



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE ESCHERİCHİA COLİ KLİNİK
İZOLATLARINDA İNTRAVENÖZ FOSFOMİSİN DİRENCİNİN
SAPTANMASI VE MEROPENEM, GENTAMİSİN, SEFTRİAKSON
ANTİBİYOTİKLERİ İLE SİNERJİST ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. HANDAN KANGÜL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR- 2022



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE ESCHERİCHİA COLİ KLİNİK
İZOLATLARINDA İNTRAVENÖZ FOSFOMİSİN DİRENCİNİN
SAPTANMASI VE MEROPENEM, GENTAMİSİN, SEFTRİAKSON
ANTİBİYOTİKLERİ İLE SİNERJİST ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. HANDAN KANGÜL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. MAHMUT METE

DİYARBAKIR- 2022

ÖNSÖZ

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından SBE.21.004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kasım, 2022

Handan KANGÜL

TEŞEKKÜR

Uzmanlık ihtisasım boyunca desteğini esirgemeyen ve bu tezin danışmanlığını yapan değerli hocam Prof. Dr. Mahmut METE' ye, eğitim ve tez çalışmam süresince her türlü desteğini hissettiren kıymetli ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT' a, ihtisas sürecimde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Tıbbi Mikrobiyoloji ABD' da görevli Prof. Dr. Selahattin ATMACA, Prof. Dr. Erdal ÖZBEK, Doç. Dr. Hakan TEMİZ hocalarıma, ihtisasım boyunca hem bir hoca hem bir abla olarak deneyimlerinden faydalandığım Dr. Öğretim Üyesi Nida ÖZCAN' a, Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Uzmanı Dr.Hüsniye ŞİMŞEK'e, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan canım annem, babam ve kardeşlerime, tüm tez sürecimde büyük emeği geçen ve desteğini esirgemeyen çok kıymetli eşime, bu süreci benimle birlikte yaşayan ilk göz ağrım biricik oğluma sevgi, saygı ve teşekkürlerimle...

ÖZET

Karbapenem dirençli *Enterobacterales* üyelerinde tedavi için kullanılabilecek antibiyotiklerin kısıtlı olması nedeniyle son dönemlerde kombinasyon tedavi rejimleri gündeme gelmiştir. Bu çalışmada karbapenem dirençli *Escherichia coli* izolatlarında agar dilüsyon yöntemi kullanılarak fosfomisine direnç oranları ile meropenem, gentamisin ve seftriakson antibiyotiklerinin kombinasyon etkileşimleri incelenmiştir. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına klinik ve yoğun bakımlarda yatan hastalardan gönderilen çeşitli örneklerden (idrar, kan, aspirat, yara, beyin omurilik sıvısı, endotrakeal aspirat) izole edilen karbapenem dirençli 60 adet *Escherichia coli* suşu çalışmamıza dahil edilmiştir.

Tür tanımlamaları için matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrofotometresi MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, ABD) kullanılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılık testleri ve karbapenem direnç durumu BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostics) ile çalışılmıştır. Karbapenem direncinin doğrulanması amacıyla ertapenem, imipenem ve meropenem disk difüzyon testleri kullanılmıştır.

Agar dilüsyon yöntemi ile suşların %76.6' sı fosfomisine, %61.6'sı meropeneme, %85' i gentamisine, %98.3' ü seftriaksona dirençli olarak saptanmıştır. İzolatların %35' i fosfomisin ve meropenem kombinasyonuna, %33.4' ü fosfomisin ve gentamisin kombinasyonuna, %1.7' si fosfomisin ve seftriakson kombinasyonuna karşı sinerjistik etkili olarak saptanmıştır. Yalnızca bir suшта fosfomisin ve meropenem kombinasyonuna karşı antagonist etki tespit edilmiştir.

Çalışmamızda meropenem ile gentamisin antibiyotiklerinin sinerji oranı yüksek saptanmıştır. Kombinasyon çalışmasında kullanılan antibiyotiklerin klinik olarak kombinasyon biçiminde kullanılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Agar Dilüsyon, *Escherichia coli*, Fosfomisin, Meropenem, Gentamisin, Seftriakson

ABSTRACT

Due to the limited use of antibiotics for the treatment of carbapenem resistant *Enterobacterales*, combination therapy regimens have recently come to the fore. In our study, fosfomycin resistance rates and combination interactions of meropenem, gentamicin and ceftriaxone antibiotics were investigated by using agar dilution method in carbapenem resistant *Escherichia coli* isolates. Sixty carbapenem-resistant *Escherichia coli* strains isolated from various samples (urine, blood, aspirate, wound, cerebrospinal fluid, endotracheal aspirate) sent to Dicle University Medical Faculty Hospitals Medical Microbiology Laboratory from patients in clinical and intensive care units were included in our study.

MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, ABD)was used for species identification. Antibiotic susceptibility tests and carbapenem resistance status of the strains were studied with BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostics). Ertapenem, imipenem and meropenem disc diffusion tests were used to confirm carbapenem resistance. By agar dilution method, %76.6 of the strains were resistant to fosfomycin, %61.6 to meropenem, %85 to gentamicin %, 98.3 to ceftriaxone. % 35 of the isolates were found to be synergistic in the fosfomycin and meropenem combination, %33.4 in the fosfomycin and gentamycin combination, and %1.7 in the fosfomycin and ceftriaxone combination. Antagonism was detected in the combination of fosfomycin-meropenem in only one strain.

In our study, the synergy rate of meropenem and gentamicin antibiotics was found to be high. More research is needed before the antibiotics used in the combination study can be used clinically in combination.

Keywords: Agar Dilution, *Escherichia coli*, Fosfomycin, Meropenem, Gentamicin, Ceftriaxone

İÇİNDEKİLER

Sayfalar

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER VE TABLOLAR	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enterobacterales Ailesinin Mikrobiyolojik Özellikleri	3
2.2. Escherichia coli	4
2.2.1. E. coli'nin mikrobiyolojik özellikleri	4
2.2.2.1. Gastroenterit	5
2.2.2.2. İdrar yolu enfeksiyonu	12
2.2.2.3. Sepsis ve neonatal menenjit	13
2.2.3. Escherichia coli' nin antibiyotik direnç mekanizmaları	14
2.2.3.1. GSBL (Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar).....	15
2.2.3.2. Karbapenem Dirençli Enterobacterales (KRE).....	16
2.2.3.3. Aminoglikozid direnci	17
2.2.3.4. Kinolon direnci.....	18
2.2.3.5.Tigesiklin direnci	18
2.2.3.6. Kolistin direnci.....	19
2.2.4. MDR E. coli izolatlarında tedavi seçenekleri	19
2.3. Fosfomisin	20
2.3.1. Fosfomisin' in kimyasal yapısı ve uygulanan formları	20
2.3.2.Etki Mekanizması	21
2.3.3. Farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler.....	22
2.3.4. Etki spektrumu.....	23
2.3.5. Fosfomisin duyarlılık testleri	23
2.3.6. Fosfomisin direnç mekanizmaları.....	23
2.3.6.1.Fosfomisin Taşıyıcı Sistemlerindeki Değişiklikler	24
2.3.6.2. MurA mutasyonları	24

2.3.6.3. Enzimatik inaktivasyon	24
2.3.7. Fosfomisin klinik kullanımı	25
2.3.7.1. İv fosfomisin	25
2.3.7.2. Oral fosfomisin	26
2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	26
2.4.1. Gradient difüzyon testi (Epsilometer test)	26
2.4.2. Disk difüzyon yöntemi	26
2.4.3. Sıvı makrodilüsyon yöntemi	27
2.4.4. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi	28
2.4.5. Agar dilüsyon yöntemi	28
2.4.6. Otomatize sistemler	28
2.5. Antibiyotik Kombinasyon Testleri	29
2.5.1. Zamana bağlı öldürme yöntemi	30
2.5.2. Dilüsyon yöntemleri (Checkerboard(CB))	30
2.5.2.1. Agar dilüsyon yöntemi	30
2.5.2.2. Mikrodilüsyon yöntemi	30
2.5.2.3. Makrodilüsyon yöntemi	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Gereçler	34
3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar	34
3.1.2. Kullanılan malzemeler ve besiyerleri	35
3.2. YÖNTEMLER	35
3.2.1. Suşların toplanması	35
3.2.2. Klinik numunelerin kültür işlemleri	36
3.2.3. Bakteri izolatlarının identifikasyonu	36
3.2.4. Antimikrobiyal duyarlılık testi (ADT)	37
3.2.5. Agar Dilüsyon yöntemi ile adt	38
3.2.5.1. Fosfomisin ve diğer antibiyotiklerin çalışma solüsyonlarının hazırlanması	37
3.2.5.2. Agar besiyeri hazırlanması	40
3.2.5.3. Besiyerine G6P eklenmesi	38
3.2.5.4. Agar dilüsyon petri plaklarının hazırlanması	39
3.2.5.5. İzolatların hazırlanması ile besiyerine inokulasyonları	41
3.2.5.6. Kombinasyon çalışması	42

3.2.5.7. Sonuçların değerlendirilmesi	48
4. BULGULAR	53
5. TARTIşMA	61
6. SONUÇLAR	73
7. KAYNAKLAR	74
8. EKLER	91



SİMGELER VE KISALTMALAR

AME :	Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	Adenozin trifosfat
CB :	Checkerboard
CFU :	Colony Forming Unit
CUP :	Chaperoneusher Pathway
DDT :	Disk Difüzyon Testi
EAEC:	Enteroagregatif <i>E. coli</i>
EHEC:	Enterohemorajik /Shiga like toksin üreten <i>E. coli</i>
EIEC:	Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EMB:	Eozin Metilen Blue
EPEC:	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC :	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GSBL:	Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz
HPI :	High Pathogenicity Island
HÜS:	Hemolitik Üremik Sendrom
IL:	İnterlökin
İV :	İntravenöz
İYE:	İdrar Yolu Enfeksiyonu
KPC :	<i>K. pneumoniae</i> karbapenemaz
KRE :	Karbapenem Dirençli Enterobacterales
LEE :	Locus Of Enterocyte Effacement
MDR :	Çoklu İlaç Dirençli
MHA :	Mueller Hinton agar
MİK :	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MRSA:	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
SMD:	Sıvı mikrodilüsyon
UPEC :	Üropatojenik <i>E. coli</i>
VRE :	Vankomisine Dirençli <i>Enterokok</i>

ŞEKİLLER

Şekil 1. Fosfomisin kimyasal yapısı.

Şekil 2. Antibiyotik dilüsyonlarının hazırlanması.

Şekil 3. İnokulasyon ve okuma amacıyla oluşturulan standart çizim.

Şekil 4. Plakların alana tam yerleşmesi amacıyla yapılan standart işaretlemeler.

Şekil 5. Antibiyotik solüsyonu içermeyen kontrol besiyeri.

Şekil 6. 27 numaralı suşun agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisin çalışması.

Şekil 7. 27 numaralı suşun agar dilüsyon yöntemi ile gentamisin çalışması.

Şekil 8. Fosfomisin-gentamisin kombinasyon çalışmasının 27. suşa ait şematize görünümü.

Şekil 9. Agar dilüsyon plaklarının değerlendirilme metodu.

Şekil 10. Agar dilüsyon plaklarının değerlendirilme metodu.

TABLolar

Tablo 1: Gastroenterite sebep olan *E.coli* suşları.

Tablo 2. *E. coli* için DDT’de karbapenemlerin zon çapı sınır değerleri.

Tablo 3. Fosfomisin- gentamisin kombinasyonu için antibiyotik solüsyonu hazırlanması.

Tablo 4. Fosfomisin- gentamisin kombinasyonunun KAMHA besiyerinde yerleşimi.

Tablo 5. Fosfomisin- meropenem kombinasyonu için antibiyotik solüsyonu hazırlanması.

Tablo 6. Fosfomisin- meropenem kombinasyonunun KAMHA besiyerinde yerleşimi.

Tablo 7. Fosfomisin- seftriakson kombinasyonu için antibiyotik solüsyonu hazırlanması.

Tablo 8: Fosfomisin- seftriakson kombinasyonunun KAMHA besiyerinde yerleşimi.

Tablo 9. 27 numaralı izolat için hesaplanmış olan FİK indeksleri.

Tablo 10. Çalışılan *E. coli* izolatlarının yatış yeri ve yaşa göre dağılımı.

Tablo 11: Çalışılan *E. coli* izolatlarının örnek tipine göre dağılımı.

Tablo 12. İdrar dışı izolatların Phonex otomatize sistem ile çalışılan ADT sonuçları.

Tablo 13. İdrar İzolatlarının Phoenix otomatize sistem ile çalışılan ADT sonuçları.

Tablo 14. Bu çalışmada kullanılan antimikrobiklerin EUCAST (v.11.0) kriterlerine göre *E. coli* için MİK sınır değerleri.

Tablo 15. Agar dilüsyon ile çalışılan *E. coli* izolatlarının belirlenen MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri, MİK aralıkları ve çalışmada kullanılan antibiyotiklere direnç oranları.

Tablo 16. Kombinasyon çalışmasında kullanılan antibiyotiklerin tek başına MİK değerleri ve hastaların demografik özellikleri.

Tablo 17. *E. coli* izolatlarının antibiyotik kombinasyon FİK indeksleri ve yorumları.

Tablo 18: Çalışılan antibiyotik kombinasyonları sonucu belirlenen etki ve oranları.

Tablo 19. Fosfomisin-meropenem etkileşiminin fosfomisin direnci ile ilişkisi.

Tablo 20. Fosfomisin-gentamisin etkileşiminin örnek türü ile ilişkisi.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çoklu ilaca dirençli bakterilere bağlı enfeksiyonların son dönemlerde yaygınlaşması ve tedavide kullanılabilecek antibiyotiklerin kısıtlılığı nedeniyle fosfomisin gibi eski antibiyotiklere yönelik araştırmalar da oldukça ilgi görmektedir. Fosfomisin 1969'da keşfedilen, gram negatif ve gram pozitif çoklu ve yaygın ilaca dirençli bakterilere karşı etkili olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (1).

Fosfomisin, pirüvil transferazı inhibe ederek etki gösteren küçük bir moleküldür. Bu enzim bakteriyel hücre duvarının temel bileşeni olan peptidoglikan öncüllerinin sentezinden sorumludur. Başlangıçta duyarlılık testlerindeki problem nedeniyle Amerika'da kullanımı sınırlı olup, testler 1983 yılında standardize edilmiştir (2).

Yaklaşık 50 yıldır parenteral olarak kullanılıyor olmasına rağmen fosfomisin çoğu patojene karşı hâlâ antimikrobiyal aktivitesini korumaktadır. Ayrıca fosfomisin diğer hücre duvarına etkili antibiyotikler ile birlikte in vitro ortamda sinerjistik etki göstermektedir (örneğin, b-laktamlar, daptomisin) (3).

Karbapeneme dirençli ve genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreticisi olan *Enterobacterales* ailesi üyeleri, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisine dirençli *Enterokok* (VRE), MDR (Çoklu ilaca dirençli) *Acinetobacter* türleri, MDR *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* antimikrobiyallere direnç noktasında en çok problem oluşturan mikroorganizmalardır (4). Son yıllarda artan karbapenem direncinin engellenmesi amacıyla alınacak en önemli tedbir, alternatif tedavi seçeneklerinin geliştirilmesidir (5).

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); *Enterobacterales* ailesi üyeleri için intravenöz fosfomisin duyarlılığını test etmek amacıyla referans yöntem olarak agar dilüsyon yöntemini önermektedir. *Escherichia coli* için ise ayrıca disk difüzyon yöntemi de kullanılabilmektedir (6).

Bu çalışmada karbapenem dirençli *E. coli* suşlarında; fosfomisin duyarlılığı ve fosfomisinle birlikte kombine edilebilecek antibiyotikler ile (gentamisin, meropenem, seftriakson) sinerjistik etkileşim durumunun in-vitro ortamda referans yöntem olan agar dilüsyon yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Böylece özellikle karbapenem

dirençli ve beta laktamaz üreticisi olan *E. coli* suşlarında yeni bir tedavi yaklaşımı sunmayı dolayısıyla mortalite ve morbiditeyi azaltmaya katkı sağlamayı amaçlıyoruz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacterales* Ailesinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Enterobacterales familyası, tıbbi olarak önemli olan en çeşitli ve heterojen gram negatif basilleri içeren mikroorganizma ailesidir. Onlarca cins ile birçok tür ve aynı zamanda alt tür tanımlanmıştır. Bu ailedeki bakteriler toprak, su ve bitkilerde yaygın olarak bulunurlar ayrıca hayvanların ve insanların bağırsak mikrobiyotalarının bir parçasıdır. Bu mikroorganizmalar insanlardaki tüm bakteriyemilerin üçte biri ile dörtte biri, idrar yolu enfeksiyonlarının %70' i ve bağırsak enfeksiyonlarının birçoğundan sorumludur (7).

Enterobacterales familyası üyeleri gram negatif basil morfolojisinde hareketli veya hareketsiz, pepton veya et özütü agarda çoğalabilen, MacConkey agarda üreyebilen fakültatif anaerob bakterilerdir. Genellikle glikozu oksitlemek yerine fermante ederler. *Plesiomonas* cinsi hariç katalaz pozitif ve oksidaz negatiftirler. Birçok cins içerir (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* ve diğerleri). Bazı enterik mikroorganizmalar *E. coli* gibi, normal mikrobiyotanın bir parçasıdır ve insidental olarak hastalığa neden olur, ancak *Salmonella* ve *Shigellae* insanlar için mutlak patojendir (8).

Enterobacterales ailesi üyeleri koyun kanlı agar üzerinde büyük, donuk gri, mukoid veya kuru görümlü koloniler şeklinde ürer; mukoid koloniler çoğunlukla *K. pneumoniae* suşlarına aittir. Kanlı agarda hemoliz değişkendir. İnce bir film veya swarming denilen buğu tarzı yayılım yapan mikroorganizmalar ise hareketli bir *Proteus* türüne ait olduğunu düşündürür. MacConkey agar üzerinde kırmızı renkte görülen, Eozin Metilen Blue (EMB) agarda ise yeşil refle gözlenen koloniler, üreyen mikroorganizmanın ortamdaki laktozdan asit oluşturabildiğini gösterir.

Ayırt edilmeleri için geliştirilmiş bazı ticari kitler veya otomatize sistemler mevcuttur. Bununla birlikte kültür izolatlarının tanımlanması için MALDI-TOF MS kullanımı birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında geleneksel biyokimyasal panellerin yerini almıştır (8). *Escherichiae* üyelerinde ayırıcı testlerden olan metil red ve indol pozitif, sitrat ve Voges Proskauer negatif diğer reaksiyonlardan ise hidrojen sülfür, fenilalanin deaminaz ve üreaz da negatiftir. *Escherichia* cinsi beş tür içerir: *E. albertii*, *E.*

hermannii, *E. coli*, *E. vulneris* ve *E. fergusonii*. Cinsin eski bir üyesi olan *E. adecarboxylata*, *Leclercia adecarboxylata* adıyla yeni bir cins olarak tanımlanmıştır. Cinsin bir diğer eski üyesi olan *E. blattae*, *S. blattae* olarak yeni bir cins olan *Shimwellia*' ya transfer edilmiştir (9).

2.2. Escherichia coli

Theodor Escherich 1885 yayınında *Bacterium coli commune* adını verdiği ince kısa basilleri ilk olarak bebek dışkılarından izole etmiştir (10). Castellani ve Chalmers isimli araştırmacılar 1919' da *E.coli* olarak isimlendirmelerine rağmen ancak 1958' de resmi olarak bu isimle tanımlanmıştır (11). *Enterobacterales* bakteri familyasına dahil olan *E. coli*, sıcak kanlı hayvanlar ve insanların gastrointestinal kanallarında kommensal olarak yerleşen en önemli patojenlerden biridir (12).

2.2.1. E. coli'nin mikrobiyolojik özellikleri

E. coli seçici olmayan besiyerlerinde ürettiğinde genellikle pürüzsüz S tipi, renksiz koloniler yapar. Koyun kanlı agarda beta hemoliz yapabilir. Çoğunlukla laktozu fermante eder. (Yaklaşık olarak yüzde 5'i laktoz fermentasyonu yapmaz) CLED (Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient) agarda sarı renkli koloniler yapar ve 24-48 saat içerisinde asit ile gaz oluşturur. Genellikle hareketlidir. Ekstraintestinal enfeksiyonlardan sorumlu olanlar polisakkarit kapsüle sahiptir. Genellikle indol üretimi, ornitin dekarboksilaz, lizin dekarboksilaz ve metil kırmızısı için pozitif; üreaz, sitrat kullanımı, H₂S üretimi ve Voges Proskauer testi için negatiftir (13).

2.2.2. E. coli' nin neden olduğu Hastalıklar, Patogenez ve Virülans Faktörleri

E. coli *Escherichia* cinsinin en yaygın ve en önemli üyesidir. K (kapsüler) H (flagellar) ve O (somatik), yüzey antijenlerine göre serotiplendirilir. Şu ana kadar tanımlanan 170 den fazla O antijen serogrubu bulunmaktadır. O ve H antijenlerinin kombinasyonu o izolatın serotipini tanımlar. Örneğin 0157 H7 virülan bir *E. coli* suşunun serotipidir ve Hemorajik Kolit ile Hemolitik Üremik Sendrom ile ilişkilidir. Karbondioksit bağımlı *E. coli* suşları, idrar ve ampiyem sıvısından rapor edilmiştir. Kapnofilik *E. coli* ile ilişkili enfeksiyonlar şu anda düşünülenlerden daha yüksektir, çünkü idrar ve yara örnekleri rutin olarak CO₂ içinde inkübe edilmez (14).

E. coli klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık saptanan bakteridir. Neredeyse tüm organ ve sistemleri tutabilen enfeksiyonlara neden olur. Gram negatif sepsis ve endotoksin kaynaklı septik şokun en sık nedenidir. Üriner sistem ve yara enfeksiyonları, immünsüprese hastalarda pnömoni, gastroenterit, yenidoğanlarda menenjit gibi enfeksiyonlara neden olur (14).

Gastrointestinal kanalda bol miktarda *E. coli* bulunur. Bağırsak perforasyonu durumlarında peritoneal kaviteye doğru yer değiştirerek fırsatçı patojene dönüşebilmelerine rağmen, birçok *E. coli* suşu plazmid veya bakteriyofaj ile kodlanan spesifik virülans faktörleri edindikleri için intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olur. Çoğu enfeksiyon (neonatal menenjit ve gastroenterit hariç) immünsüpresif durumlarda endojen yolla oluşur (15).

2.2.2.1. Gastroenterit

Gastroenterite neden olan *E. coli* suşları temel olarak 5 alt gruba ayrılır. Bunlar Enterotoksijenik (ETEC), Enteropatojenik (EPEC), Enteroagregatif (EAEC), Enterohemorajik /Shiga like toksin üreten (EHEC/ STEC) ve Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) şeklindedir. İlk 3 grup ince bağırsakları tutan sekretuar diyare nedeni iken son 2 grup kolonu tutar.

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)

ETEC gelişmekte olan ülkelerde bakteriyel diyarenin en sık nedenlerinden biridir ve tahmini olarak bu ülkelere seyahat edenlerin yüzde 30'u bu enfeksiyonu geçirmektedir.(yıllık yaklaşık olarak 840 milyon vaka). Gaita ile kontamine olmuş içme suyu ve yiyeceklerin tüketimi ile bulaşır. İnsandan insana bulaş yoktur. ETEC'in neden olduğu sekretuar diyare 1-2 günlük inkübasyon periyodunun ardından 3-5 gün devam eder. Sulu hemorajik olmayan ishal, karın krampları ve daha az sıklıkla bulantı, kusma gibi kolera benzeri semptomlara neden olur ancak genellikle daha hafif geçirilir. Çocuklarda, yaşlılarda, altta yatan hastalıkları bulunan ve malnutrisyonu bulunan bireylerde mortalite yüksektir.

Kolonizasyon faktörleri ve enterotoksinleri kodlayan genler plazmid aracılı kodlanır. Kolonizasyon faktörleri ailelere ve ayrıca antijenik özelliklerine göre alt bölümlere ayrılırlar (CFA/I, CFA/II, CFA/IV en yaygın olanlarıdır). Yirmiden fazla

kolonizasyon faktörü tanımlanmıştır. Konak hücrelerine olan özgüllük ve konak üzerindeki reseptörlere olan afiniteleri ile tanımlanırlar.(15)

ETEC tarafından eksprese edilen kolonize edici fimbrialar bakterinin bağırsak duvarına tutunmasını sağlar. Bir kez bağlandıklarında plazmid aracılı kodlanan salgı toksinleri olan ısıya dirençli toksin (ST) ve/veya ısıya duyarlı toksin (LT) eksprese edilir.

LT; adenilat siklazı uyarır ve ardından artan hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) bağırsak kript hücrelerinden klorür salgılanmasına yol açar. Bu mekanizma ayrıca bağırsak villuslarından sodyum klorür emilimini de engeller. Bağırsak lümenine serbest su sekresyonu olur, böylece sulu ishal meydana gelir. ST de aynı şekilde, guanilat siklazı uyararak hücre içi siklik guanozin monofosfatın (cGMP) artmasına, klorür sekresyonuna ve sodyum klorür absorpsiyonunun inhibisyonuna yol açarak sulu diyareye neden olur (16).

Potansiyel olarak ETEC kontaminasyonu olabilecek gıdaların tüketiminde dikkatli olunması turist diyaresi sıklığını önemli ölçüde azaltır. Antimikrobiyal profilaksi etkili olabilir ancak antibiyotik direncinin artmasına da neden olabileceğinden antibiyotiklerin kombinasyon şeklinde uygulanması önerilir. İshal geliştiğinde antibiyotik tedavisine başlanması hastalık süresini önemli ölçüde kısaltır (17).

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

Enterik hastalıktan sorumlu olan iki *E. coli* alt grubu; EPEC ve EHEC, kromozomal bir patojenite adasında kodlanan ve LEE (locus of enterocyte effacement) olarak bilinen bir dizi virülans genine sahiptir. EPEC grubu 1940 ve 1950' lerde bildirilen ishal salgınları ilişkili ilk *E. coli* suşlarıydı. Başlangıçta salgınlara özgü serotipler olarak sınıflandırılmalarına rağmen daha sonra LEE varlığı ve Shiga Toksin yokluğuna göre sınıflandırılmaktadır. Ayrıca plazmid aracılı kodlanan EAF (*E. coli* Adherence Factor) varlığına veya yokluğuna göre tipik veya atipik suş olarak da ayrılmaktadırlar.

Hastalık bakterinin ince bağırsak epitel hücrelerine tutunması ve mikrovillus harabiyeti ile başlar. EPEC ilk olarak epitel hücre yüzeyinde plazmid ile kodlanan BFP (bundle forming pili) aracılı mikrokolonilerin oluşumuna yol açar ancak bu plazmid atipik EPEC'de bulunmaz. Bağlanmanın sonraki aşamaları LEE patojenite adasında kodlanan genler tarafından düzenlenir. Bağlanma sonrası, bakterinin tip III sekresyon

sistemi aracılığıyla konak epitel hücrelerine bakteriyel proteinler salgılanır. Bir protein olan translocated intimin receptor (Tir), epitel hücre zarına yerleşerek bakteri dış zarında bulunan intimin ve adezin için reseptör görevi görür. Bağlanma ile birlikte aktin polimerizasyonu ve hücre yüzey bütünlüğünün bozulması sonucu hücre ölümü gerçekleşir.

Sporadik hastalık veya salgınlar gelişmiş ülkelerde nadirdir. Günümüzde gelişmemiş ülkelerde genellikle atipik suşların neden olduğu ve infantlarda gelişen sporadik vakalar bildirilmektedir. Hastalık kontamine yüzeylerle veya gıdalarla temas sonrası fekal oral yolla bulaşır. İnsanlar tipik suşların tek kaynağı olmasına rağmen atipik suşlarda hem insanlar hem hayvanlar rezervuar olabilir.

Hastalık esas olarak 2 yaşından küçük çocuklarda görülür. Sıklıkla ateş ve kusmanın eşlik ettiği şiddetli olabilen sulu ishal ile karakterizedir. Bakterinin alımı ile hastalık birkaç saat içerisinde başlayabilir çoğunlukla birkaç gün içinde gerilese de hospitalizasyon gerektiren persistan ishaller de meydana gelebilir (15).

Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)

EAEC ilk olarak 1985' te tanımlanmıştır. Belirgin bir şekilde bir araya toplanmış ve Hep-2 hücrelerine yığılmış tuğla benzeri bir model ile yapışmasıyla ayırt edilmiştir. EPEC ve DAEC (diffüz adherent *E. coli*) yapışma modellerinden ayırt edilebilen bu yapışma modeli, ilk olarak 1987' de Santiago, Şili' deki çocuklar arasındaki ishal salgınları ile ilişkilendirilmiştir.

Prototip suşlar üzerindeki laboratuvar çalışmaları, toplu yapışma (AA) fenotipinin, topluca pAA olarak adlandırılan 55-65 MDa plazmitleri üzerinde kodlandığını ortaya çıkarmıştır. Daha sonraki bir raporda, plazmitin bir parçasının, EAEC' yi diğer *E. coli* suşlarından ayırt edebilen, spesifik ve değişken olan hassas bir DNA probu olarak faydalı olduğu bulunmuştur. Birçok epidemiyolojik çalışma, EAEC' yi tanımlamak için artık AA fenotipini ve plazmit kodlu probu kullanmaktadır. Keşfedilmesinden bu yana, yapılan çok sayıda çalışma da EAEC'yi ishal ile ilişkilendirmiştir (18).

