin ve karbapenem direncinden sorumlu olması muhtemel sıklıkla bildirilen direnç determinantlarını PZR yöntemiyle araştırdık. ***i) fosA3 ve fosC2 genleri varlığı***; Çalışmamızda 61 izolatımızın hiçbirinde *fosA3* ve *fosC2* geni saptamadık. *fosA3* geni, literatürde özellikle Asya bölgesinde

*Enterobacterales* izolatlarında fosfomisin direncinden sorumlu en sıklıkla bildirilen mekanizma olmasına rağmen çalışmamızda hiçbir izolatımızda bu genin saptanmaması ilginç bir sonucumuzdu<sup>118,119,120</sup>. Ülkemizde bu konuyla ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır; idrar örneklerinden izole edilen 185 *Enterobacterales* izolatının, *Klebsiella* spp. (%58,4), *Enterobacter* spp. (%12,9), *E. coli* (%10,8), *M. morganii* (%8,6), *P. rettgeri* (%3,2), *P. mirabilis* (%2,7), incelendiği bir çalışmada 2 (%1,1) izolatta plazmidik *fosA3* saptanmıştır; bu izolatlardan biri *E. coli* iken diğeri *M. morganii*'dir<sup>121</sup>. Ülkemizden bildirilen diğeri bir çalışmada ise *fosA3* ve *bla<sub>CTX-M</sub>* birlikteliği gözlenen *K. pneumoniae* suşunun saptanması dünyada artan *bla<sub>CTX-M</sub>* üreten *Enterobacterales* izolatlarının bir sonucu olarak yakın gelecekte fosfomisin direncinde artış beklenebileceğini öngörmektedir<sup>122</sup>. Yukarıda da belirttiğimiz gibi *fosA3* aynı ya da bir konjuge plazmidde *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>SFO-1</sub>*, *bla<sub>AmpC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *gyrA*, *parC*, *parE*, *sul1*, *sul2*, *strA*, *strB*, *aac(6)-Ib*, *aadA5*, *aphA6*, *tetA*, *mphA*, *floR*, *dfrA7*, *rmtB* ve *merA* genleri ile birlikteliği bildirilmiştir; diğeri genlerle birlikte bulunmaları, ÇİD suşlarının ortaya çıkışını kötüleştirmektedir<sup>75</sup>. *fosC2* de diğeri *fosA* alt tipleri gibi esas olarak *Enterobacterales* izolatlarında gösterilmiştir<sup>118</sup>. Ancak yapılan çalışmalar *fosA3* kadar yaygın olmadığını ileri sürülmekte ve ülkemizde de yapılan sınırlı sayıda çalışmada saptanmamıştır<sup>121,122</sup>. Bu sonuçları dikkate aldığımızda izolatlarımızın fosfomisin direncinden, daha önce yukarıda belirttiğimiz diğeri mekanizmaların birinin veya birkaçının sorumlu olabileceğini söyleyebiliriz. Bunun için çalışmamızın kapsamının genişletilmesine ihtiyaç vardır. **ii) Plazmidik *mcr1-5* genlerinin varlığı;** Çalışmamızda kazanılmış kolistin direncine yol açan plazmidik direnç genlerinden *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* ve *mcr-5* araştırılmış ve izolatlarımızın hiçbirisinde saptanmamıştır. On farklı varyantı olan plazmidik *mcr* (*mcr1-10*) şu ana kadar 61 ülkeden bildirilmiş olup gram-negatifler arasında hızla yayılmaktadır. Bu da yakın gelecekte küresel bir halk sağlığı sorunu olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir<sup>123,124</sup>. *mcr-1*'in kolistin direncinden sorumlu aktarılabilir plazmidik bir gen olduğu ilk kez 2015 yılında gösterilmiştir. Ülkemizde ise ilk saptanan *mcr-1* geni 2018 yılında bir *E. coli*

izolatındadır<sup>125</sup>. Bu kapsamda yapılan sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte 58 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatında yapılan bir çalışmada kolistin direnç oranı %59,7 olarak bulunurken, 3 izolatta *mcr-1* saptanmış olup bu izolatlarda *bla<sub>OXA-48</sub>* birlikteliği bulunmaktaydı. Ayrıca bu izolatlardan 1 tanesinde *bla<sub>OXA-51</sub>* saptanmıştır<sup>126</sup>. Yine ülkemizde yapılan bir başka çalışmada kolistine dirençli bulunan 40 *Enterobacterales* izolatında *mcr1-5* genleri bakılmış olup 2 *E.coli* izolatında *mcr-1* bulunmuştur. Bilindiği üzere kolistin direncinden sorumlu olduğu bildirilen ve LPS modifikasyonuna sebep olan kromozomal mekanizmalar da vardır. Bunlar lipid A'nın 4' veya 1' konumuna 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz, fosfoetanolin veya galaktozamin eklenmesi ile LPS'in anyonik yükünün azaltılması sonucu katyonik kolistin bağlanmasının engellenmesi ile kolistin direncine sebep olurlar. Muhtemelen kolistin dirençli izolatlarımızda bu mekanizmalardan biri veya birkaçı dirençten sorumludur. **iii) Karbapenem direnç genlerinin varlığı;** Çalışmamızdaki izolatlarda *Enterobacterales* üyelerinde yaygın olarak bulunan karbapenemaz genlerini araştırdık. Elli izolatta (%82) *bla<sub>OXA-48</sub>*, 6 izolatta (%9,9) *bla<sub>NDM</sub>* saptandı ve bu izolatların 4 tanesinde (%6,6) *bla<sub>OXA-48</sub>* ve *bla<sub>NDM</sub>* birlikteliği bulunmaktaydı. Bu sonuçlar, ilk defa 2001 yılında İstanbul'da bir *K. pneumoniae* izolatında saptanan *bla<sub>OXA-48</sub>*'nin halen ülkemizdeki en yaygın karbapenemaz türü olduğunu doğrulamaktadır<sup>127</sup>. Bunun yanı sıra *bla<sub>KPC</sub>*, ülkemizde ilk defa 2011 yılında saptanmış olup, bizim çalışmamızda %13,1 olarak bulunmuştur. 2019 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada ise ülkemizdeki *bla<sub>KPC</sub>* oranı %16,4 olarak bildirilmiştir<sup>116</sup>. Bu orandaki artış dikkat çekici olup *bla<sub>KPC</sub>*'nin ülkemizde yayıldığını göstermektedir. Ülkemizde European Survey on Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) projesi kapsamında 2014 yılında değerlendirilen 124 *K. pneumoniae* izolatlarındaki sonuçlara bakıldığında izolatların %83,1'inde *bla<sub>OXA-48</sub>*; %6,5'inde *bla<sub>NDM</sub>*; %2,4'ünde; *bla<sub>IMP</sub>* %1,6'sında; *bla<sub>VIM</sub>* %3,2'sinde bulunurken, yedi izolatta iki enzim bir arada (*bla<sub>OXA-48</sub>* ile *bla<sub>NDM</sub>* %2,4; *bla<sub>OXA-48</sub>* ile *bla<sub>VIM</sub>* %2,4; *bla<sub>VIM</sub>* ile *bla<sub>NDM</sub>* %0,8) olarak tespit edilmiş olup *bla<sub>KPC</sub>* hiçbir izolatta saptanmamıştır. Ülkemizde 2019 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada ise *E.coli* ve *K.pneumoniae*

izolatları incelenmiş olup genotipik olarak toplam 207 izolatın karbapenemaz direnç genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Tek tip karbapenemaz geni pozitifliği saptanan izolatların oranları sırasıyla *bla*<sub>OXA-48</sub> %52,2; *bla*<sub>KPC</sub> %16,4; *bla*<sub>NDM</sub> %15 ve *bla*<sub>VIM</sub> %0,5 olarak bulunmuşken iki gen pozitifliği saptanan izolatların oranları sırasıyla *bla*<sub>OXA-48</sub> ile *bla*<sub>NDM</sub> %12,6; *bla*<sub>KPC</sub> ile *bla*<sub>NDM</sub> %2,8 ve *bla*<sub>OXA-48</sub> ile *bla*<sub>VIM</sub> birlikteliği %0,5 olarak tespit edilmiştir.

Karbapenem direncinin altında yatan spesifik mekanizmaların anlaşılması ve yerel epidemiyolojinin izlenmesi bu enfeksiyonların etkin tedavisi için gereklidir. Örneğin, seftazidim-avibaktamın özellikle *bla*<sub>KPC</sub> ve *bla*<sub>OXA-48</sub> pozitif izolatlar üzerinde etkinliğinin yaklaşık %98 olduğu bildirilmesine karşın, *bla*<sub>VIM</sub> ve *bla*<sub>NDM</sub> gibi B sınıfı karbapenemazlar üzerinde etkinliği bulunmamaktadır<sup>128</sup>. Karbapenem direncinde en sık karşılaştığımız mekanizma; Ambler sınıf A (örn. *bla*<sub>KPC</sub>), sınıf B (örn. *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> ve *bla*<sub>NDM</sub>) ve sınıf D beta-laktamazlar (*bla*<sub>OXA-48</sub> ve varyantları) dahil olmak üzere çeşitli karbapenemazların ekspresyonudur. Enzimatik olmayan karbapenem direnç mekanizmaları ise porin kodlayan genlerin ekspresyonunun kaybını, kromozomal olarak kodlanmış porin genlerindeki (OprD gibi) mutasyonları ve atım pompalarını kodlayan genlerin (MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ gibi) aşırı ekspresyonunu içermektedir<sup>65</sup>.