EAEC, gelişmekte olan ülkelerde, akut veya kronik (14 günden uzun süren) ishale neden olur. Bu organizmalar aynı zamanda sanayileşmiş ülkelerdeki gıda kaynaklı hastalıklar, turist ishali ve HIV pozitif hastalarda persistan ishale ilişkili olabilir. İnsan

hücrelerine bağlanma şekillerine göre karakterize edilirler. Bu *E. coli* grubu oldukça heterojendir ve patojenite mekanizmaları hala kesin olarak aydınlatılamamıştır. EAEC' nin bazı suşları Shiga Toksin benzeri toksin üretirken diğerleri; hücresel hasara sebep olabilen plazmit kodlu enterotoksin ve hemolizin üretebilir. Tanı klinik olarak konulabilir ancak doku kültürü ile doğrulanması gerekmektedir (17).

Enterohemorajik /Shiga like toksin üreten *E. coli* (EHEC/ STEC)

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), düşük enfeksiyöz doza sahip olması (<100 organizma), küçük çocuklarda, yaşlılarda ve immünsüpresif kişilerde hastalığın ağır seyredişi, özellikle zoonotik ve gıda kaynaklı enfeksiyona sebep olması nedeniyle endişe kaynağı olmuştur.

Tüm EHEC suşları, Shiga toksini benzeri bir toksin eksprese ederler ve bu nedenle Shiga toksijenik *E. coli* olarak da bilinirler. Tarihsel olarak, bu suşlar aynı zamanda verotoksijenik *E. coli* (VTEC) olarak da bilinirler ve üretilen bu toksinin, geçmişte yaygın olarak tanı amacıyla kullanılan Vero doku kültürü hücrelerinde (bir Afrika yeşil maymununun böbrek hücre topluluğu) in-vitro morfolojik değişiklikler oluşturma kabiliyeti vardır. EHEC suşları ile kolonizasyon, insanlarda hafif ile şiddetli diyare dahil olmak üzere çeşitli klinik sonuçlara neden olabilir; bununla birlikte, EHEC suşlarının bir alt kümesi, özellikle insan hemolitik üremik sendromuna (HÜS) neden olmakla ilişkilidir. *E. coli* O157 H7 en iyi tanınanıdır ve EHEC prototipinin bir temsilcisi olarak kullanılır. EHEC suşları, aynı zamanda, örneğin domuzlarda ödem hastalığı ve kümes hayvanlarında şişmiş kafa sendromu gibi, hayvancılıktaki hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (19).

İnsanlarda, *E. coli* O157 H7 ile bağırsak kolonizasyonunun klinik sonuçları, asemptomatik taşıyıcılıktan non-hemorajik ishale, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendroma (HÜS) kadar değişir (20). *E. coli* O157 H7' nin patojenitesi, kontamine yiyecek veya suyun alınmasını takiben bağırsak mukozasının kolonizasyonu ile başlar. Enfeksiyöz doz son derece düşüktür (<100 organizma), bu da bakterinin midenin asidik ortamına dayanma kabiliyetini göstermektedir (21).

Bu grubun tüm üyeleri Shiga toksin 1 (Stx1) veya 2 (Stx2) varlığıyla tanımlanmaktadır. Stx1, *Shigella dysenteriae* tarafından üretilen Shiga toksini ile

esasen aynıdır; Stx2 ise %60 benzerliğe sahiptir. Her iki toksin de lizojenik bakteriyofaj aracılığıyla edinilir. Her ikisinin de bir A alt birimi ve konak hücre üzerinde spesifik bir glikolipide (globotriaosylceramide [Gb3]) bağlanan beş B alt birimi vardır. Bağırsak villuslarındaki ve böbreklerdeki endotel hücrelerinde yüksek konsantrasyonda Gb3 reseptörü bulunur. A alt birimi aktivasyondan sonra, iki moleküle bölünür ve A1 parçası 28S rRNA 'ya bağlanır ve protein sentezinin durmasına neden olur. HÜS daha çok, glomerüler endotel hücreleri hasarı meydana getirdiği gösterilen Stx2 üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Endotel hücrelerindeki hasar, trombosit aktivasyonu, trombin birikimi ile azalmış glomerüler filtrasyon ve bunun sonucunda akut böbrek yetmezliğine neden olur. Shiga toksinleri ayrıca B alt birim reseptörü Gb3' ün ve inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu da uyarır (tümör nekroz faktörü TNF- α , interlökin IL-6 gibi)

Şiddetli hastalık daha sık EHEC O157 H7 ile ilişkilidir. Başlangıçta, 3 ila 4 günlük kuluçkadan sonra hastalarda abdominal ağrının eşlik ettiği diyare gelişir. Hastaların yaklaşık yarısında kusma görülür, yüksek ateş ise genellikle görülmez. Hastalık başlangıcından itibaren 2 gün içinde, hastaların %30 ila %65' inde şiddetli karın ağrısı ve kanlı diyare izlemektedir. Tedavi edilmeyen hastalarda semptomların gerilemesi 4-10 günü bulmaktadır.

HÜS akut böbrek yetmezliği, trombositopeni ve mikroanjiyopatik hemolitik anemi ile seyreden ve 10 yaşından küçük çocukların yüzde 5-10 unda görülen bir sendromdur. Hastaların %30' unda şiddetli sekeller (böbrek yetmezliği, hipertansiyon, santral sinir sistemi bozuklukları gibi) ortaya çıkabilir ve hastaların %3 ila %5' inde mortal olabilir (15).

Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)

EIEC kolonun epitel hücrelerine tutunup penetre olur. Patogenez hemen hemen *Shigella* türleriyle aynıdır. *Shigella* türlerinde olduğu gibi, çoğu suş hareketsizdir, laktozu geç fermante ederler veya etmezler. En yaygın olarak görülen serogruplar O29, O112ac, O28ac, O124, O136, , O144, O143, O164 ve O152' dir. Enfeksiyon en sık ETEC enfeksiyonundan ayırt edilemeyen sulu ishal olarak ortaya çıkmaktadır. Bazı hastalar dizanteri sendromu ile başvurur; ayırt edici özellikler ise yüksek ateş ve

kolittir. Semptomlar urgency ve tenesmus; bulgular ise dışkıda kan, mukus ve çok sayıda lökosit görülmesidir (22).

Enfeksiyonun seyri boyunca bağırsak lümeninde kalan ve histolojik hasar yapmayan ETEC' den farklı olarak EIEC, özellikle kalın bağırsakta bulunan intestinal mukozaya penetre olur ve basiller dizanteri için karakteristik olan inflamasyon ve mukozal ülserasyona neden olurlar. *Shigella* ve EIEC ince ve kalın bağırsaktaki lenfoid foliküllerin üzerini örten epitel hücrelerinin önemli bir bileşeni olan özelleşmiş antijen sunucu M hücreleri yoluyla enterositlere girerler. Makrofajlarda apoptozu indüklerler böylece fagozitoza uğramazlar ve bazolateral yolla enterositlere girerler.

EIEC' nin neden olduğu ishal mekanizması hala tam aydınlatılamamıştır fakat plazmit ile kodlanan enterotoksine bağlı olduğu düşünülmektedir (23).

E. coli patojenik olmayan kommensal suşların yanında birçok farklı hastalığa sebep olan suşları da içerir. Ayırt edici olması açısından bağırsak dışı patojenik *E. coli* suşları ExPEC olarak, bağırsak patojeni olan *E. coli* suşları ise IPEC olarak adlandırılır. ExPEC, birden fazla anatomik bölgede çok çeşitli ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olabilir. Sıklıkla idrar yolu enfeksiyonuna (İYE), sepsisemiye, menenjitte ve ayrıca yumuşak doku hasarına neden olur. İnsan ve hayvanlarda idrar yolu enfeksiyonu ile ilişkili üropatojenik *E. coli* (UPEC), yenidoğan menenjit ile ilişkili *E. coli* (NMEC), insan ve hayvanlarda sistemik enfeksiyona neden olan sepsisemik *E. coli* (SePEC), kuş kolibasilozuna neden olan kuş patojenik *E. coli* (APEC) ve endometriyal patojenik *E. coli* (EnPEC) patojenlerini içerir (24).

Tablo 1: Gastroenterite sebep olan *E. coli* suşları⁽¹⁵⁾

Organizma	İnkübasyon Periyodu	Semptomlar	Epidemiyoloji	Patogenezi	Klinik Özellikler
ETEC	24-72 saat	Sulu Diyare	Turist Diyarisinin en yaygın nedeni	ETEC ince bağırsakta ısıya dayanıksız (HL) veya ısıya dayanıklı (HS) enterotoksinler üretir. Toksinler hipersekresyona neden olur.	Genellikle ani başlayan ishale neden olur; kusma nadirdir. Yenidoğanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olur. Yetişkinlerde, genellikle 1-3 gün içinde kendi kendini sınırlar.
EIEC	48-72 saat	Dizanteri	Ara sıra dizanteri salgınları seyrek sporadik enfeksiyon	Kolon mukozasında Shigelloza benzer invazyon	Halzilik, başağrısı, karın ağrısı ve yüksek ateş ile beraber kanlı ishal, Dışkıda lökosit bulunur
EHEC	24-72 saat	Sulu, Kanlı Diyare	Az pişmiş Hamburger ve Fast food ilişkili Kanlı Diyare	Shiga Toksin benzeri Toksinler üretir. Sıklıkla O157 H7 Serotipi	Kanlı ishal, Hemorajik Kolit ve HÜS e neden olur. <i>E. coli</i> için Sorbitol negatif dışkı kültürü O157 H7 için antiserum diğer serotipler için Enzim İmmunoassay kullanılır.
EPEC	Yavaş Başlangıçlı	Sulu Diyare	Gelişmekte olan ülkelerde yenidoğan ishalinin yaygın bir nedenidir	EPEC mukozaya yapışarak epitel hücreleri hücre iskeletinde değişiklikler oluşturur	3-6 gün içinde halsizlik ve diyare ile başlar.5-15 gün içinde geriler. Elektrolit dengesizlikleri ve diğer komplikasyonlar ölme neden olabilir. Antimikrobiyal tedavi önem arzeder

2.2.2.2. İdrar yolu enfeksiyonu

Genç kadınlardaki idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık olarak %90' ından *E. coli* sorumludur. Semptomlar genellikle dizüri, piyüri, hematüri ve idrar sıklığında artış olmasıdır. Üst üriner sistem enfeksiyonlarında yan ağrısı da olabilir. İdrar yolu enfeksiyonları; sepsis belirtileri ile bakteriyemiye de neden olabilir. Sağlıklı konakta oluşan, mesane veya böbreği de içeren birçok üriner sistem enfeksiyonuna sınırlı sayıda O antijen içeren serotip neden olur. Bu serotiplerin kolonizasyonunu ve enfeksiyonunu kolaylaştıran virülans faktörleri mevcuttur. Bunlar üropatojenik *E. coli* (UPEC) olarak tanımlanmıştır. Tipik olarak bu mikroorganizmalar sitotoksik olan ve doku invazyonu yapan hemolizin adlı toksini üretir. Pyelonefrite de neden olan suşlar ise, K antijenini eksprese eder ve bir kan grubu antijeni olan P antijenine bağlanan P fimbriasına sahiptir. Son on yılda pandemik bir klon olan *E. coli* O25b/ ST131 önemli bir patojen olarak ortaya çıkmıştır. Bu organizma beta laktam antibiyotiklere, florokinolonlara ve aminoglikozitlere karşı antibiyotik direncini kodlayan direnç faktörlerinin plazmit aracılı alınmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (25).

E. coli genomlarında otuz sekiz farklı CUP (chaperone–usher pathway) pilus operonu tanımlanmıştır ve tek bir UPEC türü, 12' den fazla farklı CUP pili kodlayabilir. Ancak, CUP operonları, farklı UPEC izolatları arasında tek tip değildir; bazı operonlar UPEC' lerin çoğunda bulunurken, bazıları ise sadece birkaç suшта bulunur. UPEC tarafından kodlanan çok sayıda CUP pili, bazılarının özellikle mesane veya böbrek epitelinde stereokimyasal özgülüğü olan reseptörleri tanıyarak alt ve üst üriner sistemdeki farklı tropizmlere aracılık ettiği bilinen farklı adezinlerle kaplıdır. Tip 1 pili ve P pili bunlardan bazılarıdır (26).

UPEC' in önemli virülans faktörleri genel olarak iki gruba ayrılabilir. Bunlar; bakteri hücre yüzeyinde bulunanlar ve salgılanan virülans faktörleridir. Bakteriyel hücre yüzey virülans faktörleri, çoğunlukla tip 1 fimbria ve P fimbria gibi fimbriaları içerir. Bu fimbrialar, konak hücre yüzeyine yapışmaya, doku invazyonuna, biyofilm oluşumuna ve sitokin salgılanmasına yardımcı olur. Bakteriyel hücre yüzeyi virülans faktörleri ayrıca flajella, kapsüler lipopolisakarit ve dış zar proteinlerini içerir. Hemolizin ve sideroforlar (aerobaktin, enterobaktin) salgılanan virülans faktörleridir. Bu virülans faktörleri, bakterilerin üriner sistemde kolonize olmasını ve etkin bir

şekilde işleyen konak savunma mekanizmasına rağmen varlığını sürdürmesini sağlamada önemlidir (27).

2.2.2.3. Sepsis ve neonatal menenjit

E. coli, özellikle yenidoğan döneminde menenjitte neden olan en yaygın gram negatif mikroorganizmadır. *E. coli*' nin neden olduğu menenjit vakalarının çoğu hematojen yayılımın bir sonucu olarak gelişir, ancak dolaşımdaki *E. coli*' nin kan-beyin bariyerini nasıl geçtiği tam olarak anlaşılamamıştır. *E. coli* serotiplerinin bolluğu göz önüne alındığında, yenidoğan menenjitinden elde edilen izolatlar arasında K1 kapsüller polisakkarit içeren *E. coli* suşlarının baskın olması (yaklaşık %80) dikkat çekicidir (28). K1, fimbrial adhezin S (sfaS) , invazin IbeA (ibeA) ve sitotoksik nekrotizan faktör (cnf1) gibi birkaç spesifik virülans faktörü kan beyin bariyeri penetrasyonunu kolaylaştırmaktadır (28- 36).

Septisemik suşlara özgü sekansların çoğu sadece birkaç suшта ortaya çıkmış olsa da, tüm suşlarda bulunan birkaç gen bulunmaktadır. Bu yaygın virülans faktörleri enfeksiyon süreci için gereklidir (37). Bu faktörlerin çoğu, septisemik suşların çoğunda bulunan bir plazmid olan ColV üzerinde kodlanmıştır. ColV plazmitleri, demir alım sistemini kodlayan genlerin yanı sıra serum direncini kodlayan genleri de taşır (38) .

Septisemik suşlarda bol miktarda bulunan başka bir demir alım sistemi, patojenik *Yersinia*' ya özgü HPI' da (high pathogenicity island) bulunan sisteme benzer bir yapı göstermektedir. Septisemik suşların HPI ile kodlanmış demir alım sistemi, siderofor yersiniabactinin biyosentezi için genleri ve onun reseptörünü kodlayan genleri içermektedir (39, 40). Birkaç septisemik suшта bulunan ek demir alım sistemleri arasında, hemin reseptörü olan ChuA ve sitABCD sistemi bulunmaktadır (41, 42).

E. coli' nin serum içerisinde yaşaması için gerekli olan ana bakteriyel bileşenler, kapsüller ve lipopolisakkaritlerdir (LPS). Septisemik suşlar, bu iki virülans faktörü açısından son derece yüksek bir çeşitlilik göstermektedir. Yirmiden fazla LPS serotipi ve çeşitli polisakkarit kapsüller içerirler. K1 gibi polisakkarit kapsüllerin serum koruyucu olduğu kabul edilir. Bununla birlikte, birçok septisemik suş, herhangi bir polisakkarit kapsülü üretmez (37).

Şimdiye kadar ökaryotik hücrelere bağlanma için önemli olarak tanımlanan tek gen, curli liflerini kodlayan gendir. Curli lifler, laboratuvar suşları da dahil olmak üzere birçok patojenik *E. coli* izolatu tarafından eksprese edilen ince agregatif yüzey lifleridir. Adherandılar ve laminin, fibronektin, plazminojen ve majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I molekülleri dahil olmak üzere birçok konak molekülünü bağlarlar. Curli liflerinin, muhtemelen fibronektine bağlanmaları yoluyla *E. coli* tarafından ökaryotik hücrelerin tutulmasında rol oynadığı gösterilmiştir (43).

ETT2_{sepsis}, birçok septisemik *E. coli* suşunda korunmuş, büyük bir delesyon içeren dejenere bir operondur ve sepsis gelişimi için gereklidir (44). ETT2_{sepsis}, virülansla ilgili bakteri proteinlerinin konakçı hücrelere yer değiştirmesine aracılık eden karmaşık bir aygıtı kodlayan tip III sekresyon sistemleri grubuna aittir. *Yersinia* ve enteroagregatif *E. coli* dahil olmak üzere birçok gram negatif bakterinin patogeneğinde önemli bir rol oynarlar. Septisemik *E. coli* suşlarında, O157 suşunun ETT2' sine (*E. coli* tip III salgılama sistemi 2) homolog tip III salgılama sisteminin bir versiyonu bulunabilir (45, 46).

2.2.3. *Escherichia coli*' nin antibiyotik direnç mekanizmaları

GSBL üreten *Enterobacterales* üyeleri, özellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae*), yüksek mortalite, artan hastanede kalış süresi ve yüksek maliyet ile ilişkilidir. Öte yandan, bu izolatlarda yaygın antibiyotik kullanımına bağlı çoklu ilaç direnci giderek artmaktadır (59).

Enterobacterales ailesi üyelerinde gelişen çoklu ilaç direnci farklı mekanizmalar ile ortaya çıkabilir. Direnç mekanizmaları; karbapenemazlar, genişletilmiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL), aminoglikozid değiştirici enzimlerin (AME) sentezi, kinolon direncine neden olan enzimlerde modifiye edici mutasyonlar ve porin-effluks mekanizmalarındaki değişiklikler olarak sıralanabilir. *E. coli* ve *Klebsiella* için direnç hemen hemen her zaman plazmit aracılığıyla kazanılır. Porin ve akış aracılı mekanizmaların katkısı ihmal edilebilir düzeydedir. *E. coli* ve *Klebsiella*'nın sahip olduğu MDR fenotipinin ayırt edici özelliği, aynı direnç plazmiti üzerinde bir AME, bir kinolon direnç determinantı ve bir GSBL kodlayan genin birlikte transferidir (51).

2.2.3.1. GSBL (Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar)

Enterobacterales 'in genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten üyeleri, sefalosporinlere, penisilinlere ve aztreonama dirençlidir. Ayrıca aminoglikozitlere, trimetoprim-sülfametoksazole ve kinolonlara da dirençlidirler (47). GSBL üreten *E. coli*, dünya çapında toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedeni olarak ortaya çıkmıştır (48).

GSBL' ler; A, B, C ve D enzimleri olmak üzere dörde ayrılır. A, D ve C sınıflarının enzimlerinin aktif bölgeleri serin enzimleridir, B sınıfı enzimler ise Zn-metalloenzimlerdir. TEM, SHV ve CTX-M, A sınıfı GSBL' lerdir (49). Türkiye'de en yaygın GSBL'ler CTX-M enzimleridir ve bunu TEM ve SHV izlemektedir (50) .

TEM Tip GSBL

Temorina *Escherichia coli* Mutant (TEM) tipi ilk olarak Yunanistan' da *E coli*' den izole edilmiş, ilk hastanın adı olan 'Temoniera' ve izole edildiği organizma ile isimlendirilmiştir. (52) A sınıfı GSBL' lere aittir ve ampisilin, penisilin, sefalotin ve sefaloridin gibi birinci nesil sefalosporinlere karşı dirence neden olur (53). Enzim, günümüzde hidrolitik yeteneklerini, blaTEM-1 yapısal genindeki mutasyon nedeniyle geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonamı da içine alacak şekilde genişletmiştir. TEM-1 ve TEM-2 en sık izole edilen türevlerdir. Çoğunlukla *E. coli* ve *K. pneumoniae*' da bulunurlar. Günümüzde dünya çapında tanımlanmış 200' den fazla TEM türevi vardır (54).

SHV Tip GSBL

Sülfhidril Varyantı (SHV) adını, aktivitesinin bağlı olduğu sülfhidril substratından almıştır. SHV başlangıçta penisilin ve 1. nesil sefalosporinlere dirençli iken, blaSHV-1 yapısal genindeki mutasyon, hidrolitik yeteneklerini geniş spektrumlu sefalosporinleri ve monobaktamları da kapsayacak şekilde genişletmesine neden olmuştur. Günümüzde dünya çapında bildirilen 190' dan fazla SHV türevi bulunmaktadır (54).

CTX-M Tip GSBL

Sefotaksimaz-Müni (CTXM) tipi A Sınıfı GSBL' lere aittir ve ilk olarak 1989' da Almanya'da izole edilmiştir, ancak daha sonra 2000 yılında Tzouveleki tarafından tanımlanmıştır (55). İsmi, sefotaksimi hidrolize etme yeteneğinden türetilmiştir, ancak şu anda 2. , 3. ve 4. nesil sefalosporinleri ve monobaktamları da hidrolize edebilmektedir (56). Bu enzimler, yatay bir gen transferinden ve ardından *Klyuvera askorbat* ' ın kromozomal AmpC beta laktamazından gelen mutasyondan kaynaklanmıştır (57). CTXM-15, dünya çapında en yaygın bulunan GSBL tipi olarak tanımlanmaktadır (58). Günümüzde dünya çapında bildirilen 170' in üzerinde CTX-M türevi vardır (54).

2.2.3.2. Karbapenem Dirençli Enterobacterales (KRE)

Karbapenemazlar, çok yönlü hidrolitik kapasitelere sahip beta laktamazlardır. Penisilinleri, sefalosporinleri, karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize etme yeteneğine sahiptirler. Bu beta laktamazları üreten bakteriler, karbapenemaz enzimlerinin birçok beta laktamı etkisiz hale getirdiği kritik enfeksiyonlara sebep olabilir. Karbapenemazlar, moleküler sınıf A, B ve D beta laktamaz sınıfına aittirler. A ve D sınıfı enzimler serin enzimi bazlı hidrolitik mekanizmaya sahipken, B sınıfı enzimler aktif bölgesinde çinko bulunduran metallo beta laktamazlardır. GES, SME, IMI, KPC ve NMC ailelerinin üyeleri A sınıfı karbapenemaz grubunda bulunurlar. D sınıfı karbapenemazlar, *Acinetobacter baumannii* ' de genellikle tespit edilen OXA tipi beta laktamazlardan oluşur. IMP, VIM, SIM, GIM ve SPM aileleri Metallo-β-laktamaz grubuna dahildirler. Temel olarak *P. aeruginosa* ' da saptanmışlardır; aynı zamanda, *Enterobacterales* ailesindeki bu beta laktamaz grubu ile ilgili dünya çapında artan sayıda rapor bulunmaktadır (64).

Karbapenem grubu antimikrobiyaller genellikle diğer antibiyotiklere dirençli şiddetli bakteriyel enfeksiyonu bulunan hastaların tedavisinde kullanılan etkinliği kanıtlanmış en güçlü antimikrobiyal ajan grubu olarak kabul edilir. Son zamanlarda *Enterobacterales* türleri arasında KRE oranlarındaki artış önemli bir endişe kaynağıdır. KRE oranlarındaki bu artış çoğunlukla beta laktamazların özel bir grubu olan karbapenemazların ortaya çıkması ve yayılmasıyla oluşmuştur. Karbapenemleri hidrolize edebilen karbapenemaz üreten suşların çoğu karbapenemlere dirençlidir (60). Üç grup karbapenemaz KPC, NDM ve OXA-48 günümüzde epidemiyolojik ve klinik

öneme sahip üç ana beta laktamaz olarak kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde KPC enzimi, KRE suşlar tarafından en yaygın üretilen karbapenemazdır (61). KPC' nin Amerika Birleşik Devletleri'nde ve başka yerlerde artışına paralel olarak, bir başka karbapenemaz grubu olan OXA-48, 2000' li yıllarda Akdeniz ülkelerinde ortaya çıkmış ve yayılmıştır (62).

Enterobacterales üyeleri arasında B Sınıfı karbapenemazların son zamanlarda yayılması, panrezistan patojenlerin habercisidir. NDM, VIM ve IMP tipindeki B Sınıfı karbapenemazlar, *E. coli* ile *Klebsiella* arasında giderek daha fazla rapor edilmektedir. OXA-48 ailesi, *Enterobacterales* familyası içerisinde en sık gözlenen OXA türü karbapenemaz ailesidir. OXA-48 enzimlerinin ilk kez tespit edilip, rapor edildiği yer Türkiye'dir. Bu enzimler zayıf karbapenemazlardır. Bununla birlikte, çeşitli hidrolitik yeteneklere sahip OXA-48 mutantları da tanımlanmıştır. OXA-48 ailesi enzimlerine sahip suşlar çoğunlukla sefepim ve seftazidime benzer geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı duyarlılık gösterirler (51). Plazmitler yoluyla hızlı yayılma potansiyeli olan çeşitli karbapenemazlar KPC ve NDM tipi karbapenemazlar da dahil olmak üzere Türkiye'den giderek daha fazla bildirilmektedir (63).

2.2.3.3. Aminoglikozid direnci

Amikasin ve tobramisin de dahil olmak üzere aminoglikozitler, çoklu ilaca dirençli gram negatif basillere karşı kullanım için hâlâ güçlü ajanlardır. Aminoglikozitlere karşı en yaygın direnç mekanizmalarından biri, aktarımında esas olarak büyük plazmitlerin aracılık ettiği aminoglikozit asetiltransferazlar, aminoglikozit fosforilazlar ve aminoglikozit adeniltransferazlar gibi aminoglikozid modifiye edici enzimlerin (AME) üretimidir (65).

Aminoglikozid modifiye edici enzimler genellikle plazmid ile kodlanır, ancak aynı zamanda transpozonlar ile de ilişkilidirler. Plazmid değişimi ve transpozonların yayılması, yalnızca belirli bir tür içinde değil, aynı zamanda çok çeşitli bakteri türleri arasında ilaca dirençli bir fenotipin hızlı bir şekilde edinilmesini kolaylaştırmaktadır. Epidemiyolojik araştırmalarda, aminoglikozid direnç mekanizmaları ilk olarak klinik olarak kullanılan ve bu enzimlere karşı spesifik duyarlılığa sahip deneysel izolatların aminoglikozitlerden oluşan bir panele duyarlılığı incelenerek belirlenmiştir (72).

Aminoglikozitlerin sitoplazmik (iç) zar boyunca taşınması elektron taşınmasına bağlıdır ve enerjiye bağlı faz I (EDP-I) olarak adlandırılır. Hız sınırlayıcıdır ve iki değerlikli katyonlar, hiperosmolarite, düşük pH ve anaerobiyoz tarafından bloke veya inhibe edilir. Sitozolda aminoglikozitler, yine enerjiye bağlı bir süreçle (enerjiye bağımlı faz II [EDP-II]) ribozomların 30S alt birimine bağlanır. Aminoglikozid değiştirici enzimler, spesifik amino veya hidroksil fonksiyonlarının kovalent modifikasyonunu katalize ederler. Bu da ribozomlara zayıf bağlanan olarak değiştirilmiş bir ilaca yol açar. Bu durum ise çoğu zaman yüksek düzeyde direnç ile sonuçlanır (70, 71).

Ribozomal bağlanma bölgelerinin değiştirilmesi, sadece streptomisine karşı önemli bir dirence neden olmaktadır. Tüm aminoglikozitleri etkileyebilecek diğer ana mekanizma ise ilacın bakterilerde alımının ve/veya birikiminin azaltılmasıdır. *E. coli*'de neomisin, kanamisin ve higromisin A için aktif effluks kanıtlanmıştır (66, 67). Çoklu ilaca direnç proteinleri ailesinin bir üyesi olan protein Mdfa bu süreçte rol almaktadır ancak klinik önemi hala belirsizdir (68, 69).

2.2.3.4. Kinolon direnci

E. coli, hedef enzimleri değiştirerek, ilacın hücreye girişini engellemek için geçirgenliğini azaltarak veya ilacı aktif olarak hücre dışına pompalayarak kinolonlara karşı dirençli hale gelebilir. Tüm bu direnç mekanizmaları, yüksek düzeyde florokinolon direncinde rol oynayabilir, ancak hedef bölge mutasyonları en önemli mekanizmadır. Tüm kinolonlar aynı mekanizmaya sahip olduğundan, sınıfın bir üyesine karşı direnç, aynı zamanda ailenin tüm üyelerine karşı azalmış duyarlılığa yol açmaktadır (73).

2.2.3.5. Tigesiklin direnci

Minosiklin türevi olan tigesiklin, glisilsiklinler olarak isimlendirilen yeni bir tetrasiklin antibiyotik grubunun tıbbi olarak onaylanmış ilk temsilcisidir (74, 75). Tigesiklin, 30S alt biriminin ribozomal A bölgesine bağlanan ve translasyonu engelleyen geniş spektrumlu bakteriyostatik bir antimikrobiyal bileşiktir (76-78). Penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae*, MRSA, GSBL üreten bakteriler ve

VRE suşlarına karşı etkilidir (79). Ayrıca, Yeni Delhi metallo- β -laktamaz-1 (NDM-1) eksprese eden bakterileri tedavi etmek için son seçenek ilaçlardan biridir (80).