## **5.2. Fosfomisin, Kolistin ve Karbapenem Duyarlılığını Saptamada VITEK® 2 Otomatize Sistemin Performansı**

Fosfomisin ve kolistinin, *K. pneumoniae* üzerindeki *in vitro* etkinliğini saptamak üzere EUCAST'ın önerdiği standart yöntemler sırasıyla agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyondur<sup>89</sup>. Yapılan çalışmalar otomatize duyarlılık test sistemleriyle elde edilen sonuçların, kategorik uyumsuzluk gösterdiğini, küçük hata, büyük hata ve çok büyük hata oranlarının yüksek olduğunu ortaya koymaktadır<sup>87,129</sup>. Bilindiği üzere yeni bir yöntemin, standart yöntemle alternatif olabilmesi için kategorik uyum oranının en az %90 olması; küçük

hata oranının %10, büyük hata oranının %3 ve çok büyük hata oranlarının %1,5'in altında olması gerekmektedir<sup>130</sup>. Bizim çalışmamızda agar dilüsyonla karşılaştırıldığında VITEK® 2'de fosfomisin için kategorik uyum oranı %70,5; büyük hata oranı %1,6 ve çok büyük hata oranı %27,9 olarak bulunmuştur (Tablo 10) (Şekil 17). Bu sonuçlar literatürle birlikte dikkate alındığında VITEK® 2'nin fosfomisin duyarlılığını saptamada kullanılmasının uygun olmadığını göstermektedir. Benzer bir çalışmada VITEK® 2'nin agarda dilüsyona göre kategorik uyumu %94,5; büyük hata oranı %4,0 ve çok büyük hata oranı %16,0 olarak bulunmuştur<sup>129</sup>. Ancak çalışmamızda VITEK® 2 ile dirençli bulunan 19 izolatın 18 tanesinin standart yöntemle de fosfomisine dirençli olarak bulunması nedeniyle, agar dilüsyonun çalışmadığı durumlarda VITEK® 2 otomatize sistemiyle dirençli bulunan sonuçların raporlanabileceği öngörülmektedir.

Kolistin duyarlılığını saptama yöntemi dikkate alındığında, standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi rutin laboratuvarlarda çalışması zahmetli bir yöntemdir. Çalışmamızda VITEK® 2'nin kolistin performansını incelediğimizde fosfomisine benzer şekilde hata oranı çok yüksek bulunmuştur. Kategorik uyum oranı %83,6; büyük hata oranı %4,9; çok büyük hata oranı %11,5'tir (Tablo 10) (Şekil 18). Bir başka çalışmada da 245 *K. pneumoniae* izolatı değerlendirilmiş olup bu değerler sırasıyla %86,1; %3,5 ve %28,4 bulunmuştur<sup>131</sup>. Çok büyük hata oranında görülen bu yüksek değerler VITEK® 2'nin kolistin için sıvı mikrodilüsyon yöntemine alternatif olmadığını ve standart yöntemle kolistin duyarlılığının saptanması gerektiğini göstermektedir.

Karbapenem duyarlılığına gelince, standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında VITEK® 2'de meropenem için kategorik uyum oranı %95,1; küçük hata oranı %4,9 olarak bulunmuş olup büyük hata ve çok büyük hataya saptanmamıştır (Tablo 10) (Şekil 19). Çalışmamızda meropenem için 'duyarlı' kategorisinde izolat bulunmaması nedeniyle çok büyük hatanın saptanamaması olasıdır. Bu çalışmamızın kısıtlayıcı yanı olmakla beraber elde ettiğimiz sonuçlar VITEK® 2 ile karbapenem

dirençli bulunan *K. pneumoniae* izolatarında güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

### **5.3. Fosfomisin Duyarlılığını Saptamada Sıvı Disk Elüsyon Alternatif Olabilir Mi?**

Standart agar dilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında sıvı disk elüsyon yönteminde fosfomisin için kategorik uyum oranı %63,9; büyük hata oranı %32,8 ve çok büyük hata oranı %3,3 olarak bulundu (Tablo 10) (Şekil 20). Ayrıca, kontrol izolatı olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922'nin MİK değeri EUCAST v.12.0 önerileri doğrultusunda 0,5 µg/mL ile 2 µg/mL arasında bulunması gerekirken; sıvı disk elüsyon testine göre >2 µg/mL olarak bulundu. Kategorik uyumsuzluk ve hata oranlarının yüksekliği ile kontrol izolatında disk elüsyonla elde edilen fosfomisin MİK değerinin beklenen aralıkta olmaması disk elüsyon yönteminin fosfomisin duyarlılığını saptamada kullanılabileceğini ileri sürmek mümkün değildir. Çalışmamızda testin performansının değerlendirilmesinde kullanılan izolatların fosfomisin MİK değerlerinin yüksek oluşu çalışmamızın kısıtlayıcı tarafıdır ve bu konuda yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇ

*K. pneumoniae*'nin antimikrobiyal direnci günümüzde global bir sorundur ve her geçen gün daha fazla rapor edilmektedir. Bu enfeksiyonlarla mücadelede kullanılabilecek antiyibotikler sınırlıdır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; kolistin, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatları üzerinde *in vitro* olarak fosfomisinle kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmekle beraber duyarlılık çalışılması şartıyla fosfomisin ve kolistin bu izolatlarla mücadelede kullanılabileceği görüşündeyiz. VITEK® 2 otomatize sistemin rutin laboratuvarlarda kullanımı daha kolay olmakla birlikte fosfomisin ve kolistin duyarlılığının belirlenmesinde performansı düşüktür. Bu antibiyotiklerin duyarlılıklarının belirlenmesinde standart yöntemlerle, fosfomisin için agar dilüsyon ve kolistin için sıvı mikrodilüsyon, çalışılması gereklidir. Ayrıca çalışmamız sonuçlarına göre sıvı disk elüsyon testinin fosfomisin duyarlılığını belirlemede yetersiz kaldığı görülmektedir.

Çalışmamız sonuçlarına göre *bla<sub>OXA</sub>*'in halen ülkemizdeki en yaygın karbapenemaz türü olduğunu ve *bla<sub>KPC</sub>*'nin ülkemizde hızla yayıldığını söylebiliriz. Fosfomisin direnç genlerinden plazmidik *fosA3* ve *fosC2* ile kolistin direncinden sorumlu plazmidik *mcr1-5*'in izolatlarımızda saptanmamış olması nedeniyle bu antibiyotiklere dirençten sorumlu olabilecek diğer mekanizmaların birinin veya birkaçının dirençten sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızın kapsamının genişletilmesi gereklidir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318-327. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
2. Humphries RM, Hindler JA, Epton E, et al. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Detection Practices in California: What Are We Missing? *Clinical Infectious Diseases*. 2018;66(7):1061-1067. doi:10.1093/cid/cix942
3. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Reviews*. 2018;31(2):e00079-17, /cmr/31/2/e00079-17.atom. doi:10.1128/CMR.00079-17
4. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Jones & Bartlett Learning; 2020.
5. Trevisan, V. *Sul Micrococco Della Rabbia e Sulla Possibilita Di Riconoscere Durante Il Periode d'incubazione, Dall'essame Del Sangue Della Persona Moricata, Se Ha Contratta l'infezione Rabbica*. Vol Rend Ist Lombardo Accad Sci Lett Sez (ser 2).; 1887.
6. Janda JM, Abbott SL. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical Microbiology Reviews*. 34(2):e00174-20. doi:10.1128/CMR.00174-20
7. Enterobacteriaceae Taxonomy. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=543>
8. Ewing WH. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th edition. *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae 4th edition*. Published online 1986. Accessed March 23, 2022. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19872036986>
9. 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
10. Klebsiella/Raoultella group Taxonomy. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=2890311&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
11. Gillespie S, Hawkey PM. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. John Wiley & Sons; 2006.
12. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:4. doi:10.3389/fcimb.2018.00004
13. Et P, Ga S, Ls T, Gl D. Klebsiella pneumoniae: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *The Pediatric infectious disease journal*. 2017;36(10). doi:10.1097/INF.0000000000001675
14. Paczosa MK, Mecsas 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