Son yıllarda GSBL ve karbapenemaz üreten *E. coli*' nin ortaya çıkması ile tedavi seçeneklerinin azalmıştır (81, 82). NDM-1 pozitifliği durumunda kolistin ve tigesiklin son seçenek ilaçlar olarak kullanılabilir (83, 84). Avrupa' da, *E. coli* suşlarında tigesikline direnç çok düşüktür (80). Ancak Tigesiklin Değerlendirme Sürveyans Denemesi sırasında toplanan bazı izolatlar, birkaç Avrupa ülkesinde tigesiklin MİK (minimal inhibitör konsantrasyon) değerlerinin arttığını göstermektedir (85).

Enterobacteriales üyelerindeki direnç, belirli düzenleyici lokuslar tarafından kontrol edilen effluks pompalarının ekspresyon artışının neden olduğu düşünülmektedir (86, 87). Ayrıca tigesikline azalmış duyarlılık gösteren suşlarda, AcrAB effluks sisteminin ve porin OmpF' nin ekspresyonunu etkileyen global bir aktivatör olan marA' nın artan ekspresyonu saptanmıştır (86).

2.2.3.6. Kolistin direnci

Bakterilerde polimiksinlere direnç, yaygın olarak lipopolisakarit molekülünü dış zara sabitleyen ve polimiksin afinitesinde azalmaya neden olan lipid A' nın modifikasyonundan kaynaklanır. Günümüze kadar raporlanan tüm polimiksin direnç mekanizmaları; lipid A modifikasyonuna neden olan, iki bileşenli düzenleyici sistemleri kodlayan genlerdeki SNP' ler (single nucleotide polymorphisms) de dahil olmak üzere (pmrAB, phoPQ gibi) kromozomal olarak gerçekleşmiştir (88). Ancak yakın zamanda *E. coli* ve *K. pneumoniae*' da mcr-1 olarak adlandırılan plazmit aracılı kolistin direnç mekanizmasının ilk vakası bildirilmiştir (89).

2.2.4. MDR *E. coli* izolatlarında tedavi seçenekleri

MDR *E. coli* suşları genellikle ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) grubuna aittir. MDR *E. coli*; tedavi seçeneklerini azaltarak, enfeksiyonların tedavisinde artan problemlere yol açmaktadır (90). Antibiyotik direncine karşı savaşmak için, daha güçlü antibiyotikler kullanılarak yapılan tedavi veya birden fazla antibiyotiğin kombinasyon tedavisi gibi tarihsel stratejiler uygulanmaktadır (91). Örneğin aminoglikozitler, tigesiklin ve polimiksinler (kolistin veya polimiksin B) ciddi

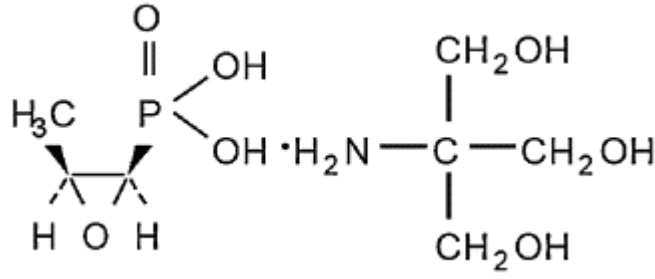
enfeksiyonlarda MDR *E. coli* tedavisinde kullanılır (92). Peroral fosfomisin GSBL üreten *E. coli*'nin neden olduğu İYE tedavisinde mükemmel aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (91). Bununla birlikte *Lactobacillus crispatus* CTV05 gibi çeşitli türler, *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Mikrobiyotayı koruyarak enfeksiyonlarla savaşmak ve böylece antibiyotik direncini önlemek yeni bir alternatif yaklaşım olmuştur (93).

2.3. Fosfomisin

Son yıllarda sürekli artış gösteren MDR bakteri sayısı, bu bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlar için antibiyotik tedavilerinin yeniden değerlendirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Fosfomisin, günümüzde bu tür enfeksiyonlar için alternatif olabilecek bir tedavi seçeneği olarak yeniden değerlendirilmektedir. Fosfomisin ilk olarak 1969 yılında *Streptomyces* türlerinin kültürlerinden keşfedilmiştir. Orijinal olarak fosfonomisin olarak adlandırılmıştır. İlk yıllarda menenjit de dahil olmak üzere ciddi enfeksiyonu olan birçok hastaya, fosfomisin parenteral olarak uygulanmıştır. Çoklu ilaca dirençli bakteriyel enfeksiyonların, nötropeni ve ateşi bulunan pediatrik onkoloji hastalarının tedavisinde diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde fosfomisin kullanımı bu ajana dikkatleri çekmiştir. Fosfomisin geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir; VRE, MRSA ve birçok gram negatif bakteri üzerine hızlı bakterisidal etkiye sahiptir. Uzun serum yarılanma ömrüne sahip olan fosfomisin, oral uygulama sonrasında idrarda yüksek konsantrasyonlara ulaştığından; *Enterococcus faecalis* ve *E.coli*'nin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde tek doz olarak uygulanabilmektedir (94).

2.3.1. Fosfomisin' in kimyasal yapısı ve uygulanan formları

Fosfomisin, bilinen diğer herhangi bir antibakteriyel ajanla kimyasal olarak ilgisi olmayan benzersiz bir antibiyotiktir. Son derece düşük moleküler ağırlığa sahip bir fosfonik asit türevidir ve proteinlere neredeyse hiç bağlanma göstermez. Ampirik formülü $C_3H_7O_4P \cdot C_4H_{11}NO_3$ 'tür ve kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 1) (96).



Şekil 1: Fosfomisin' in Kimyasal Yapısı ⁽⁹⁶⁾

Fosfomisin iki oral formülasyonda mevcuttur; fosfomisin trometamin (eş anlamlısı trometamol) ve sentetik olarak hazırlanan fosfomisine göre geliştirilmiş biyoyararlanımı ile çözünür bir tuz olan fosfomisin kalsiyum. Fosfomisin trometamin, fosfomisin kalsiyuma kıyasla kana daha kolay emildiğinden, fosfomisin oral uygulaması için tercih edilen formülasyondur. Ayrıca fosfomisin disodyum olarak intravenöz bir formülasyon da mevcuttur (96).

2.3.2.Etki Mekanizması

Streptomyces wedmorensis, *Streptomyces viridochromogenes* ile *Streptomyces fradiae* bakterilerinin fermentasyon ürünü olan fosfomisin bir fosfoenolpiruvat analogudur (95).

Fosfomisin bakteriyel fimbria sentezini ve motilitesini azaltarak antibakteriyel etki gösterir. Gram negatif ve gram pozitif patojenlerin; üriner sistem epiteline, üriner kateterlerin iç tabakasına yapışmasını dolayısıyla kolonizasyonunu da engeller, inhibitör konsantrasyonların altında da adezyon önleyici etki yaratabilir. Adezyon özelliği bakterilere hücre yüzeyine tutunma, idrar akışına direnme, mesane yüzeyinde birikme ve dokulara girme yeteneği kazandırır; bu özellik, alt üriner sistem enfeksiyonunun patogeneğinde anahtar faktör olarak rol alır. Fosfomisin, biyofilm tabakalarından da geçerek mikroorganizmalar üzerinde etki etmeye devam eder. Düşük inhibitör konsantrasyonlarda dahi fosfomisin, *E. coli*' nin plazmitleri transfer etme ve patojenite ile ilgili enzimleri üretme yeteneğini engellediği da gösterilmiştir (94).

Fosfomisin, fosfoenolpiruvat sentetaz içeren ilk basamağı inhibe ederek gram negatif ve gram pozitif bakterilerde hücre duvarı sentezini bloke eden bakterisidal etkili bir

antimikrobiyaldır. Fosfomisin, duyarlı bakteri hücrelerine iki farklı taşıma sistemi aracılığıyla girer: yapısal olarak işlevsel bir l-a-gliserofosfat taşıma sistemi (GlpT) ve heksoz-fosfat alım sistemi (UhpT). Peptidoglikan sentezini N-asetilmuramik asit oluşumunu bloke ederek inhibe eder.

Fosfomisinin, çok çeşitli gram negatif ile gram pozitif bakterileri kapsayan geniş bir etki spektrumu mevcuttur. Eşsiz etki mekanizması, beta-laktamlar, aminoglikozitler ve florokinolonlar da dahil olmak üzere diğer antibiyotiklere sinerjik bir etkileşim sağlayabilir (96).

Fosfomisin, lenfosit, monosit ve nötrofil fonksiyonunu değiştirerek immünomodülatör etkiler göstermektedir. Akut inflamatuvar sitokin yanıtını in-vitro ve in-vivo ortamda etkilemektedir. İnterlökin-1 β (IL-1 β) , Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-1 α üretimini baskımlarken, IL-10 üretimini arttırmaktadır. Fosfomisin, kronik hemodiyaliz uygulanan ve renal transplantasyon alıcısı hastalarda bile patojenlerin nötrofil aracılı fagositozunu artırır ve diğer antimikrobiyallere kıyasla nötrofillerin bakterisidal yeteneklerinin de artmasına neden olur (102).

Staphylococcus saprophyticus, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter spp.* , *Staphylococcus capitis* ve *Pseudomonas spp.* fosfomisine doğal olarak dirençlidir (102).

2.3.3. Farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler

Fosfomisin, oral uygulamayı takiben hızla emilir ve serbest asit olan fosfomisine dönüştürülür. Biyoyararlanım fosfomisin trometamin için yaklaşık %40 olmasına karşılık fosfomisinin kalsiyum tuzu için %12' dir. Fosfomisin trometaminin %30-60 'ı idrarla değişmeden atılmakta buna karşın, fosfomisinin kalsiyum tuzu %9-18' i değişmeden atılmaktadır (97). Fosfomisinin renal eliminasyon oranı %95' tir. Tübüler sekresyon oluşmaz. Fosfomisin, 4 ila 8 saat arasında değişen nispeten uzun bir eliminasyon yarı ömrüne sahiptir (98). Fosfomisin, serum, böbrekler, mesane duvarı, prostat, akciğerler, kemik, beyin omurilik sıvısı, apse sıvısı ve kalp kapakçıklarında klinik olarak anlamlı konsantrasyonlara ulaşarak dokularda iyi bir dağılıma sahiptir. Fosfomisin, inflamasyonlu meninkslerin varlığında beyin omurilik sıvısına (BOS) ve dokulara yeterince nüfuz eder (96).

2.3.4. Etki spektrumu

Fosfomisinin antimikrobiyal aktivitesi oldukça geniştir. Fosfomisin, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), sefalosporin ve / veya penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae*, MRSA ve VRE türleri gibi gram pozitif koklara karşı mükemmel bir bakterisidal aktivite gösterir, Fosfomisin ayrıca *Neisseria meningitidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter türleri*, *Shigella spp*, *Serratia marcescens*, ve genellikle ≤ 64 µg/ml fosfomisin konsantrasyonlarında inhibe edilen *Salmonella typhi* gibi birçok gram negatif bakteriye karşı çok iyi aktivite gösterir. *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* izolatları genellikle fosfomisine dirençlidir. Ancak fosfomisin, beta laktam antibiyotikler (sefepim, aztreonam veya meropenem) veya aminoglikozitler gibi diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde etkili olabilir (96).

Fosfomisinin aminoglikozidlerle kombinasyonları, diğer sınıflardan antibiyotikler ile kombine kullnımları karşılaştırıldığında daha yüksek bakterisidal etkiler göstermiştir. Bu, antibiyotiğe dirençli patojenlerin yönetiminde çok hedefli bir mekanizmanın rolünü göstermektedir. *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* dahil olmak üzere MDR bakteriyel izolatlarına karşı fosfomisin ve aminoglikozitlerin (amikasin veya gentamisin) kombinasyon tedavileri için benzer bulgular bildirilmiştir (101).

2.3.5. Fosfomisin duyarlılık testleri

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin fosfomisine in-vitro duyarlılıklarını belirlemek için agar dilüsyon, broth dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır (99). Genellikle aerobik atmosferde 35-37 °C' de 25 µg/ml glukoz-6-fosfat eklenmiş Mueller–Hinton agar veya broth kullanılarak agar veya broth dilüsyon testi önerilmektedir (100).

MDR gram negatif patojenler için agar dilüsyon, disk difüzyonu ve Epsilometer test karşılaştırıldığında, disk difüzyonunun *Acinetobacter baumannii* ve *Enterobacterales* için düşük performans gösterdiğini ve Epsilometer test' in test edilen tüm patojenler için kötü performans göstermiştir (102).

2.3.6. Fosfomisin direnç mekanizmaları

2.3.6.1. Fosfomisin Taşıyıcı Sistemlerindeki Değişiklikler

E. coli gibi yaygın olarak fosfomisine duyarlı bakterilerde, bakteri içine fosfomisine giriş aracı olarak kullanılan alım sistemlerinde mutasyonlar meydana geldiğinde direnç gelişmektedir (103). Fosfomisin taşıyıcılarını kodlayan kromozomal *glpT* ve *uhpT* genlerindeki mutasyonlar, fosfomisin alımının bloke edilmesine veya azalmasına neden olmaktadır (104, 105).

cyaA ve *ptsI* genlerindeki mutasyonlar ise (düşük cAMP seviyeleri ve fosfomisin taşıyıcılarının aşağı regülasyonu ile sonuçlanmaktadır) da tanımlanmış ve pilus biyosentezinde ve epitel hücrelerine yapışma kabiliyetinde bir azalma ile ilişkilendirilmiştir (104, 106).

2.3.6.2. MurA mutasyonları

MurA'daki mutasyonlar, enolpiruvil transferazın fosfomisin için daha düşük afinitesi ile sonuçlanır (107). Enolpiruvil transferazın fazla miktarda eksprese olması da fosfomisin direnci ile ilişkilidir (105).

2.3.6.3. Enzimatik inaktivasyon

Birçok fosfomisin modifiye edici enzim tanımlanmıştır. İlk tanımlanan (1988'de) FosA (glutatyon S-transferaz), *Enterobacteriales* ailesinde plazmitler yoluyla aktarılan bir metalloenzimdir. Aktif olmayan bir eklenti ile glutatyon ve fosfomisin arasındaki reaksiyonu katalize eder. Genin benzer yapıya sahip yeni alt tipleri tanımlanmıştır (fosA2, fosA3, fosA4 ve fosA5). Plazmitlerde birlikte aktarılan, blaSFO-1, blaCTX-M, blaCMY, blaNDM, blaOXA, blaKPC, blaAmpC, blaTEM, blaSHV, *gyrA*, *parC*, *parE*, *sul1*, *sul2*, *strA*, *strB*, *aac(6')-Ib*, *aadA*, *tetA(A)*, *dfrA7*, *mphA*, *mera*, *rmtB*, *aphA6* ve *floR* genlerinin beta laktamlara, kinolonlara, aminoglikozidlere, makrolidlere, sülfonamidlere ve tetrasiklinlere karşı direnç kazandırdığı bildirilmiştir (102).

FosB, gram pozitif bakterilerde (*Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*'de ve kromozomal olarak *Bacillus subtilis*'te kodlanan plazmit) sistein ve fosfomisin arasındaki reaksiyonu katalize eden benzer bir enzimdir (aminoasit dizisi FosA'ninkine %48 oranında benzerdir) (102). FosX, fosfomisinin su ile reaksiyonunu

katalize eden *Listeria monocytogenes*' in bir kromozomal enzimidir (108). *Pseudomonas syringae*' da bulunan FosC, ATP ile fosforilasyonu katalize eden glutatyon S-transferaza benzer bir enzimdir ve fosfomisin inaktivasyonuna neden olur (109).

Fosforilasyon yoluyla fosfomisin yapı bozukluğuna neden olan kinazlar (yapısal ve işlevsel olarak FosC ile ilişkili olan FomA ve FomB) *Streptomyces spp.* ve nadiren *P.aeruginosa*' da tanımlanmıştır (110).

2.3.7. Fosfomisin klinik kullanımı

2.3.7.1. İv fosfomisin

Falagas ve ark.' ları, intravenöz fosfomisin uygulaması ile ilgili olarak gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile enfekte olan 1604 hastayı incelemiştir (pnömoni, osteomyelit, obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlar, artrit, sepsis, cervical lamfadenit, peritonit, burun ve boğaz enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, diyabetik ayak enfeksiyonları ve tifo ateşi). Hastalar tek başına veya diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde intravenöz fosfomisin ile tedavi edilmiştir. Tedavi protokolü hastaların % 81.1' inde başarılı olmuştur (111).

Son zamanlarda, MRSA, VRE ve MDR gram negatif bakteriler, özellikle karbapenem dirençli *K. pneumoniae* kaynaklı sepsis veya nosokomial enfeksiyonları olan kritik hastalarda, benzeri olmayan etki mekanizması ve aminoglikozitler veya kolistin tarafından indüklenen nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisi nedeniyle intravenöz fosfomisin uygulanmıştır. Michalopoulos ve ark.' ları, karbapenem dirençli *K. pneumoniae*' nin neden olduğu yoğun bakım ünitesi kaynaklı enfeksiyonlarda fosfomisinin etkinliğini ve güvenliğini incelemiştir. Fosfomisinin, özellikle diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde erişkin hastalarda karbapenem dirençli *K. pneumoniae*' ya bağlı enfeksiyonların tedavisinde bir alternatif olarak düşünülebileceği sonucuna varmışlardır. Veriler ayrıca fosfomisinin intravenöz formülasyonunun göz enfeksiyonları için faydalı olabileceğini düşündürmektedir (96).

2.3.7.2. Oral fosfomisin

Fosfomisin esas olarak, özellikle *E. coli* ve *Enterococcus faecalis*' in neden olduğu ve dirençli gram pozitif ve gram negatif bakterilere bağlı nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Çoğu Avrupa ülkesinde, oral fosfomisin uzun yıllardır, özellikle komplike olmayan sistit tedavisinde kullanılmaktadır. Tek doz fosfomisin trometamin, 1-3 gün boyunca idrarda terapötik bir konsantrasyon oluşturur. Karşılaştırmalı klinik deneyler, 3 g tek doz fosfomisin trometaminin, İYE' leri tedavi etmek için kullanılan nitrofurantoin, norfloksasin ve trimetoprim/sülfametoksazol gibi standart ajanların 7-10 günlük tedavi rejimleri kadar klinik olarak etkili olduğunu göstermektedir. Fosfomisin trometamin iyi tolere edilir ve gebelik sırasında kullanım için güvenlidir (96).

2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

2.4.1. Gradient difüzyon testi (Epsilometer test)

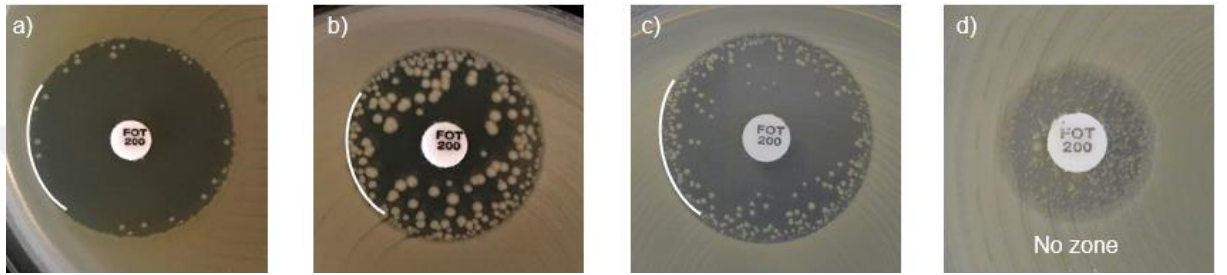
Gradient difüzyon testinde, emdirilmiş antimikrobiyal içeren şeritler ile kullanılır. Agar yüzeyine yerleştirilen şeritler, antibiyotiğin besiyerine yayılımı açısından disk difüzyon testi ile aynı prensiplerden yararlanır, ancak MİK değerleri, test edilecek antibiyotiğin bir gradyanı uygulanarak saptanır. Şeritteki antibiyotik gradyanı, artan sayıda küçük nokta üzerinde tekrarlanan dizilerde 15 farklı antimikrobiyal konsantrasyonu uygulanarak yapılmıştır. Stripin inokülasyon ortamına yerleştirilmesi, antibiyotiğin agar üzerinde, şeridin bir ucundan diğer ucuna, düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru yayılmasına neden olur. MİK, büyüme inhibisyon bölgesinin şeridin kenarıyla kesiştiği şeridin üst tarafında basılı doğrusal ölçekte okunur.

2.4.2. Disk difüzyon yöntemi

Bu yöntem, kullanım kolaylığı ve diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha düşük maliyetli olması nedeniyle halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Seyreltme yöntemlerinden farklı olarak, bir MİK değeri saptanamaz, ancak duyarlılık

kategorisini tahmin etmek için ilaç inhibisyon bölgesinin çapı aynı suşun MİK değerleriyle karşılaştırılır.

E. coli suşları için 50 µg Glukoz 6 fosfat içeren 200 µg fosfomisin içeren diskler ile disk difüzyon testi yapılması önerilmektedir. Şekil 2' de görülen a, b, c örneklerinde zon içerisindeki koloniler gözardı edilir, d örneğinde ise inhibisyon zonu oluşmamış kabul edilir (6).



Şekil 2. *E. coli* için fosfomisin disk difüzyon testi inhibisyon zonu değerlendirilme örnekleri⁽⁶⁾.

2.4.3. Sıvı makrodilüsyon yöntemi

Başlangıçta sıvı ortamda antimikrobiyal ajanın seri dilüsyonları yapılır, ardından standart bir bakteri süspansiyonu eklenir. Genellikle 10 adet tüp içerisinde 1 ila 2 mL' lik bir hacimde katyon ayarlı müller hinton besiyeri kullanılır. Test edilecek mikroorganizma inokülasyonu yapılır ve 35 °C' de 16- 20 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresinin sonunda tüpler bulanıklık değerlendirilerek görsel olarak incelenir. Bulanıklılık, ortamda bulunan antimikrobiyal ajanın konsantrasyonu ile bakteri üremesinin inhibe olmadığını gösterir. Bulanıklık görülmeyen ilk dilüsyon değeri MİK değeri olarak kabul edilir.

Aynı anda test edilmesi gereken antibiyotik sayısındaki büyük artış nedeniyle klinik patojenler için, sıvı makrodilüsyon prosedürü artık klinik laboratuvarlarda yapılmamaktadır. Bunun yerine, sıvı makrodilüsyon yönteminin bir uyarlaması olan sıvı mikrodilüsyon testi yapılır.

2.4.4. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon (SMD) prosedürü, mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara duyarlılığının plastik bir plakaya kalıplanmış bir dizi mikrotüp kuyucuğunda belirlenmesi dışında prensip olarak makrodilüsyon yöntemine benzerdir.

2.4.5. Agar dilüsyon yöntemi

Referans bir yöntem olan agar dilüsyon prosedüründe, katı besiyeri ortamı kullanılır. Bu yöntem, yalnızca seçilmiş olan antimikrobiyal madde konsantrasyonlarını test ederek büyük laboratuvarlarda rutin kullanım için başarıyla uyarlanmıştır. Yöntemin kısa bir açıklaması ana hatlarıyla verilmiş olsa da, agar dilüsyon testi esas olarak referans laboratuvarlar tarafından uygulanmaktadır. Standartlaştırılmış bir bakteri süspansiyonu, her biri farklı konsantrasyonda antimikrobiyal içeren ve ilacın terapötik aralığını kapsayan bir dizi agar plakasına inoküle edilir. 35 °C’ de 18 saat inkübe edildikten sonra değerlendirmeye alınır. Örneğin, belirli bir antimikrobiyal ajan için terapötik aralık 2 ila 12 µg/ g ise 1, 4, 8, 16 ve 32 µg/ mL antimikrobiyal ajan içeren bir dizi agar plakası, test edilen organizmanın duyarlılığını belirlemek için kullanılabilir. Organizma ilk üç dilüsyon plağında ürer, ancak 16 µg/mL antimikrobiyal madde içeren dilüsyon plağında üremezse, o zaman 16 µg/mL’lik bir MİK değeri saptanır.

2.4.6. Otomatize sistemler

Otomatize sistemler, daha kısa çalışma süresine ve manuel yöntemlere göre daha az emekle çok sayıda sonuç üretimine olanak sağlar. Otomatize sonuçlar yüksek oranda tekrarlanabilir ve uzman bilgisayar sistemlerinin geliştirilmesi, sistemde yerleşik uzman kuralları kullanarak sonuçların yerleşik olarak yorumlanmasına ve büyük miktarda duyarlılık verisinin toplanması ve analiz edilmesine olanak tanımaktadır. Çoğu büyük laboratuvar otomatik bir sistem satın almış olsa da, enstrümantasyon üzerindeki yüksek sermaye maliyeti ve manuel yöntemlere kıyasla gerekli sarf malzemeleri, bazı küçük tesislerdeki kullanımını kısıtlamıştır (113).

2.5. Antibiyotik Kombinasyon Testleri

Günümüzde bakterilerde antibiyotik direnç oranları hızlı bir şekilde artmaktadır. Bu sebeple yeni antimikrobiyaller geliştirilmeye çalışılmaktadır. Fakat bu süreç uzun bir zaman alacağından, halihazırda kullanılan antimikrobiyallerin etkisinin devam etmesinin sağlanması önem arz etmektedir. Bu sebeple, farklı tedavi stratejileri ve yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi aşamalarında, bakterilerde meydana gelen direnç ile savaşılabilmek için, monoterapinin yerini kombinasyon tedavisi almaktadır.

Kombinasyon antibiyotik tedavisinde kullanılan antimikrobiyaller arasında 4 farklı etkileşim olur. Bunlar;

1- Sinerjistik Etki: Çalışılan antibiyotiklerin birarada ortaya çıkardığı etki, her bir antibiyotik tek başına oluşturduğu etkiden daha yüksek ise, bu duruma sinerjistik etki adı verilir. Kombinasyon çalışmalarında sinerjistik etki 3 farklı şekilde olabilir. Bunlar antimikrobiyallerin bakterilerde farklı yollarla farklı hedefleri veya farklı yollarla aynı hedefleri inhibe etmesi, aynı yolla farklı hedefleri inhibe etmesi şeklinde sıralanabilir.

2- Additif Etki: Kombinasyon çalışmasında araştırılan antibiyotiklerin birlikte etkisi, ayrı ayrı etkilerinin toplandığında oluşan etki kadar ise bu etkileşim additif etki olarak tanımlanır. Kısmi sinerji ismi de verilmektedir.

3- Antagonizma: Çalışılan antibiyotiklerin birarada ortaya çıkardığı etki, her bir antibiyotik tek başına kullanılması sonucunda gerçekleşen etkiden az ise bu durumda antagonist etkiden bahsedilir. Burada negatif bir etkileşim oluşmaktadır.

4- İndiferan Etki: Antibiyotiklerin bir arada kullanıldıklarında oluşan etki, içlerinden daha etkili olan antibiyotik oluşturduğu kadardır. Antibiyotikler birbiriyle etkileşim içine girmezler (114- 116).

Sinerji Saptama Yöntemleri

Antibiyotik kombinasyon testlerinin in-vitro etkinliğinin saptanması amacıyla 4 yöntem kullanılabilir.

1- Zamana bağlı öldürme yöntemi

2- Dilüsyon yöntemleri

a) Agar dilüsyon yöntemi

b) Mikrodilüsyon yöntemi

c) Makrodilüsyon yöntemi

3- Gradient difüzyon yöntemi (bakınız; antibiyotik duyarlılık testleri)

4- Disk diffüzyon yöntemi (bakınız; antibiyotik duyarlılık testleri)

2.5.1. Zamana bağlı öldürme yöntemi

Zamana bağlı öldürme yöntemi kombinasyonun oluşturduğu bakterisidal etki durumunu, dilüsyon testleri ise sıklıkla antibiyotik kombinasyonlarının inhibisyon etki durumunu ölçmek için kullanılır.

2.5.2. Dilüsyon yöntemleri (Checkerboard(CB))

2.5.2.1. Agar dilüsyon yöntemi

Kombinasyon çalışmasında az sayıda antibiyotik ve çok suş çalışılacaksa bu yöntem tercih edilebilir. Her bir antibiyotik solüsyonu plaktaki 20 mL agar ile dilüe olacaktır. Bu nedenle stok solüsyonlar planlanan son konsantrasyonun 20 katı derişimde hazırlanır. Agara eklenecek olan her bir antibiyotik solüsyonu hacmi plaktaki agar miktarının en fazla %5' i kadar olmalıdır. Agar yüzeyine 10^4 CFU (Colony Forming Unit) bakteri içerecek şekilde ekim yapılır. Değerlendirmeler mikrodilüsyon yönteminde yapıldığı şekilde yapılır (114, 115).

2.5.2.2. Mikrodilüsyon yöntemi

Mikrodilüsyon CB metodu çalışma prosedürü ve sonuçların değerlendirilmesi bakımından basit bir yöntemdir. Araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir (115, 117).