15. Hua KF, Yang FL, Chiu HW, et al. Capsular Polysaccharide Is Involved in NLRP3 Inflammasome Activation by *Klebsiella pneumoniae* Serotype K1. *Infect Immun*. 2015;83(9):3396-3409. doi:10.1128/IAI.00125-15
16. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013;4(2):107-118. doi:10.4161/viru.22718
17. Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, Uchida K, Tsujimoto S, Yamaguchi K. Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2000;49(11):1003-1010. doi:10.1099/0022-1317-49-11-1003
18. Shu HY, Fung CP, Liu YM, et al. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology*. 155(12):4170-4183. doi:10.1099/mic.0.029017-0
19. Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence*. 2017;8(7):1111-1123. doi:10.1080/21505594.2017.1317412
20. Diago-Navarro E, Chen L, Passet V, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *J Infect Dis*. 2014;210(5):803-813. doi:10.1093/infdis/jiu157
21. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, et al. wzi Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol*. 2013;51(12):4073-4078. doi:10.1128/JCM.01924-13
22. Cryz SJ, Mortimer PM, Mansfield V, Germanier R. Seroepidemiology of *Klebsiella* bacteremic isolates and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol*. 1986;23(4):687-690.
23. Sahly H, Aucken H, Benedi VJ, et al. Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(1):20-26. doi:10.1007/s10096-003-1047-7
24. Sialic Acids - PubMed. Accessed March 24, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20301246/>
25. Capsular Serotype K1 or K2, Rather than magA and rmpA, Is a Major Virulence Determinant for *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess in Singapore and Taiwan | Journal of Clinical Microbiology. Accessed March 24, 2022. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01150-06>
26. Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedi VJ, Tomás JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infection and Immunity*. 1992;60(6):2529-2535. doi:10.1128/iai.60.6.2529-2535.1992
27. Merino S, Altarriba M, Izquierdo L, Nogueras MM, Regué M, Tomás JM. Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* O5 wb gene cluster and its role in pathogenesis. *Infect Immun*. 2000;68(5):2435-2440. doi:10.1128/IAI.68.5.2435-2440.2000
28. Raetz CRH, Guan Z, Ingram BO, et al. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J Lipid Res*. 2009;50(Suppl):S103-S108. doi:10.1194/jlr.R800060-JLR200
29. Hansen DS, Mestre F, Alberti S, et al. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J Clin Microbiol*.

- 1999;37(1):56-62. doi:10.1128/JCM.37.1.56-62.1999
30. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(3):413-451. doi:10.1128/MMBR.00012-07
  31. Hsieh PF, Liu JY, Pan YJ, et al. Klebsiella pneumoniae peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation. *J Infect Dis*. 2013;208(10):1580-1589. doi:10.1093/infdis/jit384
  32. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, et al. Klebsiella pneumoniae Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(4):1485-1493. doi:10.1128/AAC.01275-10
  33. Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, Tsai SF, Wang JT. Serum-Induced Iron-Acquisition Systems and TonB Contribute to Virulence in Klebsiella pneumoniae Causing Primary Pyogenic Liver Abscess. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;197(12):1717-1727. doi:10.1086/588383
  34. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):322-332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
  35. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JDD, Laupland KB. Incidence, risk factors, and outcomes of Klebsiella pneumoniae bacteremia. *Am J Med*. 2009;122(9):866-873. doi:10.1016/j.amjmed.2009.03.034
  36. Tsay RW, Siu LK, Fung CP, Chang FY. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial Klebsiella pneumoniae infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med*. 2002;162(9):1021-1027. doi:10.1001/archinte.162.9.1021
  37. Bagley ST. Habitat association of Klebsiella species. *Infect Control*. 1985;6(2):52-58. doi:10.1017/s0195941700062603
  38. 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. doi:10.15620/cdc:82532
  39. Jiao Y, Qin Y, Liu J, et al. Risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study. *Pathog Glob Health*. 2015;109(2):68-74. doi:10.1179/2047773215Y.0000000004
  40. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis JS. Extended-spectrum beta-lactamases: epidemiology, detection, and treatment. *Pharmacotherapy*. 2001;21(8):920-928. doi:10.1592/phco.21.11.920.34529
  41. Gu D, Dong N, Zheng Z, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(1):37-46. doi:10.1016/S1473-3099(17)30489-9
  42. *Transmission of Pathogens by Hands*. World Health Organization; 2009. Accessed April 24, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144014/>
  43. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A, Graziano E, Russo A. Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(10):749-761. doi:10.1080/14787210.2018.1522249
  44. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, et al. Infections caused by KPC-

- producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(7):2133-2143. doi:10.1093/jac/dkv086
45. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(1):18. doi:10.1186/s12941-017-0191-3
  46. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(4):391-400. doi:10.1016/S1473-3099(18)30099-9
  47. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):862-872. doi:10.1111/1469-0691.12697
  48. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2108-2113. doi:10.1128/AAC.06268-11
  49. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):1798-1803. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03514.x
  50. Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(2):159-177. doi:10.1586/eri.12.162
  51. Gutiérrez-Gutiérrez B, Salamanca E, de Cueto M, et al. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (INCREMENT): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(7):726-734. doi:10.1016/S1473-3099(17)30228-1
  52. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.* 2017;131:185-195. doi:10.1016/j.ejmech.2017.03.022
  53. Georgopapadakou NH, Liu FY. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;18(1):148-157. doi:10.1128/AAC.18.1.148
  54. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):4943-4960. doi:10.1128/AAC.00296-11
  55. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo).* 1979;32(1):1-12. doi:10.7164/antibiotics.32.1
  56. Barza M. Imipenem: first of a new class of beta-lactam antibiotics. *Ann Intern Med.* 1985;103(4):552-560. doi:10.7326/0003-4819-103-4-552
  57. Cielecka-Piontek J, Zajac M, Jelińska A. A comparison of the stability of ertapenem and meropenem in pharmaceutical preparations in solid state. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46(1):52-57. doi:10.1016/j.jpba.2007.08.024
  58. Prescott WA, Gentile AE, Nagel JL, Pettit RS. Continuous-infusion antipseudomonal Beta-lactam therapy in patients with cystic fibrosis. *P T.* 2011;36(11):723-763.

59. 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
60. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
61. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(11):4783-4788. doi:10.1128/AAC.00574-09
62. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(4):593-656. doi:10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003
63. Yamachika S, Sugihara C, Kamai Y, Yamashita M. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 3):429-436. doi:10.1099/jmm.0.051631-0
64. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med*. 2017;37(2):303-315. doi:10.1016/j.cll.2017.01.005
65. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S521-S528. doi:10.1093/cid/ciz824
66. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(2):321-347. doi:10.1128/CMR.00068-15
67. Eschenburg S, Priestman M, Schönbrunn E. Evidence That the Fosfomycin Target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) Is Essential for Product Release. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(5):3757-3763. doi:10.1074/jbc.M411325200
68. Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2013;2(2):217-236. doi:10.3390/antibiotics2020217
69. Carlone NA, Borsotto M, Cuffini AM, Savoia D. Effect of fosfomycin trometamol on bacterial adhesion in comparison with other chemotherapeutic agents. *Eur Urol*. 1987;13 Suppl 1:86-91. doi:10.1159/000472869
70. Yokota S ichi, Okabayashi T, Yoto Y, Hori T, Tsutsumi H, Fujii N. Fosfomycin suppresses RS-virus-induced *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* adhesion to respiratory epithelial cells via the platelet-activating factor receptor. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;310(1):84-90. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02049.x
71. Sauermann R, Marsik C, Steiner I, et al. Immunomodulatory Effects of Fosfomycin in Experimental Human Endotoxemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(5):1879-1881. doi:10.1128/AAC.00914-06
72. Morikawa K, Zhang J, Nonaka M, Morikawa S. Modulatory effect of macrolide antibiotics on the Th1- and Th2-type cytokine production. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;19(1):53-59. doi:10.1016/s0924-8579(01)00457-5
73. Tullio V, Cuffini AM, Banche G, et al. Role of fosfomycin tromethamine in modulating non-specific defence mechanisms in chronic uremic patients towards ESBL-producing *Escherichia coli*. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008;21(1):153-160. doi:10.1177/039463200802100117
74. Oliva A, Furustrand Tabin U, Maiolo EM, Jeddari S, Bétrisey B, Trampuz A. Activities of Fosfomycin and Rifampin on Planktonic and Adherent *Enterococcus faecalis* Strains in an Experimental Foreign-Body Infection Model. *Antimicrob*

- Agents Chemother.* 2014;58(3):1284-1293. doi:10.1128/AAC.02583-12
75. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clinical Microbiology Reviews.* 2016;29(2):321-347. doi:10.1128/CMR.00068-15
  76. Pontikis K, Karaikos I, Bastani S, et al. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43(1):52-59. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.09.010
  77. Falagas ME, Athanasiaki F, Voulgaris GL, Triarides NA, Vardakas KZ. Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2019;53(1):22-28. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.09.013
  78. Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T, Bhandu T, Pathania R. Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-AbaF. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):68-74. doi:10.1093/jac/dkw382
  79. Truong-Bolduc QC, Wang Y, Hooper DC. Tet38 Efflux Pump Contributes to Fosfomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(8):e00927-18. doi:10.1128/AAC.00927-18
  80. Venkateswaran PS, Wu HC. Isolation and characterization of a phosphonomycin-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1972;110(3):935-944. doi:10.1128/jb.110.3.935-944.1972
  81. Arca P, Rico M, Braña AF, Villar CJ, Hardisson C, Suárez JE. Formation of an adduct between fosfomycin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(10):1552-1556. doi:10.1128/AAC.32.10.1552
  82. Poirel L, Vuillemin X, Kieffer N, Mueller L, Descombes MC, Nordmann P. Identification of FosA8, a Plasmid-Encoded Fosfomycin Resistance Determinant from *Escherichia coli*, and Its Origin in *Leclercia adecarboxylata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(11):e01403-19. doi:10.1128/AAC.01403-19
  83. Upret G, Luther A, Obrecht D, Ermert P. Emerging peptide antibiotics with therapeutic potential. *Med Drug Discov.* 2021;9:100078. doi:10.1016/j.medidd.2020.100078
  84. El-Sayed Ahmed MAEG, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):868-885. doi:10.1080/22221751.2020.1754133
  85. Sabnis A, Hagart KL, Klöckner A, et al. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. Cole PA, Gao L, van Schaik W, eds. *eLife.* 2021;10:e65836. doi:10.7554/eLife.65836
  86. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(11):3087-3095. doi:10.1093/jac/dkaa205
  87. Aprile A, Scalia G, Stefani S, Mezzatesta ML. In vitro fosfomycin study on concordance of susceptibility testing methods against ESBL and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;23:286-289. doi:10.1016/j.jgar.2020.09.022
  88. van Mens SP, ten Doesschate T, Kluytmans-van den Bergh MFQ, et al. Fosfomycin Etest for Enterobacteriaceae: Interobserver and interlaboratory