Bu yöntemde kombinasyonda kullanılacak her bir antibiyotik için bir U tabanlı 96 kuyucuklu steril mikropalak gereklidir. Çalışılacak olan antibiyotiklerin stok solüsyonları hazırlanır. İlk antibiyotik için yukarıdan aşağı, diğer antibiyotik için farklı bir mikropalakta sağ taraftan sola doğru seri şekilde dilüsyonlar yapılır. Daha sonra

ikinci antibiyotik dilüsyonları birinci antibiyotik dilüsyonlarına eklenir. Her bir antibiyotik için MİK değerlerini saptamak amacıyla ayrı bir bölgede birer sutun kullanılır. Çalışılan mikroorganizmanın o antibiyotik için duyarlı MİK değer aralığının en az 3-4 kat alt ve en az 2 (optimum 8) kat üst dilüsyonları kullanılmalıdır. Çalışma için bir gece inkübe edilmiş taze kültür kullanılmalıdır. Bakteri için inokulum hazırlamak amacıyla Katyon Ayarlı Mueller Hinton Buyyon (KAMHB) (Ca^{+2} : 20-25 mg/L, Mg^{+2} : 10-12.5 mg/L ile desteklenen Mueller Hinton Buyyon) veya steril % 8.5 tuzlu su kullanılmalıdır (115).

İnokulumun hazırlanması

Başlangıçta 0.5 McFarland bulanıklık değerinde (1.5×10^8 CFU/mL) bakteri süspansiyonu hazırlanır. Son adımda bakteri süspansiyonu kuyucuklara eklendiğinde bakteri yoğunluğu 1.10^5 CFU/ mL olmalıdır. Kuyucukta bulunan besiyeri miktarı 0.1 mL ise ve inokulum miktarı 0.01 mL ise bu durumda 0.5 McFarland süspansiyonu (1×10^8 CFU/mL) 1: 20 sulandırılmalı ve 5×10^6 CFU/ mL sayısı elde edilmelidir. Bu süspansiyondan 0.01 mL miktarında alınıp mikropalak kuyucuğuna eklenir ise, çalışılan bakterinin son yoğunluğu ortalama 5×10^5 CFU/mL olacaktır (118).

Her bir mikropalakta bir kuyucuk üreme kontrolü amacıyla antibiyotiksiz bırakılmalıdır. Bir kuyucuk da besiyeri kontrolü amacıyla yalnızca besiyeri içermelidir. İnkübasyon sonrası antibiyotiksiz kuyucukta yoğun üreme görülmeli yalnızca besiyeri içeren inokulum eklenmemiş kuyucukta ise üreme görülmemelidir. Kalite kontrolü ise uygun olan ATCC (American Type Culture Collection) suşları kullanılarak yapılır. Kalite kontrolü amacıyla kullanılan antibiyotik stok solüsyonları ile sulandırmaları çalışılmalıdır.

İnokulum saflığının kontrol edilmesi amacıyla çalışılan bakteri süspansiyonu (5×10^6 CFU/mL) 1: 100 oranında sulandırılıp 1 µL koyun kanlı agara ekilir ve 24 saat sonra üreyen kolonilerin saf olup olmadığına bakılır (115).

İnokulum yoğunluğunun kontrol edilmesi amacıyla üreme kontrol kuyucuğunun içerisinde 10 µL miktarında bir tüpe konulur. Üzerine 90 µL steril serum fizyolojik eklenir (1: 10 dilüsyon). Bu tüpten alınıp 1: 10 oranında dilüe edilir (toplam 1: 100 dilüsyon). Son tüpten de 1: 5 oranında dilüsyon yapılır (toplamda 1: 500 dilüsyon)

oluşan bu son dilüsyon oranından 100 µL alınır ve koyun kanlı agara ekilir. Yaklaşık 18 saat (16- 20) 35-37°C’de inkübasyon sonrası plakta ortalama olarak 100 koloni (75- 125) bulunması gerekir. Antibiyotik kombinasyon paneli tamamlanır ve daha sonra mikroplak ortalama 18 saat (16- 20) süreyle 35- 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılır.

Kalite kontrol suşlarının MİK değerleri uygun ise ve inokulum saflık kontrolü, üreme kontrolü, besiyeri sterilite kontrolü, inokulum yoğunluk sonuçları olması gereken şekilde olduyorsa test geçerli kabul edilmektedir. Daha sonra mikroplak değerlendirilir.

İlk olarak birinci antibiyotiğin, daha sonra ikinci antibiyotiğin tek başına MİK değerleri okunur ve kayıt altına alınır. Sonra kombinasyon kuyucukları okunur ve üreme olan kuyucuklar kaydedilir. Sonuçların yorumlanması amacıyla öncelikle her iki antibiyotiğin ayrı ayrı fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanır.

a antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri

FİK a = -----

a antibiyotiğinin tek başına MİK değeri

b antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri

FİK b = -----

b antibiyotiğinin tek başına MİK değeri

FİK indeksi (FİKİ)= FİK_a + FİK_b

$FİKİ \leq 0.5$ ise sinerjistik; $> 0.5 - \leq 1$ ise additif; $> 1 - < 4$ ise indiferan; ≥ 4 ise antagonistik etki olarak değerlendirilir (114, 119, 120).

2.5.2.3. Makrodilüsyon yöntemi

Mikrodilüsyon ile yöntem olarak aynıdır. Mikroplak yerine deney tüpleri ile çalışılır. Her bir tüp içerisinde bulunuyor olması gereken miktar 0.25’ er mL hacimde iki

antibiyotik solüsyonu ile 0.5 mL bakteri süspansiyonu yani toplamda 1 mL kadardır. Bu yöntemde büyük miktarlarla çalışıldığı için mikrodilüsyonda çalışılan panelin tümünü makrodilüsyon yöntemi ile sağlamak oldukça güçtür. Sıklıkla kısıtlı panel hazırlanıp 1/2 MİK, MİK ve 2 x MİK değerleri kullanılır. Antibiyotik stok solüsyonları her bir test tüpü içerisinde hedeflenen son konsantrasyonun 4 katı olmak zorundadır. Mikrodilüsyon metodu ile aynı biçimde değerlendirilir (115).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 04.02.2021 tarihinde Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 100 numaralı karar ile etik kurallara uygun bulunmuş ve yürütülmüştür.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar

- 1) Vortex
- 2) Hassas Terazî
- 3) - 20 °C Buzdolabı
- 4) Steril enjektör(10 ml)
- 5) + 4 °C Buzdolabı
- 6) Bunsen Beki
- 7) Etüv
- 8) Otoklav
- 9) Pastör fırını
- 10) Benmari
- 11) Steril plastik öze (10 µl)
- 12) 6 lt, 4 lt, 1 lt hacimlerinde Balon joje
- 13) Puar
- 14) 25, 10 ve 5 cc lik steril cam pipet
- 15) Steril eküvyon
- 16) Steril folkon tüpü (45 ml)
- 17) Steril petri kutusu, 90 mm

- 18) Otomatik pipet (1-10µl)
- 19) Otomatik pipet (100-1000µl)
- 20) BD Phoenix (Becton-Dickinson Diagnostics, MD)
- 21) MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, ABD)
- 22) McFarland Cihazı (Becton-Dickinson Diagnostics)
- 23) Steril eppendorf tüpleri (2 ml)

3.1.2. Kullanılan malzemeler ve besiyerleri

- 1) %5 Koyun Kanlı Agar (RTA, Türkiye)
- 2) Katyon Ayarlı Müller Hilton Besiyeri (Becton-Dickinson, ABD)
- 3) Fosfomisin disodyum salt hidrat (Sigma / Aldrich, ABD)
- 4) Meropenem (Sigma / Aldrich, ABD)
- 5) Gentamisin (Sigma / Aldrich, ABD)
- 6) Seftriakson (Sigma / Aldrich, ABD)
- 7) %0,9 steril serum fizyolojik
- 8) Steril distile su
- 9) Glikoz 6 fosfat disodyum salt hidrat (Sigma / Aldrich, ABD)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Suşların toplanması

Bu çalışmaya 15.02.2021- 15.12.2021 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına klinik ve yoğun bakımlarda yatan hastalardan gönderilen çeşitli örneklerden (idrar, kan, aspirat, yara, beyin omurilik sıvısı, endotrakeal aspirat) izole edilen ve MALDI Biotyper 3.1 ile tanımlanan karbapenem dirençli 60 adet *E. coli* suşu dahil edildi. Mükerrer üreme görülen hasta numunelerinde en erken gönderilen numunedan izole edilen suş

çalışmaya dahil edildi. Poliklinik hastaları ve yatış süresi 48 saati geçmeyen hastalar çalışmaya alınmadı.

Suşların karbapenem direnci ve antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostics) ile çalışıldı. Ertapenem, imipenem ve meropenem disk difüzyon testleri ile karbapenem direnci doğrulandı. İzolatlar %20 gliserollü Tryptic Soy Broth besiyerine alınıp -20°C ' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Klinik numunelerin kültür işlemleri

Kan numuneleri hasta başında BD Bactec Peds Plus/F veya Bactec Plus aerobic/F şişelerine alınmış ardından inkübasyon için BACTEC FX (Becton- Dickinson, A.B.D) sistemine yerleştirilmiştir. Üreme sinyali göstren şişelerden EMB Agar, %5 Koyun Kanlı Agar, Sabouraud Dextrose Agar' a subkültürler yapılmıştır. İdrar ve endotrakeal aspirat örnekleri kantitatif yöntemle, diğer örneklerde ise besiyerlerine ekim seyreltme yöntemiyle yapılmıştır. Endotrakeal aspirat örneklerinde gram boyama preparatları incelenip Murrey ve Bartlett skorlama sistemi ile Bartlett skoru sıfırdan ve Murrey skoru üçten büyük olan örneklerde saptanan üremeler anlamlı kabul edilip çalışmaya alınmıştır (121).

Yara örneklerinde ise gram boyama için Q skorlama sistemine göre değerlendirme yapılmıştır. Q skoru sıfırdan fazla olan örneklerdeki üremeler çalışmaya dahil edilmiştir (122).

3.2.3. Bakteri izolatlarının identifikasyonu

Kültürde üreyen ve enfeksiyon ajanı olan izolatlar için, Maldi Biotyper 3 (Bruker Daltonics, ABD) sistemi kullanılmıştır. Kütle spektrometre (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight- Mass Spectrometry: MALDI-TOF-MS) yöntemi ile tanımlanmıştır.

Besiyerinde üremiş olan saf koloniler, önceden ekstraksiyon işlemi yapılmadan steril bir iğne öze yardımıyla paslanmaz çelik plağın üzerindeki her suş birer daireye olacak şekilde alınıp kuruması için bir süre beklendi. Çelik plağa alınan suşların üzerine sırasıyla 1'er µl formik asit ve siyano 4-hidroksisinnaminik asit (HCCA) matrix çözeltisi eklendi. İşlem aralıklarında örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Matriks çözeltisi, lazer ışınlarının çelik plak üzerindeki örnekler ile iletişimi gerçekleştirerek örnekte bulunan moleküllerin doğru şekilde iyonizasyonu için ortam sağlar. İyonize olup hızla moleküller cihaz içindeki silindirik alanda hareketlenir ve böylece cihaz içindeki detektöre ulaşmış olur. Tanımlama için laboratuvarımızda bulunan Microflex LT (Bruker Daltonics, Almanya) sistemi kullanılmıştır. Sistemde pozitif lineer mod ile 2-20 kDa kütle aralığında iyonlar oluşturulur. Bu iyonların detektöre çarpması ile ölçülen spektrumlar MALDI Biotyper 3.1 yazılımı (Bruker Daltonics, Almanya)'na aktarmaktadır. Bu spektrumlar cihazın veri tabanındaki spektrum görüntüleriyle karşılaştırılmaktadır. Her çalışma öncesi tanımlama sisteminin kalibrasyonu amaçlı Bakteriyel Test Standardı (BTS) kullanılmaktadır.

MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, ABD) sisteminde cihazda bir veri tabanı bulunmaktadır. Oluşan spektrum ile veri tabanındaki spektrumlar karşılaştırılır. Sonuçta benzerlik oranı baz alınarak mikroorganizmalara ait tanımlama skorları hesaplanır. Tanımlama skorları ne kadar yüksek ise, tanımlamanın güvenilirliği de o kadar yüksek olur. Skorun 2 veya üzerinde olması tanımlamanın cins ve tür düzeyinde; 1.7-2 arasında olması ise cins düzeyinde güvenilir olduğunu ifade etmektedir (123, 124).

Güvenilirliği şüpheli sonuçlarda ise kolonilerin saflığının, kültürün tazeliğinin, cihazın periyodik bakımlarının ve belli aralıklarla kalibrasyon durumlarının kontrol edilmesi önerilmektedir (125). Bu çalışmaya kütle skorlamasına göre puanı 2' nin üzerinde olan suşlar dahil edilmiştir.

3.2.4. Antimikrobiyal duyarlılık testi (ADT)

Çalışılan izolatların antimikrobiyal duyarlılık testleri, idrar örnekleri için Phoenix UNMIC-401 Paneli, diğer örnekler için NMIC-400 panelleri kullanılarak BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemi sistemi ile çalışılmıştır. Kültürde saf olarak üreyen suşlar 0.5 McFarland bulanıklığında suspanse edilip panellere aktarılmıştır. Yaklaşık 16- 18 saat sonra sonuçlanan antibiyotik duyarlılık raporları EUCAST v.11.0 kriterleri ve uzman kuralları baz alınarak değerlendirilmiştir (6).

E. coli suşları için BD Phoenix otomatize sistemle çalışılan karbapenem direnci kayıt altına alınmıştır. Karbapenem dirençli saptanan suşlar disk difüzyon testi ile tekrar çalışılıp doğrulanmıştır.

Taze kültür ekimi yapılan ve saflaştırılan birkaç bakteri kolonisi steril pamuklu eküvyon çubuğu ile alınıp steril %0.85 NaCl solüsyonunda, 0.5 McFarland değerinde standart bakteri yoğunluğunda süspanse edildi. Süspansiyonun 15 dakika içinde inokülasyonu yapıldı. Steril pamuklu eküvyon kullanılarak, inokulum süspansiyonu içerisinde çubuğun pamuklu kısmı tüpün duvarlarına bastırılarak pamuktaki fazla süspansiyon akıtıldı. İnokulum Mueller-Hinton agar (MHA) yüzeyinin her bölgesine eşit dağılacak şekilde 60 derecelik açılarla üç doğrultuda yayıldı. Ertapenem, imipenem ve meropenem diskleri inokülasyon bittikten sonra 15 dakika içerisinde agar yüzeyine yerleştirildi. Plaklar 15 dakika süre içerisinde ters çevrilip normal atmosfer basıncında $35\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 16-20 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. Otomatik kumpas ile, oluşan zon çapları ölçüldü. Zon çapları EUCAST referans sınır değer tabloları baz alınarak değerlendirme yapıldı (Tablo 2) (6, 112).

Tablo 2. *E. coli* için DDT'de karbapenemlerin zon çapı sınır değerleri.

	Meropenem(M)	Meropenem(MD)	İmipenem	Ertapenem
Disk İçeriği (µg)	10	10	10	10
Zon Çapı(mm)	22	22	22	25
sınırları	22	16	19	25

MD: Menenjit Dışı enfeksiyonlar M:Menenjit enfeksiyonları

3.2.5. Agar Dilüsyon yöntemi ile adt

EUCAST tarafından *Enterobacterales* familyası üyeleri için fosfomisin duyarlılığının belirlenmesi amacıyla kullanılacak yöntem olarak agar dilüsyon yöntemini önermektedir (112).

3.2.5.1. Fosfomisin ve diğer antibiyotiklerin çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Agar dilüsyon yöntemi için toz halde bulunan fosfomisin disodyum salt hidrat (Sigma-Aldrich, ABD) ve dilüsyon oluşturmak için steril distile su kullanıldı. Her antibiyotik için EUCAST tarafından belirlenen MİK sınır değerinin 4 kat altı ve 3 kat üstü olacak şekilde 8 farklı dilüsyon hazırlanması planlandı.

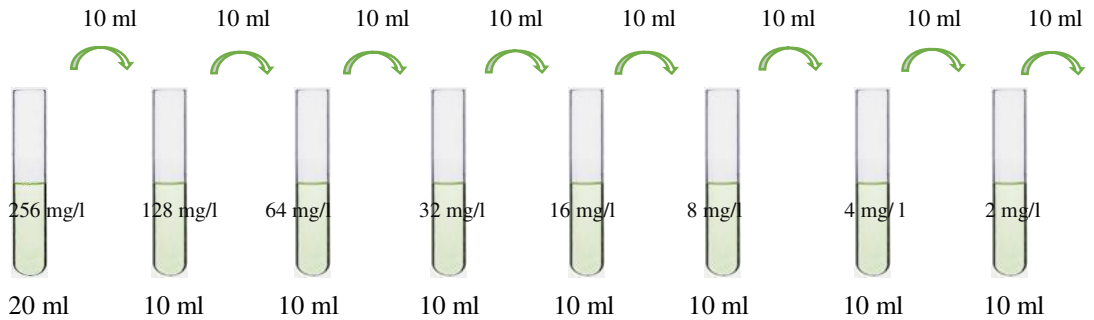
Buna göre fosfomisin için 2 mg/ l- 256 mg/l, meropenem ve gentamisin için 0.125 mg/ l- 16 mg/l, seftriakson için 0.0625 mg/ l- 8 mg/l dilüsyon aralığı belirlendi.

Hacim/ ağırlık/ potens formülü ile hesaplanan ve steril koşullarda tartılan steril 51.2 mg fosfomisin disodyum 20 ml steril distile su içerisinde çözündürülerek fosfomisin stok solüsyonu (2560 mg /L fosfomisin içeren) hazırlandı. Stok solüsyonunun MHA eklendiğinde 10 kat dilüe olması sonucu son konsantrasyonun 256 mg/l olması planlandı.

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

Dilüsyonlar 10 ml steril distile su içeren falkon tüpleri ile seri aktarım yapılarak oluşturuldu. 2 mg/l konsantrasyon değeri oluşana kadar toplamda 7 defa tüpler arası seri dilüsyon yapıldı. Son tüpteki 10 ml ise dışarı atıldı. Bu şekilde 256-128-64-32-16-8-4-2 mg/l şeklinde 8 farklı antibiyotik konsantrasyon solüsyonu elde edilmiş oldu.

Başlangıç stok solüsyonu hazırlamak amacıyla fosfomisin için kullanılan yöntem diğer antibiyotikler için de kullanıldı. Seftriakson için 1.6 mg, meropenem ve gentamisin için 3.2 mg toz antibiyotik hassas terazi ile tartıldı. Her bir antibiyotik için 7 kez sulandırım yapıldı. Böylece meropenem, gentamisin ve seftriakson için de 8 farklı konsantrasyonda antibiyotik dilüsyonu elde edilmiş oldu.



Şekil 2. Fosfomisin dilüsyon solüsyonlarının hazırlanması.

3.2.5.2. Agar besiyeri hazırlanması

Kasyon ayarlı Mueller Hinton Agar (KAMHA) (Becton Dickinson, USA) firma prospektüsü doğrultusunda hazırlandı. 121 °C ve 1 atm basınç değerinde 15–20 dakika otoklav kullanılarak (Hirayama, Japonya) sterilize edildi. Soğutulduktan sonra 45- 55 °C’de sabit sıcaklıkta kalması için sıcak su banyosunda bekletilmiştir.

3.2.5.3. Besiyerine G6P eklenmesi

Mikroorganizmaların fosfomisin için duyarlılıklarını belirlemek amacıyla sıvı mikrodilüsyon, agar dilüsyon, disk difüzyon ve Epsilometer test teknikleri kullanılmaktadır. EUCAST; agar dilüsyon yöntemi için kullanılan MHA ile SMD yöntemi için kullanılan sıvı besiyerine 25 mg/l G6P eklenmesini önermektedir (6).

Her 1 litre besiyeri için 25 mg G6P hesaplanıp tartıldı. 45-55°C’ de sıcak su banyosunda bekletilen 1 litre besiyerinden 20 ml miktarında alındı ve içerisine 25 mg G6P eklenip çözünmesi sağlandı. G6P eklenmiş olan 20 ml hacmindeki MHA, besiyeri filtresinden (Alkim, Türkiye) geçirilerek steril edildi. Sterilize olan G6P içeren besiyeri kalan besiyerine tekrar eklendi.

3.2.5.4. Agar dilüsyon petri plaklarının hazırlanması

Fosfomisin, meropenem, gentamisin ve seftriakson için monoterapi MİK değerlerini tespit etmek amacıyla tüm dilüsyonlar için birer petri plağı kullanıldı (Örneğin fosfomisin için 2 mg/l-256 mg/l arası olacak şekilde 8 farklı dilüsyon). Plakların üzerlerine içerdikleri antibiyotik konsantrasyonları not edildi. Kombinasyon çalışması için fosfomisin ile araştırılan diğer antibiyotiğin konsantrasyonları plakların üzerlerine not edildi (Örneğin fosfomisin 256 mg/l ve meropenem 32 mg/l şeklinde). Böylece her bir kombinasyon için 64 plak hazırlandı ve fosfomisin ile kullanılan diğer antibiyotiğin konsantrasyonu petrilerin üzerine not edildi. Toplamda monoterapi için 32 petri, kombinasyon için 192 petri hazırlandı. Mermer bir zemin üzerine 56 adet 1 cm² lik küçük kare içeren standart bir çizim yapıldı. Tüm plaklara bu çizimin tam üzerine gelecek şekilde inokulasyon yapıldı. Böylece okuma ve inokulasyon standardize edildi (Şekil 3 ve 4).

Her bir petri içine 1 kısım antibiyotik solüsyonu, 9 kısım KAMHA içerecek şekilde (2 ml antibiyotik solüsyonu ve 18 ml KAMHA) eklenip karıştırıldı. Ticari firma

prospektüsü uyarınca hazırlanan bu besiyeri sıcak su banyosunda 45-55 °C'ye kadar soğutuldu. Kullanılacak olan antibiyotik karışımından 1 kısım (2 ml) ve 9 kısım da MHA' nın (18 ml) petri plaklarının içerisinde karışması sağlandı (antibiyotik 1/10 sulandırılmış oldu). Bu şekilde agar dilüsyon plaklarının içerdikleri (fosfomisin için 2 mg/l-256 mg/l, seftriakson için 0.0625mg/l-8 mg/l ve meropenem- gentamisin için 0.125 mg/l-16 mg/l) antibiyotik konsantrasyonlarına ulaşıldı. Kullanılan besiyerinden hazırlanan, antibiyotik solüsyonu eklenmeyen plaklar üreme kontrolü amacıyla kullanılmıştır (**Şekil 5**) . Besiyeri ve antibiyotik solüsyonundan oluşan karışımların oda sıcaklığında katılaşması için beklenildi.

3.2.5.5. İzolatların hazırlanması ile besiyerine inokulasyonları

Önceden saklamaya alınmış olan saf olduğu bilinen suşlar oda sıcaklığında bekletildikten sonra %5 Koyun Kanlı Agara pasajlanıp 35°C' de 16- 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Taze kültürden alınan koloniler steril serum fizyolojik ile süspanse edilip Densichek (bioMerieux, Fransa) optik okuyucu kullanılarak 0.5 McFarland değerinde bulanıklık oluşturulmuştur.

Agar dilüsyon yöntemi prosedüründe yüzeydeki bakteri yoğunluğunun 10^4 KOB/ml olması gerekmektedir. 0.5 McFarland değeri yaklaşık olarak 10^8 KOB/ml bakteri içermektedir. Steril serum fizyolojik ile 1:10 oranında seyreltilerek 10^7 KOB/ml bakteri yoğunluğu elde edildi. Otomatik pipet ile her bir bakteri süspansiyonu içeren tüpten 2 µl miktarda alındı. En düşük konsantrasyonda fosfomisin içeren plaktan en yüksek konsantrasyonda fosfomisin içeren plağa doğru olacak şekilde, agar yüzeyinde hedeflenen alanlara inokulasyon yapıldı. Böylece her bir suş için 10^4 KOB/ml yoğunluğunda bakteri inokulasyonu yapılmış oldu. Bakteri süspansiyonlarının her birinin 15 dakika içerisinde inokulasyonu tamamlandı.

Fosfomisin içeren plaklara inokulasyon yapılmadan önce üreme kontrol plağına kontaminasyon kontrolü amacıyla inokulasyon yapıldı. Oda ısısında inokulum alanları kuruyana dek beklendi. Daha sonra plaklar ters çevrilip 35±2°C' de 16- 20 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.5.6. Kombinasyon çalışması

Çalışmamızda meropenem (Sigma-Aldrich, ABD), fosfomisin (Sigma-Aldrich, ABD), gentamisin (Sigma-Aldrich, ABD) , seftriakson (Sigma-Aldrich, ABD) toz antibiyotikleri ile glukoz 6 fosfat' ın (Sigma-Aldrich, ABD) toz formu kullanılmıştır. Hacim/ ağırlık/ potens formülü ile antibiyotik miktarları hesaplanmıştır. Stok solüsyonları hazırlandıktan sonra, antibiyotik solüsyonları duyarlı MİK aralığının 3 kat üst, 4 kat alt konsantrasyonları çalışılacak şekilde oluşturulmuştur. Dilüsyon aralıkları fosfomisin için 2 mg/l-256 mg/l, seftriakson için 0.0625 mg/l-8 mg/l, gentamisin ve meropenem için 0.125 mg/l-16 mg/l olarak hesaplanmıştır.

Seri dilüsyonları hazırlamak amacıyla ilk adımda stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonu için 256 mg fosfomisin steril koşullarda tartıldı. 50 ml steril distile su içerisinde çözdürülüp 5120 mg/l konsantrasyonunda fosfomisin disodyum elde edildi. Gentamisin, meropenem ve seftriakson için 3 ayrı stok solüsyonu kullanılacağından 3 adet hazırlanmıştır.

Dilüsyon için içerisinde 25 ml steril distile su bulunan falkon tüplerinden 7 adet hazırlandı. Stok solüsyonundan 25 ml alınıp sonraki tüplere seri bir şekilde aktarım yapıldı. Son falkon tüpünden 25 ml alınıp dışarı atıldı. Böylece son konsantrasyon olan 40 mg/l değeri elde edilmiş ve 8 farklı konsantrasyonda fosfomisin solüsyonu hazırlanmıştır.

Gentamisin, meropenem ve seftriakson için de kombinasyon çalışması için gerekli olan stok solüsyonu hazırlanırken aynı yöntemler kullanılmıştır. Fakat gentamisin ile meropenem için 0.125 -16 mg/l konsantrasyon aralığı belirlendiğinden başlangıçtaki tartımda gentamisin ve meropenemden 16 mg, seftriakson için 0.0625 l-8 mg/l konsantrasyon aralığı belirendiğinden başlangıçtaki tartımda seftriaksondan 8 mg alınarak 50' şer ml steril distile su içerisinde çözdürülmüştür. Dilüsyon işlemleri fosfomisin ile aynı şekilde yapılmıştır. Son konsantrasyon seftriakson için 1.25 mg/l, meropenem için 2.5 mg/l ve gentamisin için 2.5 mg/l olarak hazırlandı. Bu şekilde kombinasyon çalışmasına girecek her bir antibiyotik için içerisinde 25' er ml farklı konsantrasyonda antibiyotik solüsyonu bulunduran 8'er adet tüp hazırlanmıştır. Fosfomisin her üç antibiyotik ile birlikte çalışılacağı için 8x3 toplamda 24 adet hazırlanmıştır.

G6P eklenmiş olan KAMHA besiyerinden 18 ml, fosfomisin solüsyonundan 1 ml ve kombinasyonu çalışılacak olan ikinci antibiyotik solüsyonundan 1 ml hacminde steril petri kutusuna eklenmiştir. Hafifçe karıştırılıp ardından oda ısısında katılaşması için bekletilmiştir. Bu şekilde her antibiyotik, aynı hacimdeki ikinci antibiyotik solüsyonu ile karıştığından konsantrasyonu yarıya düşmüş ve besiyeri de eklendiğinden 9 kat daha dilüe olmuştur.

Kombinasyon çalışması yapılırken; fosfomisinin en düşük konsantrasyonu olan 40 mg/l konsantrasyonu içeren falkon tüpünden 1' er ml ve gentamisinin 2.5-320 mg/l konsantrasyon aralığındaki 8 farklı dilüsyonundan 1' er ml alınarak petrilere eklenip hafifçe karıştırıldı. Aynı şekilde 80 mg/l fosfomisin içeren ikinci dilüsyon tüpünden de 1' er ml ve gentamisinin 8 farklı dilüsyonundan 1' er ml alınarak petrilere eklenip hafifçe karıştırıldı. Bu şekilde fosfomisinin 5120 mg/l içeren son konsantrasyonuna kadar bu işlemler tüm konsantrasyonlara uygulandı. Toplamda 64 petri içerisine her iki antibiyotiğin 8 farklı konsantrasyonunun tüm kombinasyonları eklenmiş oldu.

Fosfomisinin en düşük konsantrasyonu olan 40 mg/l konsantrasyonu içeren falkon tüpünden 1' er ml ve meropenemin 2.5-320 mg/l konsantrasyon aralığındaki 8 farklı dilüsyonundan 1' er ml alınarak petrilere eklenip hafifçe karıştırıldı. Aynı şekilde 80 mg/l fosfomisin içeren ikinci dilüsyon tüpünden de 1' er ml ve meropenemin 8 farklı dilüsyonundan 1' er ml alınarak petrilere eklenip hafifçe karıştırıldı. Bu şekilde fosfomisinin 5120 mg/l içeren son konsantrasyonuna kadar bu işlemler tüm konsantrasyonlara uygulandı. Toplamda 64 petri içerisine her iki antibiyotiğin 8 farklı konsantrasyonunun tüm kombinasyonları eklenmiştir.

Fosfomisinin en düşük konsantrasyonu olan 40 mg/l konsantrasyonu içeren falkon tüpünden 1' er ml ve seftriaksonun 1.25-160 mg/l aralığındaki 8 farklı dilüsyonundan 1' er ml alınarak petrilere eklenip hafifçe karıştırıldı. Aynı şekilde 80 mg/l fosfomisin içeren ikinci dilüsyon tüpünden de 1' er ml ve seftriaksonun 8 farklı dilüsyonundan 1' er ml alınarak petrilere eklenip hafifçe karıştırıldı. Bu şekilde fosfomisinin 5120 mg/l içeren son konsantrasyonuna kadar bu işlemler tüm konsantrasyonlara uygulandı. Toplamda 64 petri içerisine her iki antibiyotiğin 8 farklı konsantrasyonunun tüm kombinasyonları eklenmiştir.

Bu şekilde her bir antibiyotik kombinasyonu için 64 farklı konsantrasyonda fosfomisin ve çalışılan antibiyotiği içeren antibiyotik karışımı elde edilmiştir. Farklı antibiyotik

konsantrasyonlarının 1' er ml karışımını içeren 64 petrinin her birine 18 ml MHA eklendi. Başlangıçta eklenen 1 ml antibiyotik solüsyonu bu şekilde 20 kat dilüe edilmiştir.

Kombinasyon çalışmasında kullanılan fosfomisin'in değişik konsantrasyonlarda antibiyotik solüsyonu bulunduran tüplerden 1' er ml hacimde alınarak düzgün bir zeminde dikey olarak aşağı doğru 1A' dan 1H yönüne doğru konsantrasyonu düşecek şekilde, A satırında en yüksek derişimde fosfomisin solüsyonu içeren plaklar olacak ve her bir harf hizasında bulunan fosfomisin derişimleri aynı olacak şekilde A' dan H'e doğru azalan konsantrasyonlarda petri kablarna aktarıldı. Kombinasyondaki diğer antibiyotik ise 1' den 8' e doğru artan derişimlerde ve her rakam hizasında sabit konsantrasyonu içerecek şekilde plaklara 1' er ml konulmuştur (**Şekil 8**).

Kombinasyon Çalışmasında Kullanılan Antibiyotikler

Tablo 3. Fosfomisin- gentamisin kombinasyonu için antibiyotik solüsyonu hazırlanması.

	Gentamisin	Fosfomisin
Dilüsyon aralığı (mg/l)	0.125 mg/l -16 mg/l	2 mg/l -256 mg/l
Konsantrasyon değeri(mg/l)	16	256
Potens (µg/mg)	1	1
Çözücü madde	Distile su	Distile su
Sulandırıcı madde	Distile su	Distile su
Duyarlı MİK sınır değeri	≤2	≤32
Ağırlık(mg)	32	512
Hacim(ml)	100	100

Tablo 4. Fosfomisin- gentamisin kombinasyonunun KAMHA besiyerinde yerleşimi.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FF:256 mg/l GN: 0.125mg/l	FF:256 mg/l GN: 0.25 mg/l	FF:256 mg/l GN:0.5 mg/l	FF:256mg/l GN:1 mg/l	FF:256 mg/l GN:2 mg/l	FF:256mg/l GN:4 mg/l	FF:256mg/l GN:8 mg/l	FF:256 mg/l GN:16 mg/l
B	FF: 128 mg/l GN :0.125mg/l	FF: 128 mg/l GN: 0.25 mg/l	FF:128 mg/l GN: 0.5 mg/l	FF:128mg/l GN: 1 mg/l	FF: 128 mg/l GN: 2 mg/l	FF:128mg/l GN: 4 mg/l	FF:128mg/l GN: 8 mg/l	FF: 128 mg/l GN:16 mg/l
C	FF: 64 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 64 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 64 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 64mg/l GN:1 mg/l	FF: 64 mg/l GN:2 mg/l	FF: 64 mg/l GN:4 mg/l	FF: 64 mg/l GN:8 mg/l	FF: 64 mg/l GN:16 mg/l
D	FF: 32 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 32 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 32 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 32 mg/l GN:1 mg/l	FF: 32 mg/l GN:2 mg/l	FF: 32 mg/l GN:4 mg/l	FF: 32 mg/l GN:8 mg/l	FF: 32 mg/l GN:16 mg/l
E	FF: 16 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 16 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 16 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 16 mg/l GN:1 mg/l	FF: 16 mg/l GN:2 mg/l	FF: 16 mg/l GN:4 mg/l	FF: 16 mg/l GN:8 mg/l	FF: 16 mg/l GN:16 mg/l
F	FF: 8 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 8 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 8 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 8 mg/l GN:1 mg/l	FF: 8 mg/l GN:2 mg/l	FF: 8 mg/l GN:4 mg/l	FF: 8 mg/l GN:8 mg/l	FF: 8 mg/l GN:16 mg/l
G	FF: 4 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 4 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 4 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 4 mg/l GN:1 mg/l	FF: 4 mg/l GN:2 mg/l	FF: 4 mg/l GN:4 mg/l	FF: 4 mg/l GN:8 mg/l	FF: 4 mg/l GN:16 mg/l
H	FF: 2 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 2 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 2 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 2 mg/l GN:1 mg/l	FF: 2 mg/l GN:2 mg/l	FF: 2 mg/l GN:4 mg/l	FF: 2 mg/l GN:8 mg/l	FF: 2 mg/l GN:16 mg/l

FF:Fosfomisin **GN:**Gentamisin

Tablo 5. Fosfomisin- meropenem kombinasyonu için antibiyotik solüsyonu hazırlanması.

	Meropenem	Fosfomisin
Dilüsyon aralığı (mg/l)	0.125 mg/l -16 mg/l	2 mg/l -256 mg/l
Konsantrasyon değeri(mg/l)	16	256
Potens (µg/mg)	1	1
Çözücü madde	Distile su	Distile su
Sulandırıcı madde	Distile su	Distile su
Duyarlı MİK sınır değeri	≤2	≤32
Ağırlık(mg)	32	512
Hacim(ml)	100	100

Tablo 6. Fosfomisin- meropenem kombinasyonunun KAMHA besiyerinde yerleşimi.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FF:256 mg/l MEM:0.125mg/l	FF:256 mg/l MEM:0.25mg/l	FF:256 mg/l MEM:0.5mg/l	FF:256mg/l MEM:1mg/l	FF:256 mg/l MEM:2mg/l	FF:256mg/l MEM:4mg/l	FF:256 mg/l MEM:8mg/l	FF:256 mg/l MEM:16 mg/l
B	FF:128 mg/l MEM:0.125mg/l	FF:128 mg/l MEM:0.25mg/l	FF:128 mg/l MEM:0.5mg/l	FF:128 mg/l MEM:1mg/l	FF:128 mg/l MEM:2mg/l	FF:128 mg/l MEM:4mg/l	FF:128 mg/l MEM:8mg/l	FF:128 mg/l MEM:16 mg/l
C	FF:64 mg/l MEM:0.125mg/l	FF:64 mg/l MEM:0.25mg/l	FF:64 mg/l MEM:0.5mg/l	FF:64 mg/l MEM:1mg/l	FF:64 mg/l MEM:2mg/l	FF:64 mg/l MEM:4mg/l	FF:64 mg/l MEM:8mg/l	FF:64 mg/l MEM:16 mg/l
D	FF:32 mg/l MEM:0.125mg/l	FF:32 mg/l MEM:0.25mg/l	FF:32 mg/l MEM:0.5mg/l	FF:32 mg/l MEM:1mg/l	FF:32 mg/l MEM:2mg/l	FF:32 mg/l MEM:4mg/l	FF:32 mg/l MEM:8mg/l	FF:32 mg/l MEM:16 mg/l
E	FF:16 mg/l MEM:0.125mg/l	FF:16 mg/l MEM:0.25mg/l	FF:16 mg/l MEM:0.5mg/l	FF:16 mg/l MEM:1mg/l	FF:16 mg/l MEM:2mg/l	FF:16 mg/l MEM:4mg/l	FF:16 mg/l MEM:8mg/l	FF:16 mg/l MEM:16 mg/l
F	FF:8 mg/l MEM:0.125mg/l	FF:8 mg/l MEM:0.25mg/l	FF:8 mg/l MEM:0.5mg/l	FF:8 mg/l MEM:1mg/l	FF:8 mg/l MEM:2mg/l	FF:8 mg/l MEM:4mg/l	FF:8 mg/l MEM:8mg/l	FF:8 mg/l MEM:16 mg/l
G	FF:4 mg/l MEM:0.125mg/l	FF:4 mg/l MEM:0.25mg/l	FF:4 mg/l MEM:0.5mg/l	FF:4 mg/l MEM:1mg/l	FF:4 mg/l MEM:2mg/l	FF:4 mg/l MEM:4mg/l	FF:4 mg/l MEM:8mg/l	FF:4 mg/l MEM:16 mg/l
H	FF:2 mg/l MEM:0.125mg/l	FF:2 mg/l MEM:0.25mg/l	FF:2 mg/l MEM:0.5mg/l	FF:2 mg/l MEM:1mg/l	FF:2 mg/l MEM:2mg/l	FF:2 mg/l MEM:4mg/l	FF:2 mg/l MEM:8mg/l	FF:2 mg/l MEM:16mg/l

FF:Fosfomisin **MEM:**Meropenem

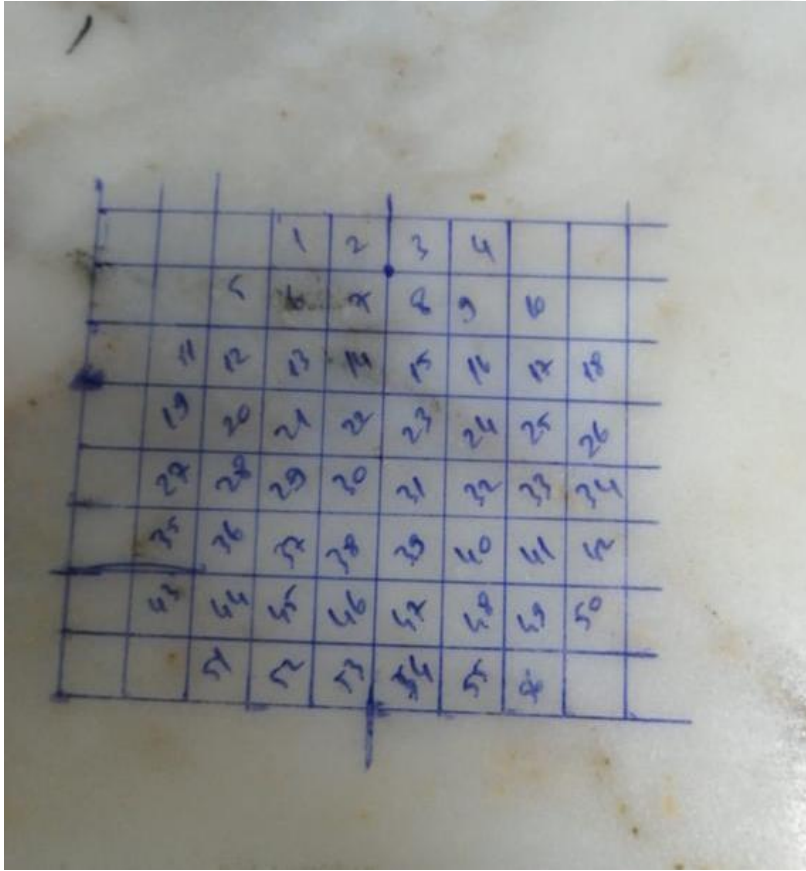
Tablo 7. Fosfomisin- seftriakson kombinasyonu için antibiyotik solüsyonu hazırlanması.

	Seftriakson	Fosfomisin
Dilüsyon aralığı (mg/l)	0.0625 mg/l -8 mg/l	2 mg/l -256 mg/l
Konsantrasyon değeri (mg/l)	8	256
Potens (µg/mg)	1	1
Çözücü madde	Distile su	Distile su
Sulandırıcı madde	Distile su	Distile su
Duyarlı MİK sınır değeri	≤1	≤32
Ağırlık(mg)	16	512
Hacim(ml)	100	100

Tablo 8: Fosfomisin- seftriakson kombinasyonunun KAMHA besiyerinde yerleşimi.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FF:256mg/l CRO:0.0625mg/l	FF:256mg/l CRO:0.125mg/l	FF:256mg/l CRO:0.25mg/l	FF:256mg/l CRO:0.5mg/l	FF:256mg/l CRO:1mg/l	FF:256mg/l CRO:2mg/l	FF:256mg/l CRO:4mg/l	FF:256mg/l CRO:8mg/l
B	FF:128mg/l CRO:0.0625mg/l	FF:128mg/l CRO:0.125mg/l	FF:128mg/l CRO:0.25mg/l	FF:128mg/l CRO:0.5mg/l	FF:128mg/l CRO:1mg/l	FF:128mg/l CRO:2mg/l	FF:128mg/l CRO:4mg/l	FF:128mg/l CRO:8mg/l
C	FF:64mg/l CRO:0.0625mg/l	FF:64mg/l CRO:0.125mg/l	FF:64mg/l CRO:0.25mg/l	FF:64mg/l CRO:0.5mg/l	FF:64mg/l CRO:1mg/l	FF:64mg/l CRO:2mg/l	FF:64mg/l CRO:4mg/l	FF:64mg/l CRO:8mg/l
D	FF:32mg/l CRO:0.0625mg/l	FF:32mg/l CRO:0.125mg/l	FF:32mg/l CRO:0.25mg/l	FF:32mg/l CRO:0.5mg/l	FF:32mg/l CRO:1mg/l	FF:32mg/l CRO:2mg/l	FF:32mg/l CRO:4mg/l	FF:32mg/l CRO:8mg/l
E	FF:16mg/l CRO:0.0625mg/l	FF:16mg/l CRO:0.125mg/l	FF:16mg/l CRO:0.25mg/l	FF:16mg/l CRO:0.5mg/l	FF:16mg/l CRO:1mg/l	FF:16mg/l CRO:2mg/l	FF:16mg/l CRO:4mg/l	FF:16mg/l CRO:8mg/l
F	FF:8mg/l CRO:0.0625mg/l	FF:8mg/l CRO:0.125mg/l	FF:8mg/l CRO:0.25mg/l	FF:8mg/l CRO:0.5mg/l	FF:8mg/l CRO:1mg/l	FF:8mg/l CRO:2mg/l	FF:8mg/l CRO:4mg/l	FF:8mg/l CRO:8mg/l
G	FF:4mg/l CRO:0.0625mg/l	FF:4mg/l CRO:0.125mg/l	FF:4mg/l CRO:0.25mg/l	FF:4mg/l CRO:0.5mg/l	FF:4mg/l CRO:1mg/l	FF:4mg/l CRO:2mg/l	FF:4mg/l CRO:4mg/l	FF:4mg/l CRO:8mg/l
H	FF:2mg/l CRO:0.0625mg/l	FF:2mg/l CRO:0.125mg/l	FF:2mg/l CRO:0.25mg/l	FF:2mg/l CRO:0.5mg/l	FF:2mg/l CRO:1mg/l	FF:2mg/l CRO:2mg/l	FF:2mg/l CRO:4mg/l	FF:2mg/l CRO:8mg/l

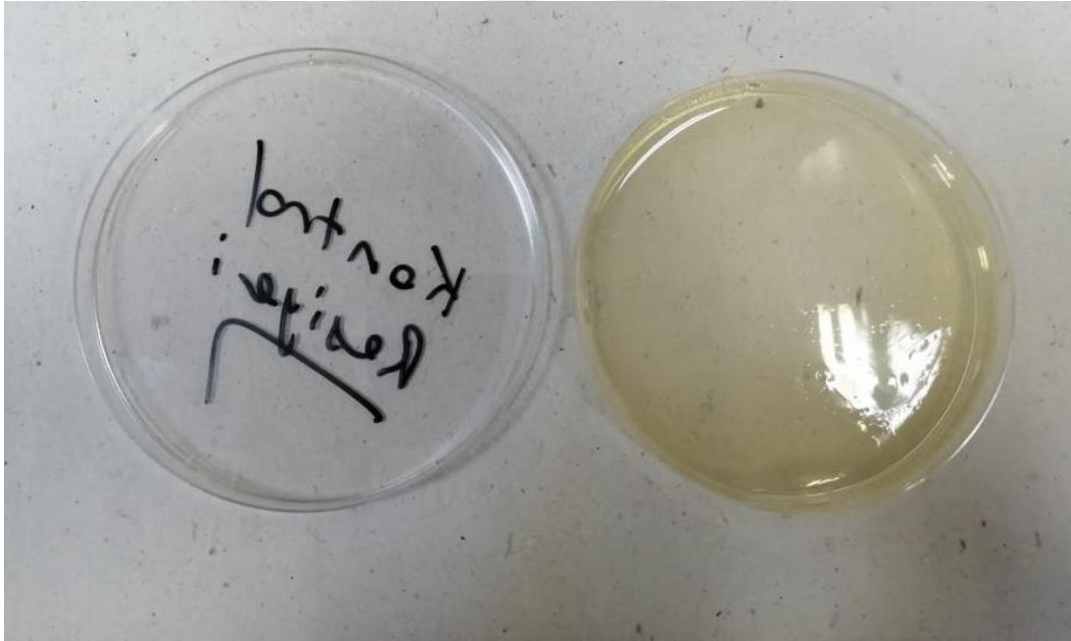
FF:Fosfomisin **CRO:**Seftriakson



Şekil 3. İnokulasyon ve okuma amacıyla oluşturulan standart çizim.



Şekil 4. Plakların alana tam yerleşmesi amacıyla yapılan standart işaretlemeler.



Şekil 5. Antibiyotik solüsyonu içermeyen kontrol besiyeri.

3.2.5.7. Sonuçların değerlendirilmesi

Agar dilüsyon plakları çizilen standart şablona yerleştirilerek okuma yapılmıştır. Agar plaklarındaki ekim noktaları değerlendirilmiş, tek bir koloni veya inokulum izi

şeklindeki görüntüler dikkate alınmamıştır. Üreme olmayan en düşük antibiyotik konsantrasyon değeri MİK değeri şeklinde kabul edilmiştir.

2mg/l	4mg/l	8mg/l	16mg/l	32mg/l	64mg/l	128mg/l	256mg/l
-------	-------	-------	--------	--------	--------	---------	---------

Şekil 6. 27 numaralı suşun agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisin çalışması.

0,125mg/l	0,25mg/l	0,5mg/l	1mg/l	2mg/l	4mg/l	8mg/l	16mg/l
-----------	----------	---------	-------	-------	-------	-------	--------

Şekil 7. 27 numaralı suşun agar dilüsyon yöntemi ile gentamisin çalışması.

Üreme gözlenen plaklar 

Şekil 8. Fosfomisin-gentamisin kombinasyon çalışmasının 27. suşa ait şematize görünümü.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FF:256 mg/l GN: 0.125mg/l	FF:256 mg/l GN: 0.25 mg/l	FF:256 mg/l GN:0.5 mg/l	FF:256mg/l GN:1 mg/l	FF:256 mg/l GN:2 mg/l	FF:256mg/l GN:4 mg/l	FF:256mg/l GN:8 mg/l	FF:256 mg/l GN:16 mg/l
B	FF: 128 mg/l GN :0.125mg/l	FF: 128 mg/l GN: 0.25 mg/l	FF:128 mg/l GN: 0.5 mg/l	FF:128mg/l GN: 1 mg/l	FF: 128 mg/l GN: 2 mg/l	FF:128mg/l GN: 4 mg/l	FF:128mg/l GN: 8 mg/l	FF: 128 mg/l GN:16 mg/l
C	FF: 64 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 64 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 64 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 64mg/l GN:1 mg/l	FF: 64 mg/l GN:2 mg/l	FF: 64 mg/l GN:4 mg/l	FF: 64 mg/l GN:8 mg/l	FF: 64 mg/l GN:16 mg/l
D	FF: 32 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 32 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 32 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 32 mg/l GN:1 mg/l	FF: 32 mg/l GN:2 mg/l	FF: 32 mg/l GN:4 mg/l	FF: 32 mg/l GN:8 mg/l	FF: 32 mg/l GN:16 mg/l
E	FF: 16 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 16 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 16 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 16 mg/l GN:1 mg/l	FF: 16 mg/l GN:2 mg/l	FF: 16 mg/l GN:4 mg/l	FF: 16 mg/l GN:8 mg/l	FF: 16 mg/l GN:16 mg/l
F	FF: 8 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 8 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 8 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 8 mg/l GN:1 mg/l	FF: 8 mg/l GN:2 mg/l	FF: 8 mg/l GN:4 mg/l	FF: 8 mg/l GN:8 mg/l	FF: 8 mg/l GN:16 mg/l
G	FF: 4 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 4 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 4 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 4 mg/l GN:1 mg/l	FF: 4 mg/l GN:2 mg/l	FF: 4 mg/l GN:4 mg/l	FF: 4 mg/l GN:8 mg/l	FF: 4 mg/l GN:16 mg/l
H	FF: 2 mg/l GN:0.125mg/l	FF: 2 mg/l GN:0.25 mg/l	FF: 2 mg/l GN:0.5 mg/l	FF: 2 mg/l GN:1 mg/l	FF: 2 mg/l GN:2 mg/l	FF: 2 mg/l GN:4 mg/l	FF: 2 mg/l GN:8 mg/l	FF: 2 mg/l GN:16 mg/l

FF: Fosfomisin, **GN:**Gentamisin

Üreme olan kuyucuklar 

Yirmiyedi numaralı izolata ait MİK değerleri **fosfomisin** için 16 mg/l, **gentamisin** için 32 mg/l olarak belirlendi. Kombinasyon çalışılmasında ise üreme olmayan en düşük MİK değerli plaklar şekilde görüldüğü üzere D1, E3, F5, G6 ve H9 agar dilüsyon plaklarıdır.

Tablo 9. 27 numaralı izolat için hesaplanmış olan FİK indeksleri.

Plak	FFMİK(mg/l)	GNMİK(mg/l)	FFFİK	GNFİK	FİK İndeksi
D1	32	0,125	2	0,003	2,003
E3	16	0,5	1	0,015	1,015
F5	8	2	0.5	0,062	0,562
G6	4	4	0,25	0,125	0,375
H9	2	32	0,125	1	1,125

FF: Fosfomisin, **GN:**Gentamisin, **FİK:** Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon

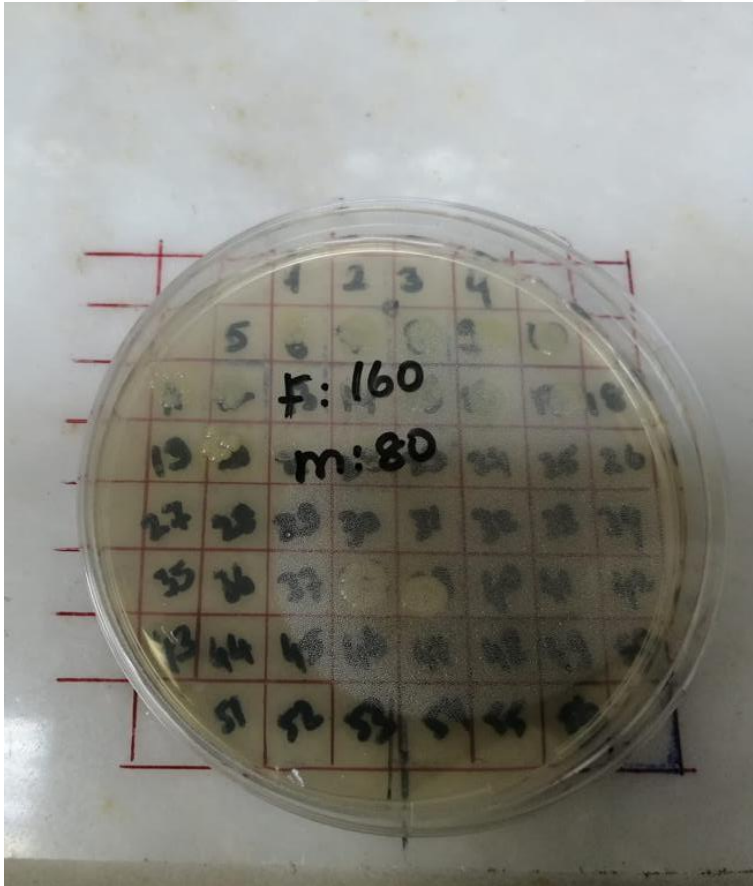
Tablo 7’ de görüldüğü gibi her iki antibiyotik için FİK indeksi hesaplama formülleri kullanılarak FİK değerleri ve FİK indeksleri hesaplandı. Beş plak içerisinde en düşük FİK indeksi 4 mg/l fosfomisin ve 4 mg/l gentamisin içeren G6 plağı için 0,375 olarak hesaplandı. Hesaplanan değer 0.5 değerinden küçük olduğu için bu suş için fosfomisin ve gentamisin arasında sinerjistik etki vardır.

Altmış izolat için agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisin-gentamisin, fosfomisin-meropenem, fosfomisin-seftriakson antibiyotiklerinin FİK indeksleri ve etkileşimleri; fosfomisin, gentamisin, seftriakson ve meropenem antibiyotiklerinin tek başlarına MİK değerleri belirlenmiştir. Altmış adet suş her bir suş için iki plakta çalışılmıştır. Tek başına dört antibiyotik için 2x (4x8) yani 64, kombinasyon çalışması için 2x(64x3) yani 384 plak kullanılmıştır.

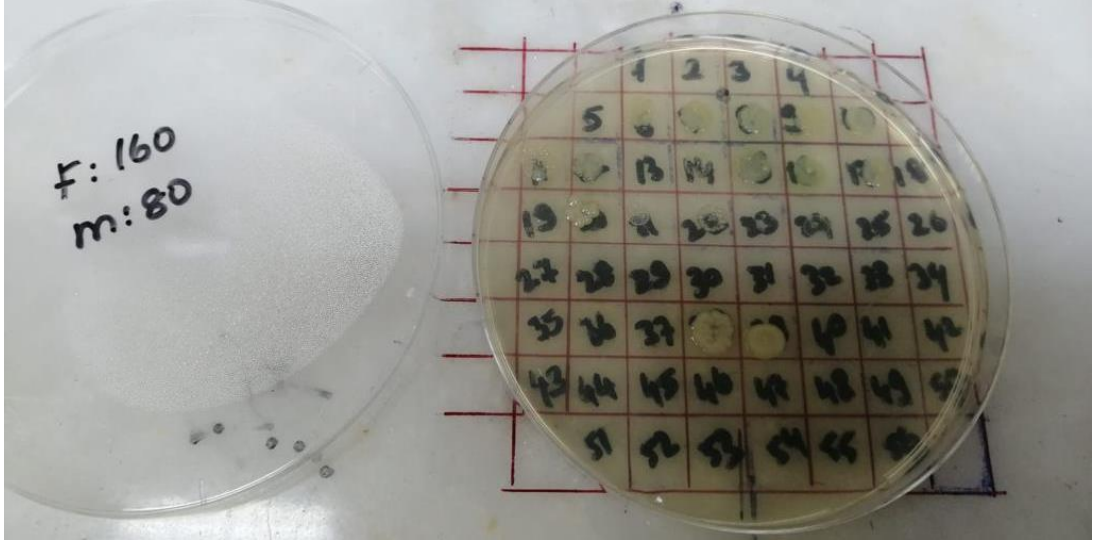
Kalite kontrol amacıyla *E. coli* ATCC 13846, *E. coli* ATCC 25992 standart suşları kullanıldı. Sonuçlar çift göz kontrollü olarak değerlendirildi. Üremenin gözlenmediği ilk plağın antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi (**Şekil 9**). Minimum İnhibitör Konsantrasyon sonuçları EUCAST v.11. önerileri doğrultusunda değerlendirilerek fosfomisin için MİK değeri ≤ 32 mg/L olanlar duyarlı, >32 mg/L

olanlar ise dirençli olarak kabul edilmiştir. Gentamisin ve meropenem (menenjit enfeksiyonlarında) için MİK ≤ 2 mg/L olan değerler duyarlı olarak; > 2 mg/L olan değerler ise dirençli olarak, meropenem (menenjit dışı enfeksiyonlarında) için MİK ≤ 2 mg/L olan değerler duyarlı olarak; > 8 mg/L olan değerler ise dirençli olarak, seftriakson (menenjit dışı enfeksiyonlarında) için MİK ≤ 1 mg/L olan değerler duyarlı olarak; > 2 mg/L olan değerler ise dirençli olarak, seftriakson (menenjit enfeksiyonları) için MİK ≤ 1 mg/L olan değerler duyarlı olarak; > 1 mg/L olan değerler ise dirençli olarak değerlendirilmiştir (6).

Çalışma verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde IBM SPSS 26 for windows istatistik paket programı kullanıldı. Kategorik değişkenler yüzdelerle ve sayı ile belirtildi. Fosfomisin direnci ve kombinasyonların sinerjistik ve additif etkileşim oranlarının kıyaslanmasında istatistiksel analiz için Ki-kare testi ve Fisher-exact testi kullanıldı. Nitel değişkenlerin kıyaslanmasında da Ki-kare testi kullanılmıştır. $p \leq 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı sonuç kabul edilmiştir.