- agreement. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018;52(5):678-681. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.06.014
89. EUCAST: EUCAST. Accessed May 25, 2022. <https://www.eucast.org/>
90. CLSI Publishes M100—Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition. Clinical & Laboratory Standards Institute. Accessed June 1, 2022. <https://clsi.org/about/press-releases/clsi-publishes-m100-performance-standards-for-antimicrobial-susceptibility-testing-31st-edition/>
91. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMGA, Diederens BMW, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ. Comparative Evaluation of the VITEK 2, Disk Diffusion, Etest, Broth Microdilution, and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in Clinical Isolates, Including Heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3726-3730. doi:10.1128/AAC.01406-06
92. Singhal L, Sharma M, Verma S, et al. Comparative Evaluation of Broth Microdilution with Polystyrene and Glass-Coated Plates, Agar Dilution, E-Test, Vitek, and Disk Diffusion for Susceptibility Testing of Colistin and Polymyxin B on Carbapenem-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*. 2018;24(8):1082-1088. doi:10.1089/mdr.2017.0251
93. Bulik CC, Fauntleroy KA, Jenkins SG, et al. Comparison of Meropenem MICs and Susceptibilities for Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Various Testing Methods. *J Clin Microbiol*. 2010;48(7):2402-2406. doi:10.1128/JCM.00267-10
94. Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing of Carbapenems: Multicenter Validity Testing and Accuracy Levels of Five Antimicrobial Test Methods for Detecting Resistance in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):351-358. doi:10.1128/JCM.41.1.351-358.2003
95. Sağiroğlu P, Hasdemir U, Altınkanat Gelmez G, Aksu B, Karatuna O, Söyletir G. Performance of “RESIST-3 O.K.N. K-SeT” immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Braz J Microbiol*. 2018;49(4):885-890. doi:10.1016/j.bjm.2018.02.002
96. YELİZ TANRIVERDİ ÇAYCI KH. *Fosfomisin Dirençli Enterobacteriaceae İzolatlarında Fosfomisin Direncinin Genotipik Olarak Araştırılması*. Tez. Ondokuz Mayıs Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı; 2018.
97. Li Y, Zheng B, Li Y, Zhu S, Xue F, Liu J. Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Fosfomycin Resistance in Clinical *Escherichia coli* Isolates in Mainland China. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135269. doi:10.1371/journal.pone.0135269
98. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, et al. Emergence of OXA-48 and OXA-181 Carbapenemases among Enterobacteriaceae in South Africa and Evidence of In Vivo Selection of Colistin Resistance as a Consequence of Selective Decontamination of the Gastrointestinal Tract. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):369-372. doi:10.1128/JCM.02234-12
99. Paul D, Bhattacharjee A, Bhattacharjee D, Dhar D, Maurya AP, Chakravarty A. Transcriptional analysis of bla<sub>NDM-1</sub> and copy number alteration under carbapenem stress. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2017;6(1):26.

doi:10.1186/s13756-017-0183-2

100. Mosca A, Miragliotta L, Del Prete R, et al. Rapid and sensitive detection of blaKPC gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. *Springerplus*. 2013;2:31. doi:10.1186/2193-1801-2-31
101. Wang Y, Wang X, Schwarz S, et al. IMP-45-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* of canine origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(9):2579-2581. doi:10.1093/jac/dku133
102. Fallah F, Borhan RS, Hashemi A. Detection of bla(IMP) and bla(VIM) metallo- $\beta$ -lactamases genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Int J Burns Trauma*. 2013;3(2):122-124.
103. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveill*. 2018;23(6). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672
104. Tacconelli E. GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. :7.
105. Lai CC, Chen SY, Ko WC, Hsueh PR. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *Int J Antimicrob Agents*. 2021;57(4):106324. doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106324
106. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2020. Accessed May 1, 2022. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2020/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2020>
107. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control. Accessed April 25, 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>
108. Zarakolu P, Eser ÖK, Otlı B, et al. In-vitro activity of fosfomycin against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates and frequency of OXA-48, NDM, KPC, VIM, IMP types of carbapenemases in the carbapenem-resistant groups. *J Chemother*. Published online September 8, 2021:1-6. doi:10.1080/1120009X.2021.1963618
109. Süzük Yıldız S, Kaşkatepe B, Şimşek H, Sarıgüzel FM. High rate of colistin and fosfomycin resistance among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2019;66(1):103-112. doi:10.1556/030.65.2018.042
110. Altinkanat Gelmez G, Can B, Ertürk Sengel B, Korten V, Soyletir G. Determination of fosfomycin susceptibility in carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains isolated prior to clinical use of the intravenous formulation in Turkey. *Marmara Medical Journal*. Published online May 25, 2021. doi:10.5472/marumj.942784
111. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011;37(5):415-419. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012
112. Bielen L, Likić R, Erdeljić V, et al. Activity of fosfomycin against