Şekil 9. Agar dilüsyon plaklarının değerlendirilme metodu.



Şekil 10. Agar dilüsyon plaklarının değerlendirilme metodu.

4. BULGULAR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanelerinin yoğun bakım ünitesi ve kliniklerinde tedavi alan hastaların farklı klinik örneklerinden izole edilen 60 KRE (Karbapenem Dirençli *Enterobacterales*) *E. coli* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Suşların hastane kökenli olması açısından poliklinik hastaları ve yatış süresi 48 saati geçmeyen hastalar çalışmaya alınmamıştır. Çalışmaya dahil edilen 60 izolatin %83.3' ü erişkin, %16.7' si çocuk hastalardan izole edilmiştir (**Tablo 10**).

Tablo 10. Çalışılan *E. coli* izolatlarının yatış yeri ve yaşa göre dağılımı.

	Erişkin	Çocuk	Toplam
Yoğun bakım (n(%))	23(%38,3)	7(%11,7)	30(%50)
Klinik (n(%))	27(%45)	3(%5)	30(%50)
Toplam (n)	50(%83,3)	10(%16,7)	60(%100)

Suşların %50' si yoğun bakım ünitelerinden, %50' si çeşitli kliniklerden gönderilen numunelerden izole edilmiştir. *E. coli* suşlarının %48.3' ü idrar, %28.3' ü kan, %11.6' sı abse, %6.6' sı yara, %3.3' ü beyin omurilik sıvısı, %1.9' u endotrakeal aspirattan izole edilmiştir (**Tablo 11**).

Tablo 11. Çalışılan *E. coli* izolatlarının örnek tipine göre dağılımı.

Örnek Tipi	İdrar	Kan	Aspirat	Yara	BOS	ETA
N	29	17	7	4	2	1
%	48,3	28,3	11,6	6,6	3,3	1,9

ETA: Endotrakeal Aspirat, **BOS:** Beyin Omurilik Sıvısı

Çalışmaya alınan *E. coli* izolatlarının (n=60) tümü ertapeneme, %98.3' ü ampiciline, %91.5' u seftazidime, %90' ı seftriaksona, %89.6' sı amoksisilin/klavunata, %88.1' i sefepime, %83.3' ü impeneme, %73.3' ü piperasilin-tazobaktama, %66.6' sı siprofloksasin, levofloksasin ve gentamisine, %60' ı trimetoprim /sülfametoksazole, %26.6' sı meropeneme, %3.4' ü amikasin dirençli idi. İdrardan izole edilen suşların (n: 29) %3.6' sı fosfomisine dirençli idi. EUCAST tarafından kolistin otomatize sistem ile güvenilir sonuçlar vermediği için değerlendirilmeye alınmadı. Sıvı mikrodilüsyon

yöntemi ile çalışılan 7 suş kolistine duyarlı saptandı. MDR izolat sayısı 48(% 80) idi (Tablo 12, Tablo 13).

Tablo 12. İdrar dışı izolatların Phonex otomatize sistem ile çalışılan ADT sonuçları.

İzolat No	Phoenix Otomatize Sistem ADT Sonuçları																
	AK	ETP	AM	AMS	FEP	CAZ	CRO	CXM	CIP	GM	İPM	LEV	MEM	TZP	SXT	AXC	
1.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	
2.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	YDD	R	S	R	S	R	
3.	S	R	R	S	YDD	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	
4.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	
5.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	
6.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	YDD	R	R	R	R	R	
7.	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	
8.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	YDD	S	R	
9.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
10.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	
11.	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	
12.	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	
13.	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	
14.	S	R	R	R	R	R	R	R	YDD	S	S	YDD	S	R	S	R	
15.	S	R	R	R	YDD	YDD	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	
16.	S	R	R	R	YDD	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	
17.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	
18.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	
19.	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	
20.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	
21.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	
22.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	
23.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	
24.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	
25.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	
26.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	
27.	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	
28.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	
29.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	
30.	S	R	R	S	R	R	R	R	YDD	S	S	S	R	S	S	S	
31.	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	YDD	S	S	S	

R: dirençli X: Çalışılmadı S: duyarlı YDD: Yüksek dozda duyarlı AK: Amikasin, AMS: Ampisilin(S)ulbaktam ETP: Ertapenem AM: Ampisilin FEP: Sefepim CAZ: Seftazidim CFM:Sefiksim CRO: Seftriakson CXM: Sefuroksim CIP: Siprofloksasin TZP: Piperasilin-tazobaktam COL: Kolistin GM: Gentamisin İPM: İmipenem LEV: Levofloksasin SXT: Trimetoprim(S)ulfametoksazol MEM: Meropenem FF: Fosfomisin AXC: Amoksisilin-klavunat NIT: Nitrofurantoin NN:Tobramisin ADT: Antibiyotik Duyarlılık Testi

Tablo 13. İdrar İzolatlarının Phoenix otomatize sistem ile çalışılan ADT sonuçları.

İzolat No	Phonex Otomatize Sistem ADT Sonuçları																
	AK	ETP	AM	CFM	CAZ	CRO	CIP	FF	GM	İPM	LEV	MEM	NIT	TZP	NN	SXT	AXC
1.	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
2.	YDD	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R
3.	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R
4.	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	X
5.	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R
6.	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R
7.	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R
8.	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
9.	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R
10.	S	R	R	R	R	R	YDD	S	S	S	YDD	S	S	R	S	R	R
11.	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
12.	S	R	R	R	R	R	R	R	S	YDD	R	S	R	R	S	R	R
13.	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R
14.	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R
15.	S	R	R	X	S	S	S	X	S	S	S	S	X	R	X	S	R
16.	S	R	R	S	X	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
17.	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R
18.	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S
19.	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
20.	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	X
21.	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R
22.	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R
23.	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R
24.	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S
25.	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R
26.	S	R?	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
27.	S	R	R	X	R	R	R	X	R	S	R	S	X	R	X	R	R
28.	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R
29.	S	R	R	R	R	R	YDD	S	S	S	YDD	S	S	R	S	R	R

R: dirençli X: Çalışılmadı S: duyarlı YDD: Yüksek dozda duyarlı AK: Amikasin, AMS: Ampisilin(S)ulbaktam ETP: Ertapenem AM: Ampisilin FEP: Sefepim CAZ: Seftazidim CFM:Sefiksim CRO: Seftriakson CXM: Sefuroksim CIP: Siprofloksasin TZP: Piperasilin-tazobaktam COL: Kolistin GM: Gentamisin İPM: İmipenem LEV: Levofloksasin SXT: Trimetoprim(S)ulfametoksazol MEM: Meropenem FF: Fosfomisin AXC: Amoksisilin-klavunat NIT: Nitrofurantoin NN:Tobramisin ADT: Antibiyotik Duyarlılık Testi

Agar dilüsyon yöntemi ile saptanan direnç oranları ise fosfomisin, meropenem, seftriakson ve gentamisin için sırasıyla %76.6, %61.6, %98.3, %85 idi. İzolatların agar dilüsyon ile belirlenen en küçük ve en büyük MİK değerleri fosfomisin için 0.125-512 mg/l, meropenem için 0.125-32 mg/l, gentamisin için 0.125-32 mg/l, seftriakson için 1-16 mg/l olarak belirlendi. MİK₅₀ değerleri fosfomisin, meropenem, gentamisin ve seftriakson için sırasıyla 64 mg/l, 8 mg/l, 32 mg/l, 16 mg/l olarak hesaplanmıştır. MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 512 mg/l, 32 mg/l, 32 mg/l, 16 mg/l olarak hesaplanmıştır (**Tablo 15**). İdrar izolatlarının agar dilüsyon yöntemi ile çalışılan direnç oranı % 65.5 olarak saptanmıştır. İdrar dışı numunelerin agar dilüsyon ile çalışılan fosfomisin direnç oranı ise %87 olarak saptanmıştır.

Tablo 14. Bu çalışmada kullanılan antimikrobiyallerin EUCAST (v.11.0) kriterlerine göre *E. coli* için MİK sınır değerleri.

Antibiyotik	MİK Sınır Değerleri	
	Duyarlı	Dirençli
Fosfomisin	≤32(mg/l)	>32(mg/l)
Meropenem(MD)	≤2(mg/l)	>8(mg/l)
Meropenem(M)	≤2(mg/l)	>2(mg/l)
Gentamisin	≤2(mg/l)	>2(mg/l)
Seftriakson (MD)	≤1(mg/l)	>2(mg/l)
Seftriakson(M)	≤1(mg/l)	>1(mg/l)

MD: Menenjit Dışı enfeksiyonlar için, **M:** Menenjit için

Tablo 15. Agar dilüsyon ile çalışılan *E. coli* izolatlarının belirlenen MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri, MİK aralıkları ve çalışmada kullanılan antibiyotiklere direnç oranları (n=60 izolat).

	Fosfomisin	Meropenem	Gentamisin	Seftriakson
MİK aralık (mg/l)	0.125-512	0.125-32	0.125-32	1-16
MİK₅₀ (mg/l)	64	8	32	16
MİK₉₀ (mg/l)	512	32	32	16
Duyarlı (n%)	14 (23.4)	20 (33.3)	9 (15)	1 (1.7)
Yüksek dozda duyarlı (n%)	0(0)	3 (5.1)	0 (0)	0 (0)
Dirençli (n%)	46 (76.6)	37 (61.6)	51 (85)	59 (98.3)

Ağar dilüsyon yöntemi ile çalışılan antibiyotik duyarlılık sonuçları MİK (mg/l)						
FF	CRO	GN	MEM	ÖRNEK	YAŞ	KLİNİK
1. 128(R)	16(R)	16(R)	16(R)	ASPIRAT	Erişkin	Klinik
2. 512(R)	16(R)	1(S)	0,5(S)	ASPIRAT	Erişkin	Klinik
3. 128(R)	16(R)	16(R)	16(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
4. 64(R)	16(R)	0,5(S)	0,125(S)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
5. 512(R)	16(R)	1(S)	1(S)	ASPIRAT	Erişkin	Klinik
6. 64(R)	16(R)	4(R)	32(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
7. 64(R)	8(R)	32(R)	1(S)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
8. 512(R)	16(R)	8(R)	0,5(S)	KAN	Erişkin	Klinik
9. 256(R)	16(R)	32(R)	0,5(S)	KAN	Çocuk	Yoğun Bakım
10. 64(R)	16(R)	8(R)	16(R)	ASPIRAT	Erişkin	Yoğun Bakım
11. 64(R)	16(R)	8(R)	1(S)	BOS	Çocuk	Klinik
12. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	YARA	Erişkin	Klinik
13. 512(R)	16(R)	32(R)	16(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
14. 256(R)	16(R)	32(R)	32(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
15. 64(R)	16(R)	32(R)	32(R)	KAN	Erişkin	Klinik
16. 16(S)	16(R)	32(R)	2(S)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
17. 128(R)	16(R)	32(R)	32(R)	YARA	Erişkin	Klinik
18. 128(R)	16(R)	32(R)	32(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
19. 64(R)	16(R)	32(R)	1(S)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
20. 64(R)	16(R)	16(R)	32(R)	BOS	Çocuk	Yoğun Bakım
21. 128(R)	16(R)	32(R)	32(R)	ETA	Erişkin	Yoğun Bakım
22. 64(R)	16(R)	32(R)	0,5(S)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
23. 256(R)	16(R)	32(R)	4(YDD)	YARA	Erişkin	Klinik
24. 16(S)	16(R)	32(R)	8(R)	ASPIRAT	Erişkin	Yoğun Bakım
25. 16(S)	16(R)	32(R)	8(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
26. 64(R)	16(R)	32(R)	32(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
27. 64(R)	16(R)	32(R)	32(R)	YARA	Çocuk	Yoğun Bakım
28. 64(R)	16(R)	32(R)	32(R)	ASPIRAT	Erişkin	Klinik
29. 64(R)	16(R)	32(R)	32(R)	ASPIRAT	Erişkin	Klinik
30. 128(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Çocuk	Klinik
31. 8(S)	16(R)	32(R)	8(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
32. 64(R)	16(R)	32(R)	32(R)	KAN	Erişkin	Yoğun Bakım
33. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Çocuk	Yoğun Bakım
34. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
35. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Yoğun Bakım
36. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Yoğun Bakım
37. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Yoğun Bakım
38. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
39. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
40. 16(S)	16(R)	2(S)	1(S)	İDRAR	Çocuk	Yoğun Bakım
41. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
42. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
43. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Çocuk	Yoğun Bakım
44. 512(R)	16(R)	32(R)	32(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
45. 2(S)	16(R)	2(S)	0,125(S)	İDRAR	Erişkin	Klinik
46. 2(S)	16(R)	32(R)	0,125(S)	İDRAR	Erişkin	Yoğun Bakım
47. 128(R)	16(R)	32(R)	8(R)	İDRAR	Erişkin	Yoğun Bakım
48. 128(R)	16(R)	16(R)	8(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
49. 128(R)	16(R)	32(R)	8(R)	İDRAR	Erişkin	Yoğun Bakım
50. 2(S)	16(R)	32(R)	0,125(S)	İDRAR	Erişkin	Klinik
51. 64(R)	16(R)	32(R)	4(YDD)	İDRAR	Erişkin	Klinik
52. 2(S)	16(R)	32(R)	0,125(S)	İDRAR	Erişkin	Klinik
53. 64(R)	1(S)	32(R)	4(YDD)	İDRAR	Erişkin	Klinik
54. 4(S)	16(R)	1(S)	0,25(S)	İDRAR	Erişkin	Klinik
55. 4(S)	16(R)	0,5(S)	0,25(S)	İDRAR	Erişkin	Klinik
56. 4(S)	16(R)	0,5(S)	0,25(S)	İDRAR	Erişkin	Klinik
57. 2(S)	16(R)	32(R)	0,125(S)	İDRAR	Erişkin	Klinik
58. 128(R)	16(R)	32(R)	8(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
59. 256(R)	16(R)	32(R)	16(R)	İDRAR	Erişkin	Klinik
60. 8(S)	16(R)	1(S)	0,5(S)	İDRAR	Çocuk	Yoğun Bakım

Tablo 16. Kombinasyon çalışmasında kullanılan antibiyotiklerin tek başına MİK değerleri ve hastaların demografik özellikleri.

FF: Fosfomisin, **CRO:** Seftriakson, **GN:** Gentamisin, **MEM:** Meropenem, **S:** Duyarlı, **R:** Dirençli

Tablo 17. *E. coli* izolatlarının antibiyotik kombinasyon FİK indeksleri ve yorumları.

	FF-MEM FİKİ	YORUM	FF-GN FİKİ	YORUM	FF-CRO FİKİ	YORUM
1.	0,75	ADDİTİF	0,562	ADDİTİF	1	ADDİTİF
2.	2	İNDİFERAN	0,5	ADDİTİF	1	ADDİTİF
3.	0,5	SİNERJİ	0,312	SİNERJİ	1,015	İNDİFERAN
4.	2,125	İNDİFERAN	0,262	SİNERJİ	0,51	ADDİTİF
5.	0,25	SİNERJİ	0,257	SİNERJİ	0,515	ADDİTİF
6.	0,656	ADDİTİF	0,187	SİNERJİ	1	ADDİTİF
7.	1,25	ADDİTİF	0,503	ADDİTİF	1,062	İNDİFERAN
8.	0,625	ADDİTİF	0,375	SİNERJİ	0,503	ADDİTİF
9.	0,375	SİNERJİ	0,75	ADDİTİF	0,625	ADDİTİF
10.	0,562	ADDİTİF	0,093	SİNERJİ	1,031	İNDİFERAN
11.	0,625	ADDİTİF	0,625	ADDİTİF	1,5	İNDİFERAN
12.	1	ADDİTİF	0,187	SİNERJİ	1,062	İNDİFERAN
13.	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN	1	ADDİTİF
14.	0,265	SİNERJİ	0,132	SİNERJİ	0,503	ADDİTİF
15.	0,281	SİNERJİ	0,062	SİNERJİ	1,031	İNDİFERAN
16.	0,25	SİNERJİ	0,75	ADDİTİF	0,75	ADDİTİF
17.	1,5	İNDİFERAN	1,5	İNDİFERAN	1,5	İNDİFERAN
18.	32,015	ANTAGONİST	1,015	İNDİFERAN	1,015	İNDİFERAN
19.	0,312	SİNERJİ	0,077	SİNERJİ	1,062	İNDİFERAN
20.	0,375	SİNERJİ	0,156	SİNERJİ	1,062	İNDİFERAN
21.	1,015	İNDİFERAN	0,14	SİNERJİ	1,015	İNDİFERAN
22.	1,062	İNDİFERAN	0,75	ADDİTİF	0,562	ADDİTİF
23.	0,5	SİNERJİ	0,501	ADDİTİF	0,75	ADDİTİF
24.	2,015	İNDİFERAN	0,375	SİNERJİ	1,125	İNDİFERAN
25.	1	ADDİTİF	0,156	SİNERJİ	1,125	İNDİFERAN
26.	1,031	İNDİFERAN	1,031	İNDİFERAN	1,031	İNDİFERAN
27.	0,312	SİNERJİ	0,281	SİNERJİ	1,031	İNDİFERAN
28.	0,531	ADDİTİF	0,156	SİNERJİ	1,031	İNDİFERAN
29.	1,031	İNDİFERAN	0,156	SİNERJİ	1,031	İNDİFERAN
30.	0,5	SİNERJİ	1	ADDİTİF	1,015	İNDİFERAN
31.	0,375	SİNERJİ	0,281	SİNERJİ	0,75	ADDİTİF
32.	1	ADDİTİF	1,031	İNDİFERAN	1,031	İNDİFERAN
33.	0,5	SİNERJİ	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
34.	0,5	SİNERJİ	1,007	İNDİFERAN	1,007	İNDİFERAN
35.	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
36.	0,562	ADDİTİF	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
37.	0,5	SİNERJİ	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
38.	0,265	SİNERJİ	1,003	İNDİFERAN	0,625	ADDİTİF
39.	0,375	SİNERJİ	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
40.	1,125	İNDİFERAN	0,5	SİNERJİ	0,507	ADDİTİF
41.	0,375	SİNERJİ	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
42.	0,503	ADDİTİF	1,003	İNDİFERAN	0,75	ADDİTİF
43.	0,625	ADDİTİF	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
44.	0,5	SİNERJİ	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
45.	2	İNDİFERAN	1,062	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
46.	2	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
47.	1,015	İNDİFERAN	1,007	İNDİFERAN	1,003	İNDİFERAN
48.	1,25	İNDİFERAN	0,562	ADDİTİF	0,75	ADDİTİF
49.	1,007	İNDİFERAN	0,75	ADDİTİF	1	ADDİTİF
50.	3	İNDİFERAN	1,007	İNDİFERAN	2,25	İNDİFERAN
51.	0,75	ADDİTİF	0,503	ADDİTİF	1,125	İNDİFERAN
52.	2	İNDİFERAN	1,015	İNDİFERAN	1,010	İNDİFERAN
53.	0,5	SİNERJİ	0,5	SİNERJİ	0,5	SİNERJİ
54.	1,5	İNDİFERAN	0,625	ADDİTİF	0,503	ADDİTİF
55.	1,5	İNDİFERAN	1	ADDİTİF	0,503	ADDİTİF
56.	1,5	İNDİFERAN	0,75	ADDİTİF	1	ADDİTİF
57.	1,5	İNDİFERAN	1,007	İNDİFERAN	2	İNDİFERAN
58.	0,515	ADDİTİF	0,515	ADDİTİF	0,515	ADDİTİF
59.	1	ADDİTİF	1,007	İNDİFERAN	1,007	İNDİFERAN
60.	0,375	SİNERJİ	0,75	ADDİTİF	0,75	ADDİTİF

FF: Fosfomisin, MEM: Meropenem, GN: Gentamisin, CRO: Seftriakson FİKİ: FİK indeksi

Agar dilüsyon ile yapılan kombinasyon çalışmamızda fosfomisin- meropenem, fosfomisin- gentamisin ve fosfomisin- seftriakson için sinerjistik etki oranları sırasıyla %35, %33.4 ve %1.7 olarak saptandı. Belirlenen additif etki oranları ise fosfomisin- meropenem, fosfomisin- gentamisin ve fosfomisin- seftriakson için sırasıyla %26.7, %28.3 ve %38.3 olarak hesaplandı. Antagonist etki ise fosfomisin- meropenem kombinasyonunda yalnızca bir suşta saptandı (**Tablo 18**).

Tablo 18: Çalışılan antibiyotik kombinasyonları sonucu belirlenen etki ve oranları.

		FF - MEM	FF - GN	FF- CRO
Sinerji (FİKİ ≤ 0.5)	%	35	33.4	1,7
Additif (FİKİ >0.5-≤1)	%	26.7	28.3	38,3
İndiferan (FİKİ >1-< 4)	%	36.7	38.3	60
Antagonizma (FİKİ ≥ 4)	%	1.6	0	0

FF: Fosfomisin, **MEM:** Meropenem, **GN:** Gentamisin, **CRO:** Seftriakson **FİKİ:** FİK indeksi

Fosfomisin- meropenem, fosfomisin- gentamisin ve fosfomisin- seftriakson kombinasyonlarının additif, sinerjistik ve indiferan olma durumlarının agar dilüsyon ile saptanan fosfomisin direnci ile ilişkisi Ki-kare analizi ile araştırılmıştır.

Bu çalışmada izole edilen *E. coli* suşlarının fosfomisin- gentamisin kombinasyon etkileşiminin sinerji, additif ve indiferan olma durumunun agar dilüsyon ile saptanan tek başına fosfomisin direnci ile ilişkisi bulunamadı. Yapılan Ki-kare analizine göre kandan izole edilen *E. coli* suşlarının fosfomisin- gentamisin kombinasyonunda sinerji gösterme durumu idrardan izole edilen *E. coli* suşları ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p=0,002**) (**Tablo 19**). Yapılan Ki-kare analizi sonucunda, agar dilüsyon ile çalışılan fosfomisine dirençli bulunan *E. coli* izolatlarının fosfomisin- meropenem kombinasyonda sinerji gösteren izolat sayısı indiferan etki gösteren izolat sayısı ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p=0,026**) (**Tablo 20**). Fosfomisin ile kombinasyon etkileşimleri araştırılan meropenem, gentamisin ve seftriakson antibiyotiklerinin agar dilüsyon yöntemi ile çalışılan duyarlılık durumlarının, çalışılan kombinasyonda fosfomisin ile birlikte additif, sinerjistik, veya indiferan etki oluşması arasında ilişki bulunup bulunmadığı Ki-kare analizi ile araştırılmıştır. Agar dilüsyon ile saptanan ve dirençli bulunan meropenem, gentamisin ve seftriakson ile oluşturdukları

kombinasyon etkileşim sonucu arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Tablo 19. Fosfomisin-meropenem etkileşiminin fosfomisin direnci ile ilişkisi.

	FOSFOMİSİN-MEROPENEM SİNERJİ	FOSFOMİSİN-MEROPENEM İNDİFERAN	Toplam	P
FF-R	18	12	30	0,026
FF-S	3	10	13	
Toplam	21	22	43	

FF: Fosfomisin, **R:** Dirençli, **S:** Duyarlı

Tablo 20. Fosfomisin-gentamisin etkileşiminin örnek türü ile ilişkisi.

	FOSFOMİSİN-GENTAMİSİN SİNERJİ	FOSFOMİSİN-GENTAMİSİN İNDİFERAN	Toplam	P
KAN	8	4	12	0,002
İDRAR	2	18	20	
Toplam	10	22	32	

5. TARTIŞMA

Enterobacterales ailesinde GSBL üreten suşlar arasında dünya çapında karbapenem direnci hızla artmaktadır ve bu yüzden Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından bu durum acil bir halk sağlığı tehdidi olarak ilan edilmiştir. Karbapenemlere dirençli *Enterobacterales* üyeleri, klinik olarak kullanılan çoğu antibiyotiğe dirençli hale gelerek neden oldukları hastalıkları tedavi etmeyi neredeyse imkansız hale getirmektedir. Bu durum, yeni geliştirilen antibiyotiklerin eksikliği ile birlikte, fosfomisin, polimiksinler ve aminoglikozitler gibi insanlarda toksisite ve etkinlik ile ilişkili önceden aşamalı olarak kullanımdan kaldırılmış antibiyotiklerin tekrar kullanılmasına yol açmıştır (54).

Fosfomisin, hücre duvarı biyosentezini engelleyen geniş spektrumlu bir epoksit antibakteriyel ajandır. Fosfomisin güvenli ve uygun maliyetli olmasının yanında, ilaçlar, uyarıcılar, gıdalar, intravenöz sıvılar ve periton diyaliz solüsyonları dahil olmak üzere diğer ajanlarla klinik olarak anlamlı farmakolojik etkileşimlere girmez. Bununla birlikte, monoterapi olarak kullanıldığında fosfomisine in vivo olarak direnç gelişebileceğinden, sistemik tedavide sıklıkla diğer antimikrobiyal ajanlarla kombinasyon halinde uygulanır. Eski bir fosfonik asit türevi olan fosfomisin, düşük moleküler ağırlığı (138 Da) ve nispeten hafif yan etkileri nedeniyle iyi bir doku penetrasyonuna sahiptir. Fosfomisin monoterapisinin ve kombinasyon halinde kullanımının, in-vitro ve in-vivo ortamda, MRSA ve *Enterobacterales* dahil olmak üzere gram pozitif ve gram negatif MDR bakteri izolatları üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (101).

Fosfomisin, esas olarak idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bir antimikrobiyaldir. Spesifik olarak, fosfomisin trometamin akut komplike olmayan sistit için oral tek doz tedavi olarak onaylanmıştır. Ayrıca fosfomisin, genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz üretimi nedeniyle oldukça yüksek direnç oranları sergileyen belirli dirençli üropatojen türleri için de yararlı bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, son çalışmalar, üropatojen bakteriler arasında ve özellikle GSBL pozitif bakterilerde meydana gelen mutasyonların, fosfomisine karşı direncin ortaya çıkmasına neden olabileceğini göstermektedir (126).

EUCAST *Enterobacterales* familyası üyeleri için fosfomisin duyarlılığının belirlenmesinde referans yöntem olarak agar dilüsyon yöntemini önermektedir. Yalnızca *E. coli* için 50 µg glikoz 6 fosfat içeren 200 µg fosfomisin diskleri ile disk difüzyon yöntemi de kullanılabilir (6). CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) yönergelerine göre de, agar dilüsyon tekniği, fosfomisin için MİK değerini belirlemek için referans yöntemdir (127). Difüzyon yöntemlerinde, diske veya gradyan şeritlerine G6P eklenir. EUCAST ve CLSI tarafından önerilen disk içeriği, 50 µg G6P ile 200 µg' dir. İnhibisyon bölgesinin veya zonların okunması genellikle sorundur çünkü *E. coli* izolatlarının %41 kadarında inhibisyon bölgesi içinde koloniler görünebilir. EUCAST, *E. coli* için okumayı standardize etmiş, inhibisyon bölgesi içinde bulunan kolonilerin göz ardı edilmesi gerektiğini önermiş aynı zamanda *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* için öneriler sunmayı planlamıştır (127). Lucas ve ark. (127) , tüm genom dizilimini kullanarak yakın zamanda inhibisyon bölgesi içinde gözlemlenen kolonileri incelemiş ve disk difüzyonu ile yeniden incelendiğinde vakaların sadece % 0.8' inin dirençli olarak kabul edildiğini tahmin etmişlerdir. Bu koloniler, dirençleri, G6P' ye bağlı fosfomisin taşınmasıyla bağlantılı uhpT genindeki delesyonlara veya anlamsız mutantlara bağlı olan mutantlardır (128).

Bugüne kadar, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi EUCAST ve CLSI tarafından fosfomisine duyarlılık çalışması için önerilen referans yöntem, besiyerine G6P eklenerek (25 mg/L) yapılan agar dilüsyonudur. Bu önerinin gerekçesi, fosfomisinin bakteri hücrelerine nüfuz etmek için 2 tip taşıyıcı kullanmasıdır. İlk taşıyıcı, gliserol 3-fosfat kullanır. Bu taşıyıcı, Mueller-Hinton agar ile oluşan glukoz veya fosfat içeren kültür besiyerindeki aktivitesini azaltır, diğer kültür besiyerlerine kıyasla fosfomisinin MİK değerlerini arttırır. İkinci taşıyıcı, G6P' nin varlığı ile indüklenir; bu nedenle besiyerine G6P eklendiğinde fosfomisin bakteriye daha etkin bir şekilde girer ve MİK değerleri büyük ölçüde azalır. 25 mg/L G6P ilavesi, enfeksiyon bölgesindeki bakterilerin fizyolojik durumunu taklit eder; MİK değerleri bu nedenle teorik değerlere yaklaşmaktadır. Ortamda 25 mg/L'nin üzerindeki G6P miktarındaki artışın MİK değerleri üzerinde çok az etkisi vardır (129). Bu çalışmadaki kombinasyon testleri için de bu veriler göz önünde bulundurularak G6P eklenerek agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

İn vitro antibiyotik duyarlılık test yöntemlerinden referans olan agar dilüsyon testi ve disk difüzyon testi ile çalışıldığında aynı zamanda EUCAST sınır değerleri yerine CLSI sınır değerleri kullanıldığında, *E. coli* diğer *Enterobacterales* türlerinden her iki yöntem için daha uyumlu sonuçlar göstermiştir (130). Bununla birlikte, birçok yazar, farklı duyarlılık yöntemleriyle belirlenen fosfomisin MİK değerlerinde korelasyon eksikliği göstermiştir (131). Cueto ve ark. (132) fosfomisin duyarlılık sonuçlarını antibiyotik duyarlılık test yöntemine göre değerlendirdikleri çalışmalarında *E. coli* için yöntemler arası anlamlı bir fark bulunmazken, *K. pneumoniae* için farklılıklar saptamışlardır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri için çoğu otomatize sistem sıvı mikrodilüsyon bazlı yöntemleri esas aldığından, bu tür sistemleri kullanan laboratuvarlarda, fosfomisine direnç olduğundan fazla tahmin edilebilir (132). Bu çalışmada agar dilüsyon yöntemi ile 60 adet KRE *E. coli* suşunda fosfomisin direnç oranı %76.6 olarak saptanırken, otomatize sistem ile çalışılan 29 adet idrar izolatında fosfomisin direnç oranı %3.6 olarak saptanmıştır. Agar dilüsyon ile ise idrar izolatlarında %65.5 oranında direnç saptanmıştır.

Karlowisky ve ark. 'nın (130) farklı antibiyotik duyarlılık saptama yöntemlerini kullanarak 554 *E. coli* suşu ile yaptıkları çalışmada, CLSI sınır değerleri uygulandığında, fosfomisine duyarlı izolatların yüzdesi, agar dilüsyonu (%98.9, 548/554 izolat), disk difüzyonu (%99.3, 550/554) ve Epsilometer test (%99.1, 549/554) için benzer olarak saptanmıştır. EUCAST sınır değerleri uygulandığında ise, fosfomisine duyarlı izolatların yüzdesi, agar dilüsyon (%98.4, 545/554), disk difüzyonu (%99.1, 549/554) ve Epsilometer test (%98.9, 548/554) için aynı şekilde yine benzer olarak saptanmıştır. Çalışmalarında *E. coli* 'nin beta laktamaz üreten izolatları ve AmpC üreten izolatları sırasıyla %94,9 ve %96,6 duyarlılık göstermiştir (130). Fakat bazı çoklu ilaca dirençli gram negatif bakterilerin araştırıldığı çalışmalarda gradyan testlerin fosfomisin duyarlılığını saptamada oldukça yetersiz olduğu saptanmıştır (133). 775 GSBL üreten *E. coli* (EUCAST sınır değerleri kullanılmıştır.) üzerinde yapılan 2018 tarihli bir Avrupa çalışmasında, araştırmacılar, agar dilüsyon ile hem epsilometer test hem de disk difüzyonu arasında %98' den fazla kategorik uyum, ancak kabul edilemez derecede yüksek ÇBH(Çok Büyük Hata) oranları (%23,3, disk difüzyonu; %12,9, Epsilometer test) gözlemlemişlerdir (134).

Fosfomisin, çeşitli ülkelerden elde edilen in vitro verilerde birincil İYE patojeni olan *E. coli*' ye karşı %98 ile %100 arasında değişen duyarlılık oranları ile mükemmel bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Örneğin, GSBL üreten *E. coli*' ye karşı fosfomisin, %86-100' lük duyarlılık oranlarına sahip ve bu oranlar genellikle nitrofurantoin, siprofloksasin veya trimetoprim-sülfametoksazol ile görülenlerden daha yüksek olarak saptanmıştır (135). Bu çalışmada referans yöntem olan agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisin duyarlılık oranı %23. 4 olarak saptanmıştır. Çalışılan tüm suşların KRE özellikte olmasının, fosfomisin direnç oranının bu çalışmada yüksek saptanmasında etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Falagas ve ark. (99) GSBL üreten mikroorganizmalar da dahil olmak üzere MDR *Enterobacterales* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar için fosfomisinin antimikrobiyal aktivitesini ve klinik etkinliğini değerlendiren 17 çalışmayı içeren derlemelerinde, 11 çalışma izolatların en az %90' ının fosfomisine duyarlı olduğunu bildirilmişlerdir. 64 µg/ml' lik CLSI duyarlılık sınır değeri kullanıldığında, GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının çoğu fosfomisine duyarlı olarak saptamıştır (sırasıyla %97 ve %81). Bu çalışmada kullanılan antibiyotik duyarlılık testi disk difüzyon yöntemi olduğundan ve derleme 2010 yılında yapıldığından direnç oranı bizim çalışmamıza göre daha düşük saptanmış olabilir. Ayrıca bizim çalışmamızda EUCAST mik sınır değeri olan 32 µg/ml kullanılmıştır.

Flamm ve ark' nın (147) 2019 yılında agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada GSBL pozitif 22 *E. coli* ve 21 *K. pneumoniae* suşunda fosfomisin duyarlılığı sırasıyla %81.8, %91.7 olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla *E. coli* ve *K. pneumoniae* için 0.5 - 2 mg/L ve 4- 8 mg/L olarak belirlenmiştir. 2018 yılında Flamm ve ark' nın (137) yaptıkları başka bir çalışmada ise karbapenem dirençli 11 *E. coli* ve 12 *K. pneumoniae* suşunda fosfomisin duyarlılığını % 92 olarak saptamışlardır. Bu suşlarda MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 8-64 mg/L ve 1->256 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarda KRE suşların GSBL pozitif suşlara kıyasla hem *E. coli* hem de *K. pneumoniae* izolatları için MİK₅₀, MİK₉₀, fosfomisin direnci açısından daha yüksek değerlere sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada ise bu artışlar ile uyumlu olarak KRE pozitif *E. coli* suşlarında MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 64 mg/l ve 512 mg/l olarak saptanmıştır.

Bouxom ve ark. (138) 2018 yılında Fransada yaptıkları çalışmada idrar ve kan örneklerinden izole ettikleri GSBL pozitif 100 adet *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşunun agar dilüsyon ile çalışılan fosfomisin duyarlılık oranını % 92.7 olarak tespit etmişlerdir.

Çin’de de 2017 yılında Bi ve ark. (139) idrar örneklerinden izole edilen 356 GSBL pozitif *E. coli* suşunda agar dilüsyon ile çalışılan fosfomisin direnç oranı aynı şekilde % 92.7 olarak belirlemişlerdir. MİK₅₀ değeri 0.5 mg/L, MİK₉₀ değeri ise 32 mg/L olarak belirlenmiştir.

Mezzatesta ve ark. ’nın (140) 2017 yılında İtalya’da agar dilüsyon, mikrodilüsyon ve gradient difüzyon yöntemleri ile yaptıkları çalışmada idrar örneklerinden izole edilen 24 adet GSBL pozitif *E. coli* ve 53 adet KPC pozitif *K. pneumoniae* suşunun fosfomisin duyarlılık oranları sırası ile %100 ve %78 olarak tespit edilmiştir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise 0.5-1 mg/L ve 32-128 mg/L olarak hesaplanmıştır. Her üç çalışmada da idrar örneklerinden izole edilen GSBL pozitif *E. coli* suşları için direnç oranları oldukça düşük seviyelerde tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda idrar örneklerinde fosfomisin direnç oranı agar dilüsyon yöntemi ile %65.5 olarak saptanmıştır. Bu çalışmalara kıyasla daha yüksek oran tespit edilmesinin suşların hastane kaynaklı ve KRE özellikte olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Falagas ve ark.’nın (99) 2010 yılında yaptıkları çalışmalarında Avrupa, Asya ve ABD’ de GSBL üreten *E. coli*’ deki fosfomisin direnç oranlarının ortalama yaklaşık olarak %3.2 olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte Oteo ve ark. ’nın (141) yaptıkları bir İspanyol çalışmasında, GSBL üreten *E. coli* suşlarındaki fosfomisin direnç oranlarında, fosfomisin kullanımındaki %50 oranında artışa paralel olarak, 2004’ ten 2008 ’e %2.2’ den %21.7’ ye bir artış olduğunu gösterilmiştir. İsrail’ de yürütülen ve idrardan izole edilen 1503 *E. coli* suşunun fosfomisine duyarlılığının değerlendirildiği yakın tarihli bir tek merkezli çalışmada, fosfomisine direnç 2015’ te %21’ den 2016’ da %31’ e yükselmiş ve GSBL üretenlerde, üretmeyenlere göre daha sık olarak saptanmıştır.(142) Bu çalışmalardaki fosfomisin direnç oranlarının yıllar geçtikçe yükselmesi ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da idrar numunelerinde fosfomisin direnç oranı %65.5 olarak saptanmıştır.

Gopichand ve ark.'nın (143) agar dilüsyon ile yaptıkları duyarlılık çalışmalarında fosfomisin, idrar örneklerinden izole edilen karbapenemaz üreten *E. coli* izolatlarının %100'ünü, *K.pneumoniae* ve *Enterobacter spp* izolatlarının %50'sini, *Pseudomonas spp* izolatlarının %30'unu inhibe etmiştir. Çalışmaya dahil edilen 217 MDR *E. coli* izolatının 78'i (%35.9) amikasin, 207'si (%95.4) gentamisin'e dirençli iken, fosfomisin bu izolatlara karşı in vitro %100 etkinlik göstermiştir. Bu çalışmalar ile uyumlu olarak agar dilüsyon yöntemi ile gentamisin direnç oranını bizim çalışmamızda da %85 olarak saptadık. Ancak bizim suşlarımızın tümü fosfomisine duyarlı olarak saptanmamıştır.

Banerjee ve ark. (144) tarafından 2017 yılında Kolkata'daki 380 yataklı üçüncü basamak bir hastanede yapılan bir çalışmada, KRE *E. coli* izolatları üzerinde fosfomisine % 89 duyarlılık ile benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Benzer şekilde, GSBL ve/veya karbapenemaz üreticisi *Enterobacterales* ailesi üyelerinde dirençli mutantların ortaya çıkışının zamana bağlı öldürme eğrileri ve in vitro modelleri kullanılarak yürütülen farmakodinami çalışmaları, sadece fosfomisinin bakterisidal aktivitesini değil, aynı zamanda türe ve izolata göre değişen dirençli alt popülasyonların yeniden büyümesini de göstermiştir (145).

Heterodirenç fenomeni, *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ve hatta *S. pneumoniae* gibi çeşitli mikroorganizmalarda rapor edilmiştir. Bu fenomen, fosfomisine daha az duyarlı bakteri alt popülasyonlarının varlığını gösterir ve fosfomisin için yüksek mutasyon sıklığını kısmen açıklar. *E. coli* izolatlarının %40 kadarında milyarda bir-yüzbinde bir oranında dirençli mutantlar görülebilmektedir. Bu mutantlar, glpT ve uhpT genlerindeki nadir mutantlar ile birlikte 32-64 mg/L'lik MİK değerleri göstermektedir. Laboratuvar ortamında ve idrarda in-vitro düşük stabiliteye sahiptirler. Tipik olarak ardışık pasajlarda düşük MİK değerleri (2-4 mg/L) geri kazanılabilir. İzolatların yaklaşık %1'inde, uhpT ve uhpA genlerindeki delesyonlar veya eklemeler ile daha düşük bir oranda (10^{-11} - 10^{-7}) dirençli mutantlar ortaya çıkabilir. Bu mutantlar, yüksek MİK düzeyleri (512-1,024 mg/L) ve izogenik suşlardan daha düşük büyüme stabilitesi sunar, ancak glpT ve uhpT mutantlarınınkinden daha yüksektir. Bu mutantlar, hipermutatör suşlarda daha sık gözlenmektedir. Bununla birlikte, tüm durumlarda, stabilitelerinin olmaması ve asidik

ortamlarda (örneğin idrarda) daha düşük seçiliim olasılıkları, in vitro olarak gözlemlenen fosfomisin direncinin in vivo olarak düşük yansımaları da açıklamaktadır. Fosfomisinin idrar gibi bazı yerlerde ulaştığı yüksek konsantrasyonların ve biyofilmlere iyi nüfuz etmesinin bu mutantların olası seçilimini en aza indirdiği belirtilmektedir. Bu gerçek, mutant seçim penceresinin (dirençli mutantların seçileceği konsantrasyon aralığı) tanımlanabildiği in vitro modellerde gösterilmiştir. 4 g/8 saatten daha yüksek terapötik rejimlerde bu seçim penceresinden kaçınılabılır (129).

Kanada, İtalya, İspanya, Yunanistan ve Birleşik Krallık'tan yapılan son araştırmalar, toplum kökenli GSBL üreten organizmalar arasında diğer antimikrobiyal ajan sınıflarına karşı dirençle ilgili endişe verici bir eğilim göstermiştir. Bu araştırmalar, GSBL üreten *E. coli*'nin, özellikle CTX-M tiplerini üretenlerin, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, gentamisin ve siprofloksasine karşı (Kanada'da izolatların %66 kadarı siprofloksasine dirençli saptanmıştır.) birlikte direnç sergilediğini göstermektedir (56). Antimikrobiyal kombinasyonların kullanımı, gelişmiş biyoyararlanım, inhibitör inhibisyonu, sıralı blokaj, karşılıklı stabilizasyon, paralel yol inhibisyonu ve düzenleme modülasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla mikrobiyal hücreleri sinerjistik olarak inaktive etmesi nedeniyle önerilmektedir (126).

Fosfomisin'in diğer antibiyotik ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında faydalı olabilen bir başka yönü, birlikte uygulanan birçok ilaç türünün toksisitesini değiştireme yeteneğidir. Spesifik olarak, fosfomisinin, aminoglikozitlerin, glikopeptitlerin ve ayrıca polimiksin B'nin toksisitesini in-vivo azalttığı rapor edilmiştir. Son olarak, amoksisilin veya klaritromisin ile sinerjistik kombinasyonun *Helicobacter pylori* enfeksiyonlu hastalar için yararlı bir alternatif tedavi seçeneği sağlayabileceği bildirilmiştir (126).

Fosfomisin ile diğer antibiyotik kombinasyonları, test edilen izolatlarla karşı sinerjistik antibakteriyel etkiler göstermiştir. Özellikle, fosfomisinin aminoglikozidlerle kombinasyonları, diğer sınıf antibiyotikleriyle karşılaştırıldığında gelişmiş bakterisidal etki ortaya çıkarmıştır. Bu durum, antibiyotiğe dirençli patojenlerin yönetiminde çok hedefli bir mekanizmanın rolünün önemini göstermektedir. K.

pneumoniae, *P. aeruginosa* ve *E. coli* dahil olmak üzere MDR bakteriyel izolatlarına karşı fosfomisin ve aminoglikozitlerin (amikasin veya gentamisin) kombinasyon tedavileri için benzer sinerjistik etkilerr bildirilmiştir (101).

Calderon ve ark.'nın (146) altı fosfomisine heterodirençli *E. coli* izolatı (dördü güçlü mutator fenotipli) ile yaptıkları 2021 tarihli bir çalışmada fosfomisin ve amikasin MİK değerleri, agar dilüsyon (AD), epsilometer test ve sıvı mikrodilüsyon (BMD) ile değerlendirilmiştir ve fosfomisin ve amikasin etkileşimleri, farklı konsantrasyonlarda dama tahtası ve zamana bağlı öldürme deneyleri ile incelenmiştir. AD ve BMD ile beş izolatın fosfomisine dirençli olduğu belirlenmiş, ancak hepsinin Epsilometer test ile duyarlı olduğu saptanmıştır. Tüm izolatların amikasinine de duyarlı olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik kombinasyonları iki izolatta sinerjistik olup antagonizma saptanmamıştır. Zamana bağlı öldürme deneylerinde kombinasyon koşulları altında hiçbir büyüme tespit edilmemiştir. HFIM (içi boş fiber enfeksiyon modeli)'de fosfomisin ve amikasin monoterapileri bakteri kültürlerini sterilize etmede başarısız olmuş; ancak fosfomisin ve amikasin kombinasyonu hızlı bir eradikasyon sağlamıştır. Bu çalışmada, monoterapide amikasin veya fosfomisin kullanılmasının fosfomisine heterorezistan *E. coli* izolatlarını ortaya çıkarması nedeniyle izolatlarının tedavi başarısızlığı riskine neden olabileceği düşünülmüştür. Bu sonuçlar, amikasin-fosfomisin kombinasyonunun bakteri yükünü hızla azaltabileceğini ve fosfomisin heterodirençli suşlara karşı dirençli alt popülasyonların ortaya çıkmasını önleyebileceğini desteklemektedir. Bizim çalışmamızda da fosfomisin ve gentamisin sinerjist etkileşim oranı aminoglikozid grubu antimikrobiyal grubuna dahil olan amikasinin sinerji gösterdiği bu çalışma ile uyumlu şekilde % 33.4 olarak saptanmıştır.

Yakın tarihli bir metaanaliz çalışmasında, çeşitli mikroorganizmalar ile birlikte çeşitli enfeksiyon türlerinde (üriner sistem, solunum sistemi, bakteriyemi, merkezi sinir sistemi ve iskelet sistemi) fosfomisin monoterapisi sırasında dirençli mutantların seçilme riskinin %3.4 olduğunu tahmin edilmiştir (129).

Fosfomisinin monoterapi olarak kullanıldığında MDR *Enterobacterales* ailesi üyelerinde %90.5 ila %100 'üne karşı etkili olduğu saptanmıştır. GSBL pozitif *E. coli* suşlarında fosfomisin ile karbapenemler (dama tahtası yöntemi ve epsilometer test ile),

aztreonam (dama tahtası ve zamana bağılı öldürme testleri ile), kolistin (zamana bağılı öldürme testi ve epsilometer test ile), netilmisin (epsilometer test ile) ve tigesiklin (zamana bağılı öldürme testleri ve epsilometer test) ile sinerji tespit edilmiştir. İzolatın fosfomisin MİK değerine eşit konsantrasyonlarda ancak daha yüksek konsantrasyonlarda olmamakla birlikte sefoksitin ile (zamana bağılı öldürme testleri ile) sinerji rapor edilmiştir. Son olarak, dama tahtası yöntemi kullanılarak NDM-1 üreten *Enterobacterales* üyelerine karşı kolistin ile sinerji rapor edilmiştir. Ancak tigesiklin ile sinerji saptanmamıştır.(102) Samonis ve ark.'nın (147) toplamda 100 adet GSBL pozitif *E. coli*, MDR *K. pneumoniae* ve MDR *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları epsilometer test ile yaptıkları kombinasyon çalışmalarında fosfomisinin, yüksek karbapenem MİK değerleri olanlar dahil serin karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarının üçte ikisinden fazlasına karşı karbapenemlerle kombinasyon halinde sinerjik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Değerlendirilen karbapenemler arasında, imipenem fosfomisin ile kombinasyon halinde GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatlarına ve ayrıca GSBL pozitif *E. coli* izolatlarına karşı en sık sinerjistik etkiye sahip karbapenemdir; doripenem ise, MDR *P. aeruginosa* izolatlarına (çoğu karbapenem dirençli olan) karşı fosfomisin ile en sık sinerjik etki gösteren karbapenemdir. Bizim çalışmamızda bu veriler ile uyumlu olarak KRE pozitif *E. coli* suşlarında meropenem ile fosfomisin kombinasyonunda %35 oranında sinerji tespit edilmiştir. Sefalosporinlerden seftriakson ile fosfomisin kombinasyonunda sinerji oranı oldukça düşük bir oran olan %1.7 olarak saptanmıştır.

Bu çalışmanın aksine Netikul ve ark. (148) karbapenemler ile fosfomisinin kombinasyonunun; en az bir karbapenem türüne karşı duyarlılığı azalmış *E. coli* veya *K. pneumoniae* suşlarına karşı sinerjistik olmadığını ($0.75 \leq \text{FİK indeksi} \leq 2.0$) saptamışlardır.

El-wafa ve ark.'nın (149), MDR *E. coli* izolatlarında CB yöntemiyle yaptıkları çalışmalarında inceledikleri tüm izolatlarda siprofloksasin, imipenem ve tobramisin, fosfomisin ile kombinasyon çalışmasında inceledikleri tüm etkileşimlerin sinerjik etki tespit etmişlerdir. Özellikle, üçlü kombinasyonların (FOS/ IPM/ CIP, FOS/ IPM/ TOB ve FOS/ CIP/ TOB), duyarlı sınır değerlerden daha düşük MİK seviyelerinde seçilen tüm izolatlara karşı sinerjiyi arttırdığını saptamışlardır.

Sugathan ve ark. (150) idrar örneklerinden izole edilen ve biyofilm oluşturan 50 adet MDR *E. coli* suşu ile yaptıkları çalışmada siprofloksasin, amikasin, meropenem antibiyotiklerinin fosfomisin ile kombinasyon etkileşimlerini agar dilüsyon yöntemi ile incelemişlerdir. Fosfomisinin, ayrı ayrı amikasin ve meropenem ile kombinasyonları, MDR *E. coli* izolatlarına karşı siprofloksasin ile kombinasyonuna kıyasla, biyofilm oluşumunu daha fazla azaltmış ve yüksek bir sinerji yüzdesi sağlamıştır. Bizim çalışmamızda da meropenem ile fosfomisin ve gentamisin ile fosfomisin kombinasyonlarının sinerji oranları seftriakson ile fosfomisin kombinasyonuna kıyasla daha yüksek saptanmıştır.

Hickman ve ark. (151) MDR *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında agar dilüsyon yöntemi ile aztreonam ve mesilinam antimikrobiyallerinin fosfomisin ile kombinasyon etkileşimlerini incelemişlerdir. Tüm suşlar aztreonama dirençli olmasına rağmen ikili kombinasyon (fosfomisin ve aztreonam) ve üçlü kombinasyon (fosfomisin, aztreonam ve mecillinam) kullanımı bakterilerin inhibisyonunda oldukça etkili bulunmuştur.

Yakın zamanda fosfomisin ve beta laktamlar (karbapenem, seftazidim, piperasilin/tazobaktam) arasında KPC üreten bir *K. pneumoniae* suşuna karşı zamana bağlı öldürme testleri kullanılarak test edilen bakterisidal aktivite açısından sinerji gözlemlenmiştir (136). Yakın tarihli bir başka zamana bağlı öldürme çalışmasında, 9/11(%82) panrezistan gram negatif basile karşı fosfomisin ve meropenem arasındaki sinerji gözlemiştir (152).

Farooq ve ark. 'nın idrar, kan, vajinal sürüntü ve yara örneklerinden izole edilen 176 MDR *E. coli* suşu ile yaptıkları çalışmada, antibiyotik direnç yüzdeleri gentamisin için %60, moksifloksasin için %15, siprofloksasin için %40, amoksisilin için %20, fosfomisin için %10 ve seftolozane/tazobaktam için %5 olarak saptanmıştır. Çift disk sinerji yöntemi ile yaptıkları kombinasyon çalışmalarında, fosfomisin ve amoksisilin kombinasyonu %92, fosfomisin ve gentamisin kombinasyonu %95 ve fosfomisin ve ceftolozane/tazobaktam kombinasyonu %99 duyarlılık saptadıklarını bildirmişlerdir (153).

Fos enzim grupları arasında, epidemiyolojik açıdan karbapenem direnci ile en ilgili olanı, *E. coli*'deki plazmit aracılı aktarılan FosA3' tür. FosA3 ilk olarak 2006'da Japonya'da tanımlanan bir *E. coli* klinik suşundan bildirilmiştir. Daha sonra Doğu

Asya' da (Çin, Hong Kong, Kore ve Japonya), GSBL üreten *E. coli* insanlarda, gıdalarda, evcil hayvanlarda *K. pneumoniae*' dan daha az yaygın olarak saptanmıştır. FosA3 geni tipik olarak, CTX-M-tipi GSBL taşıyan bir konjugatif plazmit üzerinde iki IS26 kopyası ile sınırlanmış bir kompozit transpozon üzerinde bulunur. Bu nedenle, böyle bir plazmit alan *E. coli*, aynı anda hem sefalosporinlere hem de fosfomisine karşı dirençli hale gelir (135).

İlginç bir kombinasyon da fosfomisinin, gram negatif mikroorganizmalarda fosfomisini hidrolize eden FosA enziminin inhibitörü olarak da aktivite gösteren bir antiviral ilaç olan fosfonoformik asit (foscarnet) türevleri ile kombinasyondur. Fosfomisin aktivitesi bu kombinasyon ile, kromozomlarında bu enzimi kodlayan *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacter cloacae* gibi bakterilere karşı artmaktadır (129).

Ayrıca temosilin ve fosfomisin kombinasyonunun hem in-vitro hem de in-vivo ortamda sinerjistik olduğu ve KPC karbapenemazlar ile temosiline direnç kazandıran OXA-48 üreten *E. coli*' ye karşı kullanıldığında dirençli mutantların ortaya çıkmasını önlediği gösterilmiştir (129).

Suich ve ark. (154) 2022 yılında kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* (n=83), *K. pneumoniae* (13) ve *P. aeruginosa* (4)' dan oluşan 100 izolatın neredeyse tümünü (95/100), epsilometer test ile fosfomisine duyarlı olarak saptamışlardır. Disk difüzyon yöntemi ile ise 88/100 izolatın fosfomisine duyarlı olarak saptamışlardır. Bu suşların arasından 30 izolat sinerji testleri için uygun bulunmuştur. Fosfomisinin antibiyotiklerin her biri ile kombinasyon halinde sinerji testi, bir kombinasyon MİK değerini belirlemek için MTST™ "çapraz" sinerji yöntemi kullanılarak her bir izolat için yapılmıştır. Tanımlanan bu dirençli 30 izolattan 21' i *E.coli*, 8' i *K. pneumoniae* ve 1' i *P.aeruginosa* olup, sinerjistik etkileşim en yaygın olarak fosfomisin ile piperasilin/tazobaktam (10/30; %33), seftazidim/avibaktam (10/30; %30) ve temosilin (8/30; %27) dahil beta-laktam antibiyotikler ile tespit edilmiştir. Aditif etki en yaygın olarak aztreonam (25/30; %83) ve meropenem (25/30; %83) ile saptanmış, ancak tigesiklin (30/30) ile %100 indiferan etkileşim saptanmıştır. Herhangi bir antibiyotik kombinasyonu ile antagonizma tanımlanmamıştır. Bu sonuçlar ile beta laktamların fosfomisin ile kombinasyon için tercih edilebilen antibiyotikler olabileceklerini

düşündürmektedir. Bu çalışmada ayrıca kolistin ile fosfomisin kombinasyonunun sinerji ile sonuçlanmadığı bildirilmiştir (%20 additif, %80 indifera etki saptanmıştır). Bu çalışmanın aksine agar dilüsyon yöntemi kullanarak yaptığımız kombinasyon çalışmamızda bir beta laktam olan seftriakson ile fosfomisin kombinasyonunun sinerji oranını %1.7 additif etki oranını ise %38.3 olarak saptadık. Meropenem ile fosfomisin kombinasyonunda ise sinerji oranı %35 iken additif etki oranı %26.7 olarak saptanmıştır. Fosfomisin ile seftriakson, meropenem veya gentamisin kombinasyonları arasında additif etki oranı %38.3 ile en yüksek seftriakson ve fosfomisin kombinasyonunda saptandı. Bahsedilen çalışmada kullanılan çapraz sinerji yöntemi ile bizim kullandığımız agar dilüsyon yönteminin farklı sonuçlar elde edilmesinde etkili olmuş olabileceğini düşünmekteyiz.

Corvec ve ark.'nın (155) zamana bağılı öldürme yöntemi ile yaptıkları kombinasyon çalışmasında, kombinasyon halinde, kolistin ile tigesiklin (%50), fosfomisin ile gentamisin (%42), kolistin ile gentamisin (%33) veya fosfomisin ile tigesiklin (%25) kombinasyonlarından önemli ölçüde daha fazla sinerji gösterdiğini bildirmişlerdir. Fosfomisin ile kolistin kombinasyonu, tek başına fosfomisininkinden önemli ölçüde yüksek sinerji oranını (%67) göstermiştir. Çalışmalarında fosfomisin ile kolistin kombinasyonunun, florokinolon dirençli gram negatif basillerin tedavisinde etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Wang ve ark.'nın (156) *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşları ile yaptıkları çalışmada, *E. coli* suşlarının biyofilmine karşı fosfomisin/ gentamisin kombinasyonu için en yüksek oranda sinerjizm (%75) saptanırken, gentamisin/ siprofloksasin kombinasyonu *P. aeruginosa* suşlarına karşı daha yüksek sıklıkta sinerji göstermiştir (%71.4).