- nosocomial multiresistant bacterial pathogens from Croatia: a multicentric study. *Croat Med J.* 2018;59(2):56-64. doi:10.3325/cmj.2018.59.56
113. Kaase M, Szabados F, Anders A, Gatermann SG. Fosfomycin Susceptibility in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae from Germany. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):1893-1897. doi:10.1128/JCM.03484-13
114. Kopacz J, Mariano N, Colon-Urban R, et al. Identification of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Positive *Klebsiella pneumoniae* Urinary Tract Isolates Harboring KPC and CTX-M  $\beta$ -Lactamases in Nonhospitalized Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(10):5166-5169. doi:10.1128/AAC.00043-13
115. European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe: Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS Net) 2016.* Publications Office; 2017. Accessed May 1, 2022. <https://data.europa.eu/doi/10.2900/296939>
116. Yildiz SS, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, et al. Türkiye’de 2019 Yılı İçinde İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Epidemiyolojisi. *MİKROBİYOLOJİ BÜLTENİ.* Published online 2019:16.
117. EUCAST General Consultation on Fosfomycin IV breakpoints. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Consultation/2022/EUCAST\\_General\\_Consultation\\_on\\_Fosfomycin\\_IV\\_final\\_\\_20220514.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/2022/EUCAST_General_Consultation_on_Fosfomycin_IV_final__20220514.pdf)
118. Update on fosfomycin-modified genes in Enterobacteriaceae | Elsevier Enhanced Reader. doi:10.1016/j.jmii.2017.10.006
119. Chen J, Wang D, Ding Y, Zhang L, Li X. Molecular Epidemiology of Plasmid-Mediated Fosfomycin Resistance Gene Determinants in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in China. :7.
120. Liu P, Chen S, Wu Z ying, Qi M, Li X yang, Liu C xia. Mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2020;22:238-243. doi:10.1016/j.jgar.2019.12.019
121. Hacıeminoğlu K. Fosfomisin dirençli enterobacteriaceae izolatlarında fosfomisin direncinin genotipik olarak araştırılması / Kübra Hacıeminoğlu ; Danışman Yeliz Tanrıverdi Çaycı. Published online 2018. Accessed April 28, 2022. <http://acikerisim.omu.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12712/29258>
122. Nigiz Ş, Hazırolan G, Köseoglu Eser Ö, Gür D. First Detection of *Klebsiella pneumoniae* Isolate Co-Harboring Fosfomycin Resistance Gene *fosA3* and *blactx-m* Among Gram Negative Urine Isolates in a Turkish Hospital. *Microb Drug Resist.* 2022;28(3):317-321. doi:10.1089/mdr.2021.0114
123. Hussein NH, AL-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD. Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol Biol Rep.* 2021;48(3):2897-2907. doi:10.1007/s11033-021-06307-y
124. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr*-1 to *mcr*-9. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(11):3087-3095. doi:10.1093/jac/dkaa205
125. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study - PubMed. Accessed May 4, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26603172/>
126. Arabacı Ç, Dal T, Başıyigit T, Genişel N, Durmaz R. Investigation of carbapenemase and *mcr*-1 genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 2019;13(06):504-509.

doi:10.3855/jidc.11048

127. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22. doi:10.1128/AAC.48.1.15-22.2004

128. Lagacé-Wiens P, Walkty A, Karlowsky JA. Ceftazidime–avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Core Evid*. 2014;9:13-25.

doi:10.2147/CE.S40698

129. van den Bijllaardt W, Schijffelen MJ, Bosboom RW, et al. Susceptibility of ESBL *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin in the Netherlands and comparison of several testing methods including Etest, MIC test strip, Vitek2, Phoenix and disc diffusion. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

2018;73(9):2380-2387. doi:10.1093/jac/dky214

130. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, et al. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4):e01934-17.

doi:10.1128/JCM.01934-17

131. Khurana S, Malhotra R, Mathur P. Evaluation of Vitek®2 performance for colistin susceptibility testing for Gram-negative isolates. *JAC Antimicrob Resist*.

2020;2(4):dlaa101. doi:10.1093/jacamr/dlaa101