6. SONUÇLAR

GSBL üreten ve karbapeneme dirençli *Enterobacterales* üyeleri ile oluşan enfeksiyonlarda tedavide kullanılabilecek antimikrobiyal seçenekleri oldukça kısıtlıdır. Uzun yıllardır, özellikle *E. coli*'nin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarında monoterapi halinde oral fosfomisin kullanılmaktadır. Bu çalışmada İv fosfomisinin KRE *E. coli* suşlarında seftriakson, meropenem ve gentamisin ile kombinasyon halinde kullanımının sinerjistik etki durumu incelenmiştir. Sonuç olarak meropenem ve gentamisin antimikrobislerinin fosfomisin ile kombinasyon halinde yüksek sinerjistik etkili olabileceğini ancak seftriakson ve fosfomisin kombinasyonunun anlamlı bir sinerjistik etki göstermediği saptanmıştır. KRE *E.coli* suşlarında kombinasyon tedavilerine yön verilmesi açısından daha fazla sayıda agar dilüsyon yöntemi ile yapılacak olan kombinasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Hazırolan G, Fosfomisin: Geçmişe Dönüş. Klimik Derg. 2020; 33(3): 213-22
2. Gardiner BJ, Stewardson AJ, Abbott IJ, Peleg AY, İnataçı Üriner Sistem Enfeksiyonu'nda Nitrofurantoin ve Fosfomisin Kullanımı. 2019;42 (1)
3. Trinh TD, Smith JR, Rybak MJ, Parenteral Fosfomycin for the Treatment of Multidrug Resistant Bacterial Infections: The Rise of the Epoxide. Pharmacotherapy. 2019;39(11)
4. Zhanel GG, Zhanel MA, Karlowsky JA, Intravenous fosfomycin: an assessment of its potential for use in the treatment of systemic infections in Canada. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2018; (2018), Article 8912039
5. Alpay Y, Yavuz MT, Aslan T, Büyükgengin B, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif *Escherichia coli* ile oluşan komplike olmayan üriner sistem infeksiyonlarının tedavisinde oral antibiyotikler karbapenemlere alternatif olabilir mi? ANKEM Derg.2017;31(3):85-91 doi: 10.5222/ankem.2017.085
6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters-Version 11.0. 2021.
7. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Ed Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, Medical Microbiology. p.p. 253, 8th ed. JMI Laboratories, Philadelphia, ABD, 2016
8. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrrow JH, Sakanari JA, Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. .p.p.231, 27th ed. Mcgraw-Hill Education, New York, ABD, 2016
9. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology. p.p. 214-229 7th ed. Philadelphia; 2017.
10. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013 Oct;26(4):822-80. doi: 10.1128/CMR.00022-13.
11. Etymologia: *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2015 Aug;21(8):1310. doi: 10.3201/eid2108.ET2108. PMID: PMC4517708.

12. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL, Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 123-140.
13. Torok ME, Moran E, Cooke F. *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*. 2 ed. ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 2016. <https://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199671328.001.0001/med-9780199671328>. Accessed January 18, 2022. p.280-281
14. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. *Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology*. p.p. 254, 7th ed. Philadelphia; 2017.
15. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. Ed Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, *Medical Microbiology*. p.p. 256-293, 8th ed. JMI Laboratories, Philadelphia, ABD, 2016
16. Estrada-Garcia T, Tarr PI. *Escherichia Coli*. *Foodborne Infections and Intoxications*.2022;125–163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00018-9>
17. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA, Jawetz. *Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. .p.p.235, 27th ed. Mcgraw-Hill Education, New York, ABD, 2016
18. Nataro JP. Enterohaggative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005; 21(1):4-8. PMID: 15687877.
19. Newell DG, La Ragione RM. Enterohaggorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies?. *Transbound Emerg Dis*. 2018; 65(1):49-71. doi: 10.1111/tbed.12789. Epub 2018 Jan 25. PMID: 29369531.
20. Karmali MA, Petric M, Lim C. Fleming PC, Steele BT. *Escherichia colicytotoxin*, haemolytic-uraemic syndrome, and haemor(R)hagic colitis. *Lancet*. 1983; 2(8362): 1299–1300
21. Foster JW. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol*. 2004; Nov;2(11):898-907. doi: 10.1038/nrmicro1021. PMID: 15494746.
22. Raj P. Pathogenesis and laboratory diagnosis of *Escherichia coli*-associated enteritis. *Clin Microbiol Newsletter*. 1993;15: 89–93.

23. Robins-Browne RM and Hartland EL. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2002; 17: 467-475
24. İdstedt BA, Finton MD, Porcellato D, Brandal LT. High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. *BMC Infect Dis*. 2018; Nov 1;18(1):544. doi: 10.1186/s12879-018-3449-2.
25. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA, Jawetz. Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. .p.p.234, 27th ed. McGraw-Hill Education, New York, ABD, 2016
26. Mandracchia VJ, Hayes DW, Yoho RM, Hayes MF. Diagnosis, Differential and Treatment Options. *Nat Rev Microbiol* . 2000;13(March):269–84.
27. Shah C, Baral R, Bartaula B. et al. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiol*. 2019; 19: 204 <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1587-3>
28. Sik Kim K. Meningitis Associated *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2006; Jan;2(1). doi: 10.1128/ecosalplus.8.6.1.2.
29. Hoffman JA, Wass C, Stins MF, Kim KS. The capsule supports survival but not traversal of *Escherichia coli* K1 across the blood-brain barrier. *Infection and immunity*, 1999; 67(7), 3566-3570.
30. Parkkinen J, Korhonen TK, Pere A, Hacker J, Soinila S. Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis, *J Clin Invest*, 1988; vol. 81(3) :860-5
31. Stins MF, Prasadarao NV, Ibric L, Wass CA, Luckett P. Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells, *Am J Pathol*. 1994;145:1228-36
32. Korhonen TK, Valtonen MV, Parkkinen J, et al. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis, *Infect Immun*, 1985; 48: 486-91
33. Huang SH, Wan ZS, Chen YH, Jong AY, Kim KS. Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression, *J Infect Dis*, 2001;183: 1071-8

34. Huang SH, Wass C, Fu Q, Prasadara NV, Stins M. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*, *Infect Immun*, 1995;63: 4470-5
35. Khan NA, Wang Y, Kim KJ, Chung JW, Wass CA. Cytotoxic necrotizing factor-1 contributes to *Escherichia coli* K1 invasion of the central nervous system. *J Biol Chem*. 2002; 277: 15607-12
36. Badger JL, Wass CA, Weissman SJ, Kim KS. Application of signature-tagged mutagenesis for identification of *Escherichia coli* K1 genes that contribute to invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun*. 2000;68: 5056-61
37. Ron EZ. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. 2010;300:367–70. 10.1016/j.ijmm.2010.04.009
38. Warner PJ, Williams PH, Bindereif A, Neilands JB. ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1981 Aug;33(2):540-5. doi: 10.1128/iai.33.2.540-545.1981. PMID: 6456229; PMCID: PMC350734.
39. Gophna U, Oelschlaeger TA, Hacker J, Ron EZ. *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; ;196(1):57-60. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10540.x. PMID: 11257548.
40. Janben T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int.J.Med.Microbiol*. 2001; 291: 371–378.
41. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res*. 2005; 36: 241–256.
42. Negre VL, Bonacorsi S, Schubert S, Bidet P, Nassif X, Bingen E. The siderophore receptor *Iron*, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor *ChuA*, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infect. Immun*. 2004;72: 1216–1220.

43. Gophna U, Barlev M, Seijffers R, Oelschläger TA, Hacker J, Ron EZ. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 2001; 69: 2659–2665.
44. Ideses D, Gophna U, Paitan Y, Chaudhuri RR, Pallen MJ, Ron EZ. A degenerate type III secretion system from septicemic *Escherichia coli* contributes to pathogenesis. *J Bacteriol.* 2005;187(23):8164-71. doi: 10.1128/JB.187.23.8164-8171.2005. PMID: 16291689; PMCID: PMC1291271.
45. S. Hartleib, R. Prager, I. Hedenström, S. Löfdahl, H. Tschäpe Prevalence of the new, SPI1-like, pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli* *Int. J. Med. Microbiol.* (2003); 292: 487-493
46. Ren CP, Chaudhuri RR, Fivian A, Bailey CM, Antonio M, Barnes WM, Pallen MJ. The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition. *J Bacteriol.* 2004 Jun;186(11):3547-60. doi: 10.1128/JB.186.11.3547-3560.2004. PMID: 15150243; PMCID: PMC415751.
47. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar;42(3):1089-94. doi: 10.1128/JCM.42.3.1089-1094.2004. PMID: 15004058; PMCID: PMC356843.
48. Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, Pascual A; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol.* 2010 Aug;48(8):2840-5. doi: 10.1128/JCM.02147-09. Epub 2010 Jun 2. PMID: 20519460; PMCID: PMC2916592.
49. Shahid, M. et al. blaCTX-M, blaTEM, and blaSHV in Enterobacteriaceae from North-Indian tertiary hospital: high occurrence of combination genes. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 2011; 4(2): 101–105
50. Copur Cicek A, Saral A, Ozad Duzgun A, Yasar E, Cizmeci Z, Ozlem Balci P, Sari F, Firat M, Altintop YA, Ak S, Caliskan A, Yildiz N, Sancaktar M, Esra Budak E, Erturk A, Birol Ozgumus O, Sandalli C. Nationwide study of *Escherichia*

- coli producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. J Antibiot (Tokyo). 2013;66(11):647-50. doi: 10.1038/ja.2013.72. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23838745. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.72>
51. Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. Resistance mechanisms. Ann Transl Med. 2016;4(17):326. doi: 10.21037/atm.2016.09.14. PMID: 27713884; PMCID: PMC5050191.
 52. Kumar SS, Hemalatha S. "Extended spectrum Beta lactamase (ESBL) Mechanism of antibiotic resistance and Epidemiology. Int J pharmtech Res . 2015; 7(2): 303-9.
 53. Rupp Mark E, Paul DF. Extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Drugs. 2003; 63(4): 353-365.
 54. Tshitshi, L. Molecular Characterization of Carbapenem Resistant Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing Enterobacteriaceae. Diss. North-West University (South Africa), 2019
 55. Tzouvelekis LS. et al. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. International journal of antimicrobial agents. 2000; 14(2):137-142.
 56. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. 2005 Jul;56(1):52-9. doi: 10.1093/jac/dki166. Epub 2005 May 25. PMID: 15917288.
 57. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Sep;46(9):3045-9. doi: 10.1128/AAC.46.9.3045-3049.2002. PMID: 12183268; PMCID: PMC127423.
 58. Bush, Karen, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010; 54(3): 969-976.
 59. Mandal DK, Sah SK, Mishra SK, Sharma S, Kattel HP, Pandit S, Yadav PK, Laghu U, Lama R, Sah NP, Sherchand JB, Parajuli K, Bastola A, Pun SB, Rijal BP, Pokharel BM. Carriage of Extended-Spectrum- β -Lactamase- and AmpC- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-PE) in Healthy Community and Outpatient Department (OPD) Patients in Nepal. Can J Infect Dis Med Microbiol.

- 2020 Feb 11;2020:5154217. doi: 10.1155/2020/5154217. PMID: 32104519; PMCID: PMC7036101.
60. Iovleva A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Clin Lab Med. 2017; 37: 303–315.
61. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. Lancet Infect Dis. 2013 Sep;13(9):785-96. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7. PMID: 23969216; PMCID: PMC4673667.
62. Potron A, Poirel L, Rondinaud E et al. Intercontinental spread of OXA-48 β -lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. Euro Surveill 2013;18 :205-49.
63. Cizmeci Z et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48-endemic area. Journal of Chemotherapy. 2017; 29(6) : 344-350.
64. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007 Jul;20(3):440-58, doi: 10.1128/CMR.00001-07. PMID: 17630334; PMCID: PMC1932750.
65. Yamane, Kunikazu, et al. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. Emerging infectious diseases. 2005; 11(6): 951.
66. Edgar R, Bibi E. MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. J Bacteriol. 1997 Apr;179(7):2274-80. doi: 10.1128/jb.179.7.2274-2280.1997. PMID: 9079913; PMCID: PMC178964.
67. Hayashi SF, Norcia LJ, Seibel SB, Silvia AM. Structure-activity relationships of hygromycin A and its analogs: protein synthesis inhibition activity in a cell free system. J Antibiot (Tokyo). 1997 Jun;50(6):514-21. doi: 10.7164/antibiotics.50.514. PMID: 9268009.
68. Lynch C, Courvalin P, Nikaido H. Active efflux of antimicrobial agents in wild-type strains of enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Apr;41(4):869-71. doi: 10.1128/AAC.41.4.869. PMID: 9087510; PMCID: PMC163815.

69. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 5853-5859
70. Bryan LE, Kwan S. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983; 23: 835-845
71. Xiong YQ, Caillon J, Drugeon H, Potel G, Baron D. Influence of pH on adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and their postantibiotic effects. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Jan;40(1):35-9. doi: 10.1128/AAC.40.1.35. PMID: 8787875; PMCID: PMC163052.
72. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):727-37. doi: 10.1128/AAC.43.4.727. PMID: 10103173; PMCID: PMC89199.
73. Webber M, Piddock LJ. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet Res.* 2001 May-Aug;32(3-4):275-84. doi: 10.1051/vetres:2001124. Erratum in: *Vet Res* 2001 Nov-Dec;32(6):623. PMID: 11432418.
74. Petersen PJ, Jacobus NV, Weiss WJ, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of a novel glycycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; vol. 43: 738-44
75. Sum PE, Petersen P. Synthesis and structure–activity relationship of novel glycycline derivatives leading to the discovery of GAR-936. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999; 9:1459-62
76. Bauer G, Berens C, Projan SJ, et al. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53:592-9
77. Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, et al. Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 2156-66
78. Jenner L, Starosta AL, Terry DS, et al. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:3812-6
79. Noskin GA. Tigecycline: a new glycycline for treatment of serious infections. *Clin Infect Dis.* 2005;41(5):303-14

80. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 2010;10: 597-602
81. Moet GJ, Jones RN, Biedenbach D, et al. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004), *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007;57:7-13
82. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, et al. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with extended-spectrum β -lactamases in community- and hospital-associated intra-abdominal infections in Europe: results of the 2008 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), *Antimicrob Agents Chemother*, 2010;54:3043-6
83. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Emerging Infect Dis*. 2011; 17 :1791-8
84. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic, *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9:466-75
85. Decousser JW, Woerther PL, Soussy CJ, Fines-Guyon M, Dowzicky MJ. The tigecycline evaluation and surveillance trial; assessment of the activity of tigecycline and other selected antibiotics against gram-positive and gram-negative pathogens from France collected between 2004 and 2016. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;30:(7):68.
86. Keeney D, Ruzin A, and Bradford PA. RamA, a transcriptional regulator, and AcrAB, an RND-type efflux pump, are associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Enterobacter cloacae*. *Microb. Drug Resist*. 2007;13:1–6.
87. Ruzin A, Visalli MA, Keeney D, and Bradford PA. 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 49:1017–1022.
88. Lee JY, Chung ES, Na IY et al. . Development of colistin resistance in pmrA-, phoP-, parR- and cprR-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69: 2966–71

89. Liu YY, Wang Y, Walsh TR et al. . Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.*2016; 16: 161–8.
90. Qureshi ZA, Paterson DL, Peleg AY, et al. Clinical characteristics of bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the era of CTX-M-type and KPC-type beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18: 887-93
91. World Economic Forum. Global Risks An Initiative of the Risk Response Network. In: Howell L, editor. Eight Edition. 2013. p. 28-35
92. Kresken M, Pfeifer Y, Hafner D, et al. Occurrence of multidrug resistance to oral antibiotics among Escherichia coli urine isolates from outpatient departments in Germany: extended-spectrum betalactamases and the role of fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44: 295-300
93. Gharthey JP, Smith BC, Chen Z, et al. Lactobacillus crispatus dominant vaginal microbiome is associated with inhibitory activity of female genital tract secretions against Escherichia coli. *PLoS One* 2014;9: e96659
94. Baylan O. Fosfomycin: Past, present and future [Fosfomisin: Dünü, bugünü ve geleceği]. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(2):311-21.
95. Greenwood D. Fosfomycin and fosmidomycin, In: Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ (eds), *Antibiotic and Chemotherapy*. 8th ed. pp: 294-6. Churchill Livingstone, Toronto. 2003
96. Michalopoulos, Argyris S. Ioannis G. Livaditis, and Vassilios Gougoutas. The revival of fosfomycin. *International journal of infectious diseases.* 2011; 15(11): e732-e739.
97. Grayson, M. Lindsay, et al. Kucers' The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs. p.p.968. CRC Press, 2010.
98. Close G. Segre, E. Bianchi, A. Cataldi, G. Zannini Pharmacokinetic profile of fosfomycin trometamol (Monuril) *Eur Urol.*1987; 13(1): 56-63

99. M.E. Falagas, S. Maraki, D.E. Karageorgopoulos, A.C. Kastoris, A. Kapaskelis, G. Samonis Antimicrobial susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomycin *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:497-499
100. Grayson, M. Lindsay, et al. Kucers' The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs. p.p.968. CRC Press, 2010.
101. Nwabor OF, Terbtthakun P, Voravuthikunchai SP, Chusri S. Evaluation of the Synergistic Antibacterial Effects of Fosfomycin in Combination with Selected Antibiotics against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Feb 25;14(3):185. doi: 10.3390/ph14030185. PMID: 33668905; PMCID: PMC7996625.
102. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Apr;29(2):321-47. doi: 10.1128/CMR.00068-15. PMID: 26960938; PMCID: PMC4786888.
103. Tsuruoka T, Miyata A, Yamada Y. Two kinds of mutants defective in multiple carbohydrate utilization isolated from in vitro fosfomycin-resistant strains of *Escherichia coli* K-12. *J Antibiot (Tokyo)*. 1978 Mar;31(3):192-201. doi: 10.7164/antibiotics.31.192. PMID: 206529.
104. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, Muratani T, Matsumoto T, Nakahama C, Tomono K. Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr;35(4):333-7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011. Epub 2010 Jan 13. PMID: 20071153.
105. Horii T, Kimura T, Sato K, Shibayama K, Ohta M. Emergence of fosfomycin-resistant isolates of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O26. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:789–793.
106. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2850–2858.
107. Venkateswaran PS, Wu HC. Isolation and characterization of a phosphonomycin-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 1972;110:935–944.

108. Fillgrove KL, Pakhomova S, Schaab MR, Newcomer ME, Armstrong RN. Structure and mechanism of the genomically encoded fosfomycin resistance protein, FosX, from *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry*. 2007; 46:8110–8120.
109. Garcia P, Arca P, Evaristo Suarez J. Product of fosC, a gene from *Pseudomonas syringae*, mediates fosfomycin resistance by using ATP as cosubstrate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1569–1573.
110. Duez JM, Mousson C, Siebor E, Péchinot A, Freysz M, Sixt N, Bador J, Neuwirth C. Fosfomycin and its application in the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae infections. *Clin Med Rev Ther*. 2011; 3:123–142.
111. M.E. Falagas, K.P. Giannopoulou, G.N. Kokolakis, P.I. Rafailidis Fosfomycin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections *Clin Infect Dis*.2008;46: 1069-1077
112. Gür D. Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2016; 46.
113. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. *Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology*. p.1106-1115. 7th ed. Philadelphia; 2017.
114. Koksall İ. Sinerji Testleri : Laboratuvarıdan kliniğe yaklaşımlar. XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 11 Kasım 2010 Gırne.
115. Bal Ç. Antibiyotik Kombinasyonlarının İn vitro Etkinliğinin Saptanması. *Flora Dergs*. 1999;4(4):219-229.
116. Aktaş G. Antibiyotik Kombinasyonları ve Sinerjistik Etkileşimleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2014 ;44(2):47-55
117. Ozseven AG, Sesli Çetin E, Ozseven L. Dama Tahtası Sinerji Testi Sonuçlarının Farklı Yöntemlerle Yorumlanması Sonuçlarımızı Etkiliyor mu? *Mikrobiyol Bul*. 2012 Jul;46(3):410-20.
118. Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS). MİK Saptama Yöntemleri. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara; 2014.
119. Zarakolu P Ayaz ÇM, Metan G. Karbapeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Çeşitli Antibiyotik

Kombinasyonları ve İn Vitro Sinerji Test Sonuçları (2002-2016). Mikrobiyol Bul 2018; 52(2): 190-197

120. Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T, Balada-Llasat JM, Pancholi P. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Nov;54(11):4678-83. doi: 10.1128/AAC.00497-10. Epub 2010 Aug 16. PMID: 20713678; PMCID: PMC2976112.

121. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi-Solunum Sistemi Örnekleri, Ankara; 2015.

122. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi-Deri, Deri Ekleri, Yumuşak Doku Örnekleri-Göz Örnekleri, Ankara; 2015.

123. MALDI Biotyper CA System- Clinical Application for Identification of Microorganisms. Billerica, MA; 2014. (Revision A).

124. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Color Atlas & Textbook Of Diagnostic Microbiology. 7th ed. Philadelphia; 2017; p.235,163.

125. Veloo ACM, Erhard M, Welker M, Welling GW, Degener JE. Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. Syst Appl Microbiol. 2011;34(1):58-62.

126. Cueto M, López L, Hernández JR, Morillo C, Pascual A. In vitro activity of fosfomycin against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: comparison of susceptibility testing procedures. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:368-70.

127. Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. Eur J Clin Pharmacol. 2010; 66:359 –368. <http://dx.doi.org/10.1007/s00228-010-0794-5>.

128. Perdigão-Neto LV, Oliveira MS, Rizek CF, Carrilho CM, Costa SF, Le-vin AS. Susceptibility of multiresistant gram-negative bacteria to fosfomycin and

performance of different susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1763-7.

129. Oteo J, Orden B, Bautista V, Cuevas O, Arroyo M, Martinez-Ruiz R et al. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomycin. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(4):712–717

130. Peretz A, Naamneh B, Tkhawkho L, Nitzan O. High rates of fosfomycin resistance in Gram-negative urinary isolates from Israel. *Microb Drug Resist* In press. 2019;0(0):1-5

131. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100–S25 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2015

132. Ballester-Téllez, Mónica, et al. "Role of inoculum and mutant frequency on fosfomycin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in Enterobacteriaceae." *Clinical Microbiology and Infection* 2017;23(5): 325-331.

133. Karlowsky JA, Lagacé-Wiens PRS, Laing NM, Baxter MR, Adam HJ, Zhanel GG. Susceptibility of Clinical Isolates of *Escherichia coli* to Fosfomycin as Measured by Four In Vitro Testing Methods. *J Clin Microbiol.* 2020 Sep 22;58(10):e01306-20. doi: 10.1128/JCM.01306-20. PMID: 32817224; PMCID: PMC7512169.

134. van den Bijllaardt W, Schijffelen MJ, Bosboom RW, Stuart JC, Diederens B, Kamping G, Le T-H, Kampinga G, Le T-N, Overdevest I, Stals F, Voorn P, Waar K, Mouton JW, Muller AE. 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. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73:2380–2387.

135. Netikul T, Leelaporn A, Leelarasamee A, Kiratisin P. In vitro activities of fosfomycin and carbapenem combinations against carbapenem nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:609–16

136. Samonis G et al. "Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*,

Escherichia coli, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2012;31(5) :695-701.

137. El-Wafa WMA, Ibrahim YM. In Vitro Activity of Fosfomycin in Double and Triple Combinations with Imipenem, Ciprofloxacin and Tobramycin Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*. 2020 May;77(5):755-761. doi: 10.1007/s00284-019-01871-w. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31919670. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01871-w>

138. Sugathan S, Mandal J. An invitro experimental study of the effect of fosfomycin in combination with amikacin, ciprofloxacin or meropenem on biofilm formation by multidrug-resistant urinary isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 2019;68.(12): 1699-1706.

139. Hickman RA, Hughes D, Cars T, Malmberg C, Cars O. Cell-wall-inhibiting antibiotic combinations with activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):O267-73. doi: 10.1111/1469-0691.12374. Epub 2013 Oct 2. PMID: 24118201.

140. Sastry, Sangeeta, and Yohei Doi. "Fosfomycin: resurgence of an old companion." *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2016; 22.(5): 273-280.

141. Perdigão Neto, Lauro Vieira, et al. "Fosfomycin in severe infections due to genetically distinct pan-drug-resistant Gram-negative microorganisms: synergy with meropenem." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019; 74.(1): 177-181.

142. Flamm RK, Rhomberg PR, Lindley JM, Sweeney K, Ellis-Grosse EJ, Shortridge D. Evaluation of the Bactericidal Activity of Fosfomycin in Combination with Selected Antimicrobial Comparison Agents Tested against Gram-Negative Bacterial Strains by Using Time-Kill Curves. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Apr 25;63(5):e02549-18. doi: 10.1128/AAC.02549-18. PMID: 30858207; PMCID: PMC6496043.

143. Farooq, Lubna, et al. "Invitro Activity of Fosfomycin Alone and in Combination with Other Antibiotics against Multi Drug Resistant–*E. coli* for Treatment at a Tertiary Care Hospital of Karachi." *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2022; 26.(01): 2676-2688.

144. Díez-Aguilar, María, and Rafael Cantón. "New microbiological aspects of fosfomycin." *Revista Española de Quimioterapia*. 2019; 32(1)

145. Lucas AE, Ito R, Mustapha MM, McElheny CL, Mettus RT, Bowler SL, et al.. Frequency and mechanisms of spontaneous fosfomycin nonsusceptibility observed upon disk diffusion testing of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2018;56:1–7. doi: 10.1128/JCM.01368-17.
146. Flamm RK, Rhomberg PR, Watters AA, Sweeney K, Ellis-Grosse EJ, Shortridge D. Activity of fosfomycin when tested against US contemporary bacterial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019 Feb;93(2):143-146. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.010. Epub 2018 Aug 28. PMID: 30236530.
147. Bouxom H, Fournier D, Bouiller K, Hocquet D, Bertrand X. Which non-carbapenem antibiotics are active against extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteralescae? *Int J Antimicrob Agents* 2018;52:100–3. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.014.
148. Bi W, Li B, Song J, Hong Y, Zhang X, Liu H, et al.. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of fosfomycin resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains from urinary tract infections in Wenzhou, China. *Int J Antimicrob Agents* 2017;50:29–34. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.02.010.
149. Mezzatesta ML, La Rosa G, Maugeri G, Zingali T, Caio C, Novelli A, et al.. In vitro activity of fosfomycin trometamol and other oral anti-biotics against multidrug-resistant uropathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2017;49:763–6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.01.020
150. Fransen F, Hermans K, Melchers MJB, Lagarde CCM, Meletiadis J, Mouton JW. Pharmacodynamics of fosfomycin against ESBL- and/ or carbapenemase-producing Enterobacteralescae. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:3374–81. doi: 10.1093/jac/dkx328.
151. Banerjee S, Sengupta M, Sarker TK. Fosfomycin susceptibility among multidrug-resistant, extended-spectrum beta-lactamase-producing, carbapenem-resistant uropathogens. *Indian J Urol*. 2017;33(2):149–154. doi: 10.4103/iju.IJU_285_16
152. Gopichand P, Agarwal G, Natarajan M, Mandal J, Deepanjali S, Parameswaran S, Dorairajan LN. In vitro effect of fosfomycin on multi-drug resistant gram-negative bacteria causing urinary tract infections. *Infect Drug*

Resist. 2019 Jul 9;12:2005-2013. doi: 10.2147/IDR.S207569. PMID: 31372008; PMCID: PMC6628599.

153. Portillo-Calderón, Inés, et al. "Activity of fosfomycin and amikacin against fosfomycin-heteroresistant *Escherichia coli* strains in a hollow-fiber infection model." *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2021; 65.(5): 02213-20.

154. Suich, Joseph, et al. "Evaluation of in vitro activity of fosfomycin, and synergy in combination, in Gram-negative bloodstream infection isolates in a UK teaching hospital." *Journal of Medical Microbiology*.2022;71(4): 001524.

155. Corvec, Stéphane, et al. "Activities of fosfomycin, tigecycline, colistin, and gentamicin against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a foreign-body infection model." *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013; 57(3): 1421-1427.

156. Wang L, Di Luca M, Tkhilaishvili T, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Front Microbiol*. 2019 Nov 6;10: 2522. doi: 10.3389/fmicb.2019.02522. PMID: 31781056; PMCID: PMC6853019.

8. EKLER

TURNİTİN RAPORU

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 18-Eki-2022 22:27 +03

NUMARA: 1928957004

Kelime Sayısı: 18923

Gönderildi: 1

Kaynağa göre Benzerlik	
Benzerlik Endeksi	
%17	
Internet Sources:	%16
Yayınlar:	%7
Öğrenci Ödevleri:	%6

AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE ESCHERİCHİA COLİ KLİNİK
İZOLATLARINDA İNTRAVENÖZ FOSFOMİSİN DİRENCİNİN
SAPTANMASI VE MEROPENEM, GENTAMİSİN, SEFTRİAKSON
ANTİBİYOTİKLERİ İLE SİNERJİST ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
Handan Kangül tarafından

7% match (06-Ağu-2022 tarihli internet)

<http://acikerisim.dicle.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11468/10093/Klebsiella%20pneumoniae%20klinik%20izolatlar%20c4%b1nda%20agar%20dil%20c3%bcsy%20isAllowed=y&sequence=1>

1% match (23-Nis-2021 tarihli internet)

<http://acikerisim.dicle.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11468/4516/539668.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

1% match (Lan Yu, Jisheng Zhang, Yanjun Fu, Yongxin Zhao, Yong Wang, Jing Zhao, Yuhang Guo, Chunjiang Li, Xiaoli Zhang. "Synergetic Effects of Combined Treatment of Colistin With Meropenem or Amikacin on Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae in vitro", Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019)

[Lan Yu, Jisheng Zhang, Yanjun Fu, Yongxin Zhao, Yong Wang, Jing Zhao, Yuhang Guo, Chunjiang Li, Xiaoli Zhang. "Synergetic Effects of Combined Treatment of Colistin With Meropenem or Amikacin on Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae in vitro", Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019](http://acikerisim.dicle.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11468/4516/539668.pdf?isAllowed=y&sequence=1)

1% match (30-Oca-2022 tarihli internet)

<https://9lib.net/document/ozl79oy4-direncili-acinetobacter-baumannii-suslarina-cesitli-antibiyotik-kombinasyonlarinin-sinerjistik.html>

1% match (27-Ara-2007 tarihli internet)

<http://bigfoot.morphos-team.net/misc/quakemaps/sm.bsp>

1% match ()

<http://keck2.umd.edu/data/anim/bakerzoom/bakerzoom128.fli